

Université de Montréal

**Impact d'une mutation ponctuelle stratégique de la protéine HOXB4 sur
son pouvoir de régulation, de prolifération et de différenciation des CSH
et des progéniteurs murins**

Par

Stéphanie Beauchemin

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

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

Maitrise ès sciences (M.Sc.)

Décembre, 2008

©Stéphanie Beauchemin, 2008

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Impact d'une mutation ponctuelle stratégique de la protéine HOXB4 sur son pouvoir de régulation, de prolifération et de différenciation des CSH et des progéniteurs murins

Présenté par :

Stéphanie Beauchemin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Luigina Mollica	Président du jury
Dr. Denis Claude Roy	Directeur de recherche
Dr Denis Cournoyer	Membre du jury

SOMMAIRE

L'expansion des cellules souches hématopoïétiques *ex vivo* représente une option des plus intéressante afin d'améliorer les greffes de moelle osseuse. Le facteur de transcription HOXB4 semble être le candidat ayant le plus de potentiel jusqu'à présent. Cependant, la très courte demi-vie de la protéine représente un obstacle majeur dans l'élaboration de protocoles cliniques. Par contre, la substitution d'un acide aminé (3 mutations individuelles) dans la partie N-terminale de la protéine augmente de près de 3 fois la stabilité intracellulaire de HOXB4. Nous avons comparé l'activité biologique de ces mutants à celle de HOXB4 natif (« wt ») dans des essais *in vitro* et *in vivo*. Nous avons démontré que la surexpression de HOXB4 muté par infection des cellules souches hématopoïétiques n'affectait pas leur pouvoir de reconstitution hématopoïétique à long terme dans des souris transplantées. Par ailleurs, nous avons noté que dans les essais de reconstitution hématopoïétique en compétition et en non compétition, les cellules surexprimant les protéines mutées ont une expansion supérieure *in vitro* et reconstituent le sang et la rate avec une répartition de cellules lymphoïdes et myéloïdes plus près de souris non-transplantées comparativement aux cellules exprimant HOXB4 « wt ». De plus, les cellules surexprimant la protéine HOXB4 mutée apparaissent beaucoup plus rapidement et en plus grande proportion dans le sang comparativement aux cellules surexprimant la forme native. Une des protéines HOXB4 mutées (1426) ne permet pas l'expansion des progéniteurs myéloïdes immatures (CMP) contrairement à la protéine « wt ». Et finalement, par les études de modulation intracellulaire protéique, nous avons démontré que les comportements des protéines HOXB4 « wt » et mutées envers les cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs n'étaient pas complètement dus à un effet de concentration protéique.

Mots-clés: cellules souches hématopoïétiques, HOXB4, expansion, différenciation, progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes, mutations, transplantation

ABSTRACT

Ex vivo hematopoietic stem cell expansion represents a most appealing option to improve bone marrow transplantation. Utilization of the unique hematopoietic stem cell (HSC) expansion abilities of the transcription factor HOXB4 for clinical applications is hampered by its short intracellular half-life. To overcome this difficulty, 3 different single amino-acid substitution mutants of HOXB4 with 3-4 fold increased half-life were generated and their biologic activity compared to that of wild type (wt) HOXB4 using *in vitro* and *in vivo* assays. We have shown that overexpression of mutated HOXB4 in HSC using an infection strategy did not impair their long term hematopoietic reconstitution potential in transplanted mice. We have found that cells overexpressing mutant HOXB4 had greater expansion *in vitro* in competitive and non-competitive designs than wt HOXB4. Moreover, *in vivo* peripheral blood and spleen repopulation had lymphoid and myeloid contributions closer to untransplanted animals with mutant than wt HOXB4. In addition, cells overexpressing mutant HOXB4 protein were detected much more rapidly and in greater proportion in peripheral blood than cells overexpressing the wt form. One of the mutated HOXB4 proteins (1426) did not promote the expansion of common myeloid progenitors in comparison to wt HOXB4. Finally, using intracellular protein modulation studies, we have shown that the effects of mutated and wt HOXB4 proteins in hematopoietic stem and progenitor cells were not completely due to a HOXB4 concentration effect.

Keyword: hematopoietic stem cell, HOXB4, expansion, differentiation, myeloid progenitor, mutations, transplantation

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
1. L'HÉMATOPOÏÈSE	2
1.1. Les composantes du système hématopoïétique	2
1.1.1. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	2
1.1.1.1. Isolation des CSH.....	3
1.1.2. Les progéniteurs hématopoïétiques.....	5
1.1.2.1. Progéniteurs myéloïdes.....	5
1.1.2.1.1. Marqueurs de surface des CMP.....	6
1.1.2.2. Progéniteurs lymphoïdes.....	6
1.1.2.3. Progéniteurs myélo-lymphoïdes.....	7
1.1.2.3.1. Le facteur de transcription PU.1.....	7
1.2. Essais de détection des CSH et des progéniteurs	8
1.2.1. Essais <i>in vitro</i>	8
1.2.1.1. Essai à court terme.....	9
1.2.1.2. Essai à long terme.....	9
1.2.2. Essais <i>in vivo</i>	10
1.3. La régulation du système hématopoïétique	12
1.3.1. Les cytokines.....	12
1.3.2. Les composantes de la matrice extracellulaire.....	13
1.3.3. Conséquence des stimulations externes.....	14
1.4. Devenir des CSH	14
1.4.1. Préservation des CSH et facteur c-myc.....	15
2. LES GREFFES DE CSH (GCSH)	16
2.1. Source des CSH utilisées pour les traitements	17
2.1.1. La moelle osseuse.....	17
2.1.2. Le sang mobilisé.....	17
2.1.3. Le sang de cordon ombilical.....	18
2.2. Problématique liée à la réussite d'une GCSH	18

3. EXPANSION DES CSH <i>EX VIVO</i>	19
3.1. Stratégies d'expansion utilisées	20
3.1.1. Cocktail de cytokines.....	20
3.1.2. Cellules stromales.....	20
3.1.3. Transduction par des rétrovirus recombinants codant pour..... des facteurs de transcription.....	21
3.1.4. Facteurs de transcription et autres molécules solubles.....	21
4. GÈNES HOX	22
4.1. Familles HOX chez les vertébrés.....	24
5. FACTEUR DE TRANSCRIPTION HOXB4	25
5.1. Obstacle à l'utilisation thérapeutique de HOXB4.....	27
5.2. Dégradation des protéines intracellulaires (Ubiquitination).....	27
5.3. Les protéines HOXB4 mutées.....	28
6. DESCRIPTION ET PERTINENCE DU PROJET	29
6.1. Hypothèse de travail.....	29
6.2. Objectifs principaux du projet.....	30
PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES	31
7. MÉTHODES	32
7.1. Justification du choix des souris/cellules.....	32
7.2. Génération des CSH exprimant les protéines HOXB4 mutées.....	32

7.2.1. Vecteurs et mutations ponctuelles du gène <i>hoxb4</i>	32
7.2.2. Cellules productrices de virus transportant le gène <i>hoxb4</i>	33
7.2.3. Transduction rétrovirale des cellules de la moelle osseuse...	34
7.3. Transplantation et culture liquide	35
7.4. Suivi de la transplantation.....	36
7.4.1. Le sang.....	36
7.4.2. Les organes.....	36
7.4.3. Analyses statistiques.....	37
7.5. Visualisation de la protéine HOXB4 intracellulaire.....	37
7.5.1. «Western Blot».....	37
7.5.2. Immunofluorescence sur lame.....	39
7.6. Modulation de la quantité de protéine	39
7.7. Études des CMP.....	40
RÉSULTATS.....	41
8. ESSAIS EN COMPÉTITION.....	42
8.1. <i>In vitro</i>	42
8.2. <i>In vivo</i>	43
9. ESSAIS DE REPOPULATION EN NON COMPÉTITION.....	43
10. EFFETS SUR LES PROGÉNITEURS (CMP)	45
11. CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DES PROTÉINES HOXB4....	46
12. MODULATION PROTÉIQUE INTRACELLULAIRE.....	47
FIGURES.....	49
DISCUSSION.....	71

13. EFFET DE LA PRESSION DE COMPÉTITION SUR LES CSH.....	72
14. COMPORTEMENT DES CSH EN NON COMPÉTITION.....	74
15. EFFET SUR LES CMP.....	76
16. EFFET DE LA MODULATION PROTÉIQUE INTRACELLULAIRE.....	78
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	82
BIBLIOGRAPHIE.....	xiii
ANNEXE.....	xxx
ANNEXE 1.....	xxxi

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.....	50
FIGURE 2.....	52
FIGURE 3.....	54
FIGURE 4.....	56
FIGURE 5.....	59
FIGURE 6.....	62
FIGURE 7.....	65
FIGURE 8.....	68

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- AGM: Aorte-Gonades-Mésonéphros
- BFU-E: «Burst Forming Unit-Erythroid»
- CAFC: cellule formatrice de «cobblestone» («Cobblestone-Area Forming Cell»)
- CFC: cellule formatrice de colonie («Colony Forming Cell»)
- CFU-E: «Colony Forming Unit-Erythroid»
- CFU-G: «Colony Forming Unit-Granulocyte»
- CFU-GEMM: «Colony Forming Unit-Granulocyte-Erythrocyte-Macrophage-Megakaryocyte»
- CFU-GM: «Colony Forming Unit-Granulocyte-Macrophage»
- CFU-M: «Colony Forming Unit-Macrophage»
- CMP: progéniteur myéloïde commun («Common Myeloid Progenitor»)
- CRU: «Competitive Repopulating Unit»
- DMSO: diméthylsulfoxyde
- FACS: cytomètre en flux («Fluorescence-activated cell sorting»)
- FBS: sérum bovin fœtal
- Fc γ RII/RIII : récepteur II et III du fragment Fc des immunoglobulines de type gamma
- G-CSFR : récepteur du facteur de stimulation des colonies granulocytaires («Granulocytes-Colony Stimulating Factor Receptor»)
- GFP: protéine fluorescente verte («Green Fluorescent Protein»)
- GM-CSFR : récepteur du facteur de stimulation des colonies granulocytaires et monocytaires («Granulocytes Monocytes-Colony Stimulating Factor Receptor»)
- GMP: progéniteur myéloïde granulocyttaire («Granulocytes Myeloid Progenitor»)
- GVHD: maladie du greffon contre l'hôte («Graft Versus Host Disease»)
- HBSS: solution saline balancée Hanks
- HRP: peroxidase «horseradish»
- KLS: population cellulaire c-kit⁺ lin⁻ sca-1⁺
- LMA: leucémie myéloïde aigue
- LMC: leucémie myéloïde chronique
- LT-HSC: cellule souche hématopoïétique – long terme («Long Term-Hematopoietic Stem Cell»)
- LTR : «Long Terminal Repeat»

LTRC: cellule capable de repopulation à long terme («Long Term Repopulating Cell»)

MEP: progéniteur des mégacaryocytes et érythrocytes («Megakaryotic-Erythrocyte Progenitor»)

NCS: sérum de veau nouveau-né

NOD/SCID: «NonObese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient»

PBS: solution saline tamponnée avec du phosphate («Phosphate Buffered Saline»)

SCF: facteur des cellules souches («Stem Cell Factor»)

SCO: sang cordon ombilical

SLAM: «Signaling Lymphocyte Activation Molecule»

SRC: cellule repopulatrice de SCID («SCID Repopulation Cell»)

ST-HSC: cellule souche hématopoïétique – court terme («Short Term Hematopoietic Stem Cell»)

VSV: virus de la stomatite vésiculaire («Vesicular Stomatitis Virus»)

wt : natif («wild type»)

YFP : protéine fluorescente jaune («Yellow Fluorescent Protein»)

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier le Dr Denis Claude Roy de m'avoir permis de poursuivre mes études dans son laboratoire de recherche, de m'avoir confié un projet aussi stimulant qu'intéressant ainsi que de m'avoir fait suffisamment confiance pour me donner une grande liberté d'action, de développement et d'application de nouvelles d'idées, me permettant ainsi de personnaliser mon projet de recherche.

Je voudrais également remercier Gorazd Krosi qui a certainement joué un rôle dans mon apprentissage, dans le développement de mon sens critique et finalement, dans l'accomplissement de ce projet.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire qui ont contribué, à travers les années, à l'agréable ambiance de travail, d'entraide et de soutien retrouvé dans le laboratoire. Et plus particulièrement à Pascale Dubé, qui est devenue une amie précieuse et exceptionnelle à qui je ne dirai jamais assez merci de m'avoir autant soutenue et aidée ainsi que de sa présence et de sa profonde et sincère amitié à tout moment.

Finalement, je tiens à remercier ma mère et ma soeur qui ont toujours cru en moi, en mes capacités et qui m'ont supportée et encouragée durant toute la durée de mes études.

Et en dernier lieu, j'ai aussi une pensée pour toi Mathieu qui a fait preuve d'une extraordinaire compréhension et qui m'a grandement éclairé lorsque j'en avais besoin.

INTRODUCTION

1. L'HÉMATOPOÏÈSE

L'hématopoïèse est un processus complexe, hautement dynamique et finement régulé, impliquant de nombreux gènes, protéines et voies de signalisation, et qui se produit normalement dans la cavité osseuse. L'intégrité du système sanguin, c'est-à-dire la régulation de la production journalière de plusieurs milliards de cellules sanguines, rouges, blanches ou plaquettes pour remplacer les nombreuses cellules qui meurent normalement chaque jour, est maintenu grâce à une grande variété de mécanismes homéostatiques, provenant généralement de la niche hématopoïétique. Ces mécanismes permettent aussi de répondre rapidement à une situation de stress par une production intense de cellules nécessaires et de revenir à des niveaux basaux lorsque le traumatisme est résolu.

1.1. Les composantes du système hématopoïétique

Le système hématopoïétique représente une continuité de cellules subissant des modifications dans leurs propriétés ainsi que leur phénotype au fur et à mesure de leur progression du niveau de cellules immatures au statut de cellules différenciées.

1.1.1. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Les CSH sont une infime population (<0.1%) de cellules retrouvées principalement dans la moelle osseuse tout près de la surface osseuse. Elles sont caractérisées à la fois par un pouvoir d'auto-renouvellement presque infini et par une pluripotentialité, attribut lui permettant de générer et maintenir toutes les cellules différenciées terminales retrouvées dans le sang, la moelle osseuse, la rate et le thymus et ainsi, de soutenir l'hématopoïèse d'un individu à long terme. Ces cellules sont communément nommées cellules souches hématopoïétiques à long terme ou LT-HSC. Un humain normal a, approximativement, 50 millions de CSH dont certaines peuvent générer jusqu'à 10^{13} cellules matures au cours de leur vie.

En ce qui concerne les souris, il a été démontré qu'une seule CSH pouvait entièrement régénérer et maintenir le système hématopoïétique, suite à une transplantation, d'une souris receveuse irradiée ou immunocompromise⁽¹⁻³⁾.

D'où revêt la très grande importance de l'autoregénération des CSH; celles-ci sont constamment soumises à des stress physiologiques qui stimulent fortement leur recrutement vers une voie de maturation définitive menant ultimement à leur perte, comme par exemple dans des conditions d'hypoxie où la production supplémentaire de globules rouges est nécessaire ou encore durant une infection, où les quantités de granulocytes et de macrophages sont amplifiées.

Les CSH font partie de la tête de la hiérarchie hématopoïétique d'où découle toutes les autres cellules hématopoïétiques ce qui les rend cruciales à l'hématopoïèse. Or, leur nombre de divisions cellulaires est vraisemblablement défini et limité. En prévention de l'épuisement des CSH dû à une multiplication trop fréquente, elles sont généralement en état de quiescence où seulement, aléatoirement, 8 à 10% des CSH entrent dans le cycle cellulaire pour subvenir aux besoins cellulaires chaque jour⁽⁴⁾ et entrent ainsi dans le cycle cellulaire environ tous les 4 à 8 semaines⁽⁵⁾. De plus, d'autres mécanismes sont aussi impliqués dans la régulation des CSH dont l'un des plus important est le prolongement des télomères par la télomérase qui est une enzyme ajoutant des séquences spécifiques et répétées, les télomères, à l'extrémité des chromosomes afin d'éviter la perte définitive de ces cellules.

De nombreux essais *in vivo* ont de plus démontré que la population de CSH, isolée de façon standard (KLS, voir définition p.4), contenait non seulement des LT-HSC mais aussi des cellules souches hématopoïétiques à court terme ou ST-HSC, qui sont un intermédiaire entre les CSH et les progéniteurs multipotents, qui eux ont définitivement perdu la capacité de s'auto-renouveler. Les ST-HSC possèdent encore une faible capacité à s'auto-renouveler mais seulement pour quelques semaines. La production des cellules matures provient ainsi majoritairement des progéniteurs plus matures qui se différencient.

1.1.1.1 Isolation des CSH

Les difficultés en rapport avec l'identification et l'isolement des CSH ne sont pas seulement liées à leur rareté mais aussi à leur absence de localisation précise dans la moelle osseuse⁽⁶⁾. Certaines propriétés des CSH peuvent varier indépendamment, ce qui augmente leur niveau d'hétérogénéité, empêchant ainsi de définir distinctement les CSH à l'aide d'un seul critère ou

encore un seul gène. De ce fait, il existe de nombreuses façons d'isoler les CSH mais jusqu'à présent, aucune ne permet d'obtenir une population totalement pure. Les techniques d'enrichissement des CSH sont basées principalement sur des caractéristiques phénotypiques (présence d'antigènes de surface) ainsi que sur des caractéristiques métaboliques (exclusion du colorant vital Hoechst 33342, par exemple). Ces populations cellulaires isolées doivent ensuite être soumises à des tests fonctionnels *in vivo* afin de confirmer leur identité via leurs caractères biologiques.

Ainsi, les CSH murines ont d'abord été identifiées à l'aide de leurs marqueurs de surface seulement et par cytométrie en flux, comme faisant partie de la population n'exprimant pas de molécules de surface spécifiques aux différentes lignées hématopoïétiques (lin^-) et exprimant fortement le *stem cell antigen 1* ($Sca1^+$) et de façon réduite le marqueur Thy1.1 ($Thy1.1^{low}$)⁽⁷⁾. Ce dernier a été délaissé avec les années puisqu'il n'était exprimé que chez certaines espèces murines. Par ailleurs, il existe de nombreuses combinaisons menant à l'isolement de la population de CSH murines mais l'enrichissement standard via les marqueurs de surface requiert non seulement l'absence de marqueurs de lignée (lin^-), la présence du «stem cell antigen» 1 ($Sca1^+$) mais en plus, la présence de c-kit ($c-kit^+$), conférant le nom de KLS à la population possédant correctement tous ces marqueurs. Plusieurs autres équipes utilisent aussi la propriété d'expulsion du colorant rhodamine 123 (ρ^-) par les CSH^(8;9). Finalement, dans les dernières années, Goodell et al. ont démontré la possibilité d'isoler les CSH en exploitant cette capacité métabolique d'expulsion d'un colorant mais cette fois-ci avec le Hoechst 33342, colorant exclu seulement par les cellules quiescentes dû à la glycoprotéine BCRP1 qu'elles produisent. Cette population a dès lors été nommée «side population»⁽¹⁰⁾ et dans le but de purifier davantage les cellules obtenues, cette propriété est souvent combinée à l'isolement des KLS. De plus, une sous-division de cette population caractérisée par l'absence de CD34 est considérée très primitive. L'absence de ce marqueur semble être important dans la caractérisation des CSH puisque d'une part, les cellules contenues dans cette subdivision de la «side population» démontrent un très grand pouvoir de «homing»⁽¹¹⁾ et d'autre part, parmi la population KLS, les cellules ne possédant pas le CD34 à leur surface présentent un plus grand potentiel de reconstitution à long terme contrairement à une majorité de cellules CD34+ qui procurent une repopulation courte et immédiate. C'est ainsi que les LT-HSC, ayant une capacité de prolifération à long terme, et les

ST-HSC, possédant un pouvoir d'auto-renouvellement plus limité, peuvent être respectivement départagées. Finalement, plusieurs études ont suggéré que de multiples marqueurs de la famille des SLAM, notamment la présence du CD150 et l'absence des marqueurs CD48 et CD244, permettaient un enrichissement des CSH nettement supérieur⁽¹²⁾. En effet, ces marqueurs combinés à ceux déjà utilisés (KLS) permettent d'isoler les CSH à une fréquence se rapprochant d'une cellule sur deux, résultat visualisé par la reconstitution de 48% des souris transplantées avec une seule de ces cellules isolées⁽¹³⁾.

Quant aux CSH humaines, classiquement retrouvées dans la population CD34⁺ et CD38⁻, leur sélection est souvent aussi basée sur l'absence de l'incorporation du colorant Hoechst, enrichissant leur fréquence à 1/2000-1/5000^(14;15).

1.1.2. Les progéniteurs hématopoïétiques

Les CSH génèrent les multiples cellules des lignées hématopoïétiques par l'entremise d'une série de progéniteurs intermédiaires, retrouvés aussi dans la région centrale de la moelle osseuse, qui perdent progressivement la capacité de s'auto-renouveler et sont généralement plus restreints quant au nombre et au type de lignée qu'ils peuvent générer. Par ailleurs, les progéniteurs sont des cellules d'une extrême importance suite à une transplantation de CSH car ces cellules contribuent grandement à la prise du greffon à court terme en générant rapidement les cellules nécessaires à l'organisme ainsi qu'à l'établissement des CSH greffées.

1.1.2.1. Les progéniteurs myéloïdes

Les progéniteurs les plus immatures de cette lignée sont connus sous le nom de progéniteurs myéloïdes communs ou CMP («Common Myeloid Progenitor»). Tout comme les CSH, ils sont retrouvés dans la moelle osseuse en petite quantité, soit 0.2% des cellules totales. Les CMP sont considérés comme les progéniteurs les plus immatures de la lignée myéloïde étant donné leur capacité à générer tous les types cellulaires de cette lignée mais ils ont une capacité d'auto-renouvellement très limitée, démontré par la disparition des cellules descendantes de CMP injectés seulement 4 semaines post-transplantation⁽¹⁶⁾. Les progéniteurs myéloïdes peuvent donner naissance aux

globules rouges, aux granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), aux monocytes/macrophages ainsi qu'aux mégacaryocytes (plaquettes). Par ailleurs, avant d'atteindre ce niveau terminal de cellules différenciées, il existe une panoplie de progéniteurs intermédiaires. Les premiers descendants directs des CMP sont les progéniteurs myéloïdes granulocytaires ou «Granulocyte Myeloid Progenitors» (GMP), qui génèrent les cellules blanches, et les progéniteurs des mégacaryocytes et érythrocytes ou «Megakaryotic-Erythrocyte Progenitors» (MEP), qui produisent les globules rouges et les plaquettes. Par la suite, chaque type cellulaire possède son propre progéniteur clonogénique qui sera destiné à produire une grande quantité de ce type de cellule exclusivement durant une très courte période de temps, en réponse à des facteurs stimulateurs spécifiques.

1.1.2.1.1. Marqueurs de surface des CMP

Encore grandement étudiés, les progéniteurs myéloïdes sont des populations cellulaires difficiles à purifier. Les marqueurs de surface exprimés chez l'humain et la souris semblent être régulés de façon très différente. Ainsi, l'isolation de CMP humain requiert l'absence de tous les marqueurs spécifiques aux différentes lignées (lin^-), la présence de CD34 ($CD34^+$), la présence en petite quantité du récepteur de la cytokine IL-3 ($IL-3R\alpha^{low}$) ainsi que l'absence de la phosphotyrosine phosphatase CD45RA ($CD45RA^-$)⁽¹⁷⁾. Par contre, ces deux derniers marqueurs ne sont pas retenus chez la souris puisqu'ils sont exprimés variablement à travers les CMP, GMP et MEP et qu'une discrimination claire entre les populations n'est pas possible. Par contre, les CMP murins sont aussi lin^- et $CD34^+$ mais doivent de plus exprimer le récepteur II et III du fragment Fc des immunoglobulines de type gamma ou $Fc\gamma RII/RIII$ en petite quantité ($Fc\gamma RII/RIII^{low}$) et le récepteur du «stem cell factor», c-kit ($c-kit^+$) mais ne doivent pas porter à leur surface les protéines Sca1 ($Sca1^-$) ni le récepteur de l'IL-7 ($IL-7R\alpha^-$)⁽¹⁸⁾.

1.1.2.2. Les progéniteurs lymphoïdes

Les progéniteurs les plus immatures connus de cette lignée sont les «Common Lymphoid Progenitor» (CLP), retrouvés aussi dans la moelle osseuse. Dépendamment des stimuli, ces progéniteurs peuvent se diviser en lymphocytes B, lymphocytes T ou en cellules NK («Natural Killer»). Autant

pour la lignée B que pour la lignée T, les progéniteurs doivent passer à travers de nombreux stades de maturation bien définis avant de se différencier de façon terminale en lymphocytes.

1.1.2.3. Les progéniteurs myélo-lymphoïdes

La très controversée convention universelle limitant les progéniteurs en deux populations indépendantes, myéloïdes ou lymphoïdes, commence peu à peu à être remise en doute par différents travaux récents.

1.1.2.3.1. Le facteur de transcription PU.1

PU.1 est connu comme l'un des facteurs de transcription le plus impliqué dans la régulation des granulocytes et des monocytes par l'activation de plusieurs gènes dont l'expression de récepteur tels G-CSFR et GM-CSFR, ainsi que dans les cellules lymphoïdes via son affinité pour le gène codant pour le récepteur alpha de l'interleukine 7 (l'IL-7R α)^(19;20). Grâce à la surexpression de ce gène dans une lignée murine, une première équipe a démontré l'émergence d'une nouvelle population de progéniteurs engagés autant dans la lignée myéloïde (granulocytes et macrophages) que lymphoïde⁽²¹⁾. À l'inverse, l'absence de PU.1 a provoqué une déficience marquée dans le développement précoce des cellules GM et des cellules lymphoïdes mais pas en ce qui concerne le développement méga-érythrocytaire⁽²²⁾. Ce potentiel mégacaryocytaire réduit est également retrouvé suite à la transplantation, dans une souris, de cellules PU.1^{med}CD34⁺KLS, qui ne forment pas, dans l'essai de CFU-S, de colonies dans la rate après 8-12 jours, celles-ci pourtant composées majoritairement de cellules provenant de la lignée des mégacaryocytes et des érythrocytes⁽²³⁾. De plus, les travaux effectués par Adolfsson et al. ont non seulement aussi démontré la présence de cette population chez la souris mais l'on également caractérisé. Additionné des marqueurs de la population KLS et de la présence du CD34, le seul autre facteur dont l'expression est requise est le récepteur à tyrosine kinase, Flt3 (Flt3⁺). Cette population, suite à une greffe, a le potentiel de maintenir la lignée GM ainsi que les lignées lymphoïdes B et T mais pas celles des mégacaryocytes et des érythrocytes. Cette perte de potentiel a également été observée *in vitro*, où les cellules Flt3⁺CD34⁺KLS, mises en méthycellulose, permettent le développement de colonies de granulocytes et de macrophages,

mais provoquent rarement le développement des mégacaryocytes⁽²⁴⁾. Finalement, à l'aide de souris transgéniques et de la protéine GFP, d'autres équipes ont réussi à trouver le patron d'expression du gène PU.1 dans les cellules hématopoïétiques. Les cellules très primitives telles les CSH, les CMP, les GMP et les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP), ainsi que les granulocytes/macrophages expriment fortement ce gène tandis que les lymphocytes B l'expriment un peu moins et qu'il est peu ou pas du tout exprimé dans les progéniteurs érythroïdes/mégacaryocytaire, les lymphocytes T et les cellules NK⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Globalement, ces travaux suggèrent l'existence d'une voie de développement additionnelle de maturation, autre que la traditionnelle myéloïde versus lymphoïde et que le développement des cellules GM ainsi que des lymphocytes B et T sont étroitement liés.

1.2. Essais de détection des CSH et progéniteurs

Les essais de détection des CSH et progéniteurs hématopoïétiques impliquent inévitablement deux paramètres ; d'un côté, la prolifération cellulaire via la mesure du nombre de cellules produites, et d'autre part, le potentiel de différenciation, estimé par le nombre de lignées cellulaires différentes produites. Par ailleurs, les molécules contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire dans les essais à court et à long terme sont quelques peu différentes. En effet, les facteurs nécessaires aux progéniteurs matures sont très bien caractérisés et disponibles à l'inverse de ceux requis par les cellules plus primitives puisque très peu est connu sur leur régulation. Conséquemment, les essais à court terme sont très bien standardisés tandis que de multiples conditions différentes sont utilisées lors d'essais à long terme.

Par ailleurs, les essais définissant les CSH et les progéniteurs sont équivalents chez la souris et l'humain, malgré une efficacité supérieure des essais murins, puisque les principes généraux les gouvernant opèrent de façon similaire dans les deux espèces.

1.2.1. Essais *in vitro*

1.2.1.1. Essais à court terme

Les progéniteurs matures, engagés dans une lignée particulière, se différencient en moins de 3 semaines et impliquent seulement 5 à 10 divisions cellulaires. Ceux-ci peuvent être facilement identifiés et quantifiés dans un essai de formation de colonies en semi solide (CFC). Grâce à l'immobilisation des cellules progénitrices dans un médium visqueux rendant le déplacement impossible, il y a apparition de colonies, suite à la multiplication cellulaire, qui peuvent être caractérisées par la composition, la grosseur et la couleur. Plusieurs types de progéniteurs ainsi que différents stades de maturation peuvent être différenciés simultanément dans une même culture. Les différents stades identifiés mènent à la formation de colonies d'un seul type cellulaire; érythrocyte (CFU-E/BFU-E) ou granulocyte (GFU-G) ou macrophage (CFU-M) ou mégacaryocyte (CFU-Meg)), deux types de cellules (granulocytes et macrophages (CFU-GM)) ou encore tous les types cellulaires myéloïdes possibles (CFU-GEMM). Ces derniers sont considérés comme les progéniteurs les plus immatures détectables dans cet essai à cause de leur multipotence. Par contre, cet essai n'est pas approprié à la détection des CSH puisque la durée de vie en méthylcellulose est de moins de 3 semaines et qu'il ne peut être remplacé. Cette période de temps trop courte ne permet pas aux CSH de produire des cellules différenciées.

1.2.1.2. Essais à long terme

Tous les systèmes identifiant des progéniteurs plus immatures doivent s'étendre au-delà de 3 semaines pour permettre dans un premier temps à ceux-ci de compléter leur différenciation et dans un deuxième temps, d'éliminer toutes possibilités de prolifération cellulaire provenant des progéniteurs matures. Ces essais ont généralement tous en commun la présence de cellules nourrices ou «feeder» produisant plusieurs facteurs régulateurs et tentant ainsi de recréer le microenvironnement retrouvé dans la moelle osseuse. D'abord générées à partir de cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse, les cellules nourrices utilisées à présent sont plutôt des lignées cellulaires stromales, immortalisées et dérivées de la moelle osseuse de souris telles les MS-5, les S17, les AFT024 ou encore les M210B4. Ces

lignées sont souvent préférées aux cellules primaires de moelle osseuse puisqu'elles ont l'avantage de supporter aussi bien le développement myéloïde que lymphoïde et sont disponibles en quantité illimitée⁽²⁸⁾.

Le premier essai, la culture à long terme – cellule initiateur ou LTC-IC est défini par la capacité des progéniteurs à donner naissance, suite à une culture de 5 à 8 semaines sur une monocouche de cellules fibroblastiques, à des cellules capables de former des colonies détectables en essai CFC standard. Pour évaluer la fréquence des progéniteurs immatures, il est cependant nécessaire d'effectuer cet essai en dilutions limites utilisant la statistique de Poisson^(29;30). Une étude menée par Zandstra et al. a démontré que cette population de cellules plus primitives, mises en évidence par cet essai, s'avère très hétérogène puisque le nombre de colonies produites par chaque cellule progénitrice cultivée exactement dans les mêmes conditions varie énormément, produisant de 1 à 100 colonies⁽³¹⁾.

L'essai de «cobblestone area forming cell» ou CAFC est une autre façon de mettre en évidence les progéniteurs immatures. Cet essai implique l'intégration des progéniteurs dans la monocouche de cellules nourrices pour y former un complexe de cellules denses et vigoureusement associés aux fibroblastes, nommé «cobblestone area». Ainsi, un seul coup d'œil permet la visualisation de ce complexe cellulaire. Plusieurs études ont démontré que les cellules purifiées de «cobblestone» au jour 30 et transplantées dans une souris irradiée menait à la reconstitution hématopoïétique à long terme de celle-ci^(32;33). Par contre, cet essai ne donne aucune information quant à la multipotence ou encore à l'hétérogénéité entre les progéniteurs.

Bien que ces essais soient les meilleurs approximations *in vitro* des cellules se rapprochant des CSH, il ne définissent pas le comportement réel des CSH. Il est aussi important de retenir qu'ils caractérisent le comportement d'une population de cellules extrêmement hétérogènes, qu'ils ne favorisent pas la différenciation lymphoïde et que le potentiel érythroïde est grandement compromis, rendant difficile les conclusions que l'on peut tirer des informations obtenues. Néanmoins, l'activité des cellules primitives mise en évidence dans ces essais est très souvent directement corrélée au comportement des CSH dans les essais *in vivo* de transplantation à long terme.

1.2.2. Essais *in vivo*

Les nombreux essais de transplantation *in vivo* ont mené à la hiérarchisation des cellules hématopoïétiques pouvant être transplantées et ainsi, à la classification de différents types de progéniteurs et de CSH, chez l'humain et plus précisément chez la souris. Dans ces essais, la longévité, mesurée ici en mois, la multipotentialité ainsi que la capacité de ciblage tissulaire ou «homing» des cellules sont les propriétés mesurées.

Les CSH murines étaient initialement identifiées grâce à leur capacité à former des colonies dans la rate d'une souris létalement irradiée, suite à une transplantation^(34;35). Depuis, de nombreuses méthodes de détection des CSH *in vivo* ont été développées. La méthode standard de détection des CSH utilise un nombre fixe de cellules isolées de la moelle osseuse à des fins de transplantation. Ainsi, pour être considérée une LTRC, la moelle osseuse et les autres organes hématopoïétiques de la souris receveuse doivent contenir des cellules différenciées des multiples lignées myéloïdes et lymphoïdes et ce, à long terme puisque l'activité des CSH, ainsi que des cellules descendantes immédiates, requiert plusieurs divisions cellulaires (>15) étalées sur plusieurs semaines, avant la production de cellules différenciées⁽²⁸⁾. Dans la version la plus stricte de cet essai de repopulation à long-terme, les CSH contenues dans la moelle osseuse d'une souris reconstituée grâce à une greffe peuvent être retransplantées dans un receveur secondaire et même tertiaire, sans perdre leurs pouvoir d'auto-renouvellement et de multipotence⁽³⁶⁾. L'analyse du sang, environ 4 mois post-transplantation, permet de déterminer les taux de granulocytes/macrophages et de lymphocytes B/T qu'il contient. Cependant, la présence de ces cellules ne donne aucune information quant au nombre de clones qui ont proliféré d'où l'importance d'utiliser un système se basant sur les mêmes principes que les dilutions limites soit l'essai d'unité de repopulation en colonie ou CRU. Cet essai implique la transplantation d'un nombre décroissant de CSH donneuses, distinctes phénotypiquement ou génétiquement de celles du receveur. Par la suite, après reconstitution, la proportion de receveurs positifs, défini par une reconstitution hématopoïétique provenant des cellules donneuses, est mesuré à l'aide de marqueurs de surface (FACS) et/ou génétiques («Southern Blot»).

Il est primordial de coinjecter des cellules de soutien contenant, entre autres, des progéniteurs matures ayant une courte vie, afin de pallier, dans un

premier temps, à la myéloablation du système causé par l'irradiation létale du receveur. Sachant de plus que les CSH qui s'établissent dans la moelle osseuse sont essentiellement quiescentes et considérées métaboliquement inactives et ce, souvent pour quelques temps⁽³⁷⁻³⁹⁾, ces cellules aident à la prise de greffe et fournissent les cellules matures nécessaires pendant un certain temps, donnant la chance aux CSH de s'établir et d'entrer dans le cycle cellulaire.

D'autre part, afin de calculer la fréquence des CSH chez l'humain, le même système est utilisé mais dans un modèle de xénogreffe chez des souris fortement immunosupprimées, principalement avec une immunodéficiência combinée sévère combinée à un diabète non-obèse (NOD-SCID). Ces souris sont déficientes au niveau du développement des lymphocytes et des cellules NK, éliminant ainsi le rejet potentiel du greffon (cellules humaines) par la souris receveuse. Dans ce système, les cellules permettant la reconstitution à long terme sont nommées cellules repopulant les SCID (SRC). Cependant, avec ce modèle, il est difficile d'évaluer la multipotentialité des CSH transplantées parce que cette déficiência entraîne aussi une incapacité du développement lymphoïde et NK des cellules humaines.

1.3. La régulation du système hématopoïétique

De nombreux facteurs, autant intra qu'extra-cellulaires, sont impliqués dans le fonctionnement du système hématopoïétique et ce sont ceux-ci qui régissent le comportement des différentes cellules (CSH, progéniteurs et cellules matures) en ce qui a trait à la prolifération, la différenciation, l'auto-renouvellement, la quiescence ou encore, la mort cellulaire. Par exemple, en situation de stress où la demande en cellules matures est augmentée, beaucoup de processus prolifératifs sont mis en branle afin d'augmenter la prolifération et la différenciation cellulaire. Une fois ce stress comblé, les processus prolifératifs et anti-apoptotiques sont grandement diminués et la cinétique de l'hématopoïèse retourne à un niveau normal de base. Ceci est dû en grande partie au contrôle effectué par la niche hématopoïétique, représentant l'environnement dans lequel les cellules sont en contact, ainsi qu'aux événements intracellulaires que ces stimuli génèrent.

1.3.1. Les cytokines

Une cytokine est une glycoprotéine qui joue un rôle de médiateur positif ou négatif, par la liaison à un récepteur spécifique présent sur une cellule cible enclenchant ainsi une variété de voies de signalisation notamment celles activant les tyrosines kinases des voies des MAP kinases, des Jun kinases et de la protéine kinase C et entraînant ultimement un changement dans l'expression génique de certains gènes ciblés par les facteurs de transcription activés. De plus, de nombreuses études impliquent aussi la voie JAK/STAT dans la modulation de la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Par exemple, l'IL-3 et le GM-CSF sont des cytokines induisant la prolifération cellulaire tandis que le ligand flt-3 et le SCF sont des facteurs de protection contre l'apoptose et de sensibilisation aux autres cytokines. Ainsi, l'effet culminant produit par l'activation et l'interaction appropriée de ces différentes cascades de signalisation permettent de générer différents types cellulaires. Par contre, certaines aberrations retrouvées dans ces voies de signalisation représentent la cause principale de nombreux désordres myélo/lymphoprolifératif.

1.3.2. Les composantes de la matrice extra-cellulaire

La matrice extra-cellulaire représente, à l'échelle microscopique, une structure réticulaire composée de cellules non-hématopoïétiques (endothéliales, stromales) et de moins de 30% de cellules hématopoïétiques (macrophages, granulocytes, progéniteurs immatures ainsi que des lymphocytes B et T)⁽⁴⁰⁾ interconnectées qui suscitent une grande variété de processus physiologiques via leurs ligand/récepteur ou par la relâche de cytokines. Les CSH et les progéniteurs immatures sont fermement liés par leurs molécules d'adhésion telles les intégrines, les sélectines et les mucines, à certaines composantes de ce réseau dont les protéines de collagène, de fibronectine et de fibrine et des protéoglycanes. Cette niche permet aux CSH/progéniteurs d'être en présence constante de cytokines et autres facteurs, qu'ils agissent de façon positive ou négative. Par exemple, dans la moelle osseuse, les macrophages sont une population de cellules très présente et jouent un rôle important dans l'érythropoïèse et la granulopoïèse grâce à la production d'une large gamme de cytokines supportant ces deux voies de différenciation^(41;42). De plus, l'isolation et l'utilisation de cellules stromales *in vitro* a mené à l'identification

de plusieurs cytokines importantes pour les cellules hématopoïétiques, soit l'IL-7, l'IL-11 et le SCF⁽⁴³⁾. L'interaction directe des CSH avec les cellules stromales est d'une importance cruciale dans le maintien de la population des CSH puisque plusieurs systèmes de signalisation sont impliqués dont SCF/c-kit, Notch/ ligand Notch et Wnt/Frizzled. L'utilisation de cellules stromales *in vitro*, dérivées de la matrice extracellulaire, a de plus démontré sa grande influence sur la régulation de l'hématopoïèse. Par exemple, le cycle cellulaire des cellules cultivées en présence de cellules stromales fluctue beaucoup suite au changement de milieu, contrairement à celles cultivées sans cellule stromale où le cycle cellulaire de ces cellules reste inchangé⁽⁴⁴⁾. De plus, la mutation du gène codant pour le ligand de c-kit (SCF) membranaire, dans une souris, cause un profond changement dans la niche hématopoïétique et mène à la perte des CSH *in vivo*⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾.

1.3.3. Conséquence des stimulations externes

Cette vaste gamme de facteurs environnementaux externes, régulant l'hématopoïèse, implique inévitablement la modulation de nombreuses autres molécules intracellulaires jouant aussi un rôle critique dans la prolifération et la différenciation cellulaire.

Ainsi, plusieurs familles de gènes dont Rb, E2F, les cyclines, SCL et Hox semblent impliquer dans la régulation de la prolifération et de l'auto-renouvellement des CSH⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾. Des gènes comme C/EBP, MyD, PaxB et Ikaros semblent plutôt être impliqués dans la différenciation cellulaire et plus spécifiquement, dans l'engagement définitif vers une lignée spécifique⁽⁵²⁻⁵⁴⁾.

1.4. Devenir des CSH

La régulation du sort prolifératif des CSH est encore grandement méconnue et aucune caractéristique unique du cycle cellulaire des CSH n'a été identifiée, expliquant la division asymétrique ou symétrique des CSH. Par contre, la molécule régulatrice p21 semble être grandement impliquée dans l'état de quiescence des CSH^(55;56). De plus, l'expression de nombreuses molécules telles HOXB4^(57;58), BMI-1^(59;60), FGF-1⁽⁶¹⁾, NOTCH⁽⁶²⁾ et WNT^(63;64), semble être nécessaire au maintien des caractéristiques des CSH.

La vaste majorité des divisions cellulaires produit deux cellules filles identiques et mène à l'augmentation du nombre de cellules. Ce processus est observé pour les cellules en culture *in vitro* mais aussi *in vivo*, lors de l'embryogénèse où une expansion cellulaire substantielle est nécessaire. Ce type de division est symétrique. Au contraire, le pool de cellules souches des différents tissus, soumises à de nombreuses conditions homéostatiques, demeure relativement constant en dépit de leur prolifération, où elles ne font pas que s'auto-renouveler mais produisent aussi des cellules différenciées. Cette balance ne peut être réalisée que si les cellules souches se divisant symétriquement pour donner deux cellules souches filles est équivalent aux cellules souches donnant deux cellules différenciées. Puisque ce complexe mécanisme ne fonctionne pas à un niveau cellulaire individuel et que ceci impliquerait la coordination de deux populations de cellules souches, il est généralement reconnu qu'il se produit une division asymétrique, impliquant la production de deux cellules filles non identiques soit une cellule souche et une cellule différenciée. Les causes menant à la division asymétrique peuvent être pré division cellulaire, l'asymétrie divisionnelle, ou post division cellulaire, l'asymétrie environnementale. La première est définie par la redistribution inégale de facteurs déterminant le caractère souche des cellules lors de la mitose. Ainsi, lors de la division, une seule des cellules reçoit ces facteurs menant à la production d'une cellule retenant les caractéristiques d'une cellule souche tandis que l'autre entre dans un processus de différenciation. L'établissement de l'asymétrie par ce mécanisme est décisif pour de nombreux processus de développement, particulièrement chez les invertébrés, et les mécanismes moléculaires sont connus et bien définis⁽⁶⁵⁾. De plus, de récentes études ont démontré que ces mécanismes étaient conservés entre les invertébrés et les vertébrés, démontrant la possibilité que celui-ci puisse aussi médier la division asymétrique chez les CSH des mammifères. Une autre alternative à la division asymétrique est aussi possible lors de l'exposition des deux cellules filles identiques à des signaux externes différents, provenant de microenvironnements distincts. Ainsi, il se produirait d'abord une division symétrique, produisant deux cellules filles identiques, où une resterait dans la niche hématopoïétique et de ce fait, conserverait son statut de cellule souche tandis que la seconde, soumise à des facteurs différents, perdrait son phénotype de cellule souche^(66;67). Malgré l'importante influence de la niche dans le maintien des cellules souches, il n'est encore pas possible de contrôler la division cellulaire des CSH *in vivo*.

1.4.1. Préservation des CSH et facteur c-myc

L'absence de différenciation des CSH semble irrévocablement dû, du moins en partie, au facteur de transcription c-myc. Le gène c-myc est d'abord reconnu pour son rôle indispensable, de manière dose-dépendante, dans les cellules lors du processus de développement embryonnaire^(68;69). En effet, les souris n'exprimant pas ce gène meurent au jour embryonnaire 10.5⁽⁷⁰⁾. En tant que facteur de transcription, la protéine C-MYC induit la transcription de plusieurs molécules impliquées dans la transition G₁/S du cycle cellulaire comme E2F, CDC25A, CDK2, CDK4, Id2, Cul1 et Rb⁽⁷¹⁻⁷⁷⁾. La surexpression de c-myc dans des cellules quiescentes est suffisante pour induire l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire démontrant son important rôle régulateur du cycle cellulaire.

Dans le cas des CSH, le facteur agit encore en fonction de sa concentration. En effet, dans la cellule, la différenciation cellulaire est d'autant plus favorable lorsque la concentration de la molécule est élevée. Inversement, ce facteur est absent dans les cellules quiescentes. Par contre, lorsque le facteur de transcription HOXB4, exprimé presque exclusivement dans les CSH, se lie à la séquence MIE1 du gène c-myc, il provoque un blocage de l'élongation de la transcription du gène⁽⁷⁸⁾. L'expression diminuée de c-myc réduit grandement la différenciation cellulaire et ainsi, garde les CSH dans un état primitif, non différenciées. Et ceci a été démontré autant par des travaux cellulaires de surexpression de c-myc, menant à la réduction du pool de CSH (perte de l'auto-renouvellement), que de délétion totale du gène, qui ont démontré le blocage de la différenciation cellulaire et l'augmentation concomitante du nombre de CSH dans la moelle osseuse ainsi qu'un attribut de facilité à se greffer suite à une transplantation.

2. LES GREFFES DE CSH (GCSH)

Plusieurs cancers hématologiques ainsi que certains autres désordres reliés au système hématopoïétique sont traités avec des transplantations de CSH. La leucémie myéloïde en est un bon exemple. La leucémie myéloïde est classifiée en 2 catégories: chronique (LMC) ou aigue (LMA). La première est causée par l'expansion aberrante de progéniteurs immatures pluripotents dont

le potentiel de différenciation est inchangé. La LMC est caractérisée par un taux anormalement élevé de cellules myéloïdes dans la moelle osseuse, une splénomégalie avec hématopoïèse extramédullaire ainsi qu'une augmentation des leucocytes, à prédominance granulocytaire, dans le sang⁽⁷⁹⁾. Cette phase chronique est suivie souvent inévitablement, en l'espace de quelques années, d'une crise blastique. D'autre part, la LMA présente une augmentation massive de cellules blastiques provenant de la multiplication de progéniteurs myéloïdes plus immatures ayant perdu la capacité de se différencier. Les aberrations chromosomiques telles les translocations, les inversions, les insertions, les délétions ainsi que les duplications sont souvent les éléments en cause dans les leucémies myéloïdes.

Il est important de garder en tête que le but de toutes interventions, lors de greffe, est d'atteindre un effet thérapeutique optimal tout en minimisant les traitements au patient.

2.1. Source des CSH utilisées pour les traitements

2.1.1. Moelle osseuse

La source première de CSH est évidemment l'organe dans lequel la majorité de ces cellules sont retrouvées soit la moelle osseuse. Le donneur, sous anesthésie, subit plusieurs perforations d'un os, généralement celui de l'os iliaque, et les cellules de la moelle osseuse sont aspirées à l'aide d'une aiguille et d'une seringue. L'inconfort causé par cette procédure dure quelques jours et les effets sérieux sont extrêmement rares. Cette intervention permet de récolter de nombreuses cellules mais avec une fréquence de CSH extrêmement basse, soit 1/100 000.

2.1.2. Le sang mobilisé

De façon rare mais normale, les CSH se détachent de la moelle osseuse pour circuler à travers l'organisme via le flot sanguin, pour ensuite retourner dans la moelle. Le sang s'avère donc aussi une source de CSH qui peut être collecté par des interventions moins douloureuses, procédure d'aphérèse, qui a inévitablement remplacé la ponction osseuse dans la plupart des transplantations. Il est possible d'augmenter la quantité des CSH dans le sang, en les mobilisant, par l'administration de G-CSF. Le G-CSF est un

facteur de croissance qui cause la prolifération des neutrophiles ainsi que la relâche de protéases. Ces enzymes clivent les glycosaminoglycanes liant les CSH aux cellules stromales de la moelle osseuse et libèrent ainsi les CSH qui peuvent librement entrer dans la circulation sanguine⁽⁸⁰⁾ pour être ultimement récoltés lors d'une aphérèse. Il semblerait que ces CSH soient à un stade d'activation plus élevé que les CSH non traitées, par exemple, et que cette propriété pourrait entraîner une meilleure prise de greffe de ces CSH. Cette source de CSH est, de plus, préférée aux cellules provenant de la moelle osseuse puisque les premières permettent une reconstitution plus rapide des neutrophiles et des plaquettes, due à l'augmentation de ST-HSC⁽⁸¹⁾, diminuant ainsi les risques d'infection et d'hémorragie, ainsi que les risques associés aux transfusions sanguines. Mais les prélèvements ne sont pas dénués de certains effets secondaires, surtout chez des patients affaiblis ou âgés et de plus, chez certains donneurs nommés faibles mobilisateurs, suite principalement à de nombreux traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie, le nombre de CSH recueillies est trop faible pour effectuer une greffe.

2.1.3. Le sang de cordon ombilical

Le SCO est une riche source de CSH où elles peuvent être prélevées facilement, sans intervention et incidemment, sans risque. Les cellules de SCO utilisées lors de transplantations proviennent majoritairement de donneurs non apparentés et sont vraisemblablement moins enclines à causer une GVHD. Par contre, dû à une restriction d'espace, le sang contenu dans le cordon ombilical ne contient que quelques millions de CSH, représentant une trop petite quantité de cellules pour reconstituer un patient adulte si l'on considère qu'une greffe nécessite entre 7 et 10 millions de CSH par Kg du receveur.

2.2. Problématique reliée à la réussite d'une greffe

Ainsi, de nombreuses options s'offrent aux patients pour la GCSH mais, plusieurs obstacles sont à considérer dont le nombre limité de CSH. D'abord, il est impossible de trouver un donneur familial compatible avec le receveur chez tous les patients; en effet, moins de 30% des patients ont un donneur apparenté compatible à près de 100%⁽⁸⁰⁾.

Dans le cas de greffes autologues, les traitements de chimiothérapies et/ou radiothérapie affectent non seulement les cellules malignes mais aussi les CSH, réduisant énormément le pool de CSH dans un premier temps. De plus, certains patients ne réagissent pas bien au facteur mobilisant, en terme de quantité de CSH récoltées, devenant ainsi une population trop réduite pour être re-transplantées.

Il est donc primordial de considérer que l'un des plus importants facteurs optimisant la prise du greffon suite à une transplantation est la quantité de cellules nucléées que contient le greffon par rapport à la taille du receveur puisque ce sont ces cellules qui procureront les facteurs nécessaires à la reconstitution de l'organisme, au moins à court terme. Ainsi, un minimum de 1.5×10^7 cellules nucléées par Kg du receveur favorisent la prise de greffe et augmentent grandement les probabilités de réussite de la greffe⁽⁸²⁾.

Quelle que soit l'origine des CSH, l'efficacité des greffes est d'autant plus grande que le nombre de cellules injectées est élevé. C'est ainsi que la multiplication *ex vivo* des CSH prend toute son importance.

3. L'EXPANSION DES CSH *EX VIVO*

L'expansion *in vitro* des CSH est un sujet encore grandement étudié et extrêmement laborieux puisqu'il nécessite l'utilisation de techniques et/ou de molécules qui n'affectent pas l'auto-renouvellement, le «homing» et la pluripotentialité des CSH, tout en considérant que nous avons très peu d'informations sur les mécanismes gouvernant ces propriétés. Ceci explique probablement le fait que l'expansion *in vitro* efficace des CSH n'a pas encore été atteinte et que les CSH mises en culture sont majoritairement perdues. Par contre, il est connu que la culture *ex vivo* des CSH mène au changement de l'expression du gène de la famille des intégrines $\beta 1$ ainsi qu'au récepteur de chemokine CXCR4^(83;84), deux importants facteurs impliqués dans le «homing» et la prise du greffon. De plus, ces cultures sont associées à l'augmentation de l'expression de Fas ligand, molécule pro-apoptotique, ainsi qu'à la diminution d'expression du gène anti-apoptotique Bcl2 dans les cellules qui est un activateur de la voie des caspases menant à l'apoptose⁽⁸⁵⁻

⁸⁷⁾. Cet excès d'apoptose pourrait contribuer à la faible expansion et même à la perte des CSH. Cependant, l'apoptose est un mécanisme normal du contrôle pointu des CSH.

3.1. Stratégies d'expansion utilisées

3.1.1. Cocktail de cytokines

Depuis le début des années 80, la recherche sur l'expansion des CSH est grandement axée sur les cocktails de cytokines et ce, à cause de leur important rôle de régulation⁽⁸⁸⁾. De plus, l'utilisation de cytokines n'altère pas les caractéristiques primitives des cellules. Près de 30 facteurs hématopoïétiques, contribuant à la prolifération et à la différenciation des CSH et des progéniteurs, ont été identifiés. Ainsi, Miller et Eaves ont démontré une expansion nette des CSH murines de 3 fois lorsqu'elles sont cultivées *in vitro* en présence d'IL-11, de Flt3 ligand et de SCF et ce, sans effet sur leur potentiel de reconstitution *in vivo*⁽⁸⁹⁾. De façon similaire avec des cellules humaines, où les CSH sont plutôt nommées CRU, plusieurs études ont démontré une modeste expansion *in vitro* des CSH. L'addition de Flt3 ligand, de SCF, de G-CSF, d'IL-3 et d'IL-6 à la culture liquide des CSH mène à une expansion de celles-ci de 2 à 4 fois⁽⁹⁰⁾. Finalement, le cocktail de cytokines optimal découvert jusqu'à présent induit une expansion des CSH de 4 à 6 fois *in vitro* et implique l'utilisation des cytokines Flt3 ligand, SCF, TPO et IL-6⁽⁹¹⁾. Cependant, ce type de manipulation peut induire une perte de certaines propriétés des CSH et les amener vers un processus de différenciation irréversible. Ceci a été démontré par une étude où les CSH non-manipulées, compétitionnant avec des CSH cultivées *in vitro* avec des cytokines, avait un potentiel de prise de greffe *in vivo* grandement réduit⁽⁹²⁾, suggérant que la stimulation par des cytokines affecte les propriétés des CSH produites et que les cytokines ne sont pas les seuls facteurs déterminant la division symétrique des CSH.

3.1.2. Cellules stromales

Dans le but de recréer un microenvironnement similaire à celui retrouvé *in vivo*, des lignées cellulaires stromales ont été générées à partir de l'Aorte-Gonades-Mésonephros (AGM), du foie fœtal ainsi que de la moelle

osseuse⁽⁹³⁻⁹⁵⁾. Ces cellules généreraient ainsi les facteurs et molécules importants, mais inconnus, régulant les CSH. Ces lignées sont souvent utilisées en combinaison avec des cytokines.

Par exemple, le groupe de Isaad et al. a utilisé un cocktail de cytokines combiné à une lignée cellulaire stromale de souris (MS-5) afin de cultiver, à court et à long terme, des CSH humaines (CD34+ CD38-). Les études à court terme leurs ont permis de conclure que la population cellulaire observée représentait exclusivement des progéniteurs cellulaires primitifs, deux fois plus nombreux et produisant des colonies plus grosses en essai de colonie (CFC) que les cellules cultivées en absence de cellules stromales. À long terme, ils ont démontré qu'il était possible de promouvoir l'expansion de ces progéniteurs immatures *in vitro* jusqu'à 3 mois sans différenciation⁽⁹⁶⁾.

Un autre groupe de recherche a quant à lui réussi l'expansion de progéniteurs hématopoïétiques à l'aide de cellules souches mésenchymateuses dérivées du sang de cordon ombilical et ce, sans ajout de cytokines supplémentaires⁽⁹⁷⁾.

3.1.3. Transduction par des rétrovirus recombinants codant pour des facteurs de transcription

Une alternative à l'utilisation de cytokines consiste en l'infection des CSH par des rétrovirus recombinants codant pour des facteurs de transcription qui interviennent dans leur développement et dont la surexpression n'est pas transformante. Ceci implique l'établissement permanent d'un gène étranger dans le génome, s'intégrant plus ou moins au hasard, préférant tout de même les régions du génome dites «ouvertes» ainsi que dans les régions de gènes plus souvent transcrits. Cette technique implique la création de micro-chimérisme causant des empreintes génétiques aléatoires et rendant ainsi chaque cellule pratiquement unique. Le risque possible d'activer des protooncogènes ou encore d'inactiver des gènes suppresseurs de tumeur est aussi à considérer. Dans ce contexte, la modification génétique permanente des CSH présente des obstacles à la fois techniques, scientifiques et éthiques significatifs dans l'éventualité d'une application thérapeutique.

3.1.4. Facteurs de transcription et autres molécules solubles

Afin d'éviter tout effet néfaste en rapport avec l'intégration stable et permanente d'un gène codant pour un facteur de transcription ou d'autres molécules dans les CSH, de nombreuses études ont montré que l'expansion des CSH pouvait être induite par l'exposition des cellules à différents facteurs solubles directement ajoutés dans la culture. Les molécules testées sont évidemment des facteurs importants reconnus dans le développement des CSH tels les BMP⁽⁹⁸⁾, Sonic Hedgehog⁽⁹⁹⁾, Pbx⁽¹⁰⁰⁾ ainsi que le facteur de transcription HOXB4. Celui-ci a même été conjugué aux cellules stromales. En effet, le groupe de Amsellem et al. a exploité la propriété des protéines HOX, via l'homéodomaine, à traverser spontanément les membranes cellulaires, en absence de récepteur spécifique. Ils ont ainsi créé une lignée stromale produisant de façon permanente la protéine HOXB4 qui permettaient la culture *ex vivo* des CSH humaines. Cette stratégie a mené à une expansion de 2.5 fois des CSH ⁽¹⁰¹⁾ mais ne pourrait par contre pas être utilisée dans un contexte clinique étant donné l'origine murine de la lignée stromale.

4. GÈNES HOX

Les gènes HOX sont des gènes ayant une conservation évolutive incroyable non seulement à travers le temps mais aussi entre les différentes espèces. Ceci est probablement dû au fait qu'originellement, il n'existait qu'un seul gène ancestral. Et à travers les nombreuses années, ce gène aurait subi plusieurs duplications et modifications génétiques, engendrant ainsi un complexe de plusieurs gènes paralogues. Pour certaines espèces tels les vertébrés, ce complexe complet se serait à nouveau dupliqué-modifié pour créer plusieurs autres complexes orthologues, où l'on en déduit qu'un avantage de sélection était conféré aux organismes possédant une plus grande quantité de gènes *hox* à cause de l'augmentation de la diversité de la réponse cellulaire face aux signaux extérieurs. Finalement, ces différents complexes ont subi d'autres diversifications subséquentes dont entre autres, la perte de gènes individuels. Ainsi, il est logique que les gènes orthologues (complexe à complexe) présentent plus de similitude entre eux que les gènes paralogues d'un même

complexe. De plus, les complexes de gènes paralogues sont homologues (séquence similaire entre les gènes) et exercent la même fonction entre les différentes espèces. Et ceci a été démontré par de nombreuses expériences d'échange de gène («gene swapping») où par exemple, la surexpression de la protéine HOXB4 humaine chez la drosophile cause le même phénotype que la surexpression de son homologue de cette espèce, Dfd («Deformed»)^(102;103).

Les gènes HOX, aussi nommés gènes homéotiques, ont d'abord été remarqués chez *Drosophila melanogaster* à cause des aberrations physiques que pouvaient causer les mutations dans ces gènes. C'est ainsi que le rôle primaire des gènes HOX a rapidement été découvert. Lors de l'embryogénèse, ces protéines ont pour mission globale de fournir une information positionnelle déterminante, dans l'axe antéro-postérieur, assurant la formation des organes à leur juste place selon les signaux émis par l'environnement. De façon générale, les gènes HOX ont des patrons d'expression qui se chevauchent et qui produisent un gradient de concentration protéique spécifique par rapport à leur ordre sur le chromosome. Ils sont de plus toujours exprimés dans l'ordre 3'→5'. Ainsi, les paralogues situés du côté 3' du complexe sont toujours grandement exprimés dans la partie antérieure de l'embryon et de moins en moins vers la partie postérieure (côté 5') et vice versa en ce qui concerne les gènes situés à l'autre extrémité. L'expression des gènes HOX mène donc à une identité vertébrale spécifique selon chaque combinaison spécifique. Par exemple chez les mammifères, une mutation dans le gène *hoxb4* affecte la région cervicale de l'embryon; les mutants *hoxc8* touchent la région thoracique et lombaire tandis que les mutants *hoxd11* affectent aussi la région lombaire ainsi que la région du sacrum.

Les gènes HOX codent pour des protéines se liant à l'ADN par une séquence hautement conservée, commune à tous de 183 nucléotides, nommé l'homéobox, et qui code un domaine de 61 acides aminés, l'homéodomaine. Tous sont des facteurs de transcription, dont l'homéodomaine comprend un motif «helix-turn-helix», qui se lie aux amplificateurs («enhancers») des gènes cibles contenant la séquence consensus 5'-TAAT-3'^(104;105). Mais lorsque les protéines HOX sont dénudées de tous co-facteurs et qu'elles ne sont pas modifiées, elles possèdent une faible affinité pour cette séquence, jouant ainsi

un rôle plus répressif. Par contre, les modifications protéiques, notamment la phosphorylation et l'ubiquitination ainsi que l'interaction de la protéine avec ses co-facteurs, les plus connus étant des membres de la famille TALE, les facteurs de transcription PBX⁽⁵⁸⁾ et MEIS⁽¹⁰⁶⁾, transforment la protéine. Ces liaisons modifient la spécificité de reconnaissance de l'ADN par les protéines, son affinité pour l'ADN ainsi que son potentiel de transactivation⁽¹⁰⁷⁾ mais les gènes visés par les protéines HOX sont encore un mystère difficile à percer. Une multitude de membres de la famille des gènes hox sont exprimés dans la plus primitive des populations hématopoïétiques tandis que dans les cellules différenciées, la quantité des protéines est indétectable⁽¹⁰⁸⁾.

4.1. Familles HOX chez les vertébrés

Chez les vertébrés, le locus des gènes HOX contient de 9 à 13 groupes de paralogues organisés en 4 complexes indépendants (A-D) sur les chromosomes 7, 17, 12 et 2, respectivement, chez l'humain et 6, 11, 15 et 2, respectivement, chez la souris⁽¹⁰⁹⁾.

De plus, l'expression des gènes HOX a aussi été identifiée dans les cellules hématopoïétiques normales et leucémiques où tous les complexes sont exprimés, sauf le complexe D qui n'est pas exprimé dans les cellules hématopoïétiques normales⁽¹¹⁰⁾. La fonction des gènes hox dans l'hématopoïèse a été quelque peu élucidée grâce à des modèles de souris «knock-out», à l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou encore par la surexpression de protéines via l'intégration de vecteurs rétroviraux dans les CSH murines et humaines. Ainsi, l'absence de la protéine HOXA5 dans des cellules humaines permet une augmentation significative des progéniteurs érythroïdes et cause l'apparition de cellules myélomonocytaires^(111;112) tandis que l'absence de HOXB6 diminue grandement la différenciation érythroïde^(113;114). En ce qui concerne la surexpression de la protéine HOXA10 dans les CSH murines, elle perturbe la différenciation des cellules B et myéloïdes, l'expansion des mégacaryocytes et finalement, mène à une leucémie myéloïde⁽¹¹⁵⁾. HOXA9 affecte le développement des cellules T et entraîne une leucémie myéloïde aigue^(116;117); et quant à HOXB3, sa surexpression bloque la différenciation lymphoïde et mène aussi éventuellement à des maladies myéloprolifératives⁽¹¹⁸⁾. Ce type de dérèglement cellulaire est également retrouvé lors de la surexpression dans

les cellules humaines. Les gènes du complexe C, quant à eux, n'ont jamais été directement impliqués dans la leucémogénèse jusqu'à présent. Cependant, quelques-uns de ces gènes sont exprimés dans des cellules néoplasiques de la lignée lymphoïde^(119;120). En ce qui concerne le complexe D, quelques gènes sont exprimés dans des cellules leucémiques tels HOXD3 dans la lignée cellulaire érythroleucémique HEL⁽¹²¹⁾ ou encore HOXD13, qui est retrouvé fusionné à NUP98 dans des cas de leucémie myéloïde aiguë^(122;123).

5. FACTEUR DE TRANSCRIPTION HOXB4

Dans le milieu des années 90, l'équipe du Dr. G. Sauvageau et al. a été la première à prouver que certains membres du complexe B des gènes homéotiques, les facteurs de transcription HOXB3 et HOXB4 plus particulièrement, possédaient non seulement un important rôle dans le développement embryonnaire mais qu'ils étaient aussi exprimés dans une sous population de la moelle osseuse enrichie en cellules hématopoïétiques immatures⁽¹⁰¹⁾. Par leurs expériences, ils ont démontré que des cellules hématopoïétiques murines surexprimant la protéine HOXB4 acquièrent une plus grande capacité à reconstituer le compartiment des CSH dans la moelle osseuse sans affecter la différenciation cellulaire suite à une première transplantation et même suite à une seconde transplantation. Ceci représentait les premières indications que le facteur de transcription HOXB4 était un régulateur de la prolifération des CSH murines mais non des cellules hématopoïétiques plus matures.

D'autres études ont par la suite démontré que ce potentiel de régénération du pool de CSH murin par le facteur HOXB4, suite à une transplantation, permettait d'atteindre un niveau basal de ces précieuses cellules et même de maintenir normalement ce niveau durant plusieurs mois. Cette stabilisation du pool de CSH à un niveau normal pré-transplantation suggérait fortement que l'expansion des CSH surexprimant HOXB4 obéissait ultimement aux mécanismes de contrôle *in vivo* retrouvés dans le milieu extracellulaire. De plus, aucune anomalie cellulaire n'a été retrouvée lors de l'analyse des différentes populations de cellules matures. Ces résultats combinés ont permis de conclure que la surexpression de la protéine HOXB4, contrairement

à plusieurs autres membres des gènes *hox*, ne conduisait pas à l'expansion anormale d'aucun type cellulaire hématopoïétique⁽¹²⁴⁾.

De plus, chez des souris où le gène *hoxb4* a été complètement retiré du génome, on observe une hématopoïèse quasi normale avec comme seule différence une légère baisse de la concentration cellulaire dans la moelle osseuse et la rate, résultat probable de la subtile réduction de la quantité de globules rouges⁽¹²⁵⁾. Ces résultats suggèrent donc que la protéine HOXB4 joue potentiellement un rôle redondant dans l'hématopoïèse des souris adultes.

Quelques années plus tard, Antonchuk et al. ont démontré qu'il était aussi possible d'obtenir une expansion significative des CSH murines *ex vivo* sans altération fonctionnelle de ces cellules lorsque la protéine HOXB4 était surexprimée⁽¹²⁶⁾. Il a été de même rapporté que la transduction de CSH humaines démontrait des résultats similaires *in vitro* et *in vivo*⁽¹⁰⁸⁾.

Par souci principalement éthique, vu la difficile application de stratégies géniques chez l'humain, des expériences similaires ont été effectuées sans modifications génétiques des CSH humaines via la protéine HOXB4 délivrée sous forme soluble. Déjà mentionné auparavant, le groupe de Amsellem et al. a démontré que les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques immatures étaient nettement amplifiés lorsqu'ils étaient co-cultivés avec une lignée cellulaire stromale génétiquement modifiée pour sécréter activement HOXB4 et que le caractère pluripotent de ces cellules amplifiées était même préservé⁽⁶⁾.

Le groupe de Krosi et al. a quant à lui contourné le transfert rétroviral stable et constitutif du gène *hoxb4* dans les CSH par la fabrication de la protéine de fusion humaine TAT-HOXB4 où TAT représente le domaine responsable de la pénétration intracellulaire de la protéine transactivatrice du VIH. Les CSH exposées à TAT-HOXB4 pendant 4 jours *in vitro* montrent une expansion de 4 à 6 fois et sont jusqu'à 20 fois plus nombreuses que les CSH non exposées⁽¹²⁷⁾. Cette expansion induite par TAT-HOXB4 est similaire à celle obtenue lors de la modification rétrovirale des CSH humaines. Finalement, les CSH amplifiées par TAT-HOXB4 possèdent encore leur potentiel normal de différenciation cellulaire et de repopulation à long terme.

C'est ainsi que le facteur de transcription HOXB4 s'est révélé être un important régulateur positif de l'auto-renouvellement des CSH murines et humaines. Cette propriété devenait intéressante à exploiter surtout dans les cas où le nombre de CSH est limité et que de plus, il est possible d'obtenir la multiplication de ces cellules très rapidement.

5.1. Obstacle à l'utilisation thérapeutique de HOXB4

Un inconvénient hautement significatif à l'utilisation de la protéine HOXB4 soluble pour l'expansion *ex vivo* des CSH humaines, dans un but thérapeutique, est sa courte demi-vie. En effet, la majorité de la protéine est perdue après seulement 4 heures dans le milieu extracellulaire et la demi-vie intracellulaire de HOXB4 est limitée à environ 1 heure⁽¹²⁷⁾. Ce qui implique une manipulation excessive des cultures de CSH *in vitro* (ajout de la protéine aux cultures cellulaires 6 fois par jour durant 4 jours), augmentant ainsi les risques d'erreurs humaines tels la contamination des cellules ou encore des variations de la concentration de la protéine dans le milieu secondaires à des ajouts protéiques répétés. Puisque le facteur de transcription HOXB4 semble, jusqu'à présent, être la molécule d'expansion des CSH ayant le plus de potentiel, nous avons tenté d'améliorer la protéine en la modifiant et ainsi, de diminuer les risques qui y sont reliés.

5.2. Dégradation des protéines intracellulaires (Ubiquitination)

La vaste majorité des protéines intracellulaires sont protéolysées par un processus de dégradation hautement spécifique et fortement régulé impliquant l'ubiquitination du substrat. La liaison covalente de multiples molécules d'ubiquitine sur la protéine cible s'effectue grâce à des mécanismes successifs induits par trois enzymes spécifiques. Initialement, la portion C-terminale de l'ubiquitine est activée par une enzyme «ubiquitin-activating» E1 où cette ubiquitine activée est immédiatement transférée par la protéine «ubiquitin-carrier» E2 à une protéine faisant partie de la famille des «ubiquitin-ligase», E3, qui a la propriété de se lier très spécifiquement aux protéines cibles⁽¹²⁸⁾. Cette dernière enzyme catalyse la liaison de l'ubiquitine à la protéine et participe également à l'élongation d'une chaîne de polyubiquitine sur ce même substrat. C'est ainsi que les molécules ubiquitinées sont reconnues et dégradées en petits peptides par le protéasome 26S.

Les mécanismes de reconnaissance gouvernant la très grande spécificité et sélectivité de l'enzyme E3 vis-à-vis des protéines cibles ne semblent pas très clairs jusqu'à présent. Cependant, les molécules à dégrader sont habituellement reconnues par la ligase E3 de trois façons différentes, soit directement par les résidus lysine présents à un endroit spécifique (N-terminal par exemple) de la protéine, soit suite à une modification post-traductionnelle comme la phosphorylation ou encore via l'association de l'enzyme à une protéine auxiliaire^(129;130).

5.3. Les protéines HOXB4 mutées

Puisqu'il était connu que les 31 premiers acides aminés de la protéine étaient impliqués dans l'ubiquitination et incidemment dans la dégradation, ce sont ces peptides qui ont été le point de départ de la fabrication des protéines mutées. La portion complète des 31 acides aminés en N-terminal fut éliminée dans la première protéine mutée créée. Par la composition en acides aminés que contient cette portion, c'est-à-dire un résidu lysine (reconnaissance directe) et près du tiers de ces acides aminés sont des résidus phosphorylables (6 sérines et 3 tyrosines), il était à prévoir qu'il y aurait beaucoup moins de sites de reconnaissance pour la liaison d'ubiquitine et qu'ainsi la dégradation serait possiblement retardée, augmentant ultimement la demi-vie intracellulaire de la protéine de plusieurs heures (de 1.1 heures à 3.5 heures). Cependant, la délétion de ces 31 acides aminés sur un total de 361 (séquence complète de la protéine) représente une proportion non négligeable d'environ 10%, pouvant potentiellement modifier les fonctions primaires de la protéine. Effectivement, cette protéine mutée (HOXB4 Δ 31) confère encore un avantage prolifératif aux CSH modifiées, mais est de loin moins efficace que la protéine HOXB4 «wt» (résultats non publiés jusqu'à présent et réalisés par le Dr. N Beslu dans le laboratoire du Dr. Sauvageau). Par contre, ces résultats peuvent être causés par plusieurs facteurs dont la toxicité de la protéine à de fortes concentrations (augmentation de la demi-vie) ou encore, à l'incapacité de la protéine mutée à interagir avec les co-facteurs affectant le comportement des CSH.

De façon à augmenter la demi-vie de HOXB4 sans en limiter l'activité, il s'en est suivi la création de plusieurs autres protéines mutées. Celles-ci ne portaient cependant qu'une mutation ponctuelle où un seul acide aminé était substitué dans cette même portion de la protéine qui avait été complètement

éliminée (HOXB4 Δ 31). Les protéines HOXB4 mutées retenues, nommées 1423, 1426 et 1427, présentaient une stabilité intracellulaire similaire à la protéine HOXB4 Δ 31, soit de 3.5, 2.5 et 4.0 heures respectivement pour chacune des protéines mutées. L'activité biologique intrinsèque de ces nouvelles protéines demeurait cependant inconnue.

6. DESCRIPTION ET PERTINENCE DU PROJET

Ce projet de maîtrise a permis d'évaluer si différentes mutations ponctuelles, individuellement distinctes les unes des autres, dans une séquence fortement impliquée dans la dégradation du facteur de transcription HOXB4, modifiaient l'activité biologique de la protéine. Sachant que les cellules hématopoïétiques, plus spécifiquement les CSH mises en contact avec HOXB4, lors de la surexpression de la protéine ou encore via la protéine soluble, possèdent un avantage sélectif les favorisant aux dépens des cellules non manipulées lors d'une greffe, il était important de savoir si l'on affectait ce pouvoir en créant une mutation ponctuelle. Suite à la transplantation de cellules hématopoïétiques non sélectionnées, modifiées génétiquement afin d'exprimer constitutivement la protéine HOXB4 «wt» ou l'une des 3 différentes protéines mutées créées, nous avons vérifié la reconstitution à court et à long terme des souris receveuses irradiées létalement. Ces études ont été réalisées, concernant la reconstitution à court terme, dans le but de déterminer le comportement des progéniteurs plus matures, un peu plus différenciés, face à la présence intracellulaire constante et relativement élevée de la protéine, en termes de temps et de la qualité de reconstitution et ce, toujours comparativement aux cellules exprimant la protéine «wt». Quant à la reconstitution à long terme, elle permettait de discerner l'impact des protéines mutées sur les progéniteurs primitifs et les CSH, et était visualisée grâce aux cellules descendantes de celles-ci.

6.1. Hypothèse de travail

Considérant les nombreuses études portant sur la protéine HOXB4 vis-à-vis les CSH, il a été clairement établi que cette protéine possède une capacité de promouvoir l'expansion des CSH, et ce autant *in vivo* qu'*ex vivo*, autant chez les cellules murines que humaines. Bien que les connaissances concernant

la régulation des CSH, et plus particulièrement l'expansion de ces cellules, en ce qui a trait aux gènes et aux facteurs impliqués, chemin de plus en plus, il n'y a aucune donnée disponible quant au *modus operandi* exact du facteur de transcription HOXB4 sur l'expansion des CSH. C'est pourquoi plusieurs paramètres moléculaires sont à considérer mais difficilement évaluables dans le présent projet. L'augmentation de la demi-vie de la protéine mutée causera une accumulation probable dans la cellule. Et puisque HOXB4 est un facteur de transcription et qu'il devient un élément non limitant, il se peut que plusieurs gènes cibles à la fois soient activés. Il se pourrait même que de nouvelles cibles géniques soient activées ou désactivées suite à la modification de la conformation tridimensionnelle de la protéine secondaire à la mutation ponctuelle, révélant potentiellement d'autres sites actifs qui auraient un impact sur l'activité cellulaire normale. Les protéines HOXB4 mutées peuvent ainsi avoir différents impacts positifs ou négatifs sur les CSH et les autres cellules hématopoïétiques qui se traduisent par une panoplie de possibilités de pouvoirs et de facultés qu'elles acquerront ou se départiront.

6.2. Objectifs principaux du projet

Ce projet avait plusieurs objectifs globaux à atteindre dont le premier était de découvrir si la substitution d'un seul acide aminé dans la protéine HOXB4 pouvait modifier son pouvoir de favoriser l'expansion des CSH. Incidemment, on observera le comportement des autres cellules hématopoïétiques face à une exposition continue du facteur de transcription, muté ou non, constituant mon deuxième objectif. Finalement, il fallait déterminer l'importance de la concentration intracellulaire de la protéine, en forte hausse chez les protéines mutées (demi-vie allongée), vis-à-vis ses propriétés habituelles.

PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

7. MÉTHODES

Ce projet impliquait d'abord l'établissement d'un procédé permettant de confectionner des CSH et autres cellules hématopoïétiques capables d'exprimer de façon stable les protéines HOXB4 d'intérêt, par l'intégration irréversible du gène dans leur génome.

7.1. Justification du choix des souris/cellules

Les souris B6/SJL, âgées de 20 semaines, ont été choisies comme souris donneuses puisque ce sont des animaux facilement accessibles; nous possédons une colonie de souris B6/SJL gérée par le personnel de l'animalerie. Les souris, âgées de 8 semaines, ont été choisies comme souris receveuses puisqu'elles sont disponibles rapidement sur commande (Jackson). Le seul élément différenciant ces deux souris est le marqueur de surface leucocytaire Ly5.1 (B6/SJL) et Ly5.2 (C57Bl/6), permettant la reconnaissance des cellules donneuses suite à une greffe. De plus, les cellules murines sont un outil de choix dans ce type d'expérimentation puisque les molécules impliquées présentent une grande homologie avec les molécules retrouvées chez l'humain.

7.2. Génération des CSH exprimant les protéines HOXB4 mutées

7.2.1. Vecteurs et mutations ponctuelles du gène *hoxb4*

Les vecteurs rétroviraux, MSCV-IRES-GFP, MSCV-HOXB4-IRES-YFP et MSCV-HOXB4muté-GFP (3 constructions pour chaque protéine mutée), comprenant des séquences LTR en 5' et en 3' et la séquence d'emballage *psi*, ont été conçus, décrites et gracieusement offertes par le groupe de N.Beslu et *al.* (article en préparation). Les mutations ponctuelles dans la portion N-terminale du gène *hoxb4* consistent en la substitution de la leucine en position 7, de la tyrosine en position 23 et de la tyrosine en position 28 par l'acide aminé alanine, correspondant aux protéines mutées 1423, 1426 et 1427 respectivement. Ceci a été réalisé en remplaçant les nucléotides 1 à 39

dans l'ADN complémentaire du gène *hoxB4* «wt» avec l'ADN double brin de ces mêmes nucléotides mais comportant la mutation désirée.

7.2.2. Cellules productrices de virus transportant le gène *hoxb4*

L'incorporation permanente de l'ADN codant pour la protéine HOXB4 dans les cellules de moelle osseuse était précédée de deux phases importantes. La première implique la transfection de la lignée cellulaire adhérente productrice de virus 293GPG avec le vecteur rétroviral codant le gène *hoxb4 wt* ou muté, à l'aide de la lipofectamine 2000 (Invitrogen). Ces cellules expriment déjà les protéines rétrovirales GAG et POL, primordiales à l'assemblage de rétrovirus fonctionnels, ainsi que la protéine G d'enveloppe du virus VSV. L'entrée dans la cellule de ce virus via cette glycoprotéine ne dépend pas d'un récepteur de surface cellulaire spécifique mais est plutôt médiée par la liaison aux lipides de la cellule menant à la fusion du virus avec la membrane plasmique. Ce qui confère à ce virus le caractère amphotropique, lui permettant d'infecter facilement tous les types cellulaires. Nous avons ainsi créé une lignée cellulaire produisant de grandes quantités de rétrovirus transportant le gène *hoxb4*. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco), additionné de FBS (Gibco) à 10%. La tétracycline (Invitrogen), utilisée à une concentration de 1µg/ml, empêche l'expression de la protéine G et de ce fait, la production de virus fonctionnels. Les virus ont été récoltés directement dans le surnageant.

Puisque la protéine d'enveloppe G est toxique pour les cellules de mammifères⁽¹³¹⁾, il n'était pas possible d'utiliser ces virus pour l'infection des cellules de la moelle osseuse. Nous avons eu recours à une seconde lignée cellulaire adhérente productrice de virus, la lignée GP+E86, facile à infecter mais difficilement transfectable. Nous avons conçu une lignée stable de cellules produisant des virus codant individuellement pour les gènes *hoxb4* «wt» ou mutés. Ces virus sont de plus en plus dangereux à manipuler dû à leur caractère écotropique, se traduisant par l'infection des cellules exprimant à leur surface la protéine CAT-1, généralement retrouvée uniquement à la surface des cellules murines. Ces cellules sont maintenues dans un milieu DMEM contenant 10% de NCS (Gibco). Puisque les gènes codant les protéines rétrovirales GAG, POL et ENV ont été introduits de façon stable dans les cellules, le milieu HXM, utilisé en alternance avec le premier milieu,

permet de sélectionner celles possédant encore ces gènes. Le milieu HXM est composé de DMEM, 10% NCS, d'hypoxanthine à 15µg/ml (Sigma), de xanthine à 250 µg/ml (Sigma) et d'acide mycophénolique à 25 µg/ml (Gibco). Étant stable, cette lignée a pu être conservée par congélation à très basse température dans l'azote liquide (-170°C). Le vial contenait entre 5 et 20 millions de cellules en suspension dans un milieu RPMI (Gibco), 20% FBS et 10% de DMSO (Invitrogen). Les cellules sont décongelées lentement dans un milieu de décongélation composé de RPMI, de 15% FBS, de 15 µg/ml de DNase (Sigma), de sodium bicarbonate à 0.035 ml/ml (préparation maison à 7.5% stock) et d'*Hepes buffer* à 25 mM/ml (Bio-Whittaker), prévenant l'aggrégation des cellules dû à celles qui sont mortes.

7.2.3. Transduction rétrovirale des cellules de la moelle osseuse

Les cellules de la moelle osseuse, contenant entre autre les CSH, utilisées pour l'infection rétrovirale proviennent de souris B6/SJL traitées, durant 4 jours, avec un agent de chimiothérapie, le 5-fluorouracil (Mayne Pharma), qui est un anti-métabolite agissant durant la phase S du cycle cellulaire, à 150 mg/Kg de souris. L'élément actif, le 5-fluorodeoxyuridylate (5-FdUMP), inhibe la thymidylate synthase empêchant la synthèse de l'ADN et menant ultimement à la mort de la cellule. Le 5-FU est de plus converti en 5-fluorouridine monophosphate (5-FUMP), qui est une molécule pouvant être incorporée dans l'ARN et qui interfère dans les processus et les fonctions habituels de l'ARN. La récolte des cellules de la moelle osseuse provenant des tibias et des fémurs s'effectue par l'expulsion sec du contenu intérieur des os à l'aide d'une aiguille et une seringue renfermant du milieu DMEM 5% FBS. Les cellules recueillies sont regroupées et sont dénombrées. Elles sont cultivées pendant 2 jours dans un milieu de stimulation contenant du DMEM avec 15% de FBS, 5 ng/ml d'IL-3 (Peprotech), 10 ng/ml d'IL-6 (Peprotech), 100 ng/ml de SCF (provenant d'une production maison du laboratoire du Dr G. Sauvageau), 50 µg/ml de gentamycine (Gibco) et 10 µg/ml de ciprofloxacine (Sigma). Chaque jour, les cellules sont comptées et le milieu de culture remplacé puisque la quantité de cellules diminue de 50%.

Ces différentes étapes ont permis d'enrichir le pool de CSH par la mort d'une vaste majorité de cellules en division ainsi que d'inciter celles-ci à entrer dans le cycle cellulaire via les signaux émis pour mettre en branle les processus menant à la reconstitution cellulaire de l'organisme.

Les cellules de la moelle osseuse survivantes ont été co-cultivées avec les cellules (GP+E86) génératrices de virus codant pour les gènes *hoxb4* «wt» et mutés pendant 48 heures, avec un changement de milieu quotidien, et la proportion de cellules de moelle osseuse infectée a été déterminée par cytométrie en flux via les protéines fluorescentes GFP (groupe contrôle et groupe HOXB4 muté) et YFP (groupe HOXB4 «wt») dont le gène était contenu dans les constructions plasmidiques de départ.

7.3. Transplantation et culture liquide

En ce qui concerne les expériences de compétition, la culture liquide de départ (*in vitro*) ainsi que le greffon (*in vivo*) contenaient 10% de cellules de moelle osseuse exprimant les protéines HOXB4 «wt»/YFP, 10% de cellules codant pour les différentes protéines HOXB4 muté/GFP ou la GFP seule (groupe contrôle) et 80% de cellules non modifiées. Ces cellules n'étaient ni triées ni séparées. La culture liquide a débuté avec une quantité de 3×10^5 cellules totales dans le milieu de stimulation précédemment décrit. La culture a été maintenue durant 18 jours et le décompte cellulaire à l'acide acétique 2% (préparation maison) ainsi que l'analyse des proportions des différentes populations (GFP et YFP), à l'aide du FACSVantage SE (Becton Dickinson), ont été effectués tous les 2 jours. De plus, lorsque la densité cellulaire devenait trop importante, les cellules étaient divisées afin d'atteindre une concentration maximale de 1×10^6 cellules/ml de milieu. Quant aux études *in vivo*, le jour précédant la transplantation, les souris receveuses, au nombre minimal de 6 par groupe, recevaient un traitement létal de radiothérapie de 8.5 Gy d'une source de ^{60}Co à un taux de 128 cGy/minute. Les souris ont été transplantées avec un greffon totalisant 3×10^5 cellules, provenant des populations mixées préalablement dans un milieu salin, du PBS ou du HBSS (Gibco) ne contenant pas de sérum. Les greffons des études de reconstitution non compétitives contenaient, quant à elles, 5×10^4 cellules infectées (GFP ou HOXB4 muté/GFP ou HOXB4 «wt»/YFP) et 1.5×10^5 de cellules non infectées. Chaque groupe était constitué de 6 à 8 souris létalement irradiées, dans les mêmes conditions que précédemment. Toutes les expériences ont été effectuées un minimum de deux fois.

7.4. Suivi de la transplantation

7.4.1. Sang

Le sang des souris du volet de l'étude où les différentes populations de cellules étaient en compétition a été prélevé une seule fois à mi-chemin de l'expérimentation soit à 8 semaines post-transplantation. Quant aux expériences en non compétition, le sang était extrait toutes les semaines. Une seule goutte de sang (<50µl), prélevée avec un capillaire hépariné (Fisher Scientific) dans la veine de la queue et stocké dans un microtube contenant de l'EDTA (Sarstedt) suffisait pour l'analyse subséquente des cellules qu'il contenait. Les globules rouges contenus dans le sang ont été lysés avec du chlorure d'ammonium 1X (solution stock 10X ajusté à un pH 7.2 : 1.55M de chlorure d'ammonium (Fisher Scientific), 0.1M de bicarbonate de potassium (Fisher Scientific) et 1 mM EDTA (Invitrogen)). Les leucocytes résiduels ont été marqués avec des anticorps produits dans le rat, reconnaissant des antigènes de souris (anti-souris) spécifiques pour les protéines CD11b couplé au tandem de fluorochromes Pe-Cy7, aux CD45R APC et aux récepteurs CD3 Pe-Cy5 (provenant tous de chez Biolegend) selon le protocole proposé par la compagnie. Les cellules marquées ont été analysées fraîches, sans fixation, pour ces marqueurs ainsi que pour les protéines GFP ou YFP qu'elles exprimaient par cytométrie en flux. Dans les deux types d'expériences, le sang a aussi été prélevé lors du sacrifice des souris.

7.4.2. Organes

Pour les études de compétition, les souris ont été sacrifiées au moins 16 semaines suivant la transplantation et pour les études en non compétition, les souris ont été sacrifiées un peu plus tardivement soit 20 semaines post transplantation. Les animaux ont été asphyxiés dans une chambre à CO₂ où les organes hématopoïétiques ont immédiatement été prélevés. Les fémurs et les tibias, contenant la moelle osseuse, la rate et le thymus ont été conservés dans du milieu DMEM contenant 10% de FBS sur glace. La moelle osseuse extraite des os a été préparée comme décrit précédemment. Quant à la rate et au thymus, les organes ont été écrasés entre deux lames aux extrémités rugueuses (VWR) afin d'extraire les cellules qu'ils contiennent et celles-ci ont été récupérées dans un milieu DMEM 5%FBS.

La contribution à la reconstitution hématopoïétique des organes et du sang par les différentes populations a été vérifiée par cytométrie en flux via les protéines fluorescentes. De plus, les cellules étaient marquées avec les anticorps anti-souris CD11b Pe-Cy7 et CD45R APC pour les cellules de la moelle osseuse, CD11b Pe-Cy7, CD45R APC et CD3 Pe-Cy5 pour les cellules de la rate et CD3 Pe-Cy5, CD4 Pe-Cy7 et CD8 APC (tous de chez Biolegend) pour les cellules de thymus afin de déterminer la diversification de chacune des populations dans les différentes lignées cellulaires. Les cellules non utilisées ont été congelées à basse température.

7.4.3. Analyses statistiques

Les résultats obtenus des cultures *in vitro* ont été analysés en utilisant une courbe de régression non linéaire du programme GraphPad Prism. Les différences statistiques ont été estimées selon le paramètre le plus haut de la meilleure courbe par le test F. Les mêmes analyses ont été effectuées pour la reconstitution périphérique dans les études de non compétition. Les différences de reconstitution dans la moelle osseuse, la rate et le thymus ont été analysés à l'aide d'un test T non apparié. Finalement, toutes les différences dont le p était plus petit que 0.05 ont été considérées significatives.

7.5. Visualisation de la protéine HOXB4 intracellulaire

7.5.1. «Western Blot»

Les protéines utilisées proviennent des cellules maintenues en culture liquide (compétition) durant 18 jours ainsi que des cellules provenant de la moelle osseuse 20 semaines post-transplantation. Celles-ci ont été triées à l'aide d'un FACSVantage SE via les protéines GFP (groupes HOXB4 muté) ou YFP (groupe HOXB4 *wt*). L'extraction des protéines totales a été effectuée sur ces cellules triées et le contenu protéique de l'équivalent de 2×10^6 cellules pour chaque population a été utilisé.

Les protéines totales contenues dans les divers échantillons ont été diluées dans du tampon d'échantillon 2X (8M d'urée, 3% de SDS, 0.005% de BBP et 70 mM de tris-HCl pH 6.8) 25% β -mercaptoéthanol et chauffées dans un bain

d'eau bouillante pendant 5 minutes. Le contenu total des échantillons a été placé dans les puits de gel de polyacrylamide. L'échelle standard de protéines «Precision Plus Protein Dual Color Standards» (Biorad) a été utilisée comme référence. La concentration en acrylamide des gels d'entassement et de séparation était de 4% et 10% respectivement. La migration était effectuée à un voltage de 100 V jusqu'à ce que les protéines atteignent le gel de séparation et le voltage était augmenté à 120 V pour le reste de la migration (environ une heure). Durant toute la durée de migration, le gel était plongé dans une solution tampon 1X composé de 250 mM de tris (Invitrogen), de 1.92 mM de glycine (Invitrogen) et 1% SDS (Gibco) pour une solution 10X. Après la migration, les protéines séparées contenues dans le gel ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF) dotée de pores de 0.2 μ m (Biorad). Ce transfert des protéines du gel vers la membrane a été effectué dans un Mini Transblot (BioRad) à 4°C à un voltage de 20 V durant toute la nuit sur une plaque magnétique. Le tampon de transfert utilisé contenait 25 mM de tris-HCl pH 8.3, 192mM de glycine et 20% v/v de méthanol (Fisher Scientific). La membrane a ensuite été séchée à température de la pièce durant 2 heures et plongée dans un bain de méthanol pour la réactiver. Afin d'évaluer la qualité du transfert, l'uniformité de la migration, la dégradation possible des protéines ainsi que l'emplacement des étalons de poids moléculaire, la membrane a été colorée au rouge Ponceau 1X (Invitrogen). La membrane était ensuite rincée dans du TBST (10 mM tris pH8, 150 mM NaCl (Invitrogen) et de 0.05% de Tween 20 (Sigma)) jusqu'à ce que la coloration disparaisse. La membrane décolorée a ensuite été saturée dans une solution de TBST-lait 5% pendant une heure à la température de la pièce sur une plaque agitatrice. Suite à plusieurs lavages avec du TBST, la membrane a été incubée pendant une heure à la température de la pièce, à douce agitation, dans du TBST-lait 1% contenant l'anticorps primaire, «rat» anti-HOXB4 (1:2000) provenant de chez DSHB («Developmental Studies Hybridoma Bank» de l'Université d'Iowa), «rabbit» anti-GFP (1 :2000) ou «rabbit» anti-pan actine (1 :2000) (tous les deux provenant de chez Cell Signaling). Après cette incubation, la membrane était lavée 3 fois 15 minutes à la température de la pièce dans du TBST. Elle était par la suite incubée dans du TBST-lait 1% contenant l'anticorps secondaire, selon la protéine a révélé, couplé à la peroxydase soit un «goat» anti-rat IgG-HRP (1:6000) ou un «goat» anti-lapin IgG-HRP (1:6000) (tous les deux provenant de chez Cell Signaling), toujours sur une plaque agitatrice. La membrane était à nouveau

lavée comme précédemment. Le complexe anticorps-antigène sur la membrane était révélé par l'utilisation de chemiluminescence via le kit ECL+ (Amersham Biosciences). La lumière émise par l'action de la peroxydase sur son substrat a été captée et photographiée par un appareil Fuji LAS-3000 (Fujifilm) et analysée par le programme Multi Gauge v2.3 (Fujifilm).

7.5.2. Immunofluorescence sur lame

Les cellules utilisées provenaient de la culture liquide au jour 7, permettent ainsi amplement et de façon stable l'expression des protéines. Un total de 20 000 cellules suspendues dans du DMEM 10% FBS ont été pré-fixées sur lame par centrifugation à 1200 RPM durant 7 minutes par cytopspin (Cytospin 3 de Shandon), restreignant les cellules dans un petit espace (cercle de 1 cm de diamètre). Les cellules sont par la suite définitivement fixées à l'aide de la paraformaldéhyde 4% (préparation maison). Les cellules fixées sont ensuite perméabilisées avec une solution de PBS/0.2% Triton X-100 (Sigma) et lavées plusieurs fois avec du PBS. Les cellules perméabilisées sont ensuite mises en contact avec l'anticorps primaire rat anti-HOXB4 (1:500) dilué dans une solution de PBS/ 0.2% Triton X-100 + 3% BSA (Vector Laboratories) pendant une heure. Les cellules sont lavées trois fois avec une solution PBS/0.2% Triton X-100 avant d'être mises en contact avec l'anticorps secondaire «goat» anti-rat IgG Texas Red, à une concentration de 1:400 (Caltag Laboratories) pendant 45 minutes. Les cellules sont lavées de la même façon que décrite ci haut. Avant de regarder la lame au microscope à fluorescence, les cellules sont plongées dans une «mounting» solution qui contient 0.25% de DABCO (VectorLabs) dans 90% de glycérol + 0.01% DAPI (Molecular Probes)

7.6. Modulation de la quantité de protéine

Les cellules de moelle osseuse ont été co-cultivées sur les cellules productrices de virus (GP+E86) comme précédemment décrit. En ce qui concerne les cellules destinées à surexprimer les protéines HOXB4 mutées, elles n'ont été exposées aux cellules productrices de virus pour une période de 15 heures seulement, réduisant ainsi le nombre d'intégrations du gène codant la protéine et de ce fait, la quantité intracellulaire de la protéine. Quant

aux cellules exprimant la protéine «wt», le temps d'incubation est resté le même, permettant ainsi de standardiser la quantité intracellulaire de la protéine HOXB4 et ce, indépendamment de la mutation lui conférant une demi-vie plus longue.

7.7.Études des CMP

L'isolation des CMP impliquait dans un premier temps, l'obtention de cellules exprimant les protéines HOXB4 «wt» ou mutées établies dans l'organisme depuis une période minimale de 8 semaines. Dans cette partie, toutes les constructions plasmidiques contenaient le gène d'intérêt ainsi que celui de la GFP seulement. Ces cellules ont été extraites de la moelle osseuse et immédiatement triées pour cette population. L'isolation de la population de CMP exprimant HOXB4/GFP a requis une étape préliminaire de déplétion des cellules possédant un marqueur de lignée cellulaire à sa surface à l'aide d'un aimant et de billes magnétiques (kit Easysep, Stem cell technologies). Les cellules lin^{-} obtenues suite à cette déplétion ont été marquées avec les anticorps CD34 Pe-Cy5, c-kit APC, Sca-1 Biotin couplé à la streptavidin APC-Cy7, Il-7R α Pe et Fc γ RII/III Pe-Cy7, provenant tous de chez Biolegend et utilisés selon les concentrations proposées par la compagnie, toujours à l'aide du FACSVantage SE. Ces cellules isolées ont été injectées dans des souris létalement irradiées, à raison de 3000 CMP par souris, additionnées de 250 000 cellules de moelle osseuse fraîche comme cellules de soutien. Le sang et les organes des souris ont été prélevés, manipulés et analysés comme décrit précédemment.

RÉSULTATS

8. ESSAIS EN COMPÉTITION

Ces essais consistaient à mélanger une population de cellules exprimant la protéine HOXB4 «wt»/YFP avec une autre population de cellules surexprimant l'une des protéines HOXB4 mutées/GFP ou GFP seulement, dans des proportions finales prédéfinies, c'est-à-dire 10 % de cellules de la première population (YFP+), 10% de la seconde population (GFP+) et 80% de cellules non modifiées, et de vérifier le comportement de chaque population. Les cellules transformées utilisées dans cet essai étaient préalablement infectées par les cellules productrices de virus qui permettaient, grâce aux intégrations rétrovirales permanentes dans l'ADN génomique, la surexpression de la protéine HOXB4 d'intérêt et des protéines fluorescentes.

8.1. *In vitro*

Cette population mixte a été gardée en culture liquide *in vitro* pendant une période de 18 jours. À tous les 2 jours, les cellules ont été dénombrées et la proportion des cellules exprimant l'une ou l'autre des protéines HOXB4 a été déterminée par cytométrie en flux via les protéines fluorescentes qu'elles contenaient (Figure 1). La figure 1A montre que la proportion de cellules exprimant la protéine HOXB4 «wt» augmente dans le temps (de 12% à 45%) contrairement aux cellules contrôle exprimant seulement la GFP, où la proportion de cellules modifiées reste inchangée (12%) *(p = 0.0001). La figure 1B montre, quant à elle, que les deux populations cellulaires exprimant HOXB4 «wt» et HOXB4/1427, prolifèrent à des taux similaires puisque leurs proportions sont comparables tout au long de l'expérimentation (15% à 32-38%). À l'opposé, les cellules exprimant les protéines mutées HOXB4/1423 et HOXB4/1426 engendrent une plus grande quantité de cellules comparativement à celles exprimant HOXB4 «wt», augmentant ainsi à des niveaux supérieurs la proportion de cellules exprimant une protéine mutée dans la culture à travers le temps (Figure 1C et 1D). Le tri des différentes populations cellulaires via les protéines fluorescentes, au jour 18 de la culture, nous a permis d'obtenir des extraits protéiques purs provenant de cellules exprimant exclusivement la protéine «wt» ou la protéine mutée (2 millions de cellules triées totales). Ces protéines ont été visualisées par «Western Blot» qui nous a permis de déterminer la concentration intracellulaire relative de la protéine HOXB4 dans les différentes populations (Figure 1E). La protéine

mutée HOXB4/1427 n'a pu être révélée puisque la mutation se retrouve dans l'épitope reconnu par l'anticorps anti-HOXB4. Les protéines mutées 1423 et 1426 sont retrouvées en plus forte concentration intracellulaire comparativement à la protéine «wt».

8.2. *In vivo*

Les souris ont été transplantées avec un greffon contenant 250 000 cellules totales dont 25 000 cellules exprimant HOXB4 «wt», 25 000 autres cellules exprimant l'une des protéines mutées (1423, 1426 ou 1427) ou la GFP seulement ainsi que 200 000 cellules non modifiées.

16 semaines suivant la transplantation, les organes hématopoïétiques et le sang ont été prélevés et analysés. La figure **2A** montre que la moelle osseuse est composée en majorité de cellules exprimant HOXB4 «wt» (65-70%), que les cellules exprimant une protéine mutée représentent une très petite proportion cellulaire (10-15%) et que celles exprimant la GFP seulement sont à peine détectables (1-2%). Les proportions sont quelque peu différentes dans la rate (figure **2B**). Les cellules exprimant la protéine «wt» représentent environ 35 à 40% des cellules totales de la rate tandis que les cellules surexprimant une protéine mutée représentaient une plus petite proportion cellulaire (18-23%) et encore davantage en ce qui concerne les cellules exprimant la protéine fluorescente seulement (4%). L'analyse du sang a démontré des résultats semblables à ceux obtenus dans la rate; près de 80% des cellules du sang expriment HOXB4 «wt» et seulement 10% exprimant la GFP seulement (* $p < 0.0001$). Cependant, les proportions des cellules exprimant une protéine mutée sont plus élevées (30-45%) et similaires aux proportions de cellules surexprimant HOXB4 «wt» (50-60%) (figure **2C**).

9. ESSAIS DE REPOPULATION EN NON COMPÉTITION

Cet essai consistait à greffer une seule population de cellules transformées dans un même organisme, soit 50 000 cellules exprimant HOXB4 «wt», désormais GFP, ou HOXB4 muté/GFP ou GFP seulement, additionné de 150 000 cellules non modifiées et de suivre leur évolution via la protéine fluorescente.

La figure **3** montre les proportions de cellules exprimant l'une ou l'autre des protéines HOXB4 dans le sang à travers le temps (20 semaines). Les souris greffées avec des cellules exprimant une protéine mutée présentent une plus grande proportion (60-80%) de ces cellules qui apparaissent plus rapidement (moins d'une semaine) dans le sang que les cellules exprimant HOXB4 «wt» (45% et 2 semaines). La figure **4A** représente des profils typiques de diversification cellulaire des cellules exprimant HOXB4 «wt» ou mutée, 14 semaines post-transplantation. La souris greffée avec des cellules exprimant HOXB4 «wt» présente une proportion de cellules myéloïdes beaucoup plus élevée (47.9%) et des proportions de cellules lymphoïdes inférieures (39.7% pour lignée B et 7.9% pour la lignée T) à celles retrouvées dans une souris non transplantée (17.3% de cellules myéloïdes, 63.7% de cellules B et 14.6% de cellules T). Toutes les souris greffées avec des cellules exprimant une protéine mutée ont des proportions de cellules myéloïdes (24-26%), lymphoïde B (55-57%) et lymphoïde T (15%) similaire à celles d'une souris normale. La figure **4B** représente les proportions cellulaires des différentes lignées parmi les cellules exprimant HOXB4 «wt» ou muté, sous forme schématique à 20 semaines post-transplantation, où les différences présentées dans la figure précédente sont encore plus prononcées.

L'analyse de la moelle osseuse (figure **5A**) montre que tous les groupes de souris greffées avec des cellules exprimant HOXB4 «wt» ou mutée reconstituent mieux l'organe que le groupe GFP (contrôle), dans des proportions de 75-90% vs 35-40% des cellules totales. L'étude de la différenciation cellulaire de ces populations exprimant HOXB4 «wt» ou muté indique qu'ils ont une différenciation myéloïde (figure **5B**) semblable à une souris normale quoiqu'un peu plus élevé chez le groupe de souris exprimant HOXB4 «wt» (45-55% et 60-70% respectivement) et qui de plus, présentent une très faible proportion de cellules B (<5%) comparativement aux autres groupes de souris greffées avec des cellules exprimant l'un ou l'autre des protéines mutées, entre 15 et 20% des cellules totales, se rapprochant de la proportion retrouvée dans une souris normale (18%) (figure **5C**). L'analyse de la rate (figure **5D**) révèle que les souris greffées avec des cellules exprimant HOXB4 mutée ont une rate reconstituée majoritairement de ces cellules (75-80%) mais pas le groupe où la population exprimant la protéine «wt» (<40%). Parmi ces cellules, la lignée myéloïde est représentée dans une proportion similaire à celle d'une souris normale, tout comme celles exprimant les protéines mutées, soit 7 à 10% (figure **5E**). La figure **5F** montre la difficulté

des cellules exprimant HOXB4 «wt» a reconstituer la lignée de cellules B (~10%) contrairement aux populations exprimant une protéine mutée (30-55%). Et finalement, aucun groupe de souris greffées avec des cellules modifiées n'a reconstitué la lignée T normalement malgré que celle-ci, des groupes souris surexprimant HOXB4 mutées, se rapprochent plus des proportions normales (5% vs 18% et 30% normalement) (figure **5G**).

10. EFFET SUR LES PROGÉNITEURS (CMP)

Cette étude consistait à injecter 3000 CMP purifiés et exprimant HOXB4 «wt»/GFP ou HOXB4 1426/GFP dans une souris létalement irradiée conjugué à 250 000 cellules de moelle osseuse fraîche à titre de cellules de soutien pour la greffe. Nous avons suivi le comportement *in vivo* de ces cellules modifiées d'abord dans le sang des souris. Seules les souris greffées avec les CMP exprimant la protéine «wt» ont des cellules provenant de ces progéniteurs dans le sang et ce, dans des proportions atteignant près de 40% après 2 semaines et même, 60% 5 semaines post-greffe (figure **6A**). Ensuite, la proportion de cellules exprimant la protéine «wt» diminue de plus en plus jusqu'à la fin de l'expérimentation et représente finalement environ 20% des cellules totales du sang. La différenciation cellulaire du sang montre que les cellules exprimant HOXB4 «wt» appartiennent majoritairement à la lignée myéloïde (70%) et qu'une petite proportion de cellules B est également présente, soit 10% (figure **6B**). Notons que la population de cellules T n'est aucunement représentée (résultat non montré mais évalué).

Les figures suivantes montrent l'analyse des organes hématopoïétiques, 10 semaines post-transplantation. La figure **6C** représente les proportions de cellules modifiées, HOXB4 «wt» ou muté, retrouvées dans la moelle osseuse et la rate des souris transplantées. Évidemment, les cellules exprimant la protéine mutée 1426 sont représentées en proportion quasi nulle (<1%), autant dans la moelle osseuse que dans la rate. Par contre, la moelle osseuse des souris greffées avec des cellules exprimant la protéine «wt» est reconstituée majoritairement de ces cellules (80%) et une plus petite proportion de ces cellules est présente dans la rate (30%). La figure **6D** présente l'étude de la différenciation cellulaire dans la moelle osseuse et indique que la lignée myéloïde est grandement représentée, soit près de 80%

des cellules exprimant HOXB4 «wt», et qu'environ 2% des cellules font partie de la lignée lymphoïde B. Quant à l'analyse de la rate, parmi les cellules exprimant la protéine «wt», environ 45% des cellules appartiennent à la lignée myéloïde et 5-10% des cellules constituent les cellules B (figure **6E**).

11. CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DES PROTÉINES HOXB4

La figure **7A** montre la présence intracellulaire de la protéine HOXB4, «wt» ou 1426, dans des cellules de moelle osseuse gardées 7 jours en culture liquide suite à l'infection par les GP+E86. Par immunofluorescence, où le noyau cellulaire est marqué par le DAPI (en bleu) et la présence du facteur de transcription HOXB4 «wt» ou 1426 est révélée par un anticorps primaire anti-HOXB4 et un anticorps secondaire anti-IgG couplé à un fluorochrome rouge (Texas Red), on observe une plus intense présence de couleur rouge dans les cellules exprimant la protéine mutée, se traduisant par une concentration intracellulaire plus élevée de la protéine mutée comparé à la protéine «wt».

Cette différence de concentration intracellulaire des protéines d'intérêt est aussi observée par «Western Blot» dans les cellules de moelle osseuse 20 semaines post-transplantation (figure **7B**). Cette étude impliquait préalablement le tri de 2 millions de cellules exprimant la protéine HOXB4 «wt» ou muté, d'où l'extraction protéique était effectuée. Trois bandes de protéines ont été révélées. La bande révélée à 25 KDa représente l'actine, protéine présente dans tous les types cellulaires et à des concentrations équivalentes, ce qui permet de confirmer que les différents extraits protéiques proviennent bel et bien d'une même quantité de cellules. La bande protéique révélée à 30 KDa marque la présence équivalente de la protéine GFP dans toutes les populations de cellules exprimant HOXB4. Finalement, la double bande représentant HOXB4 à 35 KDa, est beaucoup plus claire lorsque la protéine «wt» est révélée comparativement aux protéines HOXB4 mutée, qui semblent être 3 à 4 fois plus concentrées. Pour la même raison citée auparavant, la quantité relative de la protéine mutée 1427 n'a pas pu être obtenue.

12. MODULATION PROTÉIQUE INTRACELLULAIRE

Cette étude impliquait la standardisation de la concentration intracellulaire des différentes protéines HOXB4 à un niveau similaire retrouvé dans les cellules exprimant la protéine «wt». Dans le cadre de cette étude, seule la protéine mutée 1426 a été étudiée. Puisque la demi-vie de cette protéine mutée est 2.5 fois augmentée, une des alternatives permettant la réduction de la quantité initiale de protéine intracellulaire était la modulation de l'expression par la réduction du nombre d'intégration du gène exprimant la protéine d'intérêt opéré par l'infection virale. C'est ainsi que la période d'exposition des cellules de moelle osseuse aux cellules productrices de virus codant pour la protéine mutée HOXB4/1426 a été réduite à quelques heures (14) pour atteindre une concentration intracellulaire similaire de la protéine mutée à la protéine «wt» dont les cellules étaient exposées pendant 48 heures et ce, autant à basse («low») qu'à haute concentration («high») (figure **8A**).

C'est ainsi que 25 000 cellules exprimant HOXB4/1426, exposées aux GP+E86 pendant 14 heures, ou HOXB4 «wt», exposées pendant 48 heures, et triées selon leur concentration en GFP et conséquemment sur la concentration du facteur de transcription («low» et «high»), additionnées de 225 000 cellules non transformées, ont été injectées dans les mêmes conditions que les autres expériences.

L'analyse du sang de ces souris, prélevées à toutes les 2 semaines, a révélé que les groupes greffées avec des cellules exprimant la protéine mutée, «low» ou «high», repopulaient en moins d'une semaine le sang et dans des proportions plus élevées (25 à 50%) que les proportions cellulaires de 15-25% retrouvées chez les souris greffées avec les populations de cellules exprimant la protéine «wt» (figure **8B**). De plus, la figure **8C** montre que ces dernières populations de cellules présentent un profil de différenciation similaire à celui obtenu dans les expériences antérieures, soit une forte proportion de cellules myéloïdes (près de 50%) et des proportions réduites de cellules lymphoïdes B (35-40%) et T (3-4%). Les deux groupes de souris ayant reçu des cellules exprimant la protéine 1426 ont encore, quant à eux, des proportions similaires à une souris non transplantée (voir figure **4A**) où le sang est composé de 25-30% de cellules myéloïdes, de 45-55% de lymphocytes B et de 10-12% de lymphocytes T.

La composition de la moelle osseuse a été analysée 20 semaines post-transplantation et a montré que les cellules exprimant une ou l'autre des

protéines HOXB4, autant en faible qu'en forte concentration, représentaient une proportion de 50 à 65% des cellules totales (figure **8D**). De plus, la figure **8E** montre qu'une forte concentration intracellulaire des protéines «wt» et 1426 mène à la production d'une plus grande quantité de cellules myéloïdes (50%) et une quantité moindre de cellules B (10-12%) comparativement aux proportions myéloïde de 30-35% et lymphoïde de 25% retrouvées chez les souris greffées avec les populations cellulaires «low». L'analyse de la rate (figure **8F**) a démontré pour sa part que les cellules exprimant la protéine «wt» à de fortes concentrations ne reconstituaient pas aussi bien la rate que les autres populations, où les proportions sont de 15% vs 35-40% respectivement. La figure **8G** montre, quant à elle, l'incapacité de ces cellules à bien reconstitué la lignée lymphoïde où moins de 30% représente les cellules B et 5% les cellules T (vs 50-60% et 17-20% respectivement pour les autres populations cellulaires exprimant HOXB4).

FIGURES

Figure 1 Prolifération des cellules de moelle osseuse transformées exprimant la GFP seulement ou les protéines HOXB4 «wt»/YFP ou muté/GFP en compétition, en culture *in vitro* et évaluation de la présence intracellulaire de la protéine dans chaque population

L'expansion de chaque population a été observée par FACS via la protéine GFP, pour le groupe contrôle et ceux des mutants HOXB4, ou par la protéine YFP, pour le groupe HOXB4 «wt», à tous les 2 jours durant une période de 18 jours.

Les cellules exprimant la protéine HOXB4 «wt» ont un plus grand pouvoir prolifératif que les cellules exprimant exclusivement la protéine fluorescente (A). L'expansion des cellules surexprimant la protéine mutée 1427 est similaire à celles de la population HOXB4 «wt» et ce, autant en terme de proportion cellulaire que de temps (B). Les cellules exprimant la protéine HOXB4 1423 se multiplient plus rapidement et engendrent une plus grande quantité de cellules, toujours comparé à la population HOXB4 «wt» (C). À l'instar de celles-ci, les cellules surexprimant la protéine mutée 1426 produisent une plus grande quantité de cellules mais tardent à se multiplier (D). L'analyse de l'expression de HOXB4 par «Western Blot», dans les populations cellulaires individuellement triées suite à 18 jours de culture, révèle d'abord la présence de la protéine HOXB4 dans toutes les populations par une double bande typique à 35 KDa (E). Les protéines mutées HOXB4 1423 et 1426 sont 3 à 4 fois plus concentrées que la protéine «wt» (ratio effectué avec la bande d'actine). La faible bande révélée par la protéine 1427 n'est pas représentative puisque la mutation dans cette protéine se retrouve dans le site de reconnaissance de l'anticorps.

Figure 1

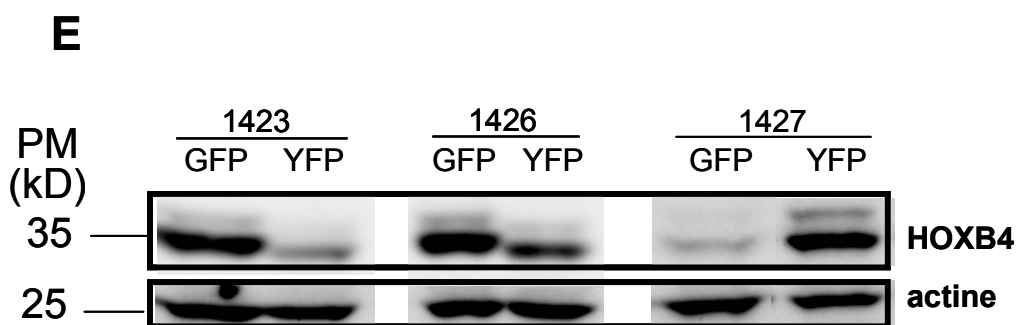
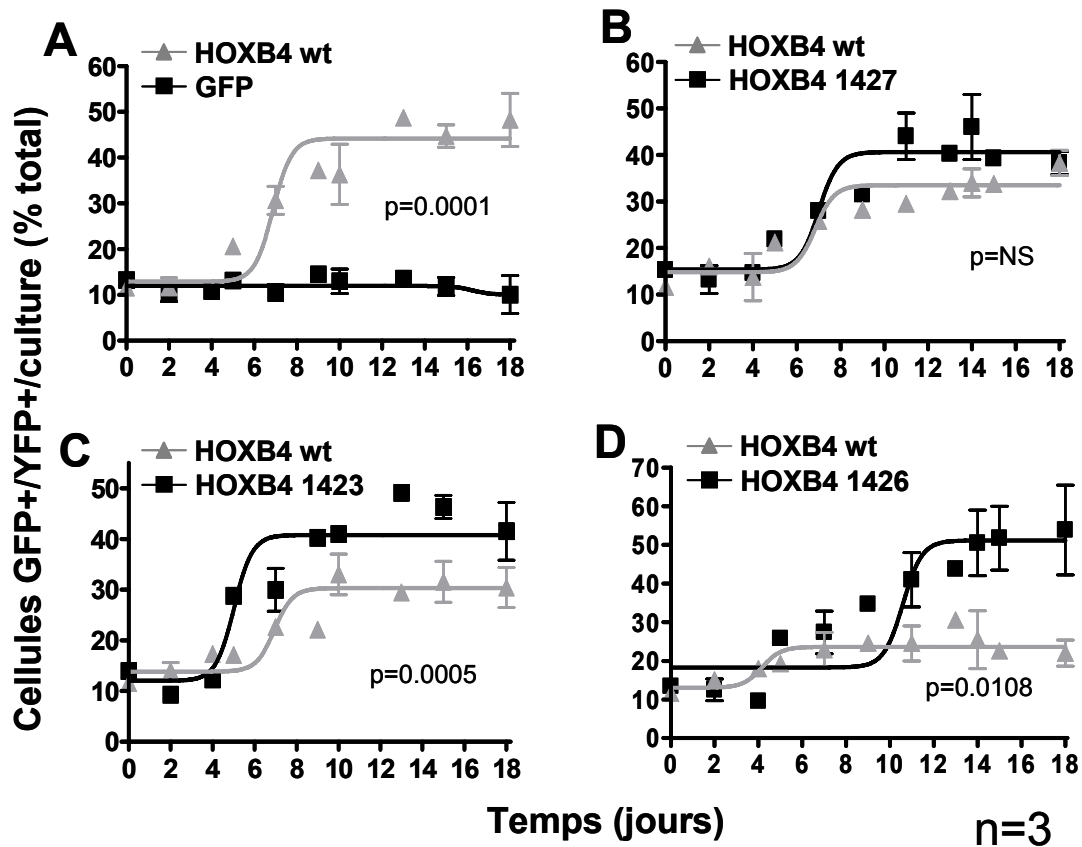


Figure 2 Contribution de chaque population cellulaire surexprimant HOXB4, «wt» ou muté, à la repopulation hématopoïétique d'une souris en essai de compétition

À 16 semaines post transplantation, l'analyse de la moelle osseuse, de la rate et du sang démontrent que les cellules surexprimant HOXB4 «wt» contribuent davantage à la reconstitution de l'organisme comparé à toutes les autres populations de cellules exprimant les protéines mutées ou la GFP. Dans un premier temps, les cellules exprimant la GFP seulement ne sont guère présentes dans tous les organes, 2, 5% et 8% des cellules totales représentent les proportions cellulaires pour la moelle osseuse, la rate et le sang respectivement.

La moelle osseuse est composée principalement de cellules exprimant HOXB4 «wt», entre 65 et 70% des cellules totales, tandis que les cellules exprimant les protéines mutées représentent une proportion cellulaire de 5 - 10% (A). Des résultats similaires sont obtenus lorsqu'on analyse la rate. Toutes les populations de cellules exprimant une protéine mutée sont retrouvées en plus petite proportion cellulaire que les cellules surexprimant HOXB4 «wt» (20-25% et 40%, respectivement) (B). Finalement, l'analyse du sang ne montre aucune différence significative entre les deux populations (HOXB4 «wt» vs muté) qui sont retrouvées en proportion similaire, entre 50%-60% (C).

Figure 2

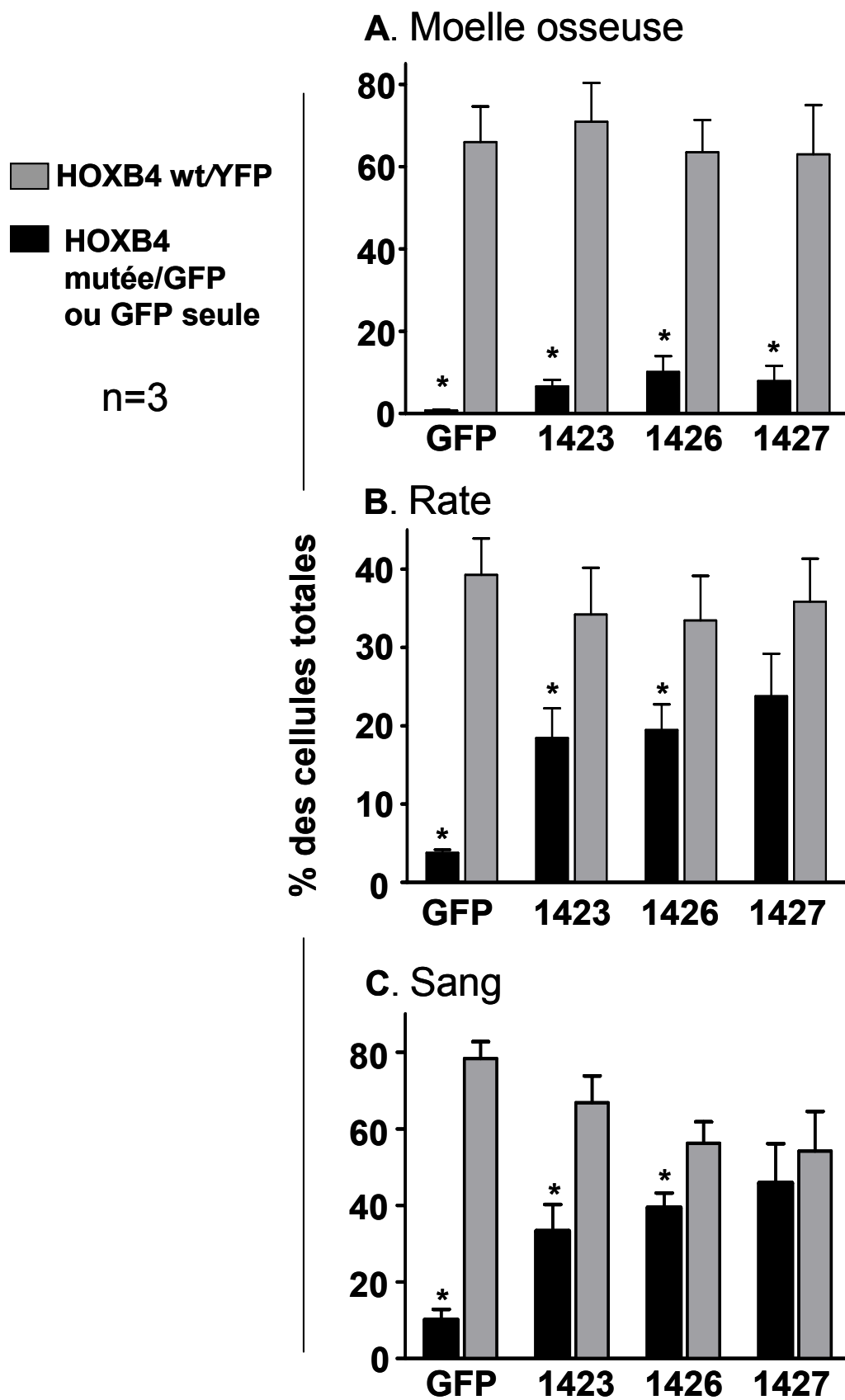


Figure 3 Repopulation du sang des souris suite à une greffe de cellules modifiées exprimant HOXB4 «wt» ou muté dans un essai non compétitif

L'analyse du sang prélevé toutes les semaines des souris greffées en non compétition démontre que les cellules surexprimant une protéine HOXB4 mutée le repopule mieux, 60-75% des cellules totales vs 45% pour le groupe de souris greffées avec des cellules exprimant HOXB4 «wt»; que la production de cellules matures du sang exprimant l'une ou l'autre des protéines mutées est hautement maintenue et stable jusqu'à la fin de l'expérimentation (*, **, *** $0.0005 \leq p < 0.005$); et finalement, que ces cellules apparaissent plus rapidement dans le sang c'est-à-dire moins d'une semaine comparativement à deux semaines pour le groupe HOXB4 «wt».

Figure 3

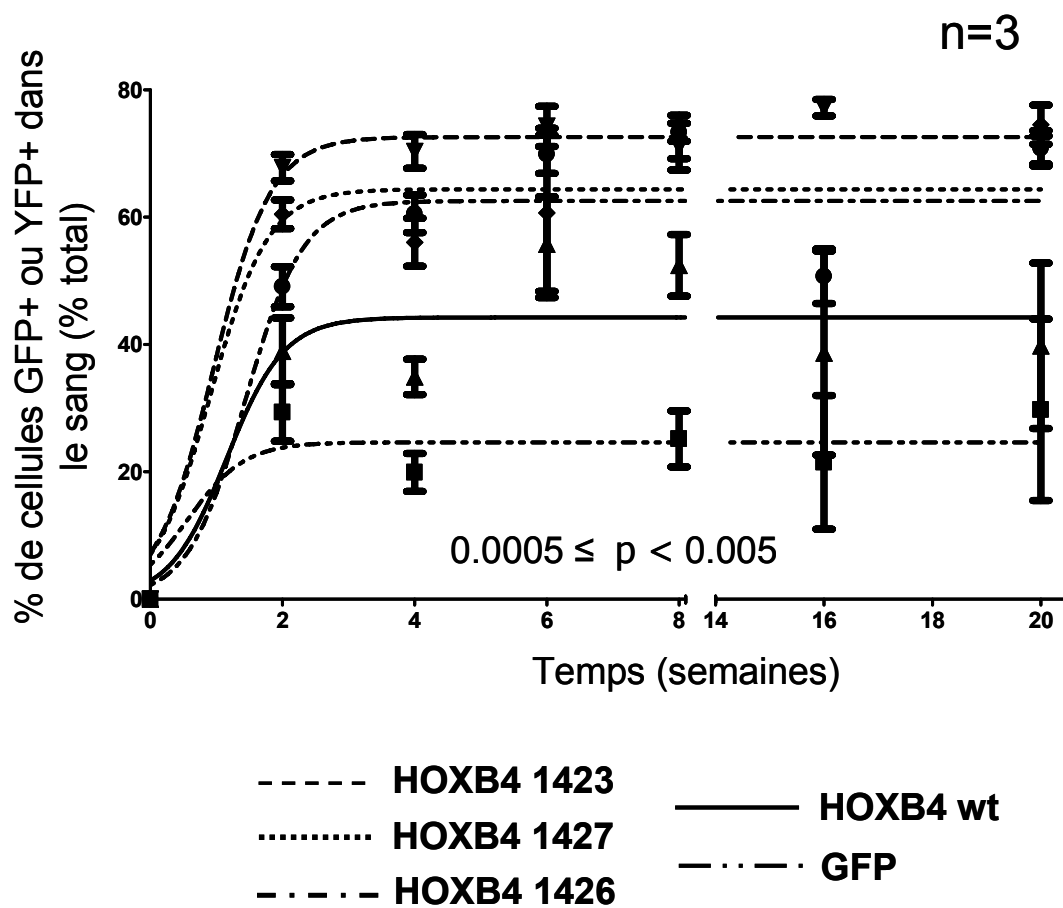
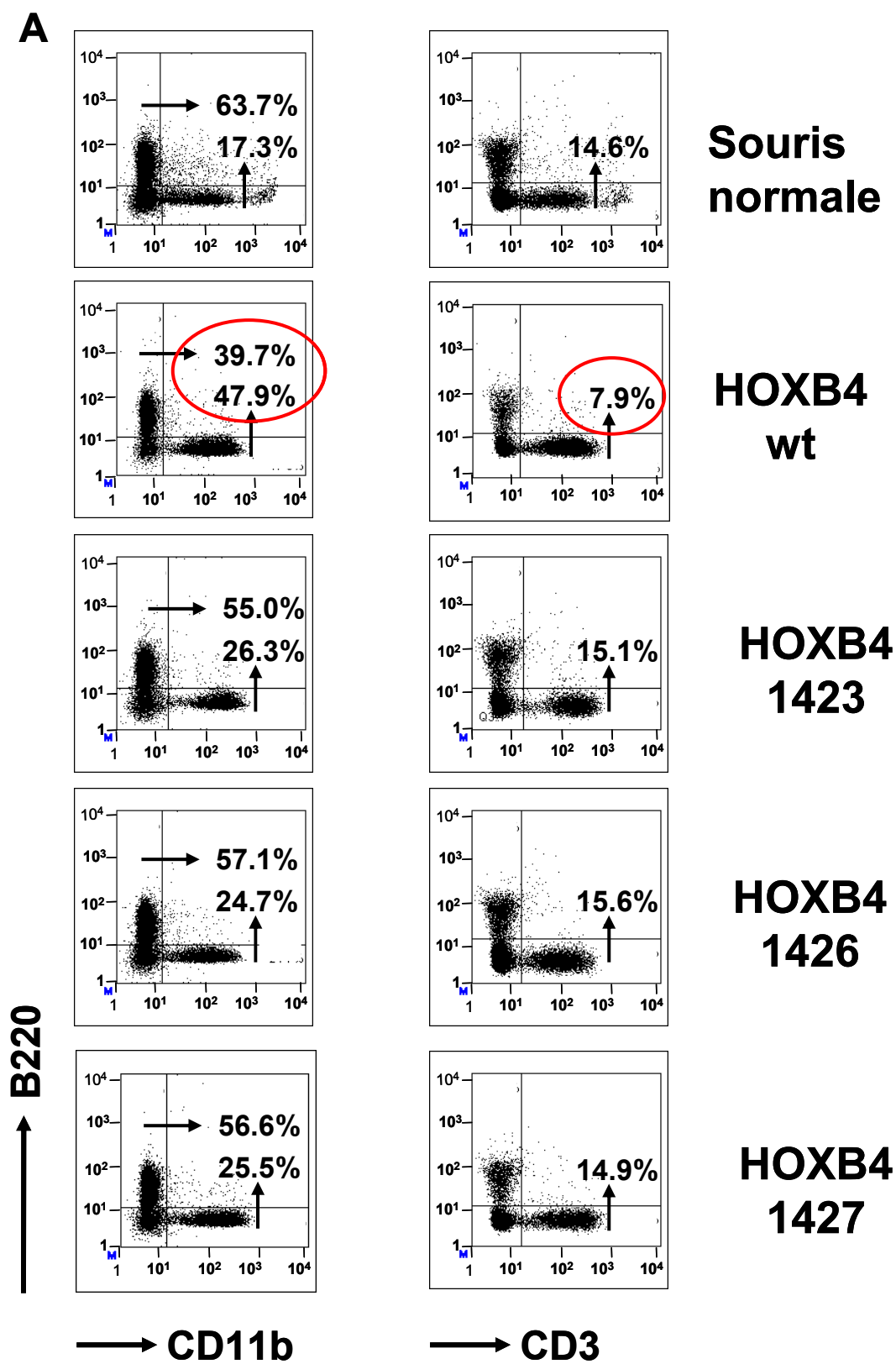


Figure 4 Diversification leucocytaire du sang des souris suite à une greffe de cellules modifiées exprimant HOXB4 «wt» ou muté

Nous avons étudié la différenciation myéloïde, à l'aide du marqueur CD11b, et la différenciation lymphoïde, avec B220 pour la lignée B et CD3 pour la lignée T, des cellules du sang parmi les populations de cellules transformées (HOXB4 «wt» ou muté).

L'analyse du sang des souris, représenté ici par des profils de FACS typiques à 14 semaines, du groupe ayant reçu des cellules exprimant la protéine «wt» démontre qu'une proportion démesurée de ces cellules appartient à la lignée myéloïde (47.9%) et que les cellules lymphoïdes ont des proportions anormalement basses comparativement à une souris normale (39.7% et 7.9% pour les lignées B et T respectivement). Quant aux souris transplantées avec des cellules exprimant les protéines mutées, leurs proportions de cellules myéloïdes (~25%) et lymphoïdes B (55-57%) sont comparables à celles d'une souris non greffée qui présente normalement des proportions cellulaires myéloïde de 17.3%, lymphoïde B de 63.7% et lymphoïde T de 14.6% (A). Les proportions cellulaires des différentes lignées obtenues à 20 semaines post-transplantation, représentées schématiquement, démontrent les mêmes observations que celles visualisées auparavant (B). (* $p < 0.0001$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.01$)

Figure 4



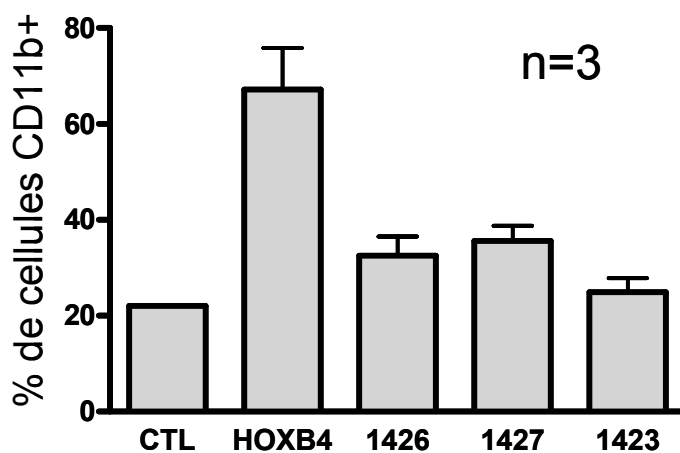
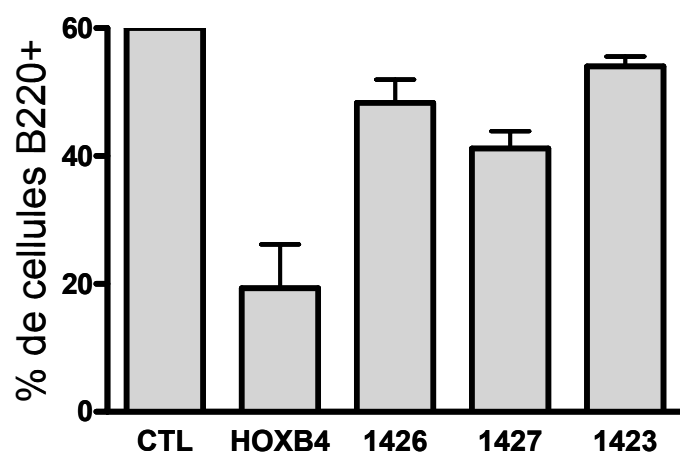
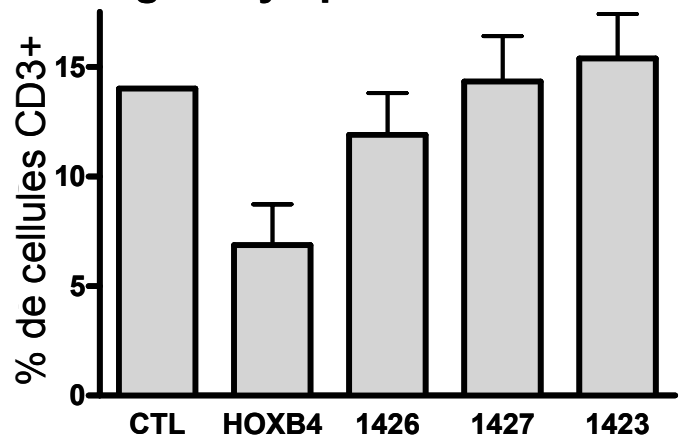
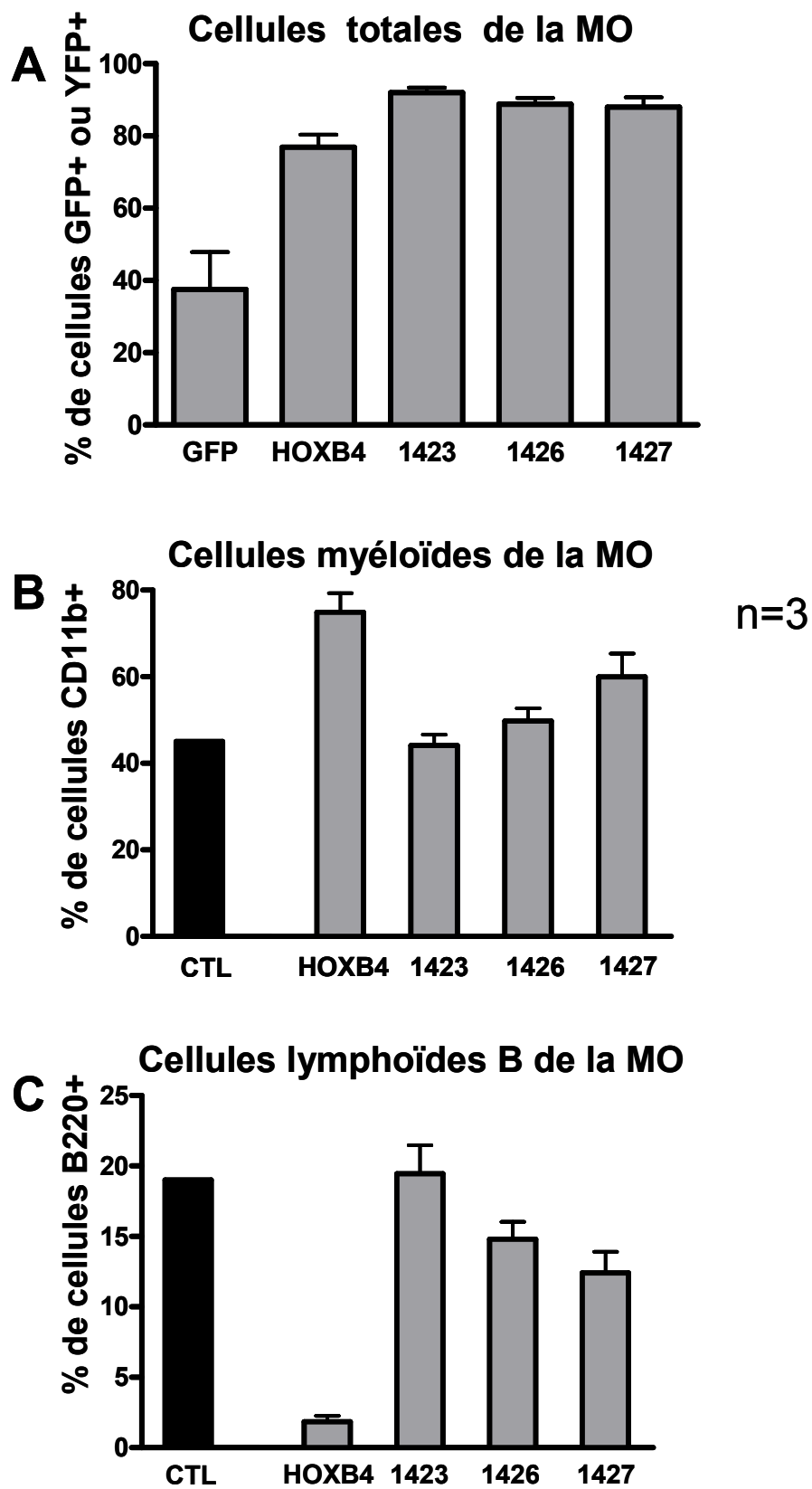
B.**Lignée myéloïde****Lignée lymphoïde B****Lignée lymphoïde T**

Figure 5 Reconstitution des organes hématopoïétiques (moelle osseuse et rate) par les cellules exprimant HOXB4 «wt»/GFP ou HOXB4 muté/GFP à 20 semaines post transplantation dans un essai de repopulation non compétitif et évaluation de l'expression de la protéine HOXB4 dans les cellules de moelle osseuse

Les cellules exprimant HOXB4 «wt» ainsi que celles exprimant les protéines mutées repopulent également bien et à de hautes proportions (80-90%) la moelle osseuse des souris contrairement aux souris greffées avec des cellules exprimant la GFP seulement (35-40%) (A). La proportion de cellules myéloïdes de tous les groupes est comparable à une souris normale (45-50%) quoiqu'un peu plus élevée pour le groupe HOXB4 «wt» (60-70% et 45-55% pour les groupes HOXB4 mutés) (B). Quant à la proportion de cellules B, elle est significativement plus élevée et se rapproche plus du taux normal chez les souris transplantées avec les cellules surexprimant HOXB4 muté (15-20%) que celles exprimant HOXB4 «wt» (<5%) (C). Des analyses semblables dans la rate ont révélé que le niveau de reconstitution de cet organe des souris transplantées avec les cellules surexprimant l'une des protéines mutées est beaucoup plus élevé comparativement au groupe HOXB4 «wt» et encore davantage par rapport au groupe GFP (65-80%, 40% et 22% respectivement) (D). Les proportions de cellules myéloïdes dans la rate des groupes de souris ayant reçu des cellules surexprimant HOXB4, «wt» ou muté, est comparable, avec moins de 10% des cellules totales, à celle retrouvée chez une souris normale (E). La reconstitution de la lignée B chez les souris des groupes HOXB4 muté, de 45 à 50%, est identique au niveau de cellules B retrouvé dans une souris normale mais fortement réduit chez les souris HOXB4 «wt» (8-20%) (F). La reconstitution du compartiment des cellules T par les différents groupes n'a pas égalé celui d'une souris normale (30%) mais on retrouve plus de cellules T chez les souris transplantées avec des cellules exprimant les protéines mutées (12-17%) que chez le groupe HOXB4 «wt» (5%) (G).

Figure 5



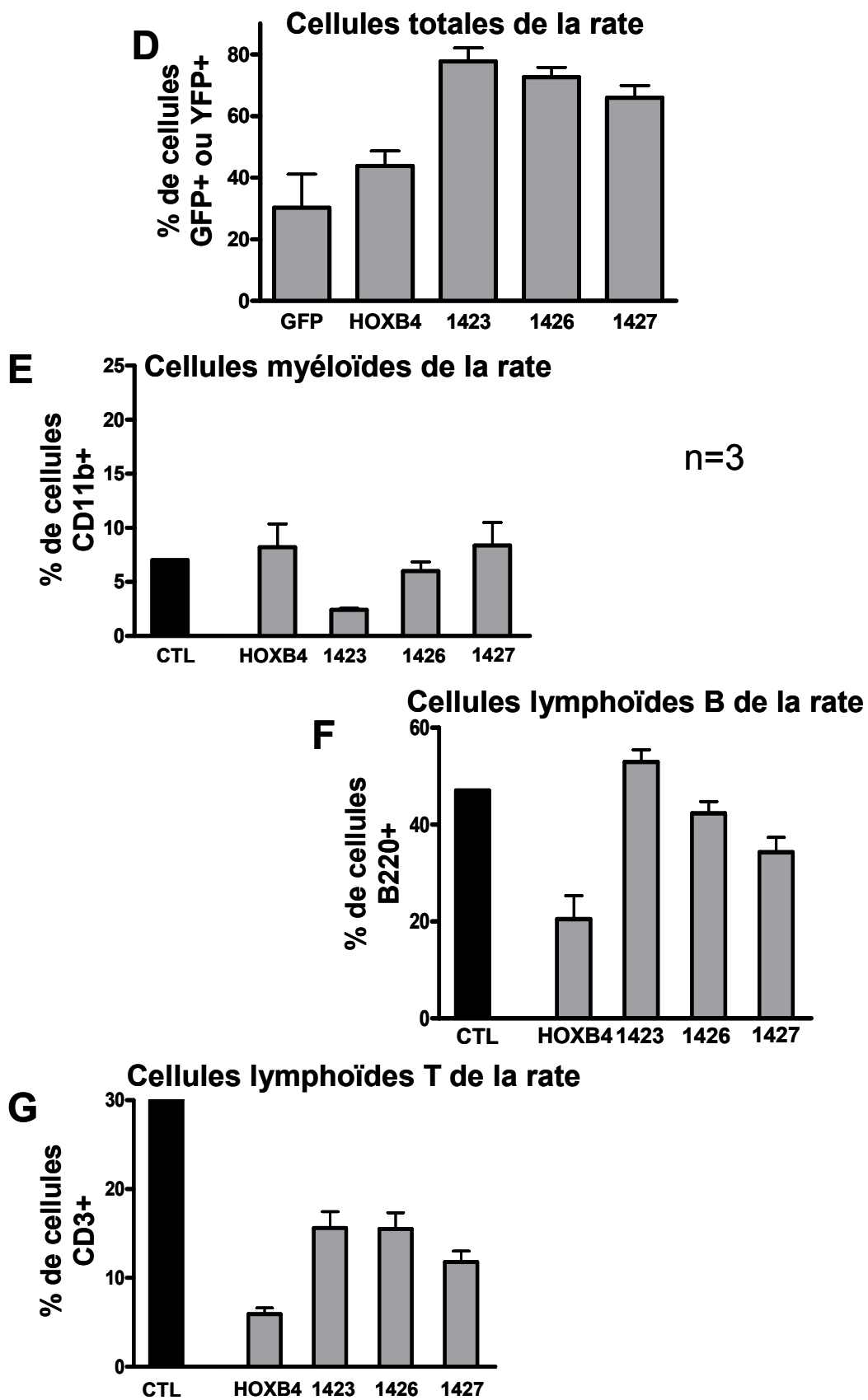
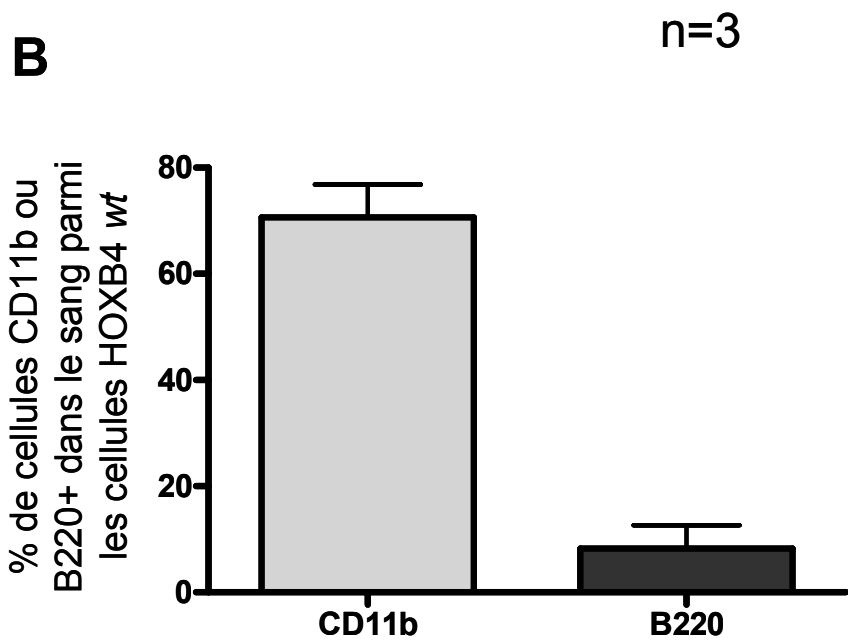
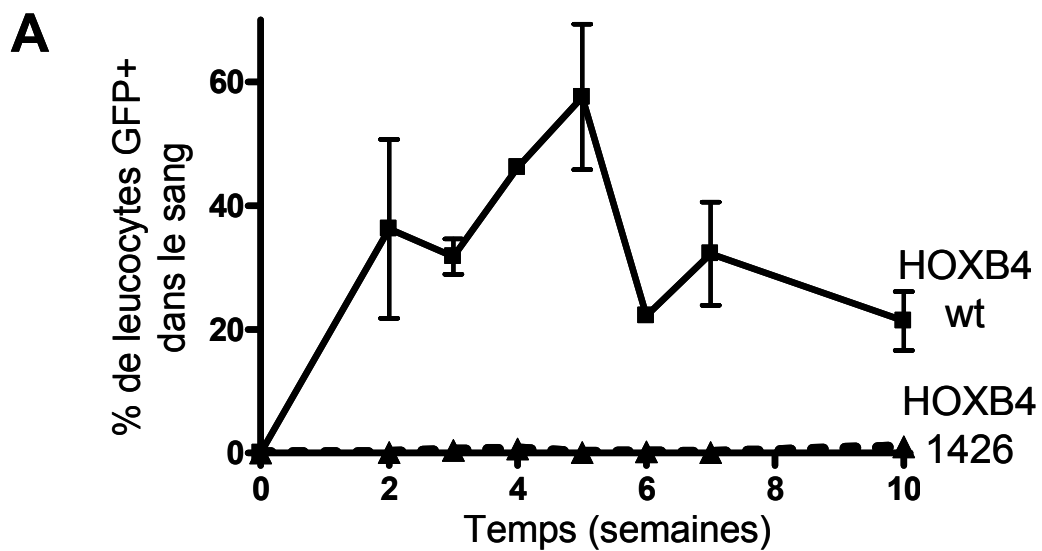


Figure 6 Effet de l'expression de la protéine HOXB4 «wt» ou HOXB4 muté 1426 dans des progéniteurs myéloïdes (CMP) sur la repopulation du sang, la différenciation cellulaire ainsi que sur la reconstitution des organes hématopoïétiques

Le sang prélevé à chaque semaine a démontré que seules les souris greffées avec des CMP exprimant la protéine HOXB4 «wt» avait des cellules descendantes (GFP+) qui circulaient dans le sang et ce, du début jusqu'à la fin de l'expérimentation (10 semaines), et qui diminuent de plus en plus en proportion, de 60% à 25%, dans le temps (A). La différenciation cellulaire du sang a montré, quant à elle, que la majorité des cellules exprimant HOXB4 «wt»/GFP sont des cellules myéloïdes (70-80%) et que les cellules B représentent une proportion cellulaire non négligeable de 10-15% (B). Finalement, l'analyse des organes des souris ayant des cellules HOXB4 «wt»/GFP dans le sang démontre qu'une grande proportion, soit 80%, des cellules exprime la protéine HOXB4 «wt» dans la moelle osseuse et seulement 25-30% dans la rate (C). Une grande proportion de ces cellules sont myéloïdes, 80% et 45% dans la moelle osseuse et la rate, mais une petite proportion de cellules B est aussi présente dans les deux organes (2-3% et 7-8% respectivement) (D-E).

Figure 6



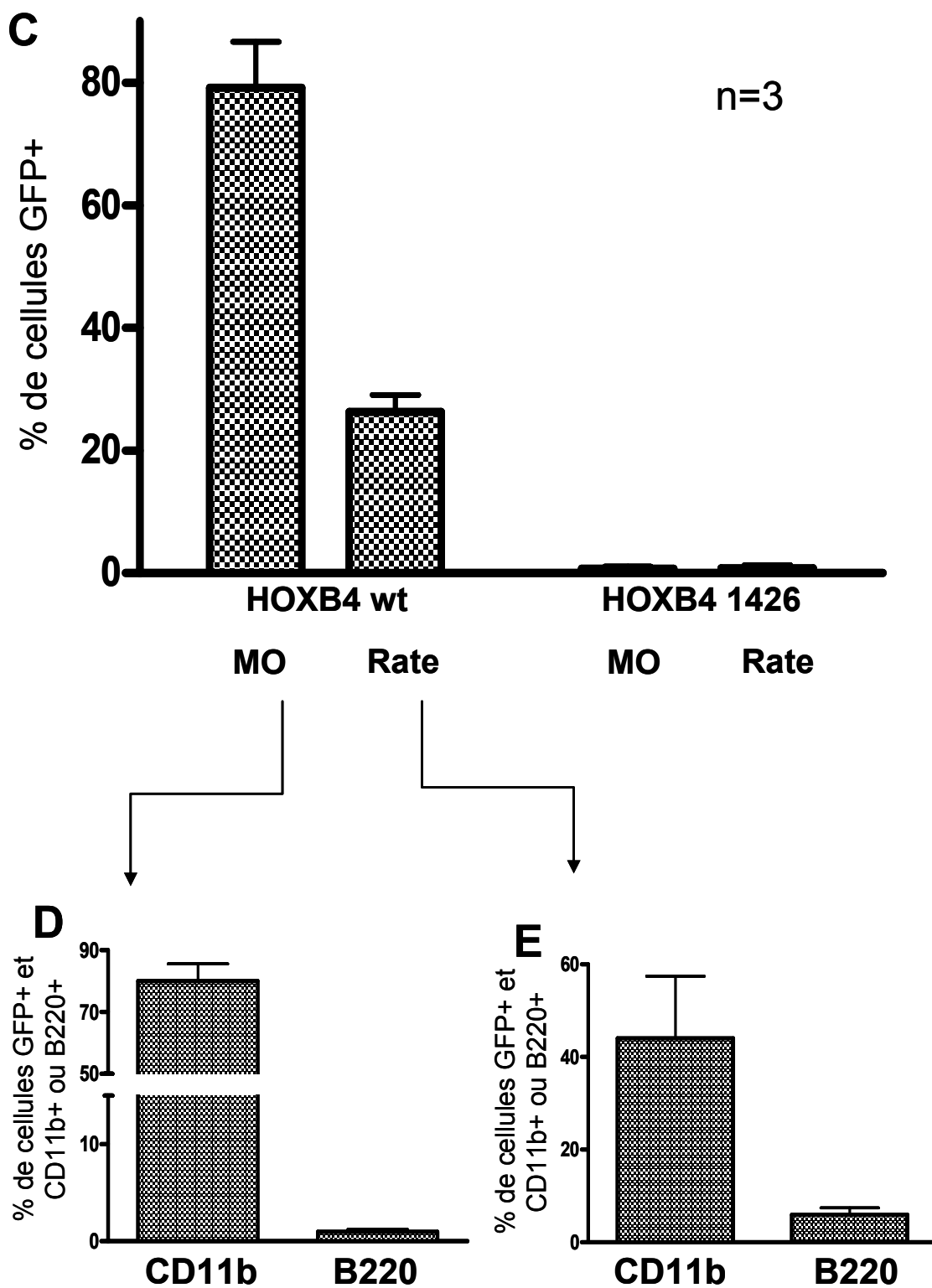
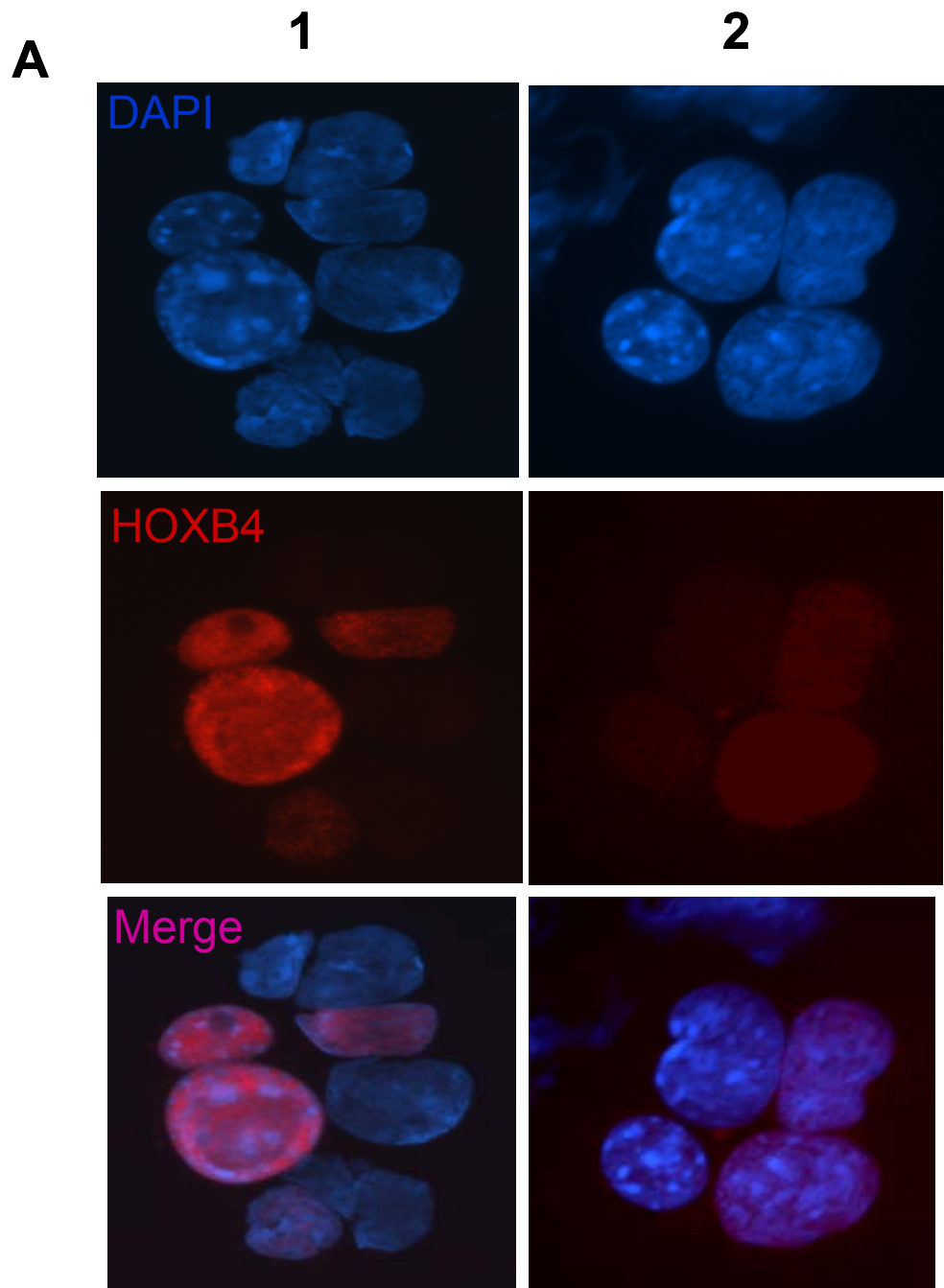


Figure 7 Expression de la protéine HOXB4 dans des cellules de la moelle osseuse, en culture liquide *in vitro* ainsi qu'à 20 semaines post transplantation

L'immunofluorescence des cellules gardées en culture *in vitro* démontre clairement que celles exprimant la protéine HOXB4 1426 ont une plus forte concentration intracellulaire, et même intranucléaire de la protéine comparativement aux cellules exprimant HOXB4 «wt». (bleu = DAPI et rouge = anti-HOXB4). La figure 7B montre la concentration intracellulaire de HOXB4 «wt» ou mutée effectués par «Western Blot» avec une extraction de protéines via la protéine GFP (exprimant conséquemment HOXB4) de souris greffées 20 semaines auparavant. Cette figure indique qu'à concentration similaire de protéine fluorescente (GFP), la protéine HOXB4 «wt» est à beaucoup plus basse concentration cellulaire, de 3 à 4 fois, que les protéines mutées 1423 et 1426. La protéine HOXB4 1427 n'a pu être révélée pour la même raison citée auparavant.

Figure 7



1=cellules exprimant HOXB4 muté 1426
2=cellules exprimant HOXB4 wt

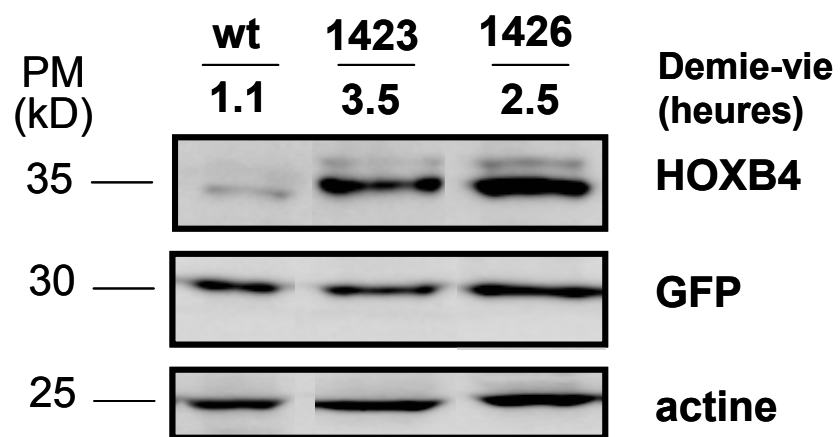
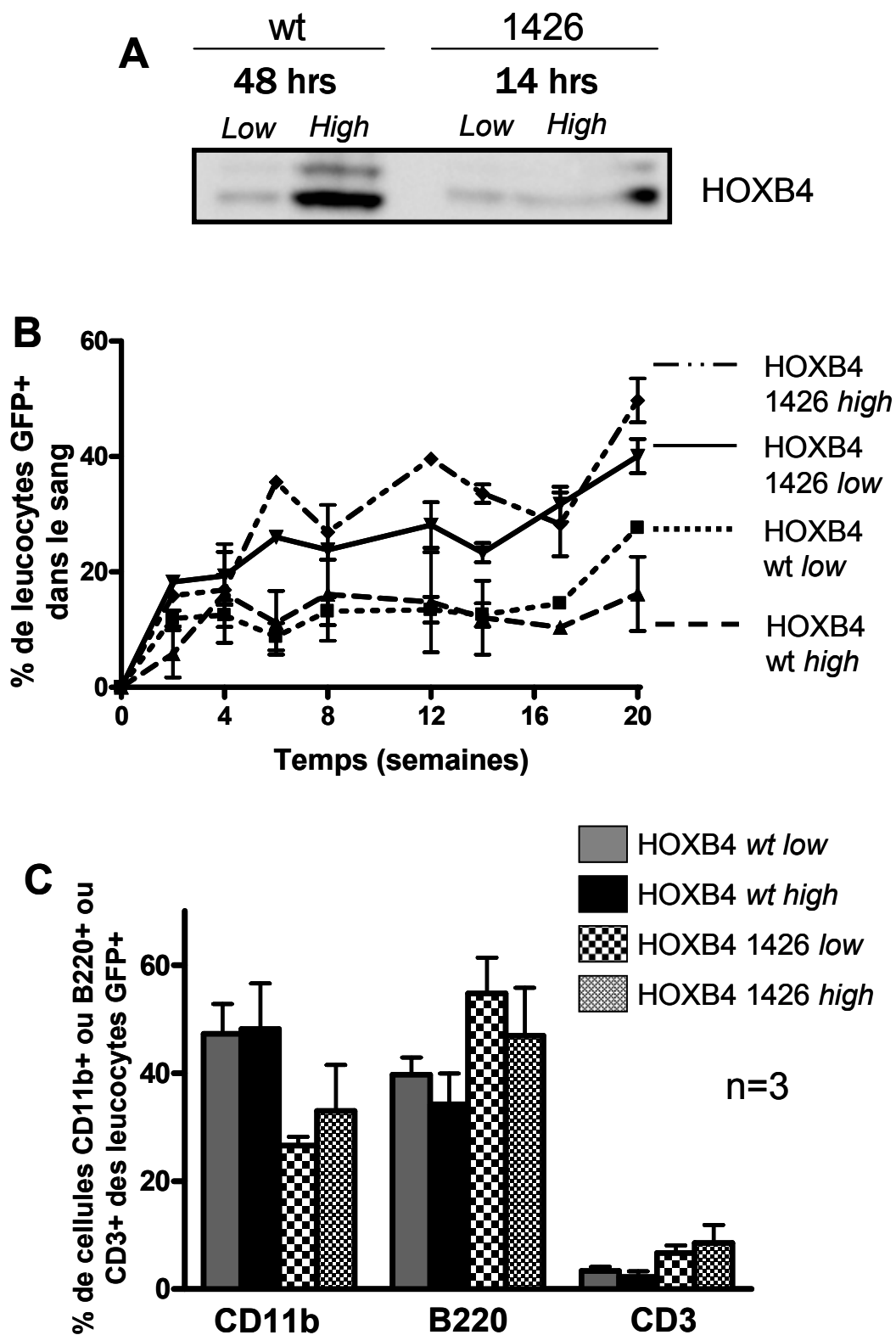
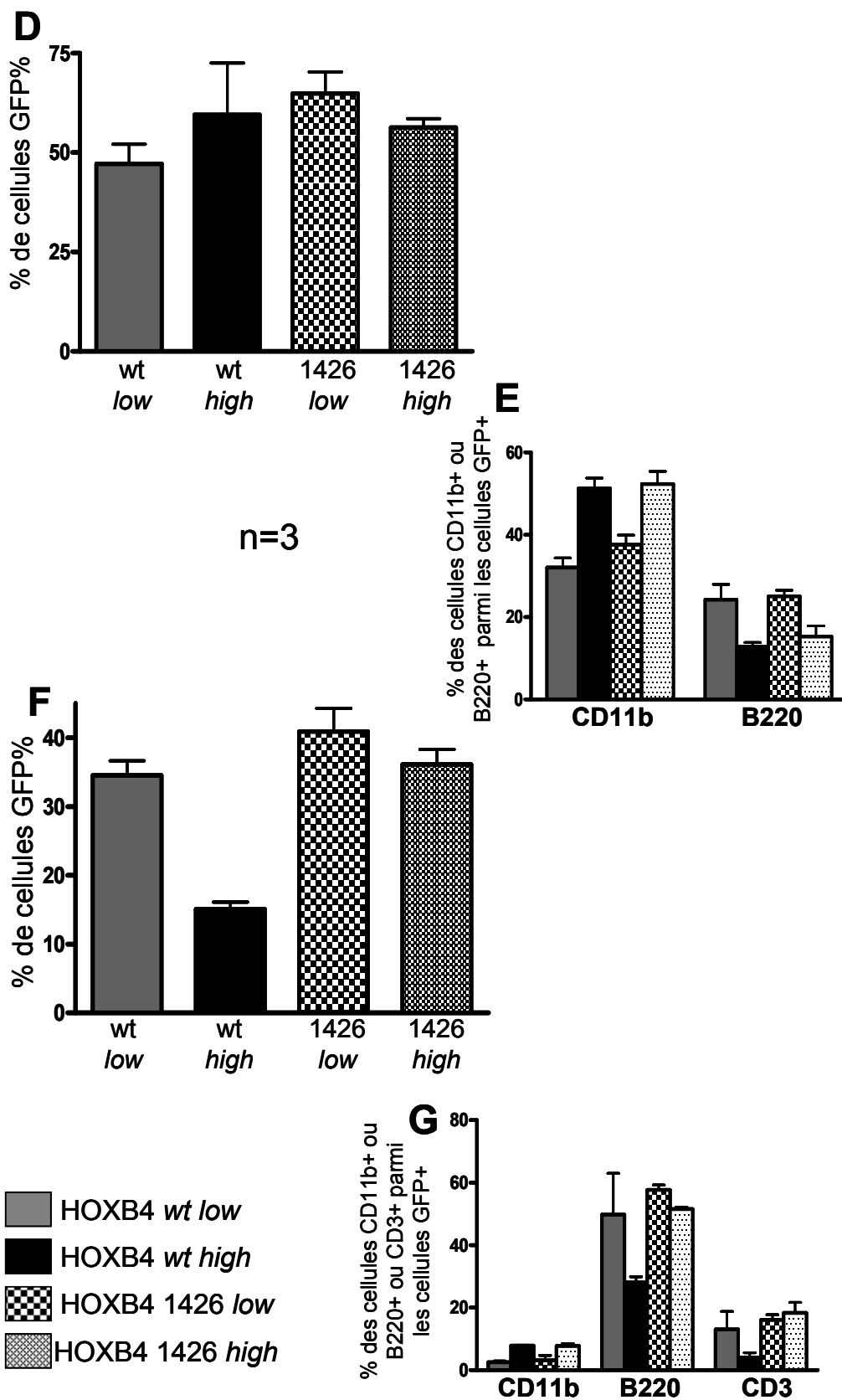
B.

Figure 8 Effet de la standardisation de l'expression de la protéine HOXB4, «wt» ou muté, sur la repopulation et la différenciation hématopoïétiques

La période d'exposition des cellules de moelle osseuse aux cellules productrices de virus codant pour la protéine mutée HOXB4/1426 a été réduite à quelques heures (14) pour atteindre la concentration intracellulaire de la protéine «wt» dont les cellules étaient exposées pendant 48 heures (A). L'analyse du sang démontre que les cellules exprimant HOXB4/1426 apparaissent plus rapidement dans le sang et en proportion plus élevée, 30-50% comparativement à une proportion de 15-20% pour celles exprimant la protéine «wt» (B). La distribution dans les différentes lignées des cellules sanguines exprimant HOXB4/1426 «low» ou «high» est similaire à la différenciation cellulaire retrouvée chez une souris normale (voir figure. 4A, souris non transplantée), où 25% des cellules appartiennent à la lignée myéloïde, 50-55% à la lignée B et 10-12% à la lignée T tandis que les cellules exprimant HOXB4 «wt» ont une proportion plus élevée de cellules myéloïdes (45-50%) et moins élevées de cellules B (35-40%) et de T (6-7%) (C). Finalement, l'analyse de la moelle osseuse des souris démontre que toutes les populations repopulent également bien le pool de cellules totales (50-65%) (D). De plus, les souris transplantées avec la population de cellules présentant une concentration intracellulaire élevée («high») de la protéine HOXB4 «wt» ou 1426 ont des profils de différenciation semblable, soit une forte proportion de cellules myéloïdes (50%) et une plus faible population de cellules B (10-15%) comparativement aux souris ayant reçu des cellules contenant peu des protéines HOXB4, où elles ont des proportions de 35-40% de cellules myéloïdes et 10-12% de cellules B (E). En ce qui concerne la rate, seules les souris greffées avec la population «high» de cellules exprimant la protéine «wt» reconstituent beaucoup moins bien l'organe, 15% vs 35-41% pour les autres groupes (F). En plus, ce même groupe a un profil de différenciation lymphoïde très différent des trois autres c'est-à-dire que ces souris possèdent moins de cellules B (25%) et de cellules T (5%) comparativement à que l'on retrouve chez les autres groupes de souris (50-60% et 15-20% respectivement) (G). La lignée myéloïde est représentée également par tous les groupes.

Figure 8





DISCUSSION

En gardant toujours en tête l'ultime but d'engendrer l'expansion des CSH *ex vivo* avec HOXB4, la substitution d'un seul acide aminé dans la protéine augmentant la demi-vie de celle-ci s'avérait être une ingénieuse solution pour pallier l'obstacle majeur du facteur de transcription qu'est sa très courte demi-vie intracellulaire (1.1 heures) et extracellulaire (3 heures). Il fallait cependant définir l'effet de la mutation sur l'activité biologique intrinsèque de la protéine, particulièrement en ce qui a trait à l'expansion des CSH.

Ces études ont permis de déterminer l'effet des protéines HOXB4 mutées non seulement sur les CSH mais aussi sur d'autres populations hématopoïétiques, tout aussi importantes. À l'exception de l'étude sur les CMP, toutes les études nous ont donné plus d'informations sur le comportement des CSH, exprimant ou non la protéine HOXB4 «wt» ou mutée. L'étude des CMP nous a permis de déterminer l'effet des protéines HOXB4 «wt» ou mutée (1426) sur une population plus mature mais toujours multipotente que les CSH. Nous avons aussi déterminé l'importance que la concentration intracellulaire de la protéine revêt dans son comportement face aux CSH et aux autres cellules hématopoïétiques. Et à travers toutes ces expériences, l'étude de la différenciation cellulaire des cellules exprimant HOXB4 «wt» ou mutée a soulevé un autre aspect important quant à la protéine exprimée.

13. EFFET DE LA PRESSION DE COMPÉTITION SUR LES CSH

D'abord, nous avons observé le rythme de prolifération et le type de différenciation cellulaire des cellules exprimant l'une ou l'autre des protéines HOXB4 en culture *in vitro*. La présence de cellules contrôles exprimant la GFP seulement était d'une importance capitale puisque ces cellules nous révélaient le taux habituel de division et de différenciation cellulaire d'une cellule normale, ne possédant pas d'avantage de croissance (i.e. HOXB4). Évidemment, ces cellules ne produisent pas de grandes quantités cellulaires puisqu'elles prolifèrent normalement sans stimulation supplémentaire, probablement au même rythme que les cellules non modifiées. À l'inverse, les cellules exprimant une des protéines HOXB4 sont toujours retrouvées en proportions supérieures à celle de départ. Ceci nous confirmait, dans un premier temps, l'avantage de multiplication conféré par HOXB4, «wt» ou muté, sur les cellules de la moelle osseuse, caractéristique déjà attribuée auparavant. Ces résultats nous ont également indiqué que les protéines

mutées (2 des 3) favorisaient davantage la multiplication cellulaire des cellules qui les expriment, en culture *in vitro*, que la protéine «wt». Il est certain que l'expression constitutive d'un facteur de transcription comme HOXB4 induit indirectement l'activation constante de plusieurs processus intracellulaires difficilement identifiables, dans ce cas-ci puisque les gènes activés par la protéine ne sont pas connus. Par contre, les cellules exprimant les protéines HOXB4 sont probablement dans un état actif perpétuel au niveau moléculaire, même en absence de signaux extracellulaires, ce qui semble être indiqué par les résultats obtenus ci-haut, et que cette activation est directement reliée à l'augmentation de la croissance de ces cellules. La protéine HOXB4 procure définitivement un avantage de croissance aux cellules qui l'expriment et cette propriété semble encore plus prononcée lorsque la protéine est mutée (HOXB4 1423 et 1426).

Les études *in vivo* de reconstitution à long terme ont exposé, quant à elles, l'ampleur de l'effet de l'expansion des CSH par HOXB4 «wt» dans le sang, la rate et plus clairement dans la moelle osseuse.

Le contenu cellulaire de celle-ci est presque entièrement composé de cellules exprimant HOXB4 «wt». Le pool de CSH exprimant la protéine «wt» est plus élevé, considérant le fait établi que HOXB4 «wt» promouvoit l'expansion des CSH *in vivo*, ce qui en d'autres termes signifie l'augmentation du nombre de cellules mères qui donnent naissance à des cellules progénitrices et qui nécessairement contribue directement à l'augmentation du nombre de cellules plus matures, que l'on détecte. Ce que nous avons pu constater par les proportions démesurément élevées de cellules exprimant HOXB4 «wt» dans la moelle osseuse. Les cellules exprimant une des protéines mutées repopulent peu la moelle osseuse mais légèrement plus que les cellules contrôles, indiquant que les protéines mutées n'ont pas perdu complètement leur pouvoir d'expansion des CSH, quoique grandement diminué.

Cependant, les cellules exprimant HOXB4 mutée reconstituent mieux la rate et le sang, où l'on y retrouve des cellules considérées plus matures que dans la moelle osseuse.

Si l'on considère le ratio cellules de la rate ou du sang (cellules plus mature)/cellules de la moelle osseuse (cellules plus primitives), on en conclut que les CSH exprimant HOXB4 «wt» pourraient générer beaucoup de cellules dites plus primitives dont les LT-HSC, les ST-HSC, les progéniteurs pluripotents et multipotents (moelle osseuse). Le même «système», encore

méconnu, déclenché par HOXB4 pour promouvoir l'expansion des CSH au détriment de la différenciation peut potentiellement s'appliquer à toutes les cellules considérées primitives. Les cellules exprimant HOXB4 «wt» produiraient incidemment moins de cellules progénitrices différenciées et moins de cellules matures, ce qui est révélé, dans cette étude, par des proportions cellulaires décevantes dans la rate et le sang (moins de cellules matures) considérant les proportions aberrantes retrouvées dans la moelle osseuse (beaucoup de cellules plus immatures). Les protéines mutées semblent, quant à elles, détenir un nouveau pouvoir prolifératif au niveau des cellules plus matures comme celles retrouvées dans le sang et dans la rate et encore davantage dans les cellules en culture *in vitro*. Ces cellules moins primitives sont probablement régies par un système moléculaire intracellulaire différent de celui retrouvé chez les CSH et elles seraient plus susceptibles aux signaux et mécanismes intracellulaires engendrés par les protéines mutées. La modification de la protéine pourrait engendrer l'exposition d'un nouveau site actif, haussant son affinité pour de nouvelles cibles impliquées dans la prolifération cellulaire, notamment celles du cycle cellulaire et réduisant du même coup son affinité pour les cibles induisant l'expansion des CSH.

14. COMPORTEMENT DES CSH EN NON COMPÉTITION

Ces études permettaient de visualiser l'effet des protéines HOXB4 mutées individuelles sur les CSH et autres cellules hématopoïétiques, sans pression de sélection cellulaire retrouvée dans les études de reconstitution en compétition. L'analyse du sang nous a permis de consolider la proposition émise auparavant suggérant que l'effet des protéines mutées ciblait plus particulièrement les cellules plus matures que les CSH. Ce sont ces cellules que nous voyons apparaître très rapidement dans le sang des souris greffées avec l'une ou l'autre des populations de cellules exprimant HOXB4 mutée. De plus, ces cellules présentent un profil de différenciation similaire à celui d'une souris normale, ce qui implique la compatibilité du facteur HOXB4 (muté) avec les cellules de la lignée lymphoïde signifiant que les protéines mutées n'agissent pas sur tous les mêmes gènes et les mêmes mécanismes que la protéine «wt», ou encore que ces protéines mutées ont une conformation différente qui modifie par exemple ses liens avec des cofacteurs et altèrent ultimement l'expression de HOXB4. Considérant les conclusions émises

jusqu'à maintenant et suivant la même logique, la protéine «wt» n'est pas nécessairement incompatible avec la lignée lymphoïde, elle promouvoit l'expansion des progéniteurs lymphoïdes immatures de la même façon qu'elle promouvoit l'expansion des CSH. Ces progéniteurs augmentent en quantité mais ne se différencient pas autant en cellules plus matures que ceux exprimant les protéines mutées. De plus, nous n'observons pas de démesure en proportion cellulaire lymphoïde, contrairement à la proportion myéloïde, puisque le contingent primitif de cellules lymphoïdes est de loin inférieur à celui de la lignée myéloïde. En d'autres termes, moins de cellules lymphoïdes primitives sont soumises à HOXB4, ce qui produit encore moins de cellules différenciées réduisant ainsi la quantité de cellules matures détectables dans le sang et la rate. À l'inverse, les protéines mutées procurent un avantage de croissance aux progéniteurs lymphoïdes plus matures, les poussant à se multiplier et à ainsi augmenter le pool de cellules B et T, détectables à des niveaux plus normaux. La disproportion myéloïde, observée lors de la reconstitution du sang par les cellules exprimant HOXB4 «wt» ne serait possiblement pas causée par un penchant excessif de la protéine HOXB4 à favoriser la lignée myéloïde. L'étude de la reconstitution hématopoïétique des organes par les cellules exprimant HOXB4 «wt» ou muté, et plus particulièrement celle de la moelle osseuse, a permis d'émettre la possibilité que la très grande quantité de cellules myéloïdes exprimant HOXB4 «wt» dans le sang est plutôt une conséquence de l'augmentation de la quantité de cellules primitives exprimant la protéine «wt» contenue dans la moelle osseuse et ce, même si elles ne se différencient que quelques fois.

Considérant les précédentes évidences que les protéines mutées promouvoient peu/pas l'expansion des CSH, les souris greffées avec les cellules exprimant ces protéines mutées contiennent donc une proportion inférieure de CSH que celles greffées avec les cellules exprimant HOXB4 «wt». Par contre, celles-ci ne présentent pas un profil de différenciation normal contrairement aux autres groupes de souris où les cellules surexpriment une protéine mutée. L'expansion des CSH/progéniteurs immatures, provoqué par HOXB4 «wt», induirait-elle un trop plein de cellules primitives provoquant ainsi un dérèglement à la base qui aurait des répercussions sur toute la production, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques? Si tel est le cas, ironiquement, trop de cellules primitives serait néfaste au bon développement cellulaire hématopoïétique.

Dans cette éventualité, le facteur d'exposition à un facteur de transcription constitutivement exprimé à long terme, est grandement à considérer.

Il est juste de croire jusqu'à présent que le pouvoir d'expansion des CSH en contact avec l'une des protéines mutées est réduit et même presque absent, du moins pour l'une d'entre elle. Une étude préliminaire de transplantation secondaire en dilutions limites, utilisant les souris des groupes HOXB4 «wt» et HOXB4 1426 de ces dernières expériences, à titre de donneur primaire, tend aussi vers cette affirmation. L'essai de dilutions limites a démontré que la fréquence des CSH exprimant HOXB4 1426 est fortement à la baisse, 1/76 658, comparativement à celle de la protéine «wt», 1/9920, suggérant que la protéine mutée ne promouvoit pas ou peu l'expansion (i.e. la multiplication) des CSH *in vivo* (voir annexe 1).

15. EFFET SUR LES CMP

Cette étude a permis, quant à elle, de visualiser le comportement *in vivo* d'une population cellulaire supposément pure soit les CMP, et qui de plus, expriment les protéines HOXB4 «wt» ou 1426. Il semblerait que la protéine HOXB4 «wt» agirait aussi sur les cellules un peu plus matures que les CSH mais pas la protéine mutée 1426, qui, vous vous souviendrez, a perdu son pouvoir de promouvoir l'expansion des CSH. Ainsi, si cette dernière n'exerce aucun effet, ou presque aucun, sur ces deux populations cellulaires distinctes à l'inverse de la protéine «wt», il se pourrait qu'un système intracellulaire similaire gère l'expansion, le maintien et la différenciation des CSH ainsi que des CMP. Le facteur de transcription HOXB4, dans sa forme native, entrerait parfaitement dans ce processus, enclenchant les mécanismes intracellulaires favorisant la division symétrique (expansion de la cellule) et non la différenciation cellulaire, évitant ainsi la perte de la cellule mère. L'avantage de croissance engendré sur les autres cellules hématopoïétiques, par les nombreux mécanismes induits par la protéine HOXB4, est probablement une conséquence indirecte de son effet de stimulation constante (dans le cas d'une surexpression due à des intégrations rétrovirales) de la division symétrique, même si ce n'est pas ce résultat réellement à chaque division (stimuli externes).

La protéine HOXB4 mutée ne semble plus posséder cette capacité d'intervenir dans la division cellulaire favorisant l'expansion de la cellule, que ce soit au niveau très primitif de la CSH ou moins immatures, du côté des CMP. Elle exerce ainsi son effet sur des cellules encore plus matures que les CMP, où un autre système intracellulaire serait enclenché et qui serait grandement permissif au facteur de transcription HOXB4 ayant une conformation tridimensionnelle différente due à une mutation ponctuelle dans ses premiers acides aminés.

Cette étude implique donc aussi le fait que les CMP sont considérées encore assez primitives, se rapprochant plus du niveau immature (CSH) que matures, puisque le même système intracellulaire d'expansion *versus* différenciation semble les diriger et qu'un autre processus est impliqué dans les cellules matures.

Finalement, la présence de cellules B, exprimant HOXB4, dans une transplantation impliquant seulement des CMP exprimant HOXB4 c'est-à-dire des cellules engagées uniquement dans la lignée myéloïde, peut d'un côté remettre en doute la pureté de l'isolement cellulaire des CMP, mais d'un autre s'expliquer par le principe de progéniteur myélo-lymphoïde⁽²⁴⁾. En effet, il est fort probable que certains progéniteurs dits myéloïdes aient aussi un potentiel lymphoïde. Deux possibilités pourraient alors découler de cette dernière hypothèse et expliquerait la présence de cellules B dans cette étude. D'abord, le groupe de CMP isolés et purifiés, selon de nombreux travaux effectués auparavant par d'autres équipes, pourrait plutôt être hétérogène malgré qu'elles possèdent tous les marqueurs utilisés dans cette expérience. Ces marqueurs permettraient d'englober une grande famille de cellules progénitrices différentes dont, par exemple, des CMP sans potentiel lymphoïde B et d'autres CMP possédant ce pouvoir. La molécule différenciant ces deux populations n'a tout simplement pas encore été découverte jusqu'à ce jour probablement dû au fait que la différenciation myéloïde est beaucoup moins étudiée que la différenciation lymphoïde. Cette molécule permettrait ainsi la ségrégation des CMP possédant ou non un potentiel lymphoïde parmi la grande famille des CMP, un peu à la manière que la présence/absence du marqueur CD34 dissocie les ST-HSC des LT-HSC respectivement, parmi la grande famille des CSH. La seconde possibilité expliquant la présence des cellules B suite à la greffe de CMP, impliquerait une population de CMP isolée plus homogène où chaque progéniteur isolé a un potentiel lymphoïde, quel que soit le niveau. Cette dernière option est selon moi, moins possible,

puisque si tous les progéniteurs injectés avaient un potentiel lymphoïde, de nombreuses cellules matures seraient produites, tout en considérant l'effet de HOXB4 «wt» sur les cellules primitives, et les souris greffées présenteraient une meilleure reconstitution des cellules B.

16. EFFET DE LA MODULATION PROTÉIQUE INTRACELLULAIRE

Il est déjà connu que l'altération d'un seul acide aminé dans une région capitale d'une protéine, sur le site de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription ou du site actif d'une enzyme par exemple, a des conséquences importantes sur l'activité de cette dernière. Et de façon moins directe, la modification de la structure primaire de la protéine peut aussi entraîner la modification de la structure secondaire. Dans le cas des trois protéines HOXB4 mutées chaque acide aminé, une leucine (1423) contenant une chaîne de 5 molécules de carbone, et deux tyrosines, l'un des rares acides aminés possédant une chaîne de carbone aromatique (1426 et 1427), ont été substitués pour une leucine, qui est quant à lui un acide aminé ayant une chaîne latérale de carbone ne contenant que deux molécules. Le motif «helix-turn-helix» caractérisant les protéines à homéodomaine peut être affecté par la mutation, ce qui pourrait expliquer la modification des propriétés des protéines HOXB4 mutées.

La seule substitution d'un acide aminé spécifique dans la protéine HOXB4 provoque, d'un autre côté, l'augmentation du temps de demi-vie intracellulaire de la protéine (de 1.1 heures à 2.5 heures). Ceci implique inévitablement, à des niveaux d'expression similaire, une hausse de la concentration intracellulaire de la protéine mutée comparativement à la protéine «wt», ce qui pourrait aussi être la cause de la modification des propriétés des protéines HOXB4 mutées. En modulant la concentration intracellulaire des protéines mutées via la réduction du nombre d'intégrations rétrovirales permanentes dans le génome des cellules modifiées à un niveau similaire à celui retrouvé dans les cellules exprimant la protéine «wt», nous éliminons ainsi cette dernière variante pouvant potentiellement être responsable des résultats obtenus dans le cadre de ce projet.

Les observations provenant de la moelle osseuse, de la rate et du sang ont démontré des résultats étrangement similaires à ceux observés dans les expériences de repopulation cellulaire en non compétition. À la différence que les proportions cellulaires des cellules modifiées (autant pour les protéines «wt» que mutées) étaient inférieures, montrant l'importance probable de la population de cellules surexprimant la protéine de façon modérée.

Les groupes de souris dont les cellules expriment une protéine mutée repopulent et reconstituent mieux le sang circulant, en terme de proportion et de diversité cellulaire et présentent une différenciation cellulaire normale dans les organes hématopoïétiques comparativement aux souris greffées avec des cellules exprimant la protéine «wt». Ces résultats suivent parfaitement la suite de raisonnements évoqués lors des expériences précédentes et ce, indépendamment de la concentration intracellulaire de la protéine. Ces derniers résultats démontrent même que les divers effets cellulaires observés ne semblent pas être uniquement reliés à la concentration intracellulaire du facteur de transcription. La substitution d'un seul acide aminé modifierait assez profondément la protéine pour que d'autres cibles géniques soient «accessibles» et qu'ainsi, une plus grande concentration intracellulaire (protéines mutées) permettrait possiblement l'activation d'un plus grand nombre de molécules potentielles agissant directement ou indirectement sur le comportement cellulaire. Ainsi, dans les groupes de souris où les cellules exprimant les protéines HOXB4 mutées, certains mécanismes importants de la division ou de la différenciation cellulaire pourraient être activés ou réprimés de façon constante et permettre un certain équilibre cellulaire hématopoïétique qui tend vers un processus normal. De plus, les modifications de l'expression génique des cellules causées par les protéines mutées pourraient aussi avoir comme conséquence l'augmentation/diminution de molécules faisant le lien entre le monde extra et intracellulaire, les récepteurs de surface, et de ce fait, rendant les cellules plus sensibles à leur environnement extérieur. Elles seraient ainsi plus enclines à divers mécanismes intracellulaires que celles exposées à la protéine «wt». Plusieurs recherches ont d'ailleurs prouvé précédemment que la faible capacité des CSH murines non modifiées à régénérer entièrement le compartiment de ces cellules, suite à une transplantation, provenait du fait qu'elles étaient simplement soumises aux mécanismes de rétroaction négative activés par les progéniteurs et les cellules matures. Ainsi, lorsque ces cellules atteignent un niveau normal, elles envoient des signaux qui inhibent, l'expansion des CSH,

qui quant à elles, n'ont pas atteint le niveau basal^(132;133). Par contre, les CSH surexprimant la protéine HOXB4 «wt» seraient un peu moins sensibles à ces mécanismes, expliquant dans un premier temps l'expansion supérieure de ces cellules *in vivo* et d'un autre côté, expliquant aussi la présence exagérée des cellules myéloïdes. Selon les résultats obtenus, les CSH exprimant les protéines mutées subiraient peu ou pas cette désensibilisation face aux stimuli normaux qui maintiennent l'équilibre cellulaire hématopoïétique et auraient de ce fait, un comportement plus similaire à une cellule non modifiée.

De plus, il a été dernièrement prouvé dans notre laboratoire (manuscrit en préparation) que des cellules humaines CD34+ mises en présence de la protéine HOXB4 «wt» recombinante accumulent 1 à 2 divisions cellulaires de retard comparativement à des cellules non exposées à la protéine après quelques jours seulement indiquant aussi qu'elles semblent moins sensibles aux mécanismes enclenchés.

Il serait par ailleurs important de vérifier l'expression des protéines HOXB4 dans les différentes populations cellulaires de la moelle osseuse et de la rate afin de s'assurer que les résultats observés ne sont effectivement pas causés par la concentration intracellulaire des protéines.

De plus, certains de ces résultats pourraient être le point de départ de nouvelles recherches sur le comportement cellulaire face au facteur de transcription HOXB4. Les proportions démesurément grandes de cellules myéloïdes ainsi que de celles largement inférieures de cellules lymphoïdes retrouvées dans les souris greffées avec des cellules surexprimant HOXB4 «wt», à tous les niveaux d'expression protéique, ne sont pas aussi extrêmes dans des souris transplantées avec des cellules exprimant HOXB4 «wt» à de très bas niveaux (HOXB4 «wt low»). En effet, dans les souris transplantées avec des cellules contenant une faible concentration intracellulaire de la protéine «wt», on retrouve des proportions de cellules myéloïdes et lymphoïdes un peu inférieures à celles retrouvées chez les souris greffées avec des cellules exprimant la protéine mutée 1426 (population «low» ou «high»), qui elles possèdent un profil de différenciation similaire à celui d'une souris normale du même âge. La concentration intracellulaire de la protéine «wt» semble être d'une très haute importance comme l'avait souligné le groupe de Klump et al où ils discutaient de l'effet des différents niveaux d'expression de la protéine HOXB4 sur les diverses populations cellulaires hématopoïétiques⁽¹³⁴⁾. Aucun type cellulaire ne tolère de très forte

concentration intracellulaire de la protéine HOXB4, à l'exception d'une population cellulaire retrouvée exclusivement dans la moelle osseuse et ayant beaucoup de récepteur au SCF, la molécule c-kit, à sa surface, représentant ainsi une population de cellules très immatures, très précoces. Il aurait été intéressant d'investiguer, à l'aide de micropuces à ADN, la ou les cause(s) de la perturbation de la différenciation cellulaire lorsque la protéine HOXB4 «wt» est présente à de forte concentration intracellulaire mais non à de faibles concentrations ou encore à de faible/forte concentrations de protéine HOXB4 mutée.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les études de compétition nous ont permis de conclure dans un premier temps que la protéine HOXB4 «wt» a sans aucun doute un pouvoir d'expansion sur les CSH qui est probablement moindre avec les protéines mutées, du moins lorsqu'introduites de façon permanente (et non dans le contexte d'une exposition temporaire avec des protéines recombinantes par exemple). Les études *in vitro* nous ont indiqué, quant à elles, que les protéines mutées avaient assurément un effet sur les cellules plus matures, plus différenciées que l'on retrouve en culture *in vitro*.

Les études de non compétition ont démontré clairement que les protéines HOXB4 mutées donnent un important avantage de croissance aux cellules progénitrices plus matures contrairement à la protéine «wt» qui encore une fois restreint son pouvoir d'expansion aux cellules immatures. Ces études nous ont aussi permis de conclure que les protéines mutées agissent, de façon positive ou négative, à favoriser le développement lymphoïde normal, caractère (propriété) que semble moins posséder la protéine «wt». Des premières réponses auraient pu être obtenues par un essai Whitlock-Witte, où nous aurions pu observer la capacité des cellules surexprimant HOXB4 «wt» ou muté à former des colonies de cellules B *in vitro*⁽¹³⁵⁾.

Les études sur les CMP ont montré que la protéine HOXB4 «wt» avait également un effet sur l'expansion, la prolifération des CMP mais pas les protéines mutées ce qui nous a permis d'avancer la sérieuse affirmation que le système enclenché par la protéine HOXB4 «wt» afin de favoriser l'expansion des CSH est le même que pour les CMP mais pas pour les cellules plus matures, qui elles semblent être plus susceptibles à l'effet que causent les protéines mutées. Les protéines HOXB4 «wt» et mutées auraient donc des rôles similaires mais à des niveaux cellulaires en partie différents.

Finalement, les études portant sur la standardisation de la protéine intracellulaire, nous ont démontré que la quantité intracellulaire de la protéine n'était probablement pas l'élément essentiel responsable modifiant la capacité d'expansion des cellules primitives par les protéines mutées. C'est ainsi que nous pouvons conclure globalement de cette étude que la seule substitution d'un acide aminé dans la portion N-terminale du facteur de transcription HOXB4, reconnu pour sa capacité à promouvoir l'expansion des CSH, modifie non seulement son temps de demi-vie mais contribue aussi à changer son

effet sur les cellules primitives, à améliorer son effet sur les cellules lymphoïdes, pourtant connu comme étant non compatible et finalement, à augmenter le pouvoir d'expansion des cellules progénitrices plus matures se traduisant par une augmentation de cellules finales. Cette dernière propriété serait avantageuse à exploiter ce qui mettrait fin aux problèmes reliés à la récupération hématopoïétique à court terme des cellules suite à une greffe (aplasie) puisque les cellules mises en contact avec les protéines mutées sont capables de générer provisoirement et rapidement les cellules matures nécessaires à la prise de greffe (par les cytokines excrétées) et au bon fonctionnement du système hématopoïétique jusqu'à ce que celui-ci soit complètement rétabli.

Les protéines mutées devraient donc être produites sous forme solubles et purifiées afin de s'assurer que ces changements de propriétés s'appliquent aussi aux cellules humaines pour des fins ultérieures d'utilisation d'expansion des cellules, dites CSH à court terme (ou possiblement à long terme, cela reste à déterminer), des patients lors d'une greffe, comblant ainsi le volet clinique de l'étude.

Du côté plus fondamental, il aurait été intéressant de se pencher sur la possible éventualité que le facteur de transcription HOXB4 soit un facteur régulant la transcription de la télomérase, enzyme ajoutant aux extrémités des chromosomes une séquence répétitive de six bases azotées non codantes, un télomère, qui auraient comme mission de protéger l'intégrité de l'ADN^(136;137). La multiplication cellulaire signifie la perte d'un brin d'ADN, séquence plus ou moins longue d'une série de télomères, à chaque division cellulaire, causant de ce fait une limite au nombre de divisions possibles. Les CSH sont pourvues de beaucoup d'activité télomérase afin de prévenir le vieillissement prématuré des cellules. L'activité télomérase pourrait donc être un facteur déterminant qui favorise la division cellulaire (symétrique identique à la cellule mère) de la CSH et conséquemment de l'expansion des CSH. Le gène de la télomérase pourrait potentiellement être l'un des gènes cibles de HOXB4. Le facteur de transcription favoriserait l'expression de l'enzyme et assurerait ainsi à la cellule, un état primitif. Si ces études s'avéraient vraies, ce serait deux importantes découvertes pour l'avancement des connaissances des gènes cibles de HOXB4 ainsi que des facteurs régissant l'expansion des CSH.

En ce qui à trait à la compatibilité de la protéine HOXB4 mutée à promouvoir le développement lymphoïde, il sera intéressant d'observer l'effet de ces protéines sur le facteur nucléaire *hemogen*, protéine grandement impliquée dans le développement des cellules hématopoïétiques et dont le gène est localisé dans une région du génome reconnue pour les mutations qui s'y produisent et qui sont impliquées dans de nombreuses néoplasies hématologiques⁽¹³⁸⁾. Cette protéine est exprimée de façon prédominante dans les précurseurs des cellules érythroïdes et mégacaryocytaires ainsi que dans les CSH et les progéniteurs primitifs. Les souris transgéniques surexprimant ce facteur montrent une infiltration sévère des organes par les neutrophiles et un dérèglement de l'homéostasie régulant l'hématopoïèse. En effet, la myélopoïèse est augmentée, ce qui contribue directement à l'expansion des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse, et de plus, on observe une importante augmentation des granulocytes dans le sang ainsi qu'une myélopoïèse anormale dans la rate⁽¹³⁹⁾. Ce profil de reconstitution ressemble à celui retrouvé dans les souris greffées avec des cellules surexprimant la protéine HOXB4 «wt». Le gène *hemgn* pourrait-il être une cible directe du facteur de transcription HOXB4? Il semblerait de plus que cette protéine serait un régulateur transcriptionnel de plusieurs importants facteurs de transcription tels Pax5 et PU.1.

Incidemment, le taux d'expression de la protéine PU.1, produite par le gène *Sfpi1*, ainsi que des autres protéines gravitant autour de celle-ci telles la protéine PML sous sa forme phosphorylée et le facteur de transcription C/EBP ϵ , auraient été aussi mes premières cibles à observer puisque ces protéines régulent une partie de la différenciation myéloïde (leucocytes) et lymphoïde. En effet, ce facteur de transcription est uniformément hautement concentré dans les cellules primitives. Cependant, la réduction de la concentration intracellulaire de la protéine est requise pour le développement normal des progéniteurs B et des progéniteurs T. Les progéniteurs myéloïdes (granulocytes-macrophages) requièrent toutefois des concentration élevées de PU.1 pour le développement normal⁽¹⁴⁰⁾. Une variation d'expression à la hausse, en présence d'HOXB4 mutée et non d'HOXB4 «wt», aurait été un bon indice que ce gène est une autre cible du facteur de transcription HOXB4. Il aurait été même possible de démontrer que les protéines mutées activent la transcription de ce gène contrairement à la protéine «wt», et que ceci serait possiblement causé par un changement de conformation de la protéine, ce qui

aurait augmenté l'affinité du facteur de transcription avec la séquence induisant la transcription du gène PU.1. La hausse et la baisse d'affinité d'un facteur pour sa séquence sur l'ADN suite à un changement tridimensionnel de la protéine s'applique sûrement aussi à la modulation de l'expression de d'autres gènes.

Dans le même ordre d'idées, la conformation des protéines mutées serait sûrement aussi l'un des facteurs mis en cause dans la modification du comportement des protéines mutées face aux CSH et aux progéniteurs matures.

BIBLIOGRAPHIE

1. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ 2001 Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell
Cell 105:369-377
2. Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL 1995 The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells,
Proc Natl Acad Sci U S A 92:10302-10306
3. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H 1996 Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell, *Science* 273:242-245
4. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL 1999 In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells
Proc Natl Acad Sci U S A 96:3120-3125
5. Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertoncello I 1997 Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment, *Exp Hematol* 25:445-453
6. Amsellem S, Fichelson S 2006 [Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by passive transduction of the HOXB4 homeoprotein], *J Soc Biol* 200:235-241
7. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL 1988 Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells
Science 241:58-62
8. de Haan G, Szilvassy SJ, Meyerrose TE, Dontje B, Grimes B, Van Zant G 2000 Distinct functional properties of highly purified hematopoietic stem cells from mouse strains differing in stem cell numbers, *Blood* 96:1374-1379

9. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T 1992 In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells, *Blood* 80:3044-3050
10. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC 1996 Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo, *J Exp Med* 183:1797-1806
11. Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC, Okano H 2004 Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells, *Immunity* 20:87-93
12. Chen J, Ellison FM, Keyvanfar K, Omokaro SO, Desierto MJ, Eckhaus MA, Young NS 2008 Enrichment of hematopoietic stem cells with SLAM and LSK markers for the detection of hematopoietic stem cell function in normal and Trp53 null mice
Exp Hematol 36:1236-1243
13. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ 2005 SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells
Cell 121:1109-1121
14. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE 1997 Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immunodeficient mice
Proc Natl Acad Sci U S A 94:5320-5325
15. van der Loo JC, Hanenberg H, Cooper RJ, Luo FY, Lazaridis EN, Williams DA 1998 Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mouse as a model system to study the engraftment and mobilization of human peripheral blood stem cells, *Blood* 92:2556-2570
16. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL 2000 A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages
Nature 404:193-197

17. Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL 2002 Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors
Proc Natl Acad Sci U S A 99:11872-11877
18. Bailey AS, Willenbring H, Jiang S, Anderson DA, Schroeder DA, Wong MH, Grompe M, Fleming WH 2006 Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium, Proc Natl Acad Sci U S A 103:13156-13161
19. DeKoter RP, Lee HJ, Singh H 2002 PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors
Immunity 16:297-309
20. Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM, Hiebert SW, Tenen DG 1996 CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter
Mol Cell Biol 16:1231-1240
21. Akashi K 2007 Cartography of hematopoietic stem cell commitment dependent upon a reporter for transcription factor activation
Ann N Y Acad Sci 1106:76-81
22. Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S, Arinobu Y, Geary K, Zhang P, Dayaram T, Fenyus ML, Elf S, Chan S, Kastner P, Huettner CS, Murray R, Tenen DG, Akashi K 2005 Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation
Blood 106:1590-1600
23. Na NT, Traver D, Weissman IL, Akashi K 2002 Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S
J Clin Invest 109:1579-1585
24. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE 2005 Identification of Flt3+

lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment
Cell 121:295-306

25. Back J, Dierich A, Bronn C, Kastner P, Chan S 2004 PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells
Blood 103:3615-3623
26. Back J, Allman D, Chan S, Kastner P 2005 Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis, Exp Hematol 33:395-402
27. Nutt SL, Metcalf D, D'Amico A, Polli M, Wu L 2005 Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors, J Exp Med 201:221-231
28. Coulombel L 2004 Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays
Oncogene 23:7210-7222
29. Croisille L, Auffray I, Katz A, Izac B, Vainchenker W, Coulombel L 1994 Hydrocortisone differentially affects the ability of murine stromal cells and human marrow-derived adherent cells to promote the differentiation of CD34⁺⁺ cells, Blood 84:4116-4124
30. Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ 1990 Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers, Proc Natl Acad Sci U S A 87:3584-3588
31. Zandstra PW, Conneally E, Petzer AL, Piret JM, Eaves CJ 1997 Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal, Proc Natl Acad Sci U S A 94:4698-4703
32. Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS, Brons NH 1989 An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse, Blood 74:2755-2763

33. Szilvassy SJ, Cory S 1993 Phenotypic and functional characterization of competitive long-term repopulating hematopoietic stem cells enriched from 5-fluorouracil-treated murine marrow, *Blood* 81:2310-2320
34. Till JE, McCulloch EA 1961 A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells
Radiat Res 14:213-222
35. Wu AM, Siminovitch L, Till JE, McCulloch EA 1968 Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture, *Proc Natl Acad Sci U S A* 59:1209-1215
36. Domen J, Weissman IL 1999 Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate
Mol Med Today 5:201-208
37. Spangrude GJ, Johnson GR 1990 Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells
Proc Natl Acad Sci U S A 87:7433-7437
38. Suda T, Arai F, Hirao A 2005 Hematopoietic stem cells and their niche,
Trends Immunol 26:426-433
39. Uchida N, He D, Frieria AM, Reitsma M, Sasaki D, Chen B, Tsukamoto A 1997 The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood
Blood 89:465-472
40. Clark BR, Keating A 1995 Biology of bone marrow stroma
Ann N Y Acad Sci 770:70-78
41. Gordon S, Fraser I, Nath D, Hughes D, Clarke S 1992 Macrophages in tissues and in vitro, *Curr Opin Immunol* 4:25-32
42. Temeles DS, McGrath HE, Kittler EL, Shaddock RK, Kister VK, Crittenden RB, Turner BL, Quesenberry PJ 1993 Cytokine expression from bone marrow derived macrophages
Exp Hematol 21:388-393

43. Kincade PW 1992 Cell interaction molecules and cytokines which participate in B lymphopoiesis
Baillieres Clin Haematol 5:575-598
44. Cashman J, Eaves AC, Eaves CJ 1985 Regulated proliferation of primitive hematopoietic progenitor cells in long-term human marrow cultures, Blood 66:1002-1005
45. Barker JE 1994 SI/Sld hematopoietic progenitors are deficient in situ
Exp Hematol 22:174-177
46. Barker JE 1997 Early transplantation to a normal microenvironment prevents the development of Steel hematopoietic stem cell defects
Exp Hematol 25:542-547
47. McCulloch EA, Siminovitch L, Till JE, Russell ES, Bernstein SE 1965 The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype SI-Sld, Blood 26:399-410
48. Elwood NJ, Zogos H, Pereira DS, Dick JE, Begley CG 1998 Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL
Blood 91:3756-3765
49. Keller G, Wall C, Fong AZ, Hawley TS, Hawley RG 1998 Overexpression of HOX11 leads to the immortalization of embryonic precursors with both primitive and definitive hematopoietic potential
Blood 92:877-887
50. Rempel RE, Saenz-Robles MT, Storms R, Morham S, Ishida S, Engel A, Jakoi L, Melhem MF, Pipas JM, Smith C, Nevins JR 2000 Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages, Mol Cell 6:293-306
51. Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ 2002 HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors, Cell 109:29-37
52. Georgopoulos K 2002 Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros, Nat Rev Immunol 2:162-174

53. Liebermann DA, Hoffman B 2002 Myeloid differentiation (MyD) primary response genes in hematopoiesis
Oncogene 21:3391-3402
54. Rolink AG, Schaniel C, Busslinger M, Nutt SL, Melchers F 2000 Fidelity and infidelity in commitment to B-lymphocyte lineage development, Immunol Rev 175:104-111
55. Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT 2000 Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1, Science 287:1804-1808
56. Cheng T, Shen H, Rodrigues N, Stier S, Scadden DT 2001 Transforming growth factor beta 1 mediates cell-cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21(Cip1/Waf1) or p27(Kip1), Blood 98:3643-3649
57. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK 2001 HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation
Exp Hematol 29:1125-1134
58. Krosl J, Beslu N, Mayotte N, Humphries RK, Sauvageau G 2003 The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential, Immunity 18:561-571
59. Lessard J, Sauvageau G 2003 Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells, Nature 423:255-260
60. Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF 2003 Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells, Nature 423:302-305

61. de Haan G, Weersing E, Dontje B, van Os R, Bystrykh LV, Vellenga E, Miller G 2003 In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1
Dev Cell 4:241-251
62. Stier S, Cheng T, Dombkowski D, Carlesso N, Scadden DT 2002 Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome
Blood 99:2369-2378
63. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL 2003 A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells, Nature 423:409-414
64. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, III, Nusse R 2003 Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors, Nature 423:448-452
65. Roegiers F, Jan YN 2004 Asymmetric cell division
Curr Opin Cell Biol 16:195-205
66. Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Spradling A 2004 The stem cell niche: theme and variations, Curr Opin Cell Biol 16:693-699
67. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T 2001 Stem cells find their niche, Nature 414:98-104
68. de la CC, Abril M, Bellosta P, Gallant P, Johnston LA 2004 Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition
Cell 117:107-116
69. Moreno E, Basler K 2004 dMyc transforms cells into super-competitors, Cell 117:117-129
70. Davis AC, Wims M, Spotts GD, Hann SR, Bradley A 1993 A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice
Genes Dev 7:671-682

71. Galaktionov K, Chen X, Beach D 1996 Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc, *Nature* 382:511-517
72. Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell BC, Mateyak MK, Tam W, Kohlhuber F, Dang CV, Sedivy JM, Eick D, Vogelstein B, Kinzler KW 2000 Identification of CDK4 as a target of c-MYC, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2229-2234
73. Lasorella A, Nosedà M, Beyna M, Yokota Y, Iavarone A 2000 Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins, *Nature* 407:592-598
74. Mateyak MK, Obaya AJ, Adachi S, Sedivy JM 1997 Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination, *Cell Growth Differ* 8:1039-1048
75. Mateyak MK, Obaya AJ, Sedivy JM 1999 c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points
Mol Cell Biol 19:4672-4683
76. O'Hagan RC, Ohh M, David G, de Alboran IM, Alt FW, Kaelin WG, Jr., DePinho RA 2000 Myc-enhanced expression of Cul1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression
Genes Dev 14:2185-2191
77. Wagner AJ, Meyers C, Laimins LA, Hay N 1993 c-Myc induces the expression and activity of ornithine decarboxylase
Cell Growth Differ 4:879-883
78. Weissman IL 2000 Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution, *Cell* 100:157-168
79. Kawamoto H, Minato N 2004 Myeloid cells
Int J Biochem Cell Biol 36:1374-1379
80. Copelan EA 2006 Hematopoietic stem-cell transplantation
N Engl J Med 354:1813-1826

81. Korbling M, Anderlini P 2001 Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?, *Blood* 98:2900-2908
82. Gluckman E 2001 Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood, *N Engl J Med* 344:1860-1861
83. Glimm H, Oh IH, Eaves CJ 2000 Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G(2)/M transit and do not reenter G(0), *Blood* 96:4185-4193
84. Orschell-Traycoff CM, Hiatt K, Dagher RN, Rice S, Yoder MC, Srour EF 2000 Homing and engraftment potential of Sca-1(+)lin(-) cells fractionated on the basis of adhesion molecule expression and position in cell cycle, *Blood* 96:1380-1387
85. Domen J, Cheshier SH, Weissman IL 2000 The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential *J Exp Med* 191:253-264
86. Takenaka K, Nagafuji K, Harada M, Mizuno S, Miyamoto T, Makino S, Gondo H, Okamura T, Niho Y 1996 In vitro expansion of hematopoietic progenitor cells induces functional expression of Fas antigen (CD95), *Blood* 88:2871-2877
87. Wang LS, Liu HJ, Xia ZB, Broxmeyer HE, Lu L 2000 Expression and activation of caspase-3/ CPP32 in CD34(+) cord blood cells is linked to apoptosis after growth factor withdrawal, *Exp Hematol* 28:907-915
88. Hai-Jiang W, Xin-Na D, Hui-Jun D 2008 Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells, *Am J Hematol* 83:922-926
89. Miller CL, Eaves CJ 1997 Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13648-13653

90. Bhatia M, Bonnet D, Kapp U, Wang JC, Murdoch B, Dick JE 1997 Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture, *J Exp Med* 186:619-624
91. Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK 2004 In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells, *Oncogene* 23:7223-7232
92. Tisdale JF, Hanazono Y, Sellers SE, Agricola BA, Metzger ME, Donahue RE, Dunbar CE 1998 Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability, *Blood* 92:1131-1141
93. Collins LS, Dorshkind K 1987 A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myelopoiesis and B lymphopoiesis, *J Immunol* 138:1082-1087
94. Ohneda O, Fennie C, Zheng Z, Donahue C, La H, Villacorta R, Cairns B, Lasky LA 1998 Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad-mesonephros region-derived endothelium, *Blood* 92:908-919
95. Wineman J, Moore K, Lemischka I, Muller-Sieburg C 1996 Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells, *Blood* 87:4082-4090
96. Issaad C, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, Coulombel L 1993 A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34⁺⁺, *Blood* 81:2916-2924
97. Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Oh W, Yang YS, Yang SE 2006 Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells, *Ann Hematol* 85:212-225

98. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, Dick JE 1999 Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells, *J Exp Med* 189:1139-1148
99. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M 2001 Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation, *Nat Immunol* 2:172-180
100. Chang CP, Brocchieri L, Shen WF, Largman C, Cleary ML 1996 Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus *Mol Cell Biol* 16:1734-1745
101. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM, Humphries RK 1995 Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo *Genes Dev* 9:1753-1765
102. Greer JM, Puetz J, Thomas KR, Capecchi MR 2000 Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution *Nature* 403:661-665
103. Zhao Y, Potter SS 2002 Functional comparison of the Hoxa 4, Hoxa 10, and Hoxa 11 homeoboxes, *Dev Biol* 244:21-36
104. Affolter M, Percival-Smith A, Muller M, Leupin W, Gehring WJ 1990 DNA binding properties of the purified Antennapedia homeodomain *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4093-4097
105. Ekker SC, Young KE, von Kessler DP, Beachy PA 1991 Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of *Drosophila*, *EMBO J* 10:1179-1186
106. Morgan R, Pettengell R, Sohal J 2004 The double life of HOXB4 *FEBS Lett* 578:1-4

107. Saleh M, Rambaldi I, Yang XJ, Featherstone MS 2000 Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases, *Mol Cell Biol* 20:8623-8633
108. Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C, Spiekermann K, Eaves CJ, Coulombel L, Sauvageau G, Hogge DE, Humphries RK 2002 Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells, *Blood* 100:862-868
109. Daftary GS, Taylor HS 2006 Endocrine regulation of HOX genes *Endocr Rev* 27:331-355
110. Owens BM, Hawley RG 2002 HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis, *Stem Cells* 20:364-379
111. Crooks GM, Fuller J, Petersen D, Izadi P, Malik P, Pattengale PK, Kohn DB, Gasson JC 1999 Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors, *Blood* 94:519-528
112. Fuller JF, McAdara J, Yaron Y, Sakaguchi M, Fraser JK, Gasson JC 1999 Characterization of HOX gene expression during myelopoiesis: role of HOX A5 in lineage commitment and maturation *Blood* 93:3391-3400
113. Kappen C 2000 Disruption of the homeobox gene Hoxb-6 in mice results in increased numbers of early erythrocyte progenitors *Am J Hematol* 65:111-118
114. Shen WF, Largman C, Lowney P, Hack FM, Lawrence HJ 1989 Expression of homeobox genes in human erythroleukemia cells *Adv Exp Med Biol* 271:211-219
115. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, Dragowska W, Lansdorp PM, Lawrence HJ, Largman C, Humphries RK 1997 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

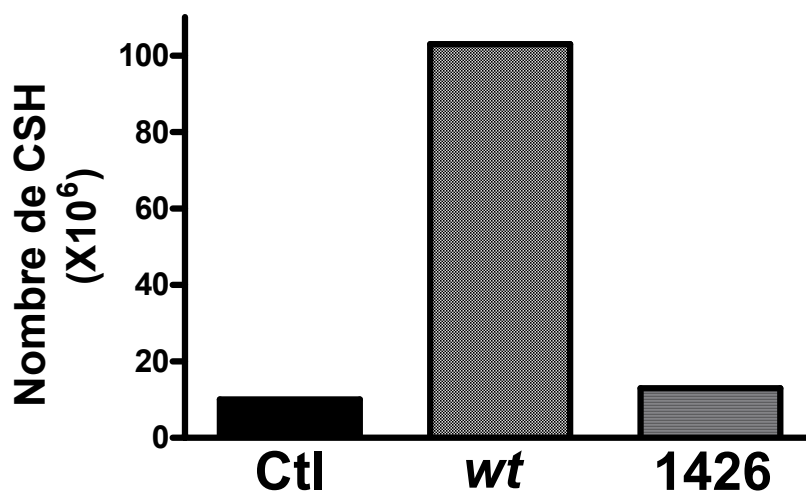
116. Izon DJ, Rozenfeld S, Fong ST, Komuves L, Largman C, Lawrence HJ 1998 Loss of function of the homeobox gene *Hoxa-9* perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes, *Blood* 92:383-393
117. Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G, Fong S, Izon DJ, Humphries RK, Largman C 1997 Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene *HOXA9* have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis, *Blood* 89:1922-1930
118. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Hough MR, Hugo P, Lawrence HJ, Largman C, Humphries RK 1997 Overexpression of *HOXB3* in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation, *Immunity* 6:13-22
119. Bijl J, van Oostveen JW, Kreike M, Rieger E, van der Raaij-Helmer LM, Walboomers JM, Corte G, Boncinelli E, van den Brule AJ, Meijer CJ 1996 Expression of *HOXC4*, *HOXC5*, and *HOXC6* in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue, *Blood* 87:1737-1745
120. Lawrence HJ, Stage KM, Mathews CH, Detmer K, Scibienski R, MacKenzie M, Migliaccio E, Boncinelli E, Largman C 1993 Expression of *HOX C* homeobox genes in lymphoid cells, *Cell Growth Differ* 4:665-669
121. Taniguchi Y, Komatsu N, Moriuchi T 1995 Overexpression of the *HOX4A* (*HOXD3*) homeobox gene in human erythroleukemia HEL cells results in altered adhesive properties, *Blood* 85:2786-2794
122. Raza-Egilmez SZ, Jani-Sait SN, Grossi M, Higgins MJ, Shows TB, Aplan PD 1998 *NUP98-HOXD13* gene fusion in therapy-related acute myelogenous leukemia, *Cancer Res* 58:4269-4273

123. Shimada H, Arai Y, Sekiguchi S, Ishii T, Tanitsu S, Sasaki M 2000 Generation of the NUP98-HOXD13 fusion transcript by a rare translocation, t(2;11)(q31;p15), in a case of infant leukaemia Br J Haematol 110:210-213
124. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK 1999 Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size, Blood 94:2605-2612
125. Brun AC, Bjornsson JM, Magnusson M, Larsson N, Leveen P, Ehinger M, Nilsson E, Karlsson S 2004 Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells, Blood 103:4126-4133
126. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK 2002 HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo, Cell 109:39-45
127. Kros J, Austin P, Beslu N, Kroon E, Humphries RK, Sauvageau G 2003 In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. Nat Med 9:1428-1432
128. Ciechanover A 1998 The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life, EMBO J 17:7151-7160
129. Breitschopf K, Bengal E, Ziv T, Admon A, Ciechanover A 1998 A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein, EMBO J 17:5964-5973
130. Glickman MH, Ciechanover A 2002 The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, Physiol Rev 82:373-428
131. Chen ST, Iida A, Guo L, Friedmann T, Yee JK 1996 Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the G protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible system, Proc Natl Acad Sci U S A 93:10057-10062

132. Iscove NN, Nawa K 1997 Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion, *Curr Biol* 7:805-808
133. Pawliuk R, Eaves C, Humphries RK 1996 Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo, *Blood* 88:2852-2858
134. Klump H, Schiedlmeier B, Baum C 2005 Control of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: HOXB4 on the threshold, *Ann N Y Acad Sci* 1044:6-15
135. Whitlock CA, Witte ON 1982 Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3608-3612
136. Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K 2002 Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia, *Oncogene* 21:680-687
137. Zimmermann S, Martens UM 2008 Telomeres, senescence, and hematopoietic stem cells, *Cell Tissue Res* 331:79-90
138. Yang LV, Nicholson RH, Kaplan J, Galy A, Li L 2001 Hemogen is a novel nuclear factor specifically expressed in mouse hematopoietic development and its human homologue EDAG maps to chromosome 9q22, a region containing breakpoints of hematological neoplasms *Mech Dev* 104:105-111
139. Li CY, Zhan YQ, Li W, Xu CW, Xu WX, Yu DH, Peng RY, Cui YF, Yang X, Hou N, Li YH, Dong B, Sun HB, Yang XM 2007 Overexpression of a hematopoietic transcriptional regulator EDAG induces myelopoiesis and suppresses lymphopoiesis in transgenic mice, *Leukemia* 21:2277-2286
140. DeKoter RP, Kamath MB, Houston IB 2007 Analysis of concentration-dependent functions of PU.1 in hematopoiesis using mouse models, *Blood Cells Mol Dis* 39:316-320

ANNEXE

Annexe 1



Conditions	Souris positive	Nombre total de souris	Fréquence des CSH
<u>HOXB4 wt</u>			
50 CRU	4	4	1/9920
10 CRU	5	5	
3 CRU	4	5	
1 CRU	2	5	
0.1 CRU	1	4	
<u>HOXB4 1426</u>			
50 CRU	4	4	1/76658
10 CRU	2	3	
3 CRU	0	4	
1 CRU	0	3	
0.1 CRU	0	2	