

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Fonctions du facteur de transcription SCL dans les
cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques**

par

Julie Lacombe

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph. D.
en Biologie Moléculaire

Août 2008

© Julie Lacombe, 2008



Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Fonctions du facteur de transcription SCL dans les cellules souches et les progéniteurs
hématopoïétiques

présentée par :
Julie Lacombe

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Claude Labbé, président-rapporteur
Dre Trang Hoang, directrice de recherche
Dr Tarik Möröy, membre du jury
Dr Frédéric Barabé, examinateur externe
Dr Michel Cayouette, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'étude des mécanismes gouvernant le système hématopoïétique requiert la compréhension des interactions existants entre les régulateurs intrinsèques de l'hématopoïèse et l'environnement cellulaire. Bien que l'expression spatio-temporelle de facteurs de transcription spécifiques soit essentielle à la différenciation et au contrôle de diverses fonctions biologiques, l'environnement y joue aussi un rôle crucial en modulant l'expression génique et donc le destin cellulaire. Ici, nous révélons le rôle essentiel du facteur de transcription SCL dans l'hématopoïèse adulte en démontrant sa capacité à contrôler certaines fonctions biologiques à différents échelons de la hiérarchie hématopoïétique. En effet, nous avons observé que *Scl* est impliqué dans le maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques en favorisant leur quiescence par la régulation directe de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire *p21*. Par ailleurs, ces travaux ont aussi permis de révéler la fonction antiapoptotique de SCL au niveau des précurseurs hématopoïétiques. Nous avons aussi démontré que les divers rôles de SCL dans le système hématopoïétiques sont sous contrôle environnemental. En effet, SCL restreint la capacité des cellules souches adultes à transiter de G0 vers G1 en réponse aux signaux mitogéniques empêchant ainsi leur activation excessive et donc leur déplétion précoce. De plus, nous avons observé que SCL contrôle la survie des précurseurs en aval du récepteur tyrosine kinase c-Kit. L'ensemble de ces données révèle dans un premier temps le rôle multifonctionnel et crucial de SCL au niveau du système hématopoïétique adulte et de façon plus générale, ces résultats mettent de l'avant le rôle instructif de l'environnement sur le destin cellulaire.

Mots-clés : *Scl/Tal1*, c-Kit, *p21*, hématopoïèse, quiescence, cycle cellulaire, survie

Abstract

Studying the mechanisms governing the hematopoietic system requires the understanding of interactions linking intrinsic regulators of hematopoiesis and cellular environment. Spatio-temporal expression of specific transcription factors is central to cell differentiation and controls multiple biological functions. The environment is also a key player in these processes as revealed by its ability to modulate gene expression and cell fate. Here, we clearly demonstrate the essential role of the transcription factor SCL in adult hematopoiesis by its capacity to control specific biological functions at different level of hemopoietic hierarchy. The work presented in this thesis put into light the crucial role of *Scl* in the long term maintenance of hematopoietic stem cells. More precisely, *Scl* favors stem cell quiescence by directly controlling the expression of *p21*, a cell cycle inhibitor essential for hematopoietic stem cell maintenance over time. Furthermore, this work revealed the antiapoptotic function of SCL in hematopoietic progenitors. We also showed that these SCL regulated functions are controlled by environmental cues. SCL indeed restrains the capacity of adult hematopoietic stem cells to transit from G0 to G1 in response to mitogenic signals, thereby preventing their excessive activation and early depletion. Finally, we also demonstrated that SCL controls progenitor survival downstream of c-Kit signaling. Together, our data unravel the central and multifunctional role of SCL in the adult hematopoietic system and in a more general manner, the instructive role of the environment on cell fate.

Keywords : *Scl/Tal1*, c-Kit, *p21*, hematopoiesis, quiescence, cell cycle control, survival

Table des matières

Chapître I : Introduction	1
1.1. Ontogénie du système hématopoïétique	1
1.1.1. Phases du développement hématopoïétique	1
1.1.1.1. L'hématopoïèse primitive ou extra-embryonnaire	2
1.1.1.2. L'hématopoïèse définitive ou intra-embryonnaire	3
1.1.2. Régulateurs importants de l'hématopoïèse	4
1.1.2.1. L'environnement	4
1.1.2.2. Régulateurs intrinsèques de l'hématopoïèse	5
1.2. La cellule souche hématopoïétique	8
1.2.1. Propriétés des cellules souches hématopoïétiques	8
1.2.2. Analyse des cellules souches hématopoïétiques	14
1.2.2.1. Caractérisation phénotypique des cellules souches hématopoïétiques	14
1.2.2.2. Essais fonctionnels <i>in vitro</i>	15
1.2.2.3. Essais fonctionnels <i>in vivo</i>	18
1.2.3. Régulateurs du maintien des cellules souches hématopoïétiques	24
1.2.3.1. Facteurs environnementaux	24
1.2.3.1.1. La niche hématopoïétique	25
1.2.3.1.2. Les cytokines	28
1.2.3.1.2.1. Modèle instructif ou permissif?	28
1.2.3.1.2.2. Steel Factor et son récepteur c-Kit	31
1.2.3.1.2.2.1. Expression et fonctions dans l'hématopoïèse	31
1.2.3.1.2.3. Expansion <i>in vitro</i>	34
1.2.3.2. Régulateurs intrinsèques	36
1.2.3.2.1. Quiescence et prolifération	36
1.2.3.2.1.1. <i>p21^{Cip1/Waf1}</i>	40
1.2.3.2.1.2. <i>Mef/Elf4</i>	42
1.2.3.2.1.3. <i>Pten</i>	43
1.2.3.2.1.4. <i>Cdc42</i>	44
1.2.3.2.1.5. <i>Gfi1</i>	46

1.2.3.2.1.6. <i>Id1</i>	47
1.2.3.2.1.7. <i>Gata-2</i>	48
1.2.3.2.1.8. <i>p18^{INK4C}</i>	49
1.2.3.2.1.9. <i>p27^{KIP1}</i>	50
1.2.3.2.2. Sénescence	55
1.2.3.2.3. Différenciation	56
1.2.3.2.4. Division symétrique	57
1.2.3.2.5. Survie cellulaire	58
1.2.3.3. Résumé	59
1.3. Le gène <i>Stem Cell Leukemia (Scl)</i>	61
1.3.1. Expression et fonctions de <i>Scl</i> dans l'hématopoïèse	61
1.3.1.1. Rôle de <i>Scl</i> dans les leucémies	61
1.3.1.2. Rôle de <i>Scl</i> dans l'embryogénèse	63
1.3.1.3. Rôle de <i>Scl</i> chez l'adulte	64
1.3.2. SCL comme régulateur transcriptionnel	68
1.3.2.1. E2A, un partenaire essentiel de SCL	69
1.3.2.1.1. Expression et fonctions dans l'hématopoïèse	70
1.3.2.1.2. Rôle de <i>E2a</i> dans le cycle cellulaire	71
1.3.2.1.3. Rôle opposé de <i>Scl</i> et <i>E2a</i> dans la lignée lymphoïde	71
1.3.3. Régulation du gène <i>Scl</i>	72
1.4. Hypothèse	74

<i>Chapître II: Résultats. Section 1: Scl sustains the quiescence and self-renewal of hematopoietic stem cells</i>	76
2.1. Summary	77
2.2. Introduction	78
2.3. Results	81
2.4. Figures and Figures Legend	87
2.5. Experimental Procedures	100

2.6. Discussion	105
2.7. Acknowledgements	108
2.8. References	109
2.9. Supplemental Figures and Table	115
2.10. Supplemental Experimental Procedures	121
<i>Chapître III: Résultats. Section 2: Genetic interaction between Scl and c-Kit in hematopoietic cell survival</i>	123
3.1. Summary	124
3.2. Introduction	125
3.3. Results	128
3.4. Figures and Figure Legends	135
3.5. Experimental Procedures	148
3.6. Discussion	152
3.7. Acknowledgements	157
3.8. References	158
<i>Chapître IV : Discussion</i>	165
4.1. Rôle de <i>Scl</i> dans les cellules souches hématopoïétiques	165
4.1.1. <i>Scl</i> est-il une <i>condition</i> nécessaire dans les cellules souches ?	166
4.1.2. Rôle de <i>Scl</i> dans la quiescence	168
4.1.2.1. <i>Scl</i> et la réponse au stress	170
4.1.2.2. <i>Scl</i> et le contrôle de la transition des HSC du stade fœtal vers le stade adulte	171
4.1.2.3. <i>Scl</i> parmi les régulateurs du cycle cellulaire	173
4.1.2.3. Rôle antiprolifératif de <i>E2a</i> dans les cellules souches hématopoïétiques	175

4.1.3. Quiescence et longévité	177
4.1.3.1. La résistance au stress	178
4.1.3.2. Quiescence et transition fœtale-adulte	180
4.2. <i>Scf</i> et la réponse à l'environnement	182
4.2.1. c-Kit et la niche hématopoïétique	183
4.2.1.1. <i>Scf</i> , un régulateur central au cœur de la niche ?	185
 <i>Conclusion</i>	 186
 <i>Références</i>	 I

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. 1: Résumé des différentes méthodes de purification des cellules souches</i>	15
<i>Tableau 1. 2: Récapitulatif des gènes impliqués dans la régulation de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte.</i>	53
<i>Supplemental Table 2. 1</i>	119

Liste des figures

<i>Figure 1. 1 : Représentation temporelle du développement hématopoïétique.</i>	7
<i>Figure 1. 2 : Schéma représentant la hiérarchie au sein du système hématopoïétique.</i>	13
<i>Figure 1. 3: Résumé des essais in vitro permettant de quantifier les précurseurs et les cellules souches hématopoïétiques.</i>	17
<i>Figure 1. 4: Résumé des essais in vivo permettant d'étudier les cellules souches hématopoïétiques.</i>	23
<i>Figure 1. 5: Modèles alternatifs de la division des cellules souches hématopoïétiques.</i>	28
<i>Figure 1. 6: La quiescence est associée à la capacité de reconstitution à long terme.</i>	38
<i>Figure 1. 7: Résumé des différentes fonctions biologiques impliquées dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques.</i>	60
<i>Figure 2. 1: Scl expression in HSC correlates with quiescence</i>	89
<i>Figure 2. 2: Scl haploidy does not affect stem cell numbers but decreases their mean repopulating ability</i>	91
<i>Figure 2. 3: Scl is required for long-term maintenance of HSC.</i>	93
<i>Figure 2. 4: Cell cycle entry of HSCs is controlled by Scl gene dosage.</i>	95
<i>Figure 2. 5: Scl-directed shRNAs facilitate the G0-G1 transition in culture.</i>	97
<i>Figure 2. 6: Cdkn1a is a direct target gene of Scl in immature hematopoietic cells.</i>	99
<i>Supplemental Figure S2. 1</i>	116
<i>Supplemental Figure S2. 2</i>	118
<i>Figure 3. 1: SCL function is required for the survival of c-Kit⁺ cells.</i>	136
<i>Figure 3. 2: SCL is required for the clonal expansion and survival of multipotent progenitors.</i>	138
<i>Figure 3. 3: SCL level determines the output of hematopoietic progenitors.</i>	140
<i>Figure 3. 4: Genetic interaction between c-kit and Scl.</i>	142
<i>Figure 3. 5: SCL regulates the expression of survival genes in erythroid progenitors.</i>	144
<i>Figure 3. 6: The antiapoptotic gene Api-5 is a direct target of SCL.</i>	146
<i>Figure 4. 1: Récapitulatifs des différentes fonctions contrôlées par Scl</i>	188
<i>Figure 4. 2 : Modèle suggéré illustrant le rôle de Scl dans la régulation des HSC.</i>	190

<i>Annexe 1: L'augmentation des niveaux de Scl accroît la compétitivité des HSC.</i>	191
<i>Annexe 2: La transplantation induit une pression proliférative majeure sur les cellules souches hématopoïétiques.</i>	192
<i>Annexe 3: Scl restreint la prolifération des cellules hématopoïétiques.</i>	193
<i>Annexe 4: E2a est essentiel au maintien à long terme des cellules souches.</i>	195
<i>Annexe 5: E2a contrôle le cycle cellulaire des HSCs.</i>	197
<i>Annexe 6: E2a contrôle la réponse aux cytokines.</i>	199
<i>Annexe 7: E2a contrôle l'expression transcriptionnelle de p21.</i>	200
<i>Annexe 8: Heb contrôle le cycle cellulaire des cellules souches.</i>	202

Liste des abréviations

AGM: aorte-gonade-mésonéphros

bHLH: basic helix-loop-helix

BL-CFC: blast-colony forming cell

BM: bone marrow

BrdU: bromodéoxyuridine

ES cells: embryonic stem cells

CFC: colony forming cells

CFSE: carboxyfluorescein succinimidyl ester

CFU-E: colony forming unit-erythroid

CFU-GEMM: colony forming unit-granulocyte erythroid macrophage megakaryocyte

CFU-GM: colony forming unit- granulocyte macrophage

CFU-S: colony forming-spleen

CLP: common lymphoid progenitor

CMP: common myeloid progenitor

CRU: competitive repopulating unit

EPO: érythropoïétine

FDCP mix: factor-dependent cell Paterson mixed potential

FL: fetal liver

GM-CSF: granulocyte macrophage-colony stimulating factor

GMP: granulocyte/macrophage progenitor

GPA: glycophorin A

IL-11: interleukine-11

HSC: hematopoïetic stem cell

KL: c-Kit⁺Sca1⁻Lin⁻

KSL: c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻

LTC-IC: long term culture-initiating cell

LT-HSC: long term-hematopoietic stem cell
MEP: megakaryocyte/erythroid progenitor
MPP: multipotent progenitor
MRA: Mean Repopulating Ability
NOD-SCID: nonobese diabetic-severe combined immunodeficient
Post-Tx: post-transplantation
Pré-Tx: pré-transplantation
SCL: Stem Cell Leukemia
shRNA: short hairpin RNA
RCA: Relative Competitive Ability
SIL: SCL Interrupting Locus
SF: Steel Factor
SLAM-KSL: c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻CD48⁻CD150⁺
SP: side-population
sSF: soluble Steel Factor
ST-HSC: short term-hematopoietic stem cell
SV: sac vitellin
TCR: T Cell Receptor
T-ALL: T cell Acute Lymphoblastic Leukemia
tmSF: transmembrane Steel Factor
WT: wild type
5'FU: 5'Fluorouracil

À mes parents, Anne et Jean-Noël

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mes parents, Anne et Jean-Noël, ainsi que mes sœurs Judith et Geneviève pour leurs encouragements inconditionnels et leur support. Je voudrais aussi remercier mes amis Vickie, Catherine, Mathieu, Caroline et Jacynthe pour leur présence et leur compréhension. Je voudrais remercier plus particulièrement mon copain Mathieu pour ses encouragements, son appui, sa confiance et ses conseils.

Je voudrais aussi remercier ma directrice de thèse Dr Trang Hoang pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes études doctorales. Je suis reconnaissante pour l'excellente formation acquise durant mon passage dans son laboratoire. Je remercie aussi spécialement Sabine Herblot pour son implication majeure à mon projet de thèse, que ce soit au niveau expérimental ou théorique. Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire plus particulièrement André Haman, Richard Martin, Stéphane Barakat, Annie Perreault et Mathieu Tremblay. Je voudrais aussi remercier Ivan Topisirovic pour son aide généreuse avec l'article faisant l'objet du chapitre III de cette thèse.

Je voudrais remercier les différentes personnes ayant contribué aux articles présentés dans cette thèse. Le Dr G. Begley pour nous avoir fourni les souris *Sc1^{+/-}* et le Dr N. Iscove pour avoir généreusement fourni les cDNA de cellules souches purifiées. Je voudrais aussi remercier Dr G. Krosi pour son rôle important dans l'article présenté au chapitre III, ce projet ayant été initié par lui. Je voudrais aussi remercier le Dr P. Aplan pour nous avoir fourni les souris *Sc1tg* et le mutant Δ SCL. Je remercie aussi le Dr G. Sauvageau pour ses conseils dans la planification expérimentales de l'article présentée dans le chapitre II et le Dr S. Lemieux pour les analyses bioinformatiques des microarrays de l'article du chapitre III. Merci aussi à Danièle Gagné pour son aide précieuse concernant la cytométrie en flux.

Je voudrais finalement remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Avant-propos

La possibilité de régénérer les divers organes du corps humain, qui relevait autrefois de la science-fiction, est maintenant abordée avec sérieux par la communauté scientifique. Une telle thérapie cellulaire semble maintenant possible depuis que des cellules souches ont été identifiées au niveau de plusieurs tissus. Ces cellules souches ont en effet le potentiel de produire toutes les cellules matures requises pour assurer la fonctionnalité des différents organes. En effet, bien que certaines avancées aient été accomplies dans ce domaine, il n'en demeure pas moins qu'il reste beaucoup de chemin à faire avant que ces pratiques deviennent courantes. Un problème majeur limitant le développement de telles stratégies provient de la rareté des cellules souches ce qui restreint grandement leur utilisation. Voilà pourquoi il est primordial de mieux comprendre les mécanismes régissant le maintien et l'expansion de ces cellules.

Le système hématopoïétique est un outil de choix pour comprendre le maintien et l'expansion des cellules souches étant donné qu'elles sont les plus étudiées et donc les mieux caractérisées. L'élucidation des mécanismes gouvernant ces fonctions permettra d'augmenter le succès des transplantations de moelle osseuse, une thérapie déjà utilisée depuis plusieurs décennies. Or, il semble que les joueurs clés orchestrant ces mécanismes soient conservées entre les cellules souches des différents tissus, faisant du système hématopoïétique un excellent modèle pour identifier les régulateurs du maintien et de l'expansion des cellules souches en général. L'identification de ces régulateurs contribuera aussi à mettre au point des thérapies cellulaires permettant de régénérer d'autres tissus. En effet, il y a beaucoup d'espoirs en ce que concerne la thérapie utilisant les cellules souches dans le traitement de plusieurs pathologies dont le diabète, l'infarctus du myocarde et les maladies neurodégénératives. Les retombées majeures découlant de l'étude des cellules souches hématopoïétiques ont motivées le choix de mon sujet de thèse de doctorat qui est de déterminer le rôle du facteur de transcription SCL au niveau des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques.

La thèse présentée ici se divise en quatre chapîtres, dont le premier est une revue de la littérature couvrant plusieurs aspects importants à la compréhension de l'hématopoïèse. Effectivement, une attention particulière est apportée aux cellules souches hématopoïétiques où il y est décrit les différentes façons de les identifier et de les étudier, de même que les différents mécanismes et régulateurs impliqués dans leur maintien et leurs fonctions. Le second chapître permet d'apprécier le rôle capital du facteur de transcription SCL dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques. En effet, il y est démontré que *Scf* favorise la quiescence des cellules souches et qu'il est essentiel à leur maintien à long terme chez l'adulte mettant de l'avant le lien intime existant entre la quiescence des cellules souches et leur longévité. Dans le troisième chapître, les résultats de cette section révèlent le rôle essentiel de *Scf* au niveau de la survie des progéniteurs hématopoïétiques en réponse à l'activation du récepteur tyrosine kinase c-Kit. Ces données démontrent le rôle instructif de l'environnement sur le destin cellulaire par son action directe sur l'activité de facteurs de transcription tissu-spécifique. Finalement, le dernier chapître contient une discussion décrivant l'importance de la régulation de la quiescence au niveau des cellules souches et faisant le lien entre les chapîtres II et III. En effet, l'ensemble de mes résultats suggère que la régulation de *Scf* par c-Kit soit un mécanisme essentiel au maintien des cellules souches hématopoïétiques. De plus, ces données révèlent l'existence de la relation étroite liant l'environnement cellulaire et les facteurs intrinsèques. Or, une meilleure compréhension des mécanismes régulant le maintien et l'expansion des cellules souches nécessite de tenir compte du lien existant entre ces deux aspects.

Chapître I : Introduction

1.1. Ontogénie du système hématopoïétique

L'hématopoïèse se caractérise par la formation de plus de dix types cellulaires impliqués dans diverses fonctions biologiques telles que l'apport d'oxygène, la réponse immunitaire innée et acquise, la coagulation et la résorption osseuse. Les cellules du système hématopoïétique sont en continuelle régénération, physiologique ou pathologique, et sont donc sujettes à une régulation très serrée. En effet, la différenciation vers les différentes lignées est le résultat de l'intégration des signaux environnementaux et de l'expression différentielle de facteurs de transcription. L'importance de cet équilibre dans le maintien d'une hématopoïèse fonctionnelle se révèle par l'apparition de leucémies qui sont associées à la dérégulation de l'expression de facteurs de transcription ou de l'activité exacerbée de voies de signalisation. C'est pourquoi durant ma thèse j'ai décidé de m'intéresser à la régulation extrinsèque et intrinsèque des fonctions biologiques du système hématopoïétique ainsi qu'à l'interaction existant entre ces deux régulateurs majeurs.

1.1.1. Phases du développement hématopoïétique

Le tissu hématopoïétique est formé à partir du mésoderme et son développement se caractérise par deux phases successives. La première phase, dite primitive, génère principalement des érythrocytes primitifs, des cellules nucléées ne produisant que de l'hémoglobine embryonnaire. La deuxième phase se caractérise par la présence de cellules souches hématopoïétiques (HSC : « hematopoietic stem cells ») ayant le potentiel de générer toutes les cellules hématopoïétiques matures observées chez l'adulte. Dans cette première section, je ferai une brève description des différentes phases de l'hématopoïèse embryonnaire et adulte de même qu'un résumé des régulateurs majeurs du développement hématopoïétique (Figure 1.1). Il est à noter qu'étant donné le haut degré de conservation entre le développement hématopoïétique chez l'humain et la souris, tout au long de ma thèse, je référerai au système murin à moins d'indications contraires.

1.1.1.1. L'hématopoïèse primitive ou extra-embryonnaire

Chez la souris, les premières cellules hématopoïétiques sont détectées au jour embryonnaire 7.5 au niveau du sac vitellin et forment des agrégats recouverts de cellules endothéliales en des structures appelées îlots sanguins. Ces cellules hématopoïétiques sont en fait des érythrocytes nucléés ressemblant aux précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse ou encore aux érythrocytes des vertébrés plus primitifs (oiseaux, poissons, amphibiens). Ces érythrocytes primitifs n'atteindront jamais le stade énucléé et parce qu'elles sont les premières cellules hématopoïétiques observées chez l'embryon, les chercheurs ont longtemps pensé que le sac vitellin était le site d'apparition des cellules souches hématopoïétiques, ce qui fût de prime abord appuyé par plusieurs études (Moore and Metcalf 1970; Liu and Auerbach 1991). Par contre, la génération d'embryons chimériques formés de tissus intra-embryonnaires de caille et de sac vitellin de poulet au stade pré-circulatoire suggère que les cellules du sac vitellin ne contribuent que de façon transitoire à l'hématopoïèse (Dieterlen-Lievre 1975). De plus, l'utilisation de chimères de poulet a démontré l'incapacité des cellules du sac vitellin à générer des lymphocytes T et B (Lassila et al. 1978; Lassila et al. 1982).

La promiscuité développementale du système hématopoïétique et des cellules endothéliales sous-tend l'idée d'un précurseur commun à ces deux lignées. Ce fût en effet suggéré en 1874 d'après l'observation que des cellules morphologiquement identiques sont présentes au stade précédent l'apparition des cellules hématopoïétiques et endothéliales. Ce précurseur appelé hémangioblaste, a par la suite été identifié par sa capacité à générer des cellules de ces deux lignées lors d'essais de différenciation en culture de cellules souches embryonnaires (Robertson et al. 2000). Bien que les stades de développement observés durant la différenciation des cellules souches et des corps embryonnaires reflètent les événements observés durant le développement normal du sac vitellin, la caractérisation de l'hémangioblaste *in vivo* demeure évasive.

1.1.1.2. L'hématopoïèse définitive ou intra-embryonnaire

Tandis que l'hématopoïèse primitive est sur son déclin (jour E10-12), c'est le début de l'hématopoïèse définitive qui se caractérise par l'apparition des cellules souches hématopoïétiques responsables de la production des cellules différenciées retrouvées chez l'adulte. Bien que le processus responsable de l'apparition de ces cellules n'est pas complètement compris, on sait que ces cellules sont présentes au niveau de l'aorte dorsale entre le jour embryonnaire 9 et 12 dans la région nommée aorte-gonade-mésonephros (AGM) (Godin et al. 1993; Medvinsky et al. 1993; Muller et al. 1994; Godin et al. 1995). L'identification des cellules souches hématopoïétiques à proximité des cellules endothéliales de l'aorte dorsale a permis de proposer deux modèles pour expliquer l'apparition des cellules souches hématopoïétiques. Le premier modèle, celui de l'endothélium homogénique, suggère que les cellules souches hématopoïétiques sont générées à partir des cellules endothéliales de l'aorte dorsale par un processus de transdifférenciation (Nishikawa et al. 1998; Hamaguchi et al. 1999; North et al. 2002; Oberlin et al. 2002; Taoudi et al. 2005). D'autre part, le deuxième modèle stipule que les cellules souches apparaissent dans la région subaortique avant de migrer et de traverser l'endothélium de l'aorte pour former des agrégats cellulaires dans la paroi interne de l'aorte (Godin et al. 1999; Bertrand et al. 2005). Quel que soit le mécanisme responsable de leur apparition, les cellules souches hématopoïétiques doivent éventuellement migrer dans le foie foetal pour subir une expansion importante et se différencier (jour E12-15). Peu avant la naissance (jour E16-17), les HSC entreprennent une deuxième migration, cette fois vers la moelle osseuse qui permettra leur maintien et supportera leur différenciation durant la vie adulte. Le foie foetal est donc un site intermédiaire d'hématopoïèse initialement colonisé de façon transitoire par les cellules primitives du sac vitellin avant d'être colonisé par les HSC de l'AGM. Bien qu'il soit clair que les cellules souches du foie foetal contribuent à l'hématopoïèse définitive chez l'adulte, il existe tout de même des différences entre les cellules souches du foie foetal et de la moelle osseuse au niveau phénotypique et fonctionnel

(Jordan et al. 1995; Morrison et al. 1995). En effet, les cellules souches du foie fœtal reconstituent plus rapidement et de façon plus efficace l'hématopoïèse d'une souris adulte irradiée (Jordan et al. 1995; Rebel et al. 1996), révélant leurs propriétés différentes et mettant de l'avant le rôle important de l'environnement sur la fonctionnalité de ces cellules.

1.1.2. Régulateurs importants de l'hématopoïèse

1.1.2.1. L'environnement

L'apparition du tissu hématopoïétique est régulée dans un premier temps par l'environnement. Par exemple, que ce soit dans le cas de l'hématopoïèse extra- ou intra-embryonnaire, l'apparition du mésoderme de même que sa spécification vers le tissu hématopoïétique requiert des signaux de l'endoderme tel l'activation des voies Wnt et BMP-4 (Belaousoff et al. 1998). En effet, des cellules souches embryonnaires murines (Johansson and Wiles 1995) et humaines (Chadwick et al. 2003) cultivées en présence de BMP-4 se différencient en cellules hématopoïétiques. De plus, à partir des cellules ES de souris, BMP-4 induit l'apparition de précurseurs mésodermaux exprimant le récepteur du VEGF flk-1 et le facteur de transcription SCL (Park et al. 2004), deux régulateurs du système hématopoïétique. La perte de BMP-4 chez la souris cause des phénotypes de pénétrances variables allant d'une absence complète de mésoderme à une réduction du nombre d'îlots sanguins dans le sac vitellin ainsi qu'une diminution de la formation de la région qui donnera naissance à l'AGM (Winnier et al. 1995).

Le rôle de l'environnement durant le développement du système hématopoïétique se révèle aussi par le débat concernant le site d'apparition des cellules souches hématopoïétiques. En effet, il a été démontré qu'en culture il est possible de générer des cellules différenciées caractéristiques de l'hématopoïèse définitive à partir du sac vitellin (Lu et al. 1996). Par contre, les cellules du sac vitellin ne contribuent pas à l'hématopoïèse définitive lorsqu'elles sont transplantées dans une souris adulte irradiée (Huang and

Auerbach 1993; Muller et al. 1994; Lu et al. 1996; de Bruijn et al. 2000), bien que ces cellules contribuent à l'hématopoïèse adulte lorsqu'elles sont initialement transplantées dans des souris nouveaux-nés (Yoder and Hiatt 1997; Yoder et al. 1997a; Yoder et al. 1997b). Sachant que l'on détecte une activité hématopoïétique dans le foie 1-2 semaines après la naissance, ces résultats suggèrent que les cellules du sac vitellin doivent d'abord transiter à travers le foie fœtal pour acquérir les propriétés nécessaires à la colonisation et à leur fonction dans la moelle osseuse. Par ailleurs, il est possible de dériver des cellules souches capables de reconstituer une souris adulte irradiée à partir de cellules de sac vitellin cultivées en présence de cellules stromales provenant de l'AGM (Matsuoka et al. 2001). Combinés, ces résultats démontrent l'incapacité de l'environnement adulte à supporter le maintien ou la différenciation des cellules du sac vitellin. De plus, chez le xénope, la transplantation d'îlots sanguins au site d'hématopoïèse définitive révèle la capacité des progéniteurs primitifs à contribuer à l'hématopoïèse définitive, et vice-versa lors de la transplantation inverse (Turpen et al. 1997). Ces résultats démontrent que les mésodermes extra et intra-embryonnaires ont la capacité de générer des cellules primitives et définitives, mais que l'environnement module le potentiel de ces progéniteurs mésodermaux. Ces observations soulèvent le point important que l'environnement est un régulateur crucial de la fonction des cellules souches hématopoïétiques.

1.1.2.2. Régulateurs intrinsèques de l'hématopoïèse

Des études d'inactivation de gènes ont démontré que le facteur de transcription SCL (*Stem Cell Leukemia*) est requis au stade de l'hématopoïèse primitive et définitive (Robb et al. 1995a; Shivdasani et al. 1995; Porcher et al. 1996; Robb et al. 1996; Hall et al. 2003). Par contre, l'inactivation conditionnelle de *Scl* chez l'adulte suggère que sa présence n'est plus requise une fois le système hématopoïétique formé (Mikkola et al. 2003; Curtis et al. 2004). Un des partenaire de SCL, la protéine à domaines LIM, LMO2, est aussi essentiel à un stade très précoce de l'hématopoïèse tel que démontré par le système hématopoïétique déficient des souris *Lmo2*^{-/-} (Warren et al. 1994; Yamada et al. 1998).

D'autres gènes, tels les facteurs de transcription AML-1 (Wang et al. 1996), GATA-2 (Tsai et al. 1994; Tsai and Orkin 1997; Rodrigues et al. 2005) et c-MYB (Mucenski et al. 1991; Clarke et al. 2000; Sumner et al. 2000) sont essentiels à l'hématopoïèse définitive seulement. Or, l'inactivation d'*Aml-1* chez l'adulte révèle qu'une fois le système hématopoïétique établi, sa présence n'est plus requise (Ichikawa et al. 2004). Par contre, en ce qui concerne GATA-2, les données suggèrent que ce facteur de transcription soit plutôt nécessaire à la capacité proliférative des cellules hématopoïétiques primitives, car son absence provoque une réduction du nombre de progéniteurs. *c-Myb* semble avoir un rôle similaire, car les embryons nuls pour ce gène montrent une déficience au niveau de plusieurs lignées hématopoïétiques.

Ces données suggèrent donc l'existence de deux catégories de régulateurs de l'hématopoïèse: ceux impliqués dans la spécification du système hématopoïétiques (SCL, AML-1) et ceux responsables de son maintien (GATA-2, c-MYB). En effet, la capacité de régénération du système hématopoïétique dépend de ces deux fonctions. D'une part, un nombre suffisant de cellules souches hématopoïétiques doit être formé au cours du développement et d'autre part, ces cellules doivent se maintenir à long terme pour que l'hématopoïèse soit soutenue tout au long de la vie d'un organisme. Il semble donc que les mécanismes contrôlant ces deux fonctions soient différents, ce qui démontre la robustesse du système hématopoïétique. En effet, on peut imaginer qu'une défaillance au niveau de la spécification pourrait être atténuée par une capacité de maintenance fonctionnelle et vice versa. À l'inverse, si ces deux fonctions étaient contrôlées par les mêmes mécanismes, une disfonction de ces mécanismes aurait des conséquences additives étant donné que la spécification de même que la maintenance des cellules souches seraient affectées en même temps.

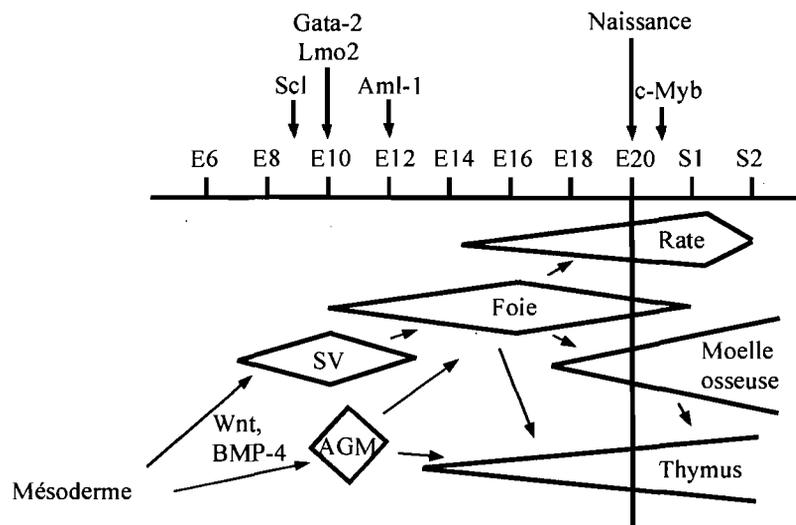


Figure 1.1 : Représentation temporelle du développement hématopoïétique.

Cinétique de colonisation des divers organes hématopoïétiques durant le développement. Quelques régulateurs y sont représentés en fonction de l'étape développementale qu'ils contrôlent. Voir section 1.1.2.2 pour plus de détails concernant ces facteurs. SV : sac vitellin, AGM : aorte-gonade-mésonephros.

Adapté de Morrison et al. (1995) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 35-71

1.2. La cellule souche hématopoïétique

Au niveau embryonnaire, les cellules souches sont dites totipotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée de l'embryon. Par contre, chez l'adulte cette permissivité des cellules souches est perdue pour faire place à la capacité de générer les cellules d'un seul tissu. En effet, le développement de plusieurs tissus est basé sur une hiérarchie de différenciation où les cellules souches en sont la base. Tel est le cas entre autre de l'épithélium intestinal (Potten and Loeffler 1990), de l'épiderme (Alonso and Fuchs 2003) et du système neuronal (Reynolds and Weiss 1992). Par contre, le système ayant été le plus étudié et le mieux caractérisé est celui qui s'organise en une hiérarchie cellulaire dont la base est la cellule souche hématopoïétique. Bien que certaines études suggèrent une grande plasticité des cellules souches hématopoïétiques, la transplantation de cellules souches hautement purifiées ne fournit aucune évidence claire que ces cellules aient la capacité de reconstituer d'autres tissus que le système hématopoïétique (Wagers et al. 2002).

1.2.1. Propriétés des cellules souches hématopoïétiques

La cellule souche hématopoïétique est à l'origine de toute la diversité des cellules du sang et est retrouvée dans la moelle osseuse chez l'humain et la souris adulte. Les premières évidences de l'existence de ces cellules proviennent de l'observation que certaines cellules de la moelle osseuse peuvent former des colonies (CFU-S) sur la rate d'une souris irradiée suite à leur transplantation (Becker et al. 1963; Siminovitch et al. 1963). Ces cellules furent dites «souches» étant donné leur multipotentialité et leur capacité d'autorenouvellement, deux attributs essentiels à ces cellules. Bien qu'il fût démontré par la suite que les CFU-S ne sont pas formés par des cellules souches mais plutôt par des progéniteurs oligopotents (Worton et al. 1969; Jones et al. 1989), ces travaux sont à l'origine des concepts qui régissent aujourd'hui la biologie des cellules souches. Les

propriétés de multipotentialité et d'autorenouvellement des cellules souches ont été confirmées au niveau clonal par d'élégantes études de deux groupes de recherche, qui démontrèrent que le même patron d'intégration rétrovirale est présent dans toutes les lignées du système hématopoïétique d'une souris hôte en transplantation primaire et secondaire (Snodgrass and Keller 1987; Keller and Snodgrass 1990).

Le système hématopoïétique est en continuelle régénération, physiologique ou pathologique (greffe, chimiothérapie), et requiert donc un réservoir de HSC pouvant être maintenues tout au long de la vie d'un être vivant pour produire les progéniteurs qui répondront aux besoins de l'organisme. L'importance de la présence des cellules souches hématopoïétiques durant la vie adulte se révèle par l'apparition de l'aplasie médullaire, une maladie qui se caractérise par une quasi-absence de HSC dans la moelle osseuse amenant une déficience en érythrocytes, lymphocytes et plaquettes sanguines. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent être divisées en deux sous populations se différenciant par leur état d'activation : celles qui sont en quiescence (en G0) et responsables de la reconstitution à long terme, et celles en cycle qui soutiennent l'hématopoïèse à court terme (Passegue et al. 2005). La présence d'une telle cascade est nécessaire pour soutenir l'hématopoïèse. En effet, les cellules en G0 forment un réservoir de cellules inactives pouvant être amené à participer à l'hématopoïèse tôt ou tard dans la vie de l'organisme. Par contre, les cellules souches en cycle sont celles qui participent activement à la reconstitution de l'hématopoïèse en s'autorenouvellant ou en générant les cellules plus différenciées telles que les progéniteurs. La quiescence, de même que les fonctions d'autorenouvellement et de multipotentialité sont donc les propriétés qui définissent la cellule souche hématopoïétique.

Deux modèles différents ont été proposés pour expliquer la dynamique d'activation des cellules souches pour reconstituer l'hématopoïèse en conditions normales ou après transplantation. Le modèle de succession clonale stipule que l'homéostasie du système hématopoïétique est maintenue par le recrutement séquentiel de plusieurs cellules souches capables de reconstitution à court terme (Capel et al. 1990; Drize et al. 1996). De cette

manière, seulement une petite fraction de la population de cellules souches contribuerait à la reconstitution de l'hématopoïèse simultanément. Suite à l'épuisement de ces clones à travers plusieurs divisions cellulaires, ceux-ci seraient remplacés par un autre petit groupe de cellules souches fraîchement entré dans le cycle cellulaire. Par contre, l'observation qu'une seule cellule souche est capable de soutenir l'hématopoïèse à long terme d'un animal contredit le modèle de succession clonale (Jordan and Lemischka 1990). Le modèle stochastique a d'abord été proposé il y a plus de quarante ans lors de la transplantation sérielle de CFU-S, où on a observé une grande variabilité dans la prolifération et l'autorenouvellement des CFU-S qu'on croyait être au départ des cellules souches (Till et al. 1964). Bien qu'il est maintenant possible d'isoler des populations hautement enrichie en cellules souches (Tableau 1.1), on observe tout de même une hétérogénéité au niveau de la capacité d'autorenouvellement de ces cellules (Benveniste et al. 2003; Ema et al. 2005). Ces observations suggèrent l'existence d'éléments stochastiques gouvernant le destin des cellules souches hématopoïétiques ou reflète l'incapacité d'isoler une population complètement pure en HSC. Pour contrer ce problème, le potentiel de reconstitution et d'autorenouvellement après transplantation des cellules souches ont été évalués selon leur patron d'intégration lentivirale ou rétrovirale (Guenechea et al. 2001; Mazurier et al. 2004; McKenzie et al. 2006). Ces études démontrent une grande variabilité au niveau de la cinétique de prolifération ainsi que de l'autorenouvellement des cellules souches, suggérant que le destin des HSC est non prédictible ce qui appui le modèle stochastique d'activation des cellules souches.

Suite à sa division cellulaire, la cellule souche génère des précurseurs hématopoïétiques possédant des potentiels de différenciation plus restreints, ce qui mène ultimement à la production de toutes les cellules matures présentes chez l'adulte (Figure 1.2). C'est ce processus de perte de potentiel de différenciation qui est à la base de l'apparition de la diversité du système hématopoïétique. En effet, les cellules souches génèrent des progéniteurs multipotents (MPP) sans capacité d'autorenouvellement (Adolfsson et al. 2001) qui vont ensuite se différencier pour produire des précurseurs

lymphoïdes (CLP) ou myéloïdes (CMP) (Kondo et al. 1997; Akashi et al. 2000). À leur tour, les CMP se différencient et peuvent engendrer soit les progéniteurs bipotents à l'origine des érythrocytes et des mégakaryocytes (MEP) ou les progéniteurs qui sont responsables de l'apparition des macrophages et des granulocytes (GMP). Par opposition aux cellules souches qui se divisent rarement, les progéniteurs ont un potentiel prolifératif important qui est responsable de la capacité des cellules souches à soutenir l'hématopoïèse.

Le maintien de l'homéostasie hématopoïétique requiert une régulation minutieuse de la balance entre les différents destins cellulaires qu'une cellule est susceptible d'adopter (différenciation, prolifération, quiescence, survie cellulaire, sénescence). La décision des cellules souches et des progéniteurs d'opter pour un destin plutôt qu'un autre repose sur l'intégration des différentes interactions protéiques au niveau d'une cellule menant à l'expression de programmes génétiques précis, de même qu'à la coordination des différentes voies de signalisation activées par l'environnement cellulaire. C'est donc la régulation étroite de la relation existant entre les facteurs intrinsèques et extrinsèques qui est responsable de la souplesse du système hématopoïétique.

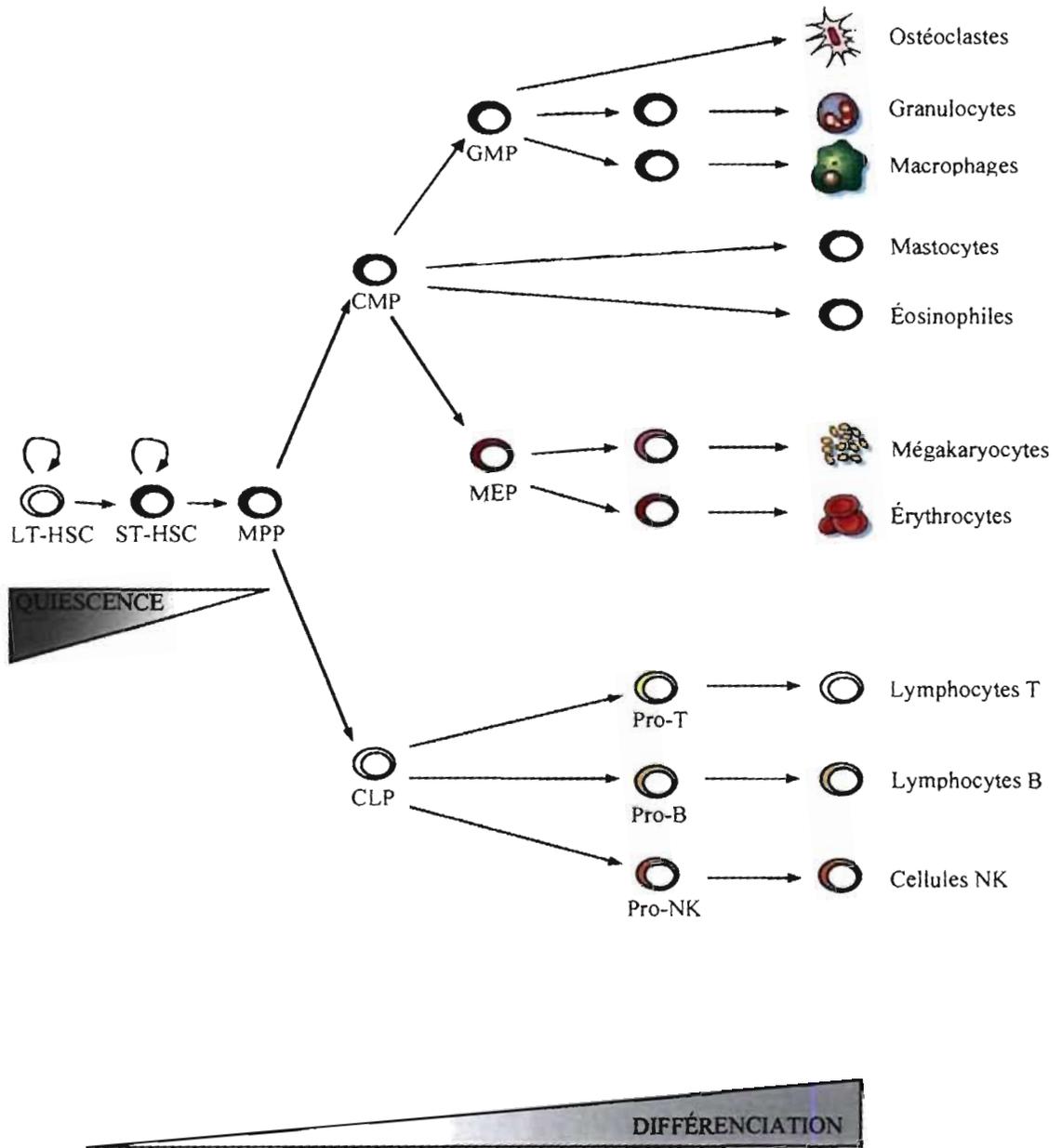


Figure 1. 2 : Schéma représentant la hiérarchie au sein du système hématopoïétique.

L'hématopoïèse repose sur les cellules souches responsables de la reconstitution à long terme (LT-HSC) qui se caractérisent par leur multipotentialité, leur capacité d'autorenouveaulement et leur état de quiescence. ST-HSC : cellules souches responsables de la reconstitution à court terme, MPP : précurseur multipotent, CLP : précurseur commun lymphoïde, CMP : précurseur commun myéloïde, GMP : précurseur des granulocytes et macrophages, MEP : précurseur des mégakaryocytes et érythrocytes.

1.2.2. Analyse des cellules souches hématopoïétiques

1.2.2.1. Caractérisation phénotypique des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches sont présentes à une fréquence d'environ une cellule sur 20 000 (Abkowitz et al. 2002) dans la moelle osseuse des souris et la rareté de cette population limite de façon importante le type d'approche pouvant être utilisée avec ces cellules telles que des études biochimiques ou protéomiques. Un problème découlant de la rareté de cette population et qui rend leur étude ardue est l'absence de marqueurs permettant d'isoler une population entièrement pure, malgré les progrès importants accomplis à ce niveau (Tableau 1.1). Une des approches utilisées visant à obtenir une population enrichie en cellules souches est basée sur la faible fréquence de leurs divisions. En effet, le traitement de la moelle osseuse avec un agent cytotoxique qui élimine spécifiquement les cellules en prolifération, le 5'fluorouracile (5'FU), permet d'obtenir une population contenant 5 à 10 fois plus de cellules souches (Lerner and Harrison 1990). De plus, la cytométrie en flux qui est maintenant couramment utilisée pour isoler les cellules souches est basée sur la présence ou l'absence de marqueurs spécifiques. Grâce à l'activité de leur transporteur ABC Bcrp1 (Zhou et al. 2001; Zhou et al. 2002), les cellules souches ont la capacité d'expulser certains colorants vitaux tel que le Hoechst 33342 et la Rhodamine 123 (Li and Johnson 1992; Goodell et al. 1996). En cytométrie en flux, la faible rétention du Hoechst par ces cellules se traduit par l'apparition d'une population faiblement fluorescentes qui se démarque du reste de la moelle osseuse. Cette population (appelée « side-population ») est hautement enrichie en cellules souches hématopoïétiques (Goodell et al. 1996). Les cellules souches peuvent aussi être isolées selon la présence des protéines de surface c-Kit et Sca1 et par l'absence des marqueurs de lignée CD3, B220, CD11b, Gr1, Ter119 (Lin⁻) (population KSL). Bien que cette population soit enrichie en cellules souches, elle contient aussi des progéniteurs et des cellules souches responsables de la reconstitution à court terme (Okada et al. 1992). De nouveaux marqueurs ont maintenant été identifiés, ce qui a

permis de fractionner la population KSL et d'obtenir une population hautement enrichie en cellule souches responsables de la reconstitution à long terme : c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻CD34⁻ (Osawa et al. 1996a) et c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻Thy^{low}flt-3⁻ (Christensen and Weissman 2001). Plus récemment, une population contenant environ 50% de cellules souches a été décrite (c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻ CD150⁺CD48⁻) (Kiel et al. 2005).

Afin de pallier à l'incapacité des chercheurs à pouvoir isoler une population pure en cellules souches hématopoïétiques, il est primordial de procéder à des essais fonctionnels pour les étudier de façon non équivoque. Ces tests font l'objet de la section suivante et sont basés sur les propriétés fondamentales des cellules souches, c'est-à-dire leur capacité à générer toutes les cellules du système hématopoïétique à long terme et à s'autorenouveler.

Tableau 1. 1: Résumé des différentes méthodes de purification des cellules souches

Protocole de purification	Fréquence	Références
Traitement au 5'FU	~ 1/2 000	(Lerner and Harrison 1990)
Kit ⁺ Sca1 ⁺ Lin ⁻	~ 1/20	(Okada et al. 1992)
c-Kit ⁺ Sca1 ⁺ Lin ⁻ CD34 ⁻	~ 1/5	(Osawa et al. 1996a)
Hoechst ^{low} (Side-Population)	~ 1/20	(Goodell et al. 1996)
c-Kit ⁺ Sca1 ⁺ Lin ⁻ Thy ^{low} Flt-3 ⁻	~ 1/3	(Christensen and Weissman 2001)
c-Kit ⁺ Sca1 ⁺ Lin ⁻ CD150 ⁺ CD48 ⁻	~ 1/2	(Kiel et al. 2005)

1.2.2.2. Essais fonctionnels *in vitro*

Le système hématopoïétique se caractérise par une hiérarchie de précurseurs possédant des potentiels de différenciation plus ou moins restreints selon leur maturité. C'est ce principe fondamental qui est à la base des essais *in vitro* utilisés pour étudier les cellules souches et les précurseurs du système hématopoïétique (Figure 1.3). Pour étudier

les progéniteurs, on cultive des cellules de moelle osseuse dans un milieu semi-solide ce qui permet d'isoler physiquement chaque précurseur, appelé CFC (colony forming cells), et d'observer sa progéniture (Broxmeyer 1984) (Figure 1.3A). L'avantage de cet essai est qu'il est quantitatif (le nombre de CFC correspond au nombre de colonies) et qualitatif (la nature des CFC est déterminé par la variété des cellules différenciées observée dans la colonie). Étant donné que la réponse mesurée est la présence de cellules matures, plus le temps requis pour générer une colonie est long, plus la cellule à l'origine de cette colonie est immature (Eaves and Eaves 1978). Dans cette optique, il faut compter au moins 5 semaines pour que les cellules plus primitives, telles que les cellules souches, se différencient et forment des colonies en culture. Par contre, la longévité du milieu semi-solide n'excédant pas trois semaines cela nécessite une étape préalable où les cellules sont en culture liquide pendant 5 semaines, avant leur transfert en milieu semi-solide, ce qui permet aux cellules immatures de se différencier (Sutherland et al. 1989). La culture des cellules de moelle en dilution limite suivie de la quantification du nombre de colonies présentes dans chaque condition permet selon les statistiques de Poisson de déterminer la fréquence des LTC-IC (long-term culture initiating cells) initialement présents qui sont associés à une fréquence de cellules souches (Sutherland et al. 1990; Croisille et al. 1994; Pettengell et al. 1994) (Figure 1.3B). Or, la population de LTC-IC semble très hétérogène et le nombre de CFC produit à 5 semaines dans les mêmes conditions varie considérablement d'une expérience à l'autre (Petzer et al. 1996; Zandstra et al. 1997). Par ailleurs, afin d'étudier des cellules fonctionnellement plus semblables aux cellules souches, certains chercheurs ont prolongé les essais de LTC-IC au-delà de 10-12 semaines, mais les cellules identifiées dans ces expériences refléteraient plutôt l'état de quiescence de certaines des cellules de départ plutôt que l'existence d'une hiérarchie au niveau des LTC-IC (Hao et al. 1996). Ces résultats sont donc en accord avec l'existence d'une relation entre la capacité de reconstitution à long terme et la quiescence.

A) Analyse des précurseurs

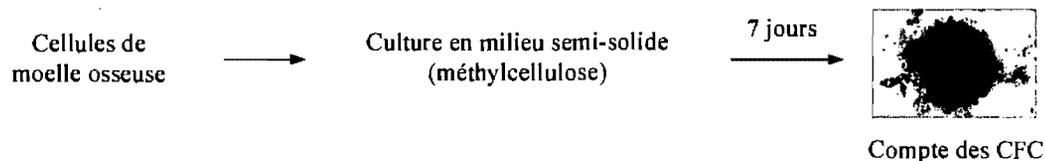
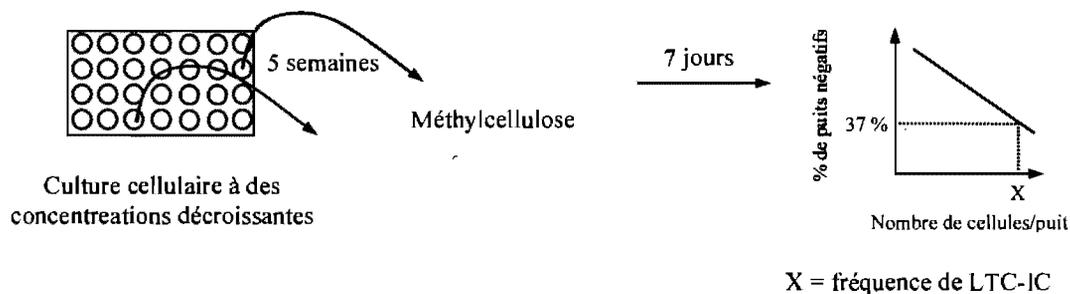
B) Analyse des cellules souches *in vitro*

Figure 1. 3: Résumé des essais *in vitro* permettant de quantifier les précurseurs et les cellules souches hématopoïétiques.

(A) Les cellules sont mises en culture dans un milieu de culture semi-solide pendant une semaine. Le nombre de précurseurs (CFC) correspond au nombre de colonies formées et le potentiel de différenciation des CFC est déterminé par la nature des cellules différenciées composant les colonies.

(B) Les cellules sont mises en culture à des concentrations décroissantes pendant 5 semaines avant d'être transférées en milieu semi-solide. La présence de CFC dans chacun des puits est alors évaluée et correspond à la présence de cellules souches dans la culture liquide. À l'aide des statistiques de Poisson il est possible de calculer la fréquence de cellules souches (LTC-IC) dans la population initiale. Selon ces tests statistiques, la concentration cellulaire où 37% des puits sont négatifs correspond à la fréquence des cellules souches dans la culture initiale. CFC : colony forming cells, LTC-IC : long term culture initiating cells. Adapté de Coulombel et al. (2004) *Oncogene* 23, 7210-7222

1.2.2.3. Essais fonctionnels *in vivo*

L'utilisation des essais *in vitro* pour l'étude des cellules souches est limitée dans l'optique où on ne connaît pas les conditions optimales pour maintenir ces cellules; le passage des cellules souches en culture cause inexorablement leur perte (Bhatia et al. 1997; Ueda et al. 2000). La transplantation de moelle osseuse dans une souris hôte préalablement irradiée permet de contourner ce problème et d'étudier ces cellules selon leur multipotentialité à long terme et leur capacité d'autorenouvellement (Snodgrass and Keller 1987; Keller and Snodgrass 1990; Iscove and Nawa 1997). L'irradiation des souris hôtes cause une ablation de leur système hématopoïétique et permet ainsi aux cellules du donneur de reconstituer l'hématopoïèse de l'hôte. La cinétique de reconstitution du système hématopoïétique permet en effet de distinguer les progéniteurs des cellules souches puisque les progéniteurs reconstituent l'hématopoïèse en moins de 3 semaines et que les cellules souches ont besoin d'au moins 3 à 4 mois (Coulombel 2004). La discrimination entre les cellules du donneur de celles du receveur se fait en utilisant des souris de génotypes différents. Par exemple, on peut distinguer les cellules exprimant différents isoformes du gène CD45 par cytométrie en flux, différentes formes de l'hémoglobine par électrophorèse ou encore la présence du chromosome Y par PCR. Il existe plusieurs variantes aux essais de transplantation, mais malgré qu'ils répondent à des questions différentes, ils sont tous basés sur la fonction de multipotentialité à long terme des cellules souches.

La quantification des cellules souches de la moelle osseuse se fait par transplantation en dilution limite, c'est-à-dire par la transplantation de quantités décroissantes de cellules de moelle osseuse (Figure 1.4A). Un nombre constant de cellules de support, du même génotype que la souris hôte, est cotransplanté avec les cellules test (le terme « cellules test » sera utilisé en référence aux cellules à étudier) afin d'assurer la survie des souris dans les conditions limites. La contribution du donneur est évaluée 4 mois post-transplantation et un minimum de 1% de reconstitution dans toutes les lignées hématopoïétiques (moelle osseuse et thymus) doit être observé pour considérer qu'une

souris a été reconstituée par au moins une cellule souche (Trevisan and Iscove 1995). L'utilisation des statistiques de Poisson permet de calculer la fréquence des CRU (competitive repopulating units) associée à une fréquence de cellules souches (Szilvassy et al. 1990). Selon ces tests statistiques, la condition où le nombre de cellules transplantées se traduit par 37% de souris hôte non reconstituées correspond à la fréquence de cellule souches dans l'extrait de départ.

Lors de la transplantation d'une quantité saturante de cellules, le potentiel individuel des cellules souches est masqué par la présence des autres qui contribuent elles aussi à la reconstitution de l'hématopoïèse. Il est donc primordial d'induire une pression sur les cellules pour révéler leur potentiel optimal. La transplantation de quantité limite de cellules souches (1-2 CRU) sollicite au maximum leur capacité de reconstitution qui est directement proportionnelle au pourcentage de reconstitution dans ces conditions (Figure 1.4B). La co-transplantation de cellules test avec des cellules *WT* (*wild-type*) est une autre façon d'induire une pression au niveau des cellules souches étudiées (Harrison 1980). Bien que cette technique requiert la transplantation de quantité saturante de cellules, les cellules *WT* entrent en compétition avec les cellules test au niveau de leur capacité à reconstituer l'hématopoïèse ce qui permet de révéler des modifications au niveau de la fonction des cellules souches test (Figure 4C). La comparaison de la proportion de cellules test au stade post-transplantation par rapport au ratio initialement transplanté permet de calculer l'index de compétitivité des cellules test.

La transplantation dans une souris irradiée cause un stress majeur sur les cellules souches qui devront proliférer et se différencier pour reconstituer l'hématopoïèse de la souris irradiée. Dans ces conditions, les cellules souches doivent aussi s'autorenouveler pour assurer leur maintien et la transplantation sérielle de cellules permet de tester cette propriété. La transplantation successive de cellules de moelle osseuse *WT* cause une déplétion du pool de cellules souches ce qui se traduit par une diminution de la reconstitution après plusieurs transplantations. C'est la comparaison de la cinétique de

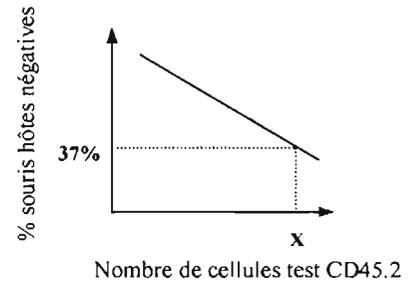
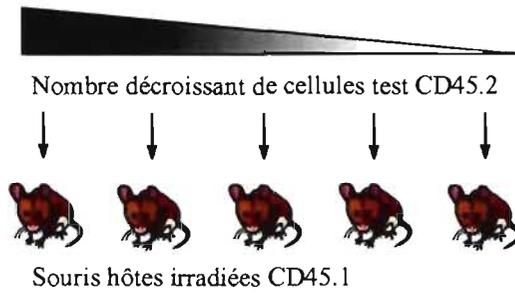
déplétion des cellules test avec celle des cellules *WT* qui permet d'évaluer la fonction d'autorenouvellement des cellules test. La présence de cellules souches est évaluée à chaque transplantation par la présence de cellules dérivées du donneur après 4 mois dans toutes les lignées hématopoïétiques.

Les expériences de transplantation ont permis d'inférer le rôle de plusieurs gènes dans la fonction des cellules souches hématopoïétiques. Bien que les conclusions des études mesurant la capacité des cellules souches transplantées à coloniser la moelle osseuse divergent (Benveniste et al. 2003; Matsuzaki et al. 2004; Camargo et al. 2006), cette technique est l'outil le plus précis présentement disponible pour quantifier et évaluer le potentiel des cellules souches. Par contre, cet essai demeure indirect et la caractérisation subséquente des fonctions biologiques dans lesquelles ces gènes sont spécifiquement impliqués reste ardue et limitée. De plus, la transplantation induit une pression proliférative importante sur les cellules souches (Annexe 2) ce qui cause une diminution de leur compétitivité (Siminovitch et al. 1964; Harrison et al. 1978; Harrison and Astle 1982). Sachant que les HSC responsables de la reconstitution à long terme sont majoritairement en quiescence, il semble que la transplantation des cellules souches amène un biais dans leur étude étant donné que la transplantation modifie leur potentiel prolifératif. Par contre, étant donné qu'on ne connaît pas encore les marqueurs de surface définissant une population complètement pure en HSC, il est essentiel de procéder à un essai fonctionnel mesurant les propriétés de ces cellules soit la différenciation dans toutes les lignées hématopoïétiques et l'autorenouvellement. En plus de permettre d'évaluer ces deux fonctions, la transplantation dans une souris irradiée permet d'analyser les cellules dans un environnement propice à leur maintien. En effet, à l'heure actuelle il est très difficile de maintenir les HSC en culture et donc l'analyse *in vitro* des cellules souches est limitée.

D'autre part, l'étude des cellules souches humaines par des essais fonctionnels *in vivo* est plus difficile à mener à cause de restrictions éthiques. Bien que les primates non humains semblent les meilleurs modèles, leur réponse immunitaire rend ces expériences

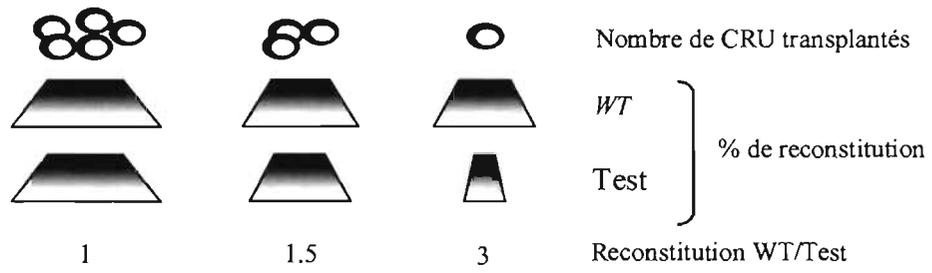
laborieuses et nécessite de transplanter les cellules humaines *in utero* à un moment précis lorsque les feotus sont immunotolérants (Srour et al. 1992; Zanjani et al. 1994). Ces limites techniques, combinées aux coûts élevés et au manque d'espace, ont contraint les chercheurs à utiliser des modèles alternatifs pour tester les cellules souches humaines comme les souris NOD-SCID (Larochelle et al. 1996; Pflumio et al. 1996; Cashman et al. 1997) ou Rag2-/- γ c-/- (Gimeno et al. 2004; Traggiai et al. 2004). Ces souris immunodéficientes permettent aux cellules souches humaines de reconstituer une hématopoïèse humaine et on peut analyser la reconstitution de 16 à 20 semaines post-transplantation ce qui permet d'évaluer la fonction des cellules souches responsables de la reconstitution à long terme. De plus, les cellules souches humaines transplantées dans ces souris peuvent former différents types de cellules matures telles que des lymphocytes T, des cellules érythroïdes et des plaquettes. Ces modèles de souris permettent donc d'étudier les cellules souches humaines selon leurs fonctions d'autorenouvellement et de multipotentialité.

A) Transplantation en dilution limite

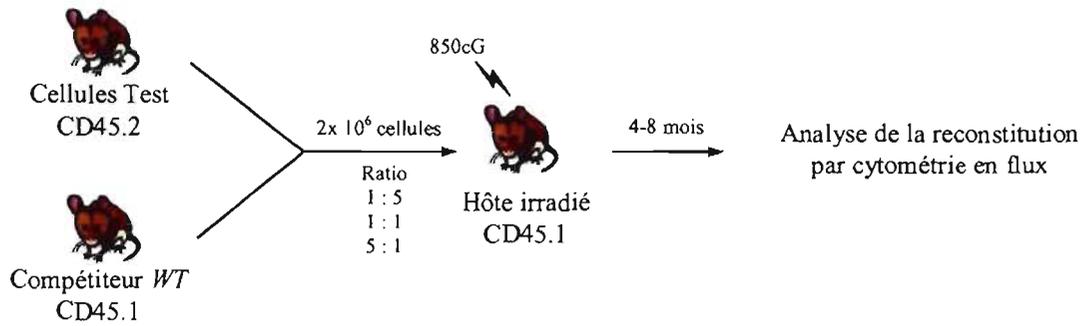


X = Fréquence de cellules souches (CRU)

B) Transplantation à concentration saturante vs limitante



C) Transplantation en compétition



D) Transplantation sérielle

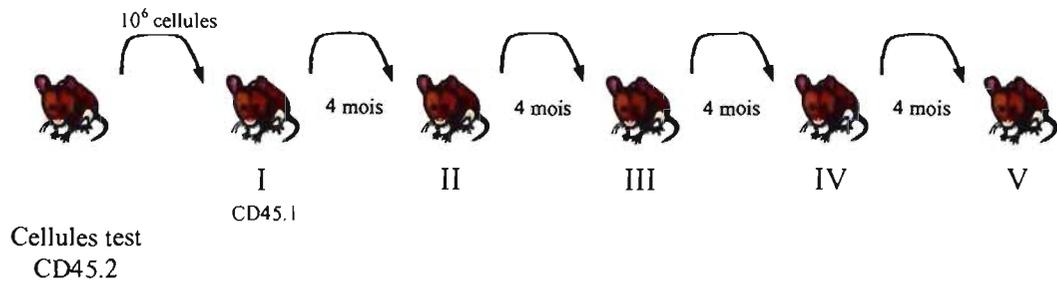


Figure 1. 4: Résumé des essais *in vivo* permettant d'étudier les cellules souches hématopoïétiques.

(A) Des cellules test (CD45.2) sont transplantées en quantité décroissantes dans des souris hôtes irradiées (CD45.1). Des cellules de support (CD45.1) sont cotransplantées pour assurer la survie aux dilutions limites. La reconstitution de la moelle osseuse et du thymus est évaluée par cytométrie en flux 4 mois post-transplantation. Une souris est considérée positive, c'est-à-dire reconstituée par au moins une cellule souche si on observe au minimum 1% de reconstitution dans toutes lignées. Les statistiques de Poisson permettent de calculer la fréquence de cellule souche (CRU) initialement présente. CRU : competitive repopulating unit

(B) La transplantation de quantité saturante de cellules souches ne permet pas d'observer le potentiel individuel des cellules. En effet, dans l'exemple présenté ici, la présence des autres cellules est suffisante pour compenser la déficience des cellules test. Par contre, en condition limite où le potentiel optimal de la cellule est requis, la défaillance des cellules test est révélée.

(C) Différents ratios de cellules test (CD45.2) sont transplantées avec des cellules compétitrices *WT* (CD45.1) dans des souris hôtes (CD45.1). La compétitivité des cellules souches est déterminée par analyse de la moelle osseuse par cytométrie en flux 4 à 8 mois après la transplantation. La comparaison de la reconstitution (CD45.2) post-transplantation par rapport à la proportion initialement transplantée permet de calculer l'index de compétitivité des cellules test.

(D) Une quantité saturante de cellules test (CD45.2) est transplantée dans des souris (CD45.1) irradiées et à 4 mois post-transplantation les cellules de moelle sont analysées par cytométrie en flux et retransplantées dans une souris hôte secondaire. Ces manipulations sont effectuées à chaque 4 mois. En parallèle, la même procédure est suivie avec des cellules *WT* (CD45.2) ce qui permet d'avoir un point de comparaison pour évaluer le potentiel d'autorenouvellement de cellules test. La série de transplantation prend fin lorsque les cellules test ou les cellules *WT* ne contribuent plus à l'hématopoïèse.

1.2.3. Régulateurs du maintien des cellules souches hématopoïétiques

Tel que mentionné précédemment, les cellules souches hématopoïétiques doivent être présentes tout au long de la vie d'un organisme pour assurer la formation de cellules matures fonctionnelles essentielles à la survie. Durant l'embryogénèse ainsi que chez l'adulte, plusieurs facteurs vont influencer le maintien des cellules souches et donc perturber leur destin. L'identification de marqueurs permettant une meilleure purification des cellules souches et l'apparition de technologies permettant l'ablation conditionnelle des gènes (Kuhn et al. 1995) ont permis de révéler le rôle d'un nombre important de gènes dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques au niveau des cellules souches hématopoïétiques. En effet, ces différents joueurs régulent le maintien des cellules souches en agissant sur divers états cellulaires tels que la quiescence/prolifération, la différenciation, la division symétrique, la survie et la sénescence.

1.2.3.1. Facteurs environnementaux

L'environnement est un régulateur majeur du développement et du maintien du système hématopoïétique. Bien qu'au niveau de la spécification du système hématopoïétique il est clair que l'environnement joue un rôle instructif, il n'en demeure pas moins qu'une fois le système hématopoïétique établi, sa fonction exacte est moins bien connue. En effet, le rôle de l'environnement est plutôt perçu comme permissif, c'est-à-dire qu'il est essentiel à la survie des cellules, sans moduler leur destin. Malgré cela, plusieurs observations suggèrent que l'environnement peut aussi être instructif ce qui démontre que son rôle est en fait beaucoup plus complexe que ce qu'on croyait au départ. Le système hématopoïétique est en continuelle régénération et doit en effet s'adapter au besoin de l'organisme, il va donc de soi de penser que l'environnement cellulaire puisse directement moduler le destin des cellules pour répondre à ces changements. Dans cette section, je discuterai donc des différents résultats supportant ces deux visions du rôle de

l'environnement et apporterai une attention particulière au récepteur c-Kit dont le rôle a été énormément étudié dans l'hématopoïèse.

1.2.3.1.1. La niche hématopoïétique

Afin de répondre aux stress hématopoïétiques en moment opportun, un organisme doit posséder un réservoir de cellules souches disponibles en cas de besoin. Ce réservoir doit en fait supporter leur autorenouvellement, et donc leur maintien, tout en inhibant leur différenciation. L'idée d'un tel microenvironnement fût introduite il y a trente ans, et on y réfère maintenant en tant que niche des cellules souches (Schofield 1978). Malgré que l'identification de ces niches soit plutôt ardue chez les mammifères, il n'est resté pas moins qu'au niveau de l'épiderme, de l'épithélium intestinal, des gonades et du système neuronal, les chercheurs ont observé que les cellules souches de ces tissus sont localisées en des endroits bien précis (Spradling et al. 2001). Par contre, c'est l'étude des cellules souches germinales de la drosophile qui a permis de mieux élucider la fonction et la structure de la niche ainsi que les voies de signalisation sous-jacentes (Lin 2002). Les ovaires et les testicules de drosophile sont des structures linéaires où la niche se situe dans la partie apicale. À cet endroit, les cellules souches germinales interagissent directement avec les cellules stromales et c'est l'orientation de la division cellulaire qui va influencer le devenir des cellules filles, c'est-à-dire que lorsqu'une division est asymétrique par rapport à la niche, la cellule fille gardant contact avec la cellule stromale reste une cellule souche tandis que celle perdant le contact se différencie (Wallenfang and Matunis 2003).

Au niveau du système hématopoïétique, il a en effet été démontré que les cellules souches se situent à des endroits bien particulier dans la moelle osseuse, soit en contact direct avec les ostéoblastes dans l'os trabéculaire et forme ce qu'on appelle la niche hématopoïétique (Taichman 2005). Cette interaction des cellules souches avec les ostéoblastes est primordiale à leur maintien : en effet, il a été démontré qu'une diminution du nombre d'ostéoblastes provoque une réduction du nombre absolu de cellules souches et

qu'une augmentation du nombre d'ostéoblastes cause un accroissement spécifique du nombre de cellules souches sans affecter les progéniteurs (Calvi et al. 2003; Zhang et al. 2003). Au niveau de la moelle osseuse, contrairement à ce qui a lieu dans le foie foetal, les cellules souches se maintiennent sans s'expandre. Ceci implique que lors de sa division cellulaire, une cellule souche donne naissance à une cellule-fille ayant un potentiel de cellule souche et une cellule-fille engagée dans le processus de différenciation (Figure 1.5). On peut penser que ce type de division asymétrique requiert la ségrégation différentielle de différents facteurs tel que démontré lors de la division asymétrique des cellules neuronales et musculaires chez la drosophile (Rhyu et al. 1994; Spana et al. 1995; Carmena et al. 1998). De plus, l'orientation de la division cellulaire par rapport à la niche y joue probablement un rôle, mais ce sont des hypothèses qui restent à valider.

Quel que soit le système étudié, les biologistes des cellules souches ont constaté certaines règles générales que ce soit au niveau de l'organisation anatomique des niches ou des mécanismes impliqués dans la régulation de cette niche et du maintien des cellules souches. En effet, une des révélations majeures est l'observation que les cellules souches sont majoritairement en quiescence, soit environ 75% pour les cellules souches hématopoïétiques (Cheshier et al. 1999; Taylor et al. 2000). Les cellules qui ont la capacité de reconstituer l'hématopoïèse à long terme sont principalement en G0, contrairement aux progéniteurs qui prolifèrent beaucoup plus et dont la capacité à reconstituer l'hématopoïèse est transitoire (Passegue et al. 2005). L'interaction physique entre les cellules souches et leur niche semble intimement liée au maintien de la quiescence et donc à l'identité de ces cellules. En effet, l'interaction entre le récepteur Tie2 et son ligand Ang-1 exprimé par les ostéoblastes est essentielle à la localisation des cellules souches dans la niche et au maintien de leur état de quiescence (Arai et al. 2004). De plus, la stimulation de cette voie de signalisation se traduit par une augmentation de la capacité de reconstitution à long terme des cellules souches. L'importance de cette interaction directe entre les cellules souches et le stroma est aussi mise en évidence dans une étude où des HSC déficientes pour le gène codant pour un récepteur sensible au calcium ne migrent pas à la niche après transplantation

et présentent des défauts fonctionnels (Adams et al. 2006). Par ailleurs, il a été démontré que la perte de fonction de CXCR4, le récepteur de la chémokine CXCL12, provoque une diminution du maintien et de la quiescence des cellules souches (Sugiyama et al. 2006). Les cellules souches étant normalement en contact avec celles exprimant CXCL12 au niveau de la niche, ces observations mettent aussi en lumière l'importance de l'interaction des cellules souches avec la niche pour assurer leur maintien.

Par contre, la propriété de quiescence des cellules souches est une caractéristique spécifique aux cellules souches adultes. En effet, au niveau fœtal, les cellules souches sont majoritairement en cycle et c'est entre la troisième et la quatrième semaine après la naissance que ces cellules acquièrent la propriété de quiescence (Bowie et al. 2006). La fréquence de cellules souches dans le foie fœtal est plus élevée que celle dans la moelle osseuse, ce qui suggère que le foie fœtal est un site propice à leur expansion (Morrison et al. 1995). Par ailleurs, il a été observé que cette diminution avait lieu entre la troisième et la quatrième semaine suivant la naissance, exactement au moment de la transition entre le stade fœtal prolifératif et le stade adulte quiescent (Bowie et al. 2007b). De plus, la transplantation de cellules souches de foie fœtal dans une souris adulte se caractérise par la diminution de leur fréquence au même niveau que celui observé dans la moelle adulte. Ces résultats démontrent que l'environnement présent dans la moelle osseuse ne permet pas de supporter l'expansion des cellules souches, mais favoriserait plutôt leur transition vers un stade plus quiescent. Par contre, les modulateurs de la transition développementale des cellules souches du stade fœtal vers le stade adulte restent encore inconnus.

Plus récemment, une nouvelle niche hématopoïétique a été identifiée au niveau des sinusoides vasculaires dans la moelle osseuse (Kiel et al. 2005). On connaît encore peu de choses au sujet de cette niche vasculaire, mais l'observation que les cellules s'y trouvant sont actives au niveau du cycle cellulaire suggère que ces niches seraient plutôt requises pour permettre la prolifération, la différenciation ou la mobilisation des cellules souches et donc une réponse immédiate.

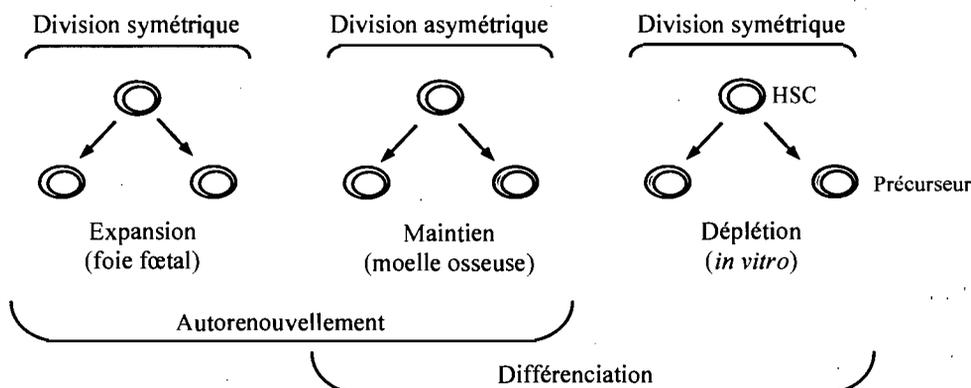


Figure 1. 5: Modèles alternatifs de la division des cellules souches hématopoïétiques.

Durant le développement (foie fœtal), les cellules souches subissent préférentiellement des divisions de type symétrique résultant en une expansion de leur nombre. Par contre, chez l'adulte (moelle osseuse), les cellules souches se divisent plutôt asymétriquement ce qui assure le maintien de ces cellules tout en permettant la différenciation. Enfin, il existe aussi un type de division symétrique générant deux cellules filles différenciées qui est probablement à l'origine du phénomène de perte des cellules souches observé lors de leur culture *in vitro*.

1.2.3.1.2. Les cytokines

1.2.3.1.2.1. Modèle instructif ou permissif?

Il est évident que les cellules hématopoïétiques sont sensibles à leur environnement puisqu'en absence de facteurs de croissance ces cellules entrent en apoptose. C'est pourquoi l'environnement cellulaire est perçu comme ayant des fonctions permissives plutôt qu'instructives sur le destin des cellules. En effet, l'activation du récepteur c-Kit ou de la voie de signalisation Jak-STAT est impliquée dans la survie des cellules hématopoïétiques (Koury and Bondurant 1990; Caceres-Cortes et al. 1994; Wu et al. 1995; Rajotte et al. 1996) et la modulation de ces voies influence le nombre de cellules souches

chez la souris (Miller et al. 1996; Miller et al. 1997; Oh and Eaves 2002), sans avoir d'effets apparent sur la différenciation cellulaire (Niwa et al. 1998; Caceres-Cortes et al. 2001). Il semble donc que les facteurs impliqués dans la survie cellulaire ne contrôlent pas la différenciation. Ce semble être le cas entre autre pour l'érythropoïétine (EPO) qui est requise pour la maturation terminale des érythrocytes, mais non pour l'apparition du progéniteur érythroïde en soi (Wu et al. 1995). De plus, la déficience en progéniteurs des souris *Epor*^{-/-} est corrigée par la stimulation avec d'autres cytokines telle la prolactine ou la thrombopoïétine (TPO) (Kieran et al. 1996; Socolovsky et al. 1997). Dans le même ordre d'idées, la défaillance plaquettaire observée chez les souris *c-Mpl*^{-/-} est corrigée par l'insertion dans le locus de ce récepteur d'une chimère composé du domaine extracellulaire du récepteur c-MPL et du domaine intracellulaire du G-CSF (Stoffel et al. 1999). L'activation de voies de signalisation communes est probablement à l'origine de la grande versatilité des cytokines et appuie l'idée de leur rôle permissif. Par contre, d'autres observations viennent contredire ces conclusions. En effet, la dose de GM-CSF semble être un facteur déterminant dans le choix d'une cellule à se différencier en macrophage ou en granulocyte (Metcalf 1980). De plus, le GM-CSF est capable d'induire la différenciation myéloïde à partir de progéniteurs lymphoïdes (Kondo et al. 2000; King et al. 2002). Par ailleurs, des résultats non publiés de notre laboratoire démontrent que le GM-CSF induit l'expression du facteur de transcription PU.1 dans les progéniteurs myéloïdes et sachant que le dosage de PU.1 est un déterminant majeur de la différenciation myéloïde (St-Denis et al., en préparation), ces résultats sont en faveur d'un rôle instructif pour le GM-CSF. D'autres résultats du laboratoire démontrent le rôle du facteur de transcription SCL en aval du récepteur du VEGF au niveau de l'hémangioblaste (Martin et al. 2004) et en aval du récepteur de l'EPO dans les progéniteurs érythroïdes (Lahlil et al., en préparation). L'environnement cellulaire peut donc moduler directement le destin des cellules en régulant l'expression de facteurs de transcription tissu-spécifiques tout en permettant leur survie.

L'expression de facteurs de transcription spécifiques aux divers embranchements du système hématopoïétique est essentielle à la différenciation dans les différentes lignées. Ces observations ont d'abord suggéré que la différenciation est simplement une conséquence de l'induction d'une série précise de gènes à partir d'une cellule souche. Par contre, plusieurs études remettent en question ce modèle simpliste. La lignée cellulaire FDCP mix (Factor-dependent cell Patterson mix) est utilisée comme modèle de cellule souche et l'étude de son profil d'expression a révélé que ces cellules expriment le récepteur de l'EPO et le facteur de transcription érythro-spécifique GATA-1 (Crotta et al. 1990; Heberlein et al. 1992). Il a aussi été démontré que les promoteurs du récepteur de l'EPO et de la β -globin contiennent des sites hypersensibles à la DNase suggérant que ces gènes érythroïdes soient actifs au niveau des cellules multipotentes (Jimenez et al. 1992). L'analyse des cellules FDCP mix et de cellules souches humaines au niveau unicellulaire a révélé qu'elles coexpriment des gènes spécifiques à la lignée érythroïde et aux granulocytes/macrophages, démontrant que l'expression du programme génétique de plusieurs lignées précède le choix vers une lignée précise (Hu et al. 1997). Par ailleurs, l'analyse par micropuces d'ADN du profil d'expression de cellules souches primaires purifiées a permis de démontrer que celles-ci expriment des gènes myéloïdes (PU.1, C/EBP α) et lymphoïdes (GATA-3) (Phillips et al. 2000; Ivanova et al. 2002). Cet état de «priming», c'est-à-dire la propriété d'exprimer les gènes de toutes les lignées à de faibles niveaux, suggère que la différenciation est plutôt un processus où les cellules perdent certains potentiels tout au long de leur progression dans la hiérarchie hématopoïétique, plutôt que d'en acquérir des nouveaux. La cellule qui se différencie éteint certains programmes génétiques et en consolide un en particulier.

Cette caractéristique des cellules souches hématopoïétiques à exprimer plusieurs facteurs de transcription à de faibles niveaux sous-tend l'existence de régulateurs capables de consolider certaines voies au détriment de d'autres. Bien que certaines évidences suggèrent que l'initiation de ce processus décisionnel soit le fruit du hasard, il n'en

demeure pas moins que la grande prévisibilité du système hématopoïétique joue en faveur d'un rôle instructif pour l'environnement afin de permettre l'homéostasie du système hématopoïétique.

1.2.3.1.2.2. Steel Factor et son récepteur c-Kit

Le récepteur c-Kit (CD117) fait partie de la famille de récepteur tyrosine kinase de type III dont sont aussi membres les récepteurs c-Fms, PDGF et Flk-2/Flt3 (Yarden et al. 1987; Qiu et al. 1988). Durant l'embryogénèse, c-Kit et son ligand sont exprimés le long des voies de migration et à la destination des cellules germinales et des mélanocytes, de même qu'aux sites soutenant l'hématopoïèse (sac vitellin, foie foetal et moelle osseuse) suggérant que c-Kit soit requis au niveau du développement de tous ces tissus (Matsui et al. 1990; Orr-Urtreger et al. 1990; Keshet et al. 1991). Une panoplie de mutations naturelles au niveau du locus codant pour le récepteur c-Kit ou son ligand ont été caractérisées ce qui a contribué à préciser le rôle de c-Kit *in vivo* (Russell 1979; Geissler et al. 1981). En effet, l'absence du ligand (mutation *Sl*), de même que l'absence du récepteur c-Kit à la surface des cellules (mutation *W*) causent la mort *in utero* ou dans la période périnatale des souris et ces mutations sont associées à une anémie macrocytaire sévère. De même, l'absence de l'activité tyrosine kinase du récepteur c-Kit (mutation *W^{k2}*) provoque la mort peu après la naissance et se caractérise aussi par une anémie sévère (Tan et al. 1990). D'autre part, des mutations ponctuelles causent des phénotypes au niveau de la fertilité, de la pigmentation et du système hématopoïétique et leur gravité varie en fonction du degré de diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur c-Kit ou de la production de son ligand (Reith et al. 1990). Ces défauts causés par une déficience de la voie de signalisation de c-Kit révèle son rôle essentiel dans le développement de ces tissus.

1.2.3.1.2.2.1. Expression et fonctions dans l'hématopoïèse

La perte d'expression de c-kit se caractérise par une anémie macrocytaire très sévère révélant le rôle crucial de c-Kit au niveau de l'hématopoïèse. Les cellules souches

hématopoïétiques capables de multipotentialité à long terme se caractérisent par l'expression du récepteur c-Kit et plusieurs études ont démontré que la fraction de la moelle c-Kit^{neg} est déficiente en cellules souches hématopoïétiques (Okada et al. 1991; Ikuta and Weissman 1992; Li and Johnson 1995; Kawashima et al. 1996). De plus, l'injection d'une cellule CD34^{low/-}c-kit⁺Sca-1⁺Lin⁻ permet de reconstituer l'hématopoïèse d'une souris irradiée en transplantation primaire et secondaire, démontrant que les cellules souches capables de reconstitution à long-terme et d'autorenouvellement expriment le récepteur c-Kit (Osawa et al. 1996a; Osawa et al. 1996b). L'expression de c-Kit augmente dans les cellules primitives en cycle et les progéniteurs pour diminuer avec la différenciation terminale sauf dans les mastocytes (Katayama et al. 1993). L'étude du récepteur c-kit a été grandement facilitée par la disponibilité de plusieurs souris possédant des mutations spontanées au locus codant pour ce récepteur ou son ligand. En effet, la capacité des cellules *WT* à reconstituer l'hématopoïèse d'une souris non irradiée possédant un récepteur c-Kit hypofonctionnel (mutation *W^{fl}*) révèle le rôle crucial de c-Kit dans la fonction des cellules souches hématopoïétiques (Boggs et al. 1982; Harrison and Aistle 1991). La moelle de ces souris compte en effet moins de cellules souches tel que démontré par le nombre réduit de CRU et de CFU-S dans ces souris (Geissler and Russell 1983; Miller et al. 1996). De plus, il a récemment été démontré que l'activation du récepteur c-Kit est absolument essentielle au maintien en quiescence des cellules souches et donc à la préservation à long terme de ces cellules (Thoren et al. 2008). Sachant que la forme transmembranaire du ligand du récepteur c-Kit est requise pour l'interaction des cellules souches avec la niche hématopoïétique (Driessen et al. 2003), ces résultats suggèrent fortement que c-kit favorise la quiescence des cellules souches en permettant leur interaction directe avec la niche hématopoïétique.

L'importance de cette voie de signalisation est aussi mise en évidence par plusieurs études *in vitro*. En effet, en présence du ligand de c-Kit, la perte des cellules souches habituellement observée lors de leur passage en culture est transitoirement retardée (Li and Johnson 1994). Par contre, la combinaison avec l'IL-11 est nécessaire pour observer une

capacité plus soutenue à maintenir les cellules souches capables de reconstitution à long terme (Holyoake et al. 1996). Il semble donc que le ligand de c-Kit favorise le maintien de la survie des cellules souches *in vitro*, mais pas leur autorenouvellement (Li and Johnson 1994; Rebel et al. 1994). En effet, plusieurs études ont démontré le rôle anti-apoptotique de la voie de c-kit au niveau des cellules hématopoïétiques. La stimulation de cellules NK par le ligand de c-kit permet leur survie due à une augmentation de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Carson et al. 1994). Par contre, au niveau de la lignée myéloïde, c-kit induit la survie de manière indépendante de BCL-2 (Gommerman and Berger 1998). De plus, d'autres études ont démontré que le ligand de c-Kit induit la phosphorylation et donc l'inhibition de la protéine proapoptotique Bad (Blume-Jensen et al. 1998). La capacité de purifier des populations plus homogènes a permis de montrer que c-kit est impliqué dans la survie des cellules immatures, mais non au niveau des cellules différenciées (Borge et al. 1997). Par contre, la capacité des cellules souches à s'autorenouveler *in vivo* dépend de la présence de Steel Factor (Miller et al. 1997; Bowie et al. 2007a). Les différences observées *in vitro* et *in vivo* au niveau du rôle de c-Kit dans l'autorenouvellement sont probablement le reflet de la régulation complexe de cette fonction. En effet, tel qu'illustré par le cas de c-Kit, la synergie de plusieurs voies de signalisation est requise pour soutenir l'autorenouvellement. Ceci se traduit *in vitro* par la nécessité de la présence de plusieurs cytokines pour maintenir et expandre les cellules souches, et *in vivo* par une déficience dans cette fonction en abrogeant seulement une voie.

Au niveau des mélanocytes, le facteur de transcription Mitf de la famille bHLHZip est impliqué dans la régulation de la différenciation et de la survie de ces cellules de manière c-Kit dépendante. En effet, il a été démontré que c-Kit contrôle l'activité transcriptionnelle de Mitf en favorisant le recrutement du coactivateur p300 (Hemesath et al. 1998; Price et al. 1998; Wu et al. 2000). Cette interaction biochimique serait effectivement essentielle à la capacité de Mitf à réguler la différenciation des mélanocytes, ce qui démontre clairement que la stimulation de c-Kit par Steel Factor peut directement moduler le destin cellulaire.

Or, au niveau du système hématopoïétique, la modulation de l'activité de facteur de transcription tissu spécifique par l'environnement n'est pas aussi bien documentée. On observe en effet une augmentation de l'expression de SCL, un facteur de transcription essentiel à l'hématopoïèse, dans les colonies érythroïdes après 7 jours de culture en présence du ligand de c-Kit (Miller et al. 1994). De plus, dans la lignée hématopoïétique TF-1, il a été montré que la perte de SCL cause une augmentation de l'apoptose spécifiquement en réponse au Steel Factor, suggérant que le facteur de transcription SCL soit requis en aval de c-Kit (Krosi et al. 1998). Par contre, mes travaux ont permis de valider cette interaction et de démontrer que SCL est requis dans la voie de c-Kit pour permettre la fonction des progéniteurs multipotents et érythroïdes primaires (Lacombe et al., en préparation). Cette étude révèle que l'environnement peut directement moduler le destin des cellules hématopoïétiques en agissant sur l'expression de facteurs de transcription tissu-spécifique.

1.2.3.1.2.3. Expansion *in vitro*

La capacité de l'environnement à moduler le destin des cellules souches hématopoïétiques est une prémisse majeure au développement d'essais visant l'expansion de ces cellules *in vitro*. En effet, le progrès à ce niveau pourrait influencer le succès de certaines thérapies basées sur l'autogreffe de moelle osseuse où le nombre de cellules souches présentes dans le greffon est insuffisant. Des études ont démontré que des cellules purifiées à partir de la moelle osseuse et cultivées pendant 10 jours en présence de IL-11, Flt3-ligand et Steel Factor permet d'augmenter de 3 fois le nombre de cellules souches et que le potentiel de multipotentialité et d'autorenouvellement de ces cellules n'est pas altéré (Miller and Eaves 1997). Par contre, il a été démontré que la prolongation du temps en culture est associée à une diminution du nombre de ces cellules (Bhatia et al. 1997; Ueda et al. 2000). De plus, il a été observé que les cellules responsables de la reconstitution à long terme s'étaient divisées au moins une fois après culture, excluant la possibilité que la perte des cellules souches *in vitro* soit causée par leur incapacité à répondre aux cytokines

(Glimm and Eaves 1999), mais plutôt à une déficience au niveau de la survie ou à l'activation d'un mécanisme de division symétrique générant deux cellules engagées dans la différenciation.

Les résultats précédents démontrent la nécessité d'identifier les facteurs environnementaux favorisant un autorenouveaulement d'expansion (division cellulaire générant deux cellules-filles avec un potentiel de cellules souches (Figure 1.5)) et une meilleure survie des cellules souches. Dans ce sens, des études récentes ont démontré une expansion importante des cellules souches suite à leur stimulation avec le facteur de croissance FGF-1 (de Haan et al. 2003). De plus, la présence de la forme soluble de la protéine Sonic Hedgehog dans le cocktail de facteurs de croissance hématopoïétiques (Flt3-ligand, Steel Factor, G-CSF, IL-3 et IL-6) augmente le nombre de cellules souches récupérées après 7 jours de culture (Bhardwaj et al. 2001). Aussi, l'ajout de BMP-4 dans le cocktail de facteurs de croissance hématopoïétique, permet aux cellules souches de se maintenir plus longtemps en culture (Bhatia et al. 1999). Par ailleurs, la culture des cellules souches sur des pétris où le ligand de Notch Delta-1 est immobilisé a permis d'augmenter le nombre de cellules souches responsables de la reconstitution à court terme de façon exponentielle après 28 jours de culture (Varnum-Finney et al. 2000). Sachant que les ostéoblastes de la niche hématopoïétique expriment le ligand de Notch Jagged-1, ces résultats mettent en lumière le rôle important de la voie de Notch dans le maintien des cellules souches. La voie de Wnt semble aussi avoir un rôle prépondérant à jouer dans l'autorenouveaulement des cellules souches (Murdoch et al. 2003; Reya et al. 2003; Willert et al. 2003). Il a entre autre été démontré que l'expression d'une forme constitutivement active de la β -caténine dans les cellules souches cause une augmentation de 80 fois de leur nombre après une semaine de culture (Reya et al. 2003). Cette augmentation du nombre de cellules souches est associée à une augmentation de l'expression de HoxB4, un régulateur intrinsèque de l'autorenouveaulement des cellules souches.

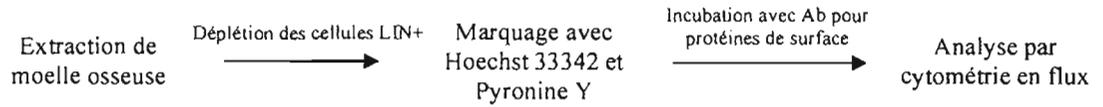
En résumé, les données présentées dans cette section démontrent que l'environnement est impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques essentielles au maintien de l'équilibre du système hématopoïétique. Bien que plusieurs évidences suggèrent que le rôle de l'environnement dans la régulation de ces fonctions soit permissif, il semble que ce rôle soit aussi instructif tel que démontré par la régulation de certains facteurs de transcription tissus spécifiques par les cytokines.

1.2.3.2. Régulateurs intrinsèques

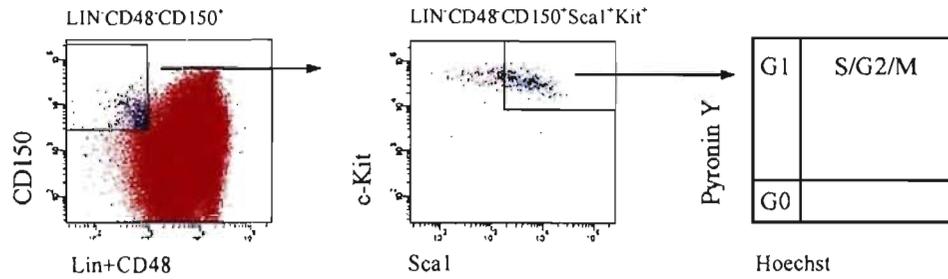
1.2.3.2.1. Quiescence et prolifération

L'entrée dans le cycle cellulaire des cellules souches doit être finement régulée afin de soutenir la production de cellules matures tout en maintenant un pool de cellules souches durant toute la vie d'un organisme. Plusieurs études convergent et suggèrent que la capacité des cellules souches à reconstituer l'hématopoïèse à long terme est associée à leur état de quiescence (Figure 1.2 et 1.6). Il a été démontré que la phase G0 du cycle cellulaire est hautement enrichie en cellules souches hématopoïétiques (Morrison and Weissman 1994) et plusieurs études *in vitro* supportent ces résultats. En effet, les cellules de moelle osseuse résistantes à la stimulation par Steel Factor et IL-3 de même qu'à la présence de 5'FU sont enrichies en cellules pluripotentes capables de générer des colonies après plusieurs semaines en culture (LTC-IC) (Berardi et al. 1995). Effectivement, le nombre de LTC-IC est élevé dans la fraction de cellules en G0 et diminue lorsque celles-ci entrent en cycle de même qu'après leur retour en G0 (Gothot et al. 1997; Gothot et al. 1998). De plus, des études *in vivo* ont aussi permis d'associer la quiescence des cellules souches à leur capacité de reconstituer l'hématopoïèse à long terme, tel que démontré par la fréquence élevée de CRU dans la fraction de cellules souches en G0 (Huttmann et al. 2001). Ces résultats ont aussi été confirmés au niveau des cellules souches humaines CD34+, où il a été observé que la fraction G0 est enrichies en LTC-IC et en cellules capables de reconstituer l'hématopoïèse d'une souris irradiée (Leemhuis et al. 1996).

A) Protocole pour analyse du cycle cellulaire des cellules souches



B) Représentation graphique des analyses par cytométrie en flux



C) Comparaison du cycle cellulaire des cellules souches et des précurseurs

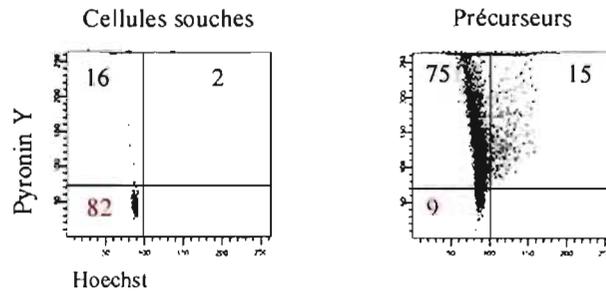


Figure 1. 6: La quiescence est associée à la capacité de reconstitution à long terme.

(A) Un extrait cellulaire provenant de la moelle osseuse est déplété en cellules différenciées à l'aide de billes magnétiques couplées à des anticorps dirigés contre des protéines exprimées par les cellules matures. Les cellules immatures sont ensuite traitées avec le Hoechst 33342 (ADN) et la PyronineY (ARN) et marquées avec un cocktail d'anticorps permettant l'analyse des cellules souches.

(B) Le cycle cellulaire est spécifiquement déterminé au niveau de la population enrichie en cellules souches ($\text{Lin}^- \text{CD48}^- \text{CD150}^+ \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+$) selon l'incorporation de Hoechst et de PyronineY. Cette approche permet de distinguer les différentes phases du cycle cellulaire selon le contenu en ADN et en ARN des cellules. En effet, les cellules quiescentes (G0) possèdent une quantité d'ADN de $2n$ et leur contenu en ARN est minimal ($\text{Hoechst}^{\text{low}} \text{PyronineY}^{\text{low}}$) compte tenu du fait qu'elles sont inactives ce qui permet de les discerner des cellules en G1 qui synthétisent plus d'ARN ($\text{Hoechst}^{\text{low}} \text{PyronineY}^{\text{int/high}}$). Les cellules en S/G2/M se caractérisent par la présence importante d'ARN et une quantité d'ADN allant de $>2n$ à $4n$.

(C) L'analyse du cycle cellulaire des cellules souches et des progéniteurs révèle que les cellules souches sont principalement en G0, tandis que les précurseurs se retrouvent en majorité dans les phases G1, S et G2/M. Ces observations associent le potentiel des cellules souches à leur état de quiescence et suggère qu'une augmentation de la prolifération cause la perte de ce potentiel. En effet, les précurseurs qui prolifèrent plus ne peuvent soutenir l'hématopoïèse à long terme.

Ces observations suggèrent donc que la population cellulaire à la base de la hiérarchie hématopoïétique est formée de cellules souches quiescentes et qu'une fraction de ces dernières entrent dans le cycle cellulaire pour soutenir l'hématopoïèse. Plusieurs groupes de recherche se sont interrogés à savoir comment ce processus d'activation prenait place. Le premier modèle suggéré propose qu'une cellule souche contribue de façon clonale à l'hématopoïèse, tandis que les autres demeurent quiescentes jusqu'à ce que le potentiel prolifératif de ce clone soit épuisé, et donc à ce moment seulement un autre clone prend la relève. Ce modèle avait été proposé d'après l'observation qu'en transplantant des cellules marquées rétroviralement, seulement quelques clones contribuent à la génération de cellules matures, à n'importe quel moment post-transplantation (Capel et al. 1990). Par contre, ces résultats furent critiqués étant donné la possibilité que seulement une fraction des cellules souches injectées pouvait avoir colonisé la moelle osseuse suite à leur transplantation. Pour pallier à ce problème, un autre groupe de recherche a généré une souris chimérique dans laquelle les cellules souches hématopoïétiques sont dérivées de cellules ES de génotypes différents, ce qui leur a permis d'observer que plusieurs cellules souches hématopoïétiques contribuent simultanément à l'hématopoïèse (Harrison et al. 1987). Bien que cette étude n'exclue pas la possibilité qu'une fraction des cellules souches soit active durant la vie de l'organisme, ces résultats furent confirmés par le travail de plusieurs autres groupes de recherche utilisant le traitement de souris au Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). Cet agent s'intègre à l'ADN lors de la division cellulaire, et donc le nombre de cellules ayant incorporé le BrdU correspond au nombre de cellules étant entrées en cycle depuis le début du traitement. De cette manière, il a été démontré qu'après 32 jours, 75% des CFU-S, une population enrichie en cellules souches et progéniteurs, avaient incorporé le BrdU (Pietrzyk et al. 1985). De plus, il a aussi été observé que sur une période de 12 semaines, 89% de la population PyronineY^{low}Hoescht^{low} hautement enrichie en HSCs avait incorporé le BrdU et que la fréquence de leur division est d'environ 30 jours (Bradford et al. 1997). Des résultats similaires ont aussi été obtenus dans le cadre d'une autre étude et révèlent que 99% des cellules souches hématopoïétiques se sont divisées à

tous les 57 jours approximativement (Cheshier et al. 1999). Cette étude démontre qu'à n'importe quel temps, en condition normale, 76% des HSCs se trouvent en G0 et 24% en cycle. Ces résultats ont aussi permis d'estimer qu'environ 8% des cellules souches entrent en cycle quotidiennement. Dans leur ensemble, ces données démontrent que la quiescence est une propriété fondamentale des cellules souches et est associée à leur capacité de reconstitution à long terme.

Il semble donc que la sortie du cycle cellulaire empêche les cellules souches de se diviser et donc potentiellement de se différencier, les maintenant sous forme de réservoir prêt à s'activer pour reconstituer l'hématopoïèse en temps opportun. Dans les sections qui suivent, je démontrerai qu'une augmentation du nombre de cellules souches transitant de la phase G0 vers G1 est associée à la défaillance de ces cellules à reconstituer l'hématopoïèse à long terme d'une souris irradiée, en prenant comme exemple les gènes qui régulent la quiescence des cellules souches hématopoïétiques (Tableau 1.2).

1.2.3.2.1.1. *p21^{Cip1/Waf1}*

La protéine p21 fait partie de la famille KIP/CIP dont les membres sont des inhibiteurs des cyclines et des *cyclin dependant kinase* (cdk) impliqués dans la progression du cycle cellulaire. L'importance de la quiescence au niveau des cellules souches a été démontrée par l'inactivation du gène codant pour cette protéine. Il a en effet été démontré que la perte de *p21* est associée à une déplétion précoce du réservoir de cellules souches en transplantations sérielles (Cheng et al. 2000b). En effet, à la cinquième transplantation, les cellules souches *p21^{-/-}* ne peuvent plus reconstituer l'hématopoïèse d'une souris irradiée tandis que les cellules de type sauvage ont toujours ce potentiel. Cette déficience des cellules *p21^{-/-}* est attribuée à une diminution du nombre de cellules souches en G0, tel que démontré par la diminution de deux fois du nombre de cellules de moelle osseuse Lin⁻ qui sont dans la fraction Hoechst^{low}PyronineY^{low}, soit en G0. Par contre, la population Lin⁻ n'étant pas une population purifiée en cellules souches, cette observation ne permet pas de

conclure que l'augmentation du nombre de cellules transitant de G0 vers G1 est responsable du phénotype observé lors de la transplantation de cellules $p21^{-/-}$. Par ailleurs, le 5'FU est un agent cytotoxique qui cible les cellules en cycle et son injection *in vivo* compromet l'hématopoïèse des souris $p21^{-/-}$ et s'accompagne d'une diminution de la survie de ces souris par rapport à celles de type sauvage. La perte de $p21$ provoquant une entrée dans le cycle cellulaire, cette observation amène les auteurs à conclure que la létalité est causée par une diminution du nombre de cellules souches, étant donné leur plus grande susceptibilité à être ciblées par le 5'FU. Par contre, les auteurs ne vérifient pas que la population de cellules souches est effectivement affectée, que ce soit par leur analyse phénotypique directe ou par la mesure des cellules présentes dans le sang.

Le modèle de souris utilisé par le groupe de Cheng et al. possède un fond génétique 129/Sv, ce qui limite grandement l'analyse du rôle de $p21$. En effet, l'utilisation de cette souche de souris permet de distinguer les cellules du donneur de celles du receveur par la présence ou l'absence du chromosome Y par PCR, ce qui rend ardue l'analyse de la reconstitution dans les différents compartiments hématopoïétiques. La souche C57BL/6 existe sous deux formes qui expriment des isoformes différents de la protéine CD45, ce qui permet de suivre la reconstitution dans toutes les populations hématopoïétiques par cytométrie en flux après transplantation. En comparaison avec la détection par PCR, cette technique est beaucoup plus rapide, plus quantitative et permet une analyse beaucoup plus détaillée de la reconstitution dans les diverses populations. Dans cette optique, un autre groupe de recherche a évalué le rôle de $p21$ dans les cellules souches hématopoïétiques en utilisant un fond génétique C57BL/6. À l'aide de ce modèle de souris, les auteurs ont transplanté des cellules $p21^{-/-}$ en compétition avec des cellules de type sauvage et n'ont pas observé de défaut au niveau de la reconstitution de l'hématopoïèse par les cellules $p21^{-/-}$, même 7 mois après transplantation ainsi qu'en transplantation secondaire (van Os et al. 2007). De plus, ils n'ont pas observé que les souris $p21^{-/-}$ ont une plus grande susceptibilité au 5'FU, ni de divergence au niveau de leur cycle cellulaire. Par contre, cette étude suggère un rôle pour $p21$ au niveau de la réparation de l'ADN, tel que démontré par

l'augmentation de la sensibilité des souris *p21*^{-/-} à l'irradiation comparé aux souris *WT*. Ces résultats corrént avec des études précédentes démontrant que l'absence de *p21* empêche la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire suite à un dommage à l'ADN (Brown et al. 1997).

La divergence de ces résultats quant au rôle de *p21* dans les cellules souches hématopoïétiques démontre que les mécanismes gouvernant le maintien de la quiescence dans les cellules souches peuvent varier en fonction de la souche de souris. En effet, il a déjà été démontré que le nombre de cellules souches de même que leur état d'activation varient en fonction du fond génétique des souris (de Haan and Van Zant 1997). Bien que ces paramètres ne semblent pas trop varier entre les souris C57BL/6 et 129/Sv, il est aussi possible que chez les souris C57BL/6 des mécanismes de compensation plus robustes existent pour contre l'effet de la perte de *p21*.

1.2.3.2.1.2. *Mef/Elf4*

Le suppresseur tumoral MEF aussi appelé ELF4 est un facteur de transcription de la famille ETS dont l'expression est réprimée par les protéines de fusion impliquées dans certaines leucémies myéloïdes aïgues (AML) (Alcalay et al. 2003; Park et al. 2003a; Muller-Tidow et al. 2004). La perte de fonction de *Mef* chez la souris a permis au groupe de Lacorazza et al. de démontrer le rôle négatif de *Mef* dans le maintien des cellule souches hématopoïétiques. En utilisant différentes combinaisons de marqueurs définissant une population enrichie en cellules souches, ce groupe a observé que la délétion de *Mef* cause une augmentation de deux à trois fois du nombre de cellules souches hématopoïétiques responsables de la reconstitution à long terme (Lacorazza et al. 2006). Cette augmentation se reflète lors de la transplantation secondaire de cellules *Mef*^{-/-} en compétition avec des cellules *WT*, où on observe une augmentation de la compétitivité des cellules *Mef*^{-/-}. L'analyse du cycle cellulaire des cellules Lin⁻Sca1⁺ permet d'observer une augmentation du nombre de ces cellules en G0 en absence de *Mef* et une diminution de la proportion de ces cellules en cycle. Ce défaut au niveau du cycle cellulaire est aussi mis en évidence par la

réduction de la capacité des cellules KSL *Mef*^{-/-} à répondre aux cytokines *in vitro*, que ce soit par analyse directe de leur cycle cellulaire ou par leur expansion clonale. Ces résultats démontrant que MEF est un régulateur négatif de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques sont confirmés par l'analyse de souris *Mef*^{-/-} et *WT* traitées au 5'FU. En effet, ces expériences montrent que les comptes cellulaires sanguins des souris *Mef*^{-/-} sont moins affectées par le traitement au 5'FU et que ces souris récupèrent mieux suite au traitement, ce qui est en accord avec le fait qu'on trouve plus de cellules souches chez ces souris 4 jours post-5'FU. La résistance de ces cellules aux agents cytotoxiques corrèle avec l'observation que MEF est réprimé dans plusieurs cas d'AML. Bien que les souris *Mef*^{-/-} ne développent pas de tumeurs, il est concevable que la perte de *Mef* favorise la survie des cellules souches leucémiques. De plus, il est aussi possible que les cellules souches hématopoïétiques *Mef*^{-/-} soient plus sujettes à la transformation étant donné qu'elles sont plus nombreuses ce qui augmente le risque de mutations additionnelles.

1.2.3.2.1.3. *Pten*

PTEN est un régulateur négatif de la voie de signalisation PI3Kinase-Akt qui joue un rôle crucial au niveau de la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire (Stiles et al. 2004; Cully et al. 2006). *Pten* est aussi un gène suppresseur de tumeurs fréquemment muté dans plusieurs cancers dont certaines leucémies. Le rôle de PTEN a été investigué au niveau des cellules souches hématopoïétiques par l'induction de sa délétion chez l'adulte (Zhang et al. 2006). Cette approche a permis d'observer que la perte de *Pten* cause une diminution spécifique au niveau des cellules souches responsables de la reconstitution à long terme. L'analyse du cycle cellulaire des cellules KSL *Pten*^{-/-} révèle une diminution du pourcentage de ces cellules en G0 qui corrèle avec l'expression de la cyclin D2. De plus, les cellules souches *Pten*^{-/-} ne compétitionnent pas avec des cellules *WT* en transplantation. En effet, bien que cinq fois plus de cellules *Pten*^{-/-} furent initialement transplantées, elle représentent seulement un huitième de la population KSL 4 mois post-transplantation. Ces résultats démontrent le rôle essentiel de PTEN comme

régulateur positif de la quiescence, de même que la nécessité d'inhiber la voie PI3Kinase pour permettre cette quiescence et donc le maintien des cellules souches hématopoïétiques à long terme.

La perte de *Pten* cause des syndromes myéloprolifératifs et des leucémies ce qui contraste avec le rôle antitumoral de MEF qui est en même temps un régulateur négatif du cycle cellulaire. La balance entre la quiescence et l'entrée dans le cycle cellulaire est un processus finement régulé ; il doit bien sûr y avoir assez de cellules en cycle pour soutenir l'hématopoïèse dans l'immédiat et assez de cellules quiescentes pour que ces cellules soient disponibles tout au long de la vie. Une dérégulation de cette balance peut compromettre l'hématopoïèse normale à court ou long terme, mais peut aussi être une prémisse pour le développement de tumeur. Une augmentation de la quiescence peut en effet participer à la sélection d'un clone leucémique en favorisant sa survie suite à la chimiothérapie ou en facilitant l'apparition de mutations additionnelles due à la présence de plus de cellules souches potentiellement transformables, comme dans le cas de la perte de *Mef*. D'autre part, la perte de *Pten* qui facilite l'entrée dans le cycle cellulaire peut aussi favoriser la tumorigénèse, par sa capacité à favoriser l'amplification d'un clone qui aurait été préalablement sélectionné. En plus de révéler le rôle primordial de la quiescence dans le maintien à long terme des cellules souches normales, l'étude des suppresseurs de tumeur MEF/ELF4 et PTEN suggère qu'un débalancement de la régulation de la quiescence soit aussi critique pour l'initiation et la progression de la transformation cellulaire.

1.2.3.2.1.4. *Cdc42*

CDC42 est une protéine de la famille des Rho GTPase qui est impliquée dans la régulation de plusieurs fonctions dont la polymérisation de l'actine, les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire ainsi que l'expression transcriptionnelle (Etienne-Manneville and Hall 2002). Le rôle de *Cdc42* a été initialement étudié au niveau des cellules souches hématopoïétiques par gain de fonction, en utilisant une souche de

souris nulle pour le gène *Cdc42GAP*, un régulateur négatif de la fonction de *Cdc42* (Wang et al. 2006). Cette étude a démontré qu'une augmentation de l'activité de *Cdc42* cause un accroissement du nombre de cellules souches et de leur capacité proliférative *in vitro* de même qu'une diminution de leur compétitivité en transplantation. Les auteurs ont attribué ces effets à une augmentation de l'apoptose et non à un changement au niveau du cycle cellulaire dans les cellules souches *Cdc42GAP^{-/-}*. Par contre, les analyses de cycle cellulaire présentées dans cette étude ne permettent pas d'évaluer la transition G0-G1 et donc ne permettent pas de confirmer que *Cdc42* n'est pas impliqué dans la régulation du cycle cellulaire des cellules souches.

Or, une étude plus récente où la perte de *Cdc42* est inducible a permis de révéler d'autres propriétés pour ce gène au niveau des cellules souches hématopoïétiques (Yang et al. 2007). La perte de fonction de *Cdc42* cause une réduction du nombre de cellules souches qui se traduit par une diminution de leur compétitivité à long terme en transplantation. Par contre, dans cette étude, grâce au marquage à la PyronineY et au Hoechst il est possible de distinguer la phase G0 de la phase G1 ce qui permet d'observer que la perte de *Cdc42* cause une diminution de 4 fois du nombre de cellules souches en G0. Cette facilité à entrer dans le cycle cellulaire s'accompagne d'une diminution de l'adhésion et de la migration cellulaire. En effet, les auteurs observent qu'en absence de *Cdc42*, la capacité des cellules souches à migrer à la niche hématopoïétique suite à leur transplantation dans une souris irradiée est déficiente.

Bien que la perte et le gain de fonction de *Cdc42* provoquent une diminution de la compétitivité des cellules souches en transpantation, ces analyses démontrent tout de même que la fonction de *Cdc42* doit être finement régulé au niveau des cellules souches hématopoïétiques. En effet, lors de la délétion de *Cdc42* ou de l'augmentation de son activité, l'adhésion, la migration cellulaire et l'organisation de l'actine sont déficientes. Ces résultats mettent en lumière le rôle important de l'interaction des cellules souches

hématopoïétiques avec leur niche pour les maintenir dans un état de quiescence et donc de préserver leur fonction à long terme.

1.2.3.2.1.5. *Gfi1*

Gfi1 est un répresseur transcriptionnel à doigt de zinc et la perte de fonction de ce gène chez la souris cause une diminution du nombre de neutrophiles et lymphocytes (Karsunky et al. 2002; Hock et al. 2003). Cette déficience au niveau de plusieurs lignées hématopoïétiques causée par la perte de *Gfi1* a amené deux groupes de recherche à s'intéresser à son rôle dans les cellules souches hématopoïétiques (Hock et al. 2004; Zeng et al. 2004).

Le travail de Zeng et al. a permis d'observer dans un premier temps que *Gfi1* est exprimé dans les populations de cellules souches capables de reconstitution à court et long terme de même que dans les progéniteurs multipotents. Ce groupe a aussi observé que la perte de *Gfi1* cause une diminution importante au niveau du nombre de cellules dans ces trois populations. Par ailleurs, la compétitivité en transplantation des cellules *Gfi1*^{-/-} est dramatiquement diminuée par rapport aux cellules de type sauvage. L'analyse du compartiment cellulaire enrichi en cellules souches à 6 mois post-transplantation révèle qu'aucune cellule *Gfi1*^{-/-} ne contribue à cette population ce qui démontre que la déficience des cellules *Gfi1*^{-/-} est causé par un défaut intrinsèque au niveau des cellules souches hématopoïétiques. De plus, l'analyse du cycle cellulaire des cellules KSL démontre que la perte de *Gfi1* favorise leur entrée dans le cycle cellulaire : effectivement on observe une diminution du nombre de cellules en G0 et une augmentation du nombre de cellules en S/G2-M en absence de *Gfi1*. Ces résultats corrént avec les analyses de profil d'expression protéique des souris *Gfi1*^{-/-} qui démontrent une augmentation de l'expression de protéines favorisant l'entrée dans le cycle cellulaire (E2F5 et E2F6) et une diminution de l'expression de p21 qui restreint l'activité proliférative des cellules.

Le travail de Hock et al. permet de tirer essentiellement les mêmes conclusions, soit que la perte de *Gfi1* cause une diminution de la compétitivité des cellules souches en transplantation. De plus, ce groupe démontre à l'aide de souris chimériques que les cellules *Gfi1*^{-/-} ont la capacité d'initier l'hématopoïèse, mais ne peuvent la soutenir à long terme, ce qui suggère que les défauts causés par la perte de *Gfi1* sont intrinsèques aux cellules souches et non causés par l'environnement. Bien que cette étude démontre une dérégulation au niveau du cycle cellulaire des cellules souches *Gfi1*^{-/-}, c'est-à-dire une diminution de la proportion de cellules en G0/G1 et une augmentation de cellules en phase S, les auteurs n'ont pas déterminé si la transition G0-G1 était affectée par la perte de *Gfi-1*. Par contre, ils observent une diminution de l'expression de *p21*, ce qui suggère que l'entrée dans le cycle cellulaire des cellules souches *Gfi1*^{-/-} est effectivement facilitée. Or, à l'inverse de ce que Zeng et al. ont observé, cette étude démontre que la perte de *Gfi1* cause une augmentation du nombre de cellules souches, ce qui peut s'expliquer par le bas âge des souris utilisées dans cette étude. En effet, à court terme, une augmentation de la prolifération peut se traduire par une augmentation du nombre de cellules souches (Hock et al. 2004), mais avec le temps cette hyperprolifération peut causer une déplétion précoce du pool de cellules souches (Zeng et al. 2004). La divergence de ces résultats suggère que faciliter l'entrée dans le cycle cellulaire cause un vieillissement prématuré et l'induction de la sénescence, ce qui est en accord avec plusieurs études démontrant que la durée de vie est inversement proportionnelle à l'activité cellulaire.

1.2.3.2.1.6. *Id1*

Id1 est une protéine agissant comme dominant négatif pour les facteurs de transcription bHLH en inhibant leur fonction de liaison à l'ADN. L'inactivation de *Id1* chez la souris adulte cause une diminution du nombre de cellules souches et du maintien à long terme de ces cellules lors d'essais de transplantation en compétition (Jankovic et al. 2007). Les auteurs de cette étude observent que pour le même nombre de cellules souches, les cellules *Id1*^{-/-} génèrent plus de progéniteurs myéloïdes que les cellules de type sauvage.

De plus, le profil d'expression des KSL *Id1*^{-/-} suggèrent aussi qu'elles sont déjà engagées dans le processus de différenciation myéloïde. Bien qu'il soit clair qu'*Id1* empêche la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, il semble aussi qu'*Id1* puisse contrôler l'entrée en cycle de ces cellules. En effet, des analyses de cycle cellulaire démontrent que les cellules KSL *Id1*^{-/-} prolifèrent plus, mais l'effet de la perte d'*Id1* sur la transition G0-G1 n'a pas été vérifiée. Par contre, la diminution du maintien à long terme des cellules souches *Id1*^{-/-} suggère que la proportion de cellules quiescentes soit diminuée dans les souris *Id1*^{-/-}, mais cette hypothèse reste à confirmer.

1.2.3.2.1.7. *Gata-2*

GATA-2 est un facteur de transcription de la famille à doigt de zinc qui influence le destin cellulaire dans plusieurs tissus. *Gata-2* est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques adultes et durant le développement (Orlic et al. 1995; Minegishi et al. 1999). De plus, son absence provoque la mort embryonnaire due à une déficience hématopoïétique très sévère (Tsai et al. 1994), ce qui suggère un rôle important pour GATA-2 au niveau des cellules souches hématopoïétiques. En effet, un groupe de recherche a investigué son rôle dans les cellules en utilisant un modèle de souris possédant seulement un allèle fonctionnel de *Gata-2* (Rodrigues et al. 2005). Les auteurs de cette étude ont observé que la diminution des niveaux de GATA-2 cause une diminution du nombre de cellules souches et de leur capacité à compétitionner avec des cellules de type sauvage en transplantation. Par contre, cette déficience fonctionnelle est accompagnée d'une augmentation de la quiescence contrairement à ce qui a été observé dans d'autres cas où une diminution de la compétitivité en transplantation est associée à une diminution de la quiescence des cellules souches. Or, les auteurs de cette étude ont observé une augmentation du nombre de cellules souches apoptotiques dans les souris *Gata-2*^{+/-} ce qui suggère que la diminution des niveaux de GATA-2 induit une sortie du cycle cellulaire qui les rend insensibles à leur environnement et induit donc leur mort. Par contre, cette hypothèse reste à confirmer.

1.2.3.2.1.8. *p18^{INK4C}*

p18 est un inhibiteur du cycle cellulaire faisant partie de la famille INK4A qui régule la fonction des CDK4/6 au début de la phase G1. L'inactivation de *p18* chez la souris cause une augmentation du nombre de cellules souches responsables de la reconstitution à long terme, mais n'influence pas la population contenant les progéniteurs (Yuan et al. 2004). De plus, des essais de transplantation en compétition révèle une augmentation importante de la compétitivité des cellules souches *p18^{-/-}*, et des essais de LTC-IC fait à partir de souris à 12 mois post-transplantation démontre que plus de 90% de la population de cellules souches est *p18^{-/-}*. D'ailleurs, en transplantation secondaire cet avantage est toujours visible suggérant que la perte de *p18* favorise l'autorenouvellement. L'inactivation de *p18* cause une augmentation plutôt modeste du nombre de cellules souches chez la souris en conditions normales en comparaison à l'effet qu'elle cause sur leur potentiel de reconstitution en transplantation ce qui a amené les auteurs à quantifier les cellules souches par transplantation en dilution limite (CRU). De cette manière, ils ont observé que la perte de *p18* cause une augmentation de 7 fois de la fréquence des CRU et de 10 fois de leur habileté à reconstituer l'hématopoïèse, ce qui corrèle avec l'observation que les cellules souches *p18^{-/-}* se divisent plus que les cellules *WT* dans un même laps de temps. L'effet de *p18* sur la division cellulaire a été testé de la façon suivante : des cellules de moelle *WT* ou *p18^{-/-}* sont marquées avec le colorant cellulaire CFSE et ensuite transplantées dans une souris. Les cellules sont récupérées deux jours plus tard et le nombre de division cellulaire que la cellule initialement marquée a subie est analysé par cytométrie en flux. En effet, l'intensité du CFSE sera plus forte dans les cellules s'étant le moins divisées, tandis que celles qui se seront divisées arboreront une plus faible intensité, étant donné qu'à chaque division, le CFSE se dilue dans deux cellules filles. Considérant l'augmentation de la capacité d'autorenouvellement des cellules *p18^{-/-}*, ces résultats suggèrent que l'absence de *p18* favorise la division symétrique générant deux cellules souches filles. Ces observations sont en accord avec des études antérieures démontrant que

l'expression de *p18* est associée à la division asymétrique (Phelps et al. 1998; Cunningham and Roussel 2001). Par contre, ces résultats contrastent avec ceux observés dans le cas de la perte de *p21* (Cheng et al. 2000b), soit une déplétion précoce du pool de cellules souches causée par une augmentation de l'entrée de ces cellules dans le cycle cellulaire.

D'autre part, la génération du double KO pour *p18* et *p21* révèle que la perte de *p18* corrige les défauts observés dans les souris *p21*^{-/-} (Yu et al. 2006). Ces résultats démontrent que ces deux inhibiteurs du cycle cellulaire régulent la fonction des cellules souches de manière différente, mais les mécanismes moléculaires sous-tendant ces deux voies demeurent inconnus. De plus, ces données suggèrent que la quiescence et l'autorenouveau sont des fonctions régulées en partie par des mécanismes différents et qu'une sortie du cycle cellulaire n'est pas nécessairement liée à une déplétion du pool de cellules souches, mais serait plutôt un prérequis pour que la cellule puisse s'autorenouveler. En effet, l'analyse au niveau unicellulaire des cellules souches présentes après la transplantation tertiaire et quaternaire révèle en effet que cette population est formée en majorité de cellules *p18*^{-/-} ou *p18*^{-/-}*p21*^{-/-}, mais aucunement de cellules *p21*^{-/-} (Yu et al. 2006). Par contre, la dominance des cellules *p18*^{-/-}*p21*^{-/-} est plus importante que dans le cas des cellules *p18*^{-/-}, ce qui suggère qu'une diminution de la quiescence favorise l'autorenouveau.

1.2.3.2.1.9. *p27*^{KIP1}

Bien que *p27* soit un inhibiteur du cycle cellulaire faisant partie de la même famille que *p21*, cette molécule diffère de *p21* dans son domaine C terminal, n'interagit pas avec les mêmes cyclin-CDK et son expression n'est pas régulée par *p53* (Polyak et al. 1994; Sherr and Roberts 1995; Sherr 1996). De plus, la délétion de *p27* chez la souris n'influence pas le nombre de cellules souches, mais augmente spécifiquement le nombre de progéniteurs (Cheng et al. 2000a). Aussi, la perte de *p27* ne modifie pas l'état du cycle cellulaire dans la population de cellules souches, mais induit une augmentation du nombre

de progéniteurs dans la phase S-G2/M. Cet effet spécifique a été confirmé par le traitement au 5'FU où la perte de *p27* augmente la sensibilité à cet agent seulement dans la population de progéniteurs. Par ailleurs, la transplantation de cellules *p27*^{-/-} en compétition avec des cellules de type sauvage révèle une augmentation de la compétitivité des progéniteurs *p27*^{-/-}, mais non des cellules souches. Ces résultats démontrent l'existence d'une régulation stade-spécifique de la prolifération cellulaire par différents membres de la famille CIP/KIP.

Par contre, cette absence de phénotype au niveau des cellules souches suite à la perte de *p27* peut aussi révéler la présence de mécanisme de compensation masquant le rôle de *p27* dans ces cellules. Un autre groupe de recherche a donc généré un double KO pour *p27* et *Mad1*, un antagoniste de MYC (Walkley et al. 2005). Les auteurs de cette étude observent que ni la perte de *p27* ou *Mad1* ne modifient la fréquence des cellules souches, mais la double délétion provoque une augmentation de 3-4 fois de la fréquence des cellules KSL et KSLCD34⁺. Par contre, la quantification fonctionnelle des cellules souches révèle une augmentation de la fréquence des CRU d'environ 2 fois suite à la perte de *p27* ou *Mad1* et une augmentation de 6 fois dans le double KO. D'autre part, la transplantation de 1000 cellules KSL de chaque génotype en compétition avec des cellules *WT* ne démontre aucune différence au niveau de la capacité des cellules KSL à reconstituer l'hématopoïèse après 6 mois, ce qui suggère que *p27* et *MAD1* affectent le nombre de cellules souches et non le potentiel de reconstitution de ces cellules. Les auteurs ont aussi observé que les KSL *p27*^{-/-}*Mad1*^{-/-} ont une capacité plus élevée à entrer dans le cycle cellulaire après 24 heures de culture comparativement aux KSL *WT*, *p27*^{-/-} et *MAD1*^{-/-}.

Ces données démontrent clairement que les effets de la régulation du cycle cellulaire sont contexte dépendant. En effet, en conditions normales une augmentation de la facilité à entrer dans le cycle cellulaire peut se traduire par une augmentation de l'autorenouvellement au dépend de la différenciation tel que démontré par l'augmentation du nombre de cellules souches dans les souris *p27*^{-/-}*Mad1*^{-/-}. Par contre, en conditions de stress, une augmentation de la vitesse d'entrée dans le cycle cellulaire des cellules souches

p27^{-/-}Mad1^{-/-} est susceptible de générer plus de cellules différenciées en favorisant la différenciation au détriment de l'autorenouvellement. L'identification des effecteurs des effets médiés par p27 et MAD1 va permettre de mieux comprendre comment ces deux régulateurs du cycle cellulaire peuvent avoir des effets différents dépendamment du contexte.

Tableau 1. 2: Récapitulatif des gènes impliqués dans la régulation de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte.

Gène	Modèle d'étude	Phénotype observé	Effets biologiques
<i>p21^{cip/waf1}</i>	<i>129/SV p21^{-/-}</i> (Cheng et al. 2000b)	↑ nombre de HSC Déplétion en transplantation sérielle (V) ↑ sensibilité au 5'FU et irradiation	↓ cellules Lin ⁻ en G0
	<i>C57BL/6J p21^{-/-}</i> (van Os et al. 2007)	Nombre normal de HSC Compétitivité normale en transplantation Sensibilité normale au 5'FU ↑ sensibilité à l'irradiation	Transition G0-G1 n.d.
<i>Mef/Elf4</i>	<i>C57BL/6J Mef/Elf4^{-/-}</i> (Lacorazza et al. 2006)	↑ nombre de LTC-IC ↑ compétitivité en transplantation I et II ↓ réponse aux cytokines ↑ résistance au 5'FU et irradiation	↑ Lin ⁻ Scal ⁺ en G0 ↓ KSL en cycle
<i>Pten</i>	<i>Pten^{LoxP/LoxP}</i> (Zhang et al. 2006)	↓ nombre de KSLFlt3 ⁻ ↓ compétitivité en transplantation	↓ KSL en G0
<i>Cdc42</i>	<i>Cdc42GAP^{-/-}</i> (Wang et al. 2006)	↑ nombre de KSL ↓ compétitivité en transplantation	Transition G0-G1 n.d. ↑ KSL en apoptose
	<i>Cdc42^{LoxP/LoxP}</i> (Yang et al. 2007)	↓ nombre de KSLCD34 ^{low} ↓ compétitivité en transplantation	↓ Lin ⁻ c-Kit ⁺ en G0 ↑ KSL en cycle
<i>Gfi1</i>	<i>Gfi1^{-/-}</i> (Zeng et al. 2004)	↓ nombre de KSLFlt3 ⁻ et KSLCD34 ⁻ ↓ compétitivité en transplantation ↑ sensibilité à l'irradiation	↓ KSL en G0 ↓ expression p21
	<i>Gfi1^{-/-}</i> (Hock et al. 2004)	↑ nombre KSLFlt3 ⁻ ↓ compétitivité en transplantation	↓ KSLFlt3 ⁻ en G0-G1 ↓ expression p21 ↑ KSL en cycle
<i>Id1</i>	<i>Id1^{-/-}</i> (Jankovic et al. 2007)	↓ CRU (3x) ↓ compétitivité en transplantation	↑ KSL en cycle ↑ différenciation

<i>Gata2</i>	<i>Gata2</i> ^{+/-} (Rodrigues et al. 2005)	↓ KSLCD34 ⁻ ↓ compétitivité en transplantation	↑ KSL en G0 ↑ KSL en apoptose ↓ expression BCL-XL
<i>p18</i> ^{<i>INK4C</i>}	<i>p18</i> ^{<i>INK4C</i>-/-} (Yuan et al. 2004)	↑ CRU ↑ KSLCD34 ⁻ ↑ compétitivité en transplantation I et II	↑ vitesse de division cellulaire Lin ⁻ Sca1 ⁺
<i>p27</i> ^{<i>KIP1</i>}	<i>129/SV p27</i> ^{<i>KIP1</i>-/-} (Cheng et al. 2000a)	Nombre normal de HSC ↑ du nombre de progéniteurs Compétitivité normale des HSC en transplantation ↑ compétitivité des progéniteurs en transplantation Sensibilité normale des HSC au 5'FU ↑ sensibilité des progéniteurs au 5'FU	Cycle cellulaire normal des Lin ⁻ Sca1 ⁺ ↑ progéniteurs en S-G2/M
	<i>C57BL/6J p27</i> ^{<i>KIP1</i>} (Walkley et al. 2005)	Nombre normal de KSLCD34 ⁻ ↓ nombre de CRU (2x) Nombre normal de progéniteurs	Cycle cellulaire des HSC n.d. ↓ Lin ⁻ Sca1 ⁻ en G0-G1

1.2.3.2.2. Sénescence

Les cellules qui prolifèrent ne possèdent généralement pas une durée de vie illimitée et ne peuvent se diviser qu'un certain nombre de fois. Ce phénomène a été décrit pour la première fois il y a 40 ans (Hayflick 1965) et est causé en grande partie par une réduction des télomères à chaque division cellulaire ce qui provoque l'entrée en sénescence des cellules (sénescence réplivative). Les cellules souches hématopoïétiques ne semblent pas échapper à cette règle. Effectivement, des cellules souches de type sauvage ne peuvent subir qu'entre quatre et sept transplantations consécutives (Siminovitch et al. 1964; Harrison et al. 1978; Harrison and Astle 1982). Par ailleurs, il a été observé que les cellules souches transplantées prolifèrent plus et que la longueur de leurs télomères est réduite par rapport à des cellules non transplantées (Allsopp et al. 2001) ce qui suggère que les antécédents prolifératifs d'une cellule influencent directement sa longévité.

Le vieillissement est associé à une diminution de la fonction des cellules souches hématopoïétiques (Morrison et al. 1996). L'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire *p16* augmente en fonction de l'âge et son expression est associée à la sénescence réplivative dans plusieurs lignées cellulaires. Effectivement, sa perte de fonction chez la souris en bas âge (8-12 semaines) ne cause aucun effet au niveau des cellules souches hématopoïétiques, tandis que sa délétion chez la souris plus vieille (56-64 semaines) induit une augmentation du nombre de cellules suivi d'une amélioration de leur capacité à reconstituer l'hématopoïèse (Janzen et al. 2006). Ces changements s'accompagnent d'une augmentation de la prolifération et d'une réduction de l'apoptose dans ces cellules.

Le membre du complexe répresseur PcG-1, *Bmi-1*, est essentiel au maintien des cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte, et sa perte de fonction est associée à une augmentation de l'expression de *p16* et *p19*, qui sont générés par épissage alternatif à partir du locus *INK4a* (Lessard and Sauvageau 2003; Park et al. 2003b). La diminution des niveaux de *p16* et *p19* permet de restaurer partiellement les défauts prolifératifs des cellules

Bmi-1^{-/-} (Oguro et al. 2006). Par contre, la sénescence induite par la perte de *Bmi-1* dans les cellules hématopoïétiques primitives est restaurée par la diminution de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire E4F1, de façon indépendante à la voie *p19* (Chagraoui et al. 2006).

Les exemples précédents démontrent que la régulation du cycle cellulaire influence directement l'initiation de la sénescence probablement en agissant sur le nombre de division qu'une cellule peut subir.

1.2.3.2.3. Différenciation

La différenciation est un régulateur négatif des cellules souches étant donné que ce phénomène cause la perte des fonctions de multipotentialité et d'autorenouvellement au niveau de ces cellules. La régulation du contrôle de l'équilibre entre l'état de cellule souche et la différenciation est donc d'une importance capitale et se révèle par les études démontrant que l'aptitude d'une cellule souche à se différencier est inversement proportionnel à sa capacité de maintien à long terme. En effet, la délétion de *c-Myc* chez l'adulte cause une diminution de toutes les cellules différenciées du système hématopoïétique ainsi qu'une augmentation de la fréquence des cellules souches responsables de la reconstitution à long terme sans affecter leur cycle cellulaire (Wilson et al. 2004). Les auteurs de cette étude observent une incapacité des cellules *c-Myc*^{-/-} à contribuer à l'hématopoïèse à long terme, bien que le compartiment KSL soit expandu, suggérant que *c-Myc* favorise la différenciation cellulaire au détriment de l'autorenouvellement. Cette accumulation de cellules souches s'accompagne d'une augmentation de l'expression de plusieurs molécules d'adhésion, amenant les auteurs à conclure que *c-Myc* contrôle la balance entre l'autorenouvellement et la différenciation en modulant l'interaction des cellules souches avec leur niche hématopoïétique.

Par ailleurs, la perte de fonction du récepteur RAR γ cause une diminution du nombre de cellules souches qui s'accompagne d'une augmentation du nombre de

progéniteurs (Purton et al. 2006). En effet, la transplantation de cellules *Rarg^{-/-}* révèle une déficience à soutenir l'hématopoïèse qui s'accroît en fonction du temps. La survie et l'état du cycle cellulaire étant normal au niveau des cellules souches *Rarg^{-/-}*, ces données démontrent le rôle important et spécifique de RAR γ dans le maintien de l'état indifférencié des cellules souches.

Combinés, ces résultats démontrent clairement que la différenciation cellulaire doit être finement régulée pour maintenir la fonction des cellules souches à long terme. En effet, une différenciation exacerbée peut mener à une déplétion précoce du réservoir de cellule souches, tandis qu'une inhibition de la différenciation provoque une augmentation du nombre de cellules souches au détriment de la formation de cellules matures permettant d'assurer la survie de l'organisme.

1.2.3.2.4. Division symétrique

Lors de sa division cellulaire, une cellule souche peut générer deux cellules filles identiques possédant toutes deux un potentiel de cellule souche. C'est principalement ce type de division symétrique qui se produit au niveau du foie foetal durant l'embryogenèse où il y a expansion massive des cellules souches. Le facteur de transcription HoxB4 est un régulateur important de ce type de division cellulaire favorisant l'expansion des cellules souches. En effet, la surexpression de HoxB4 cause une expansion importante *in vivo* et *in vitro* des cellules souches hématopoïétiques (Krosl et al. 2003; Sauvageau et al. 2004). D'autre part, l'analyse du cycle cellulaire des cellules *Sca1⁺Lin⁻* surexprimant HoxB4 révèle qu'elles prolifèrent moins et que la fréquence de leur division est réduite comparativement à des cellules contrôles (Cellot et al. 2007). Pour qu'une cellule s'autorenouvelle, elle doit en effet être capable de répondre à un signal mitotique. Par contre, la capacité de HoxB4 à favoriser l'autorenouvellement semble médiée par un mécanisme indépendant de l'activation de la prolifération et supporte grandement le rôle de Hoxb4 comme régulateur de la nature de la division cellulaire plutôt que du nombre de

division. En effet, on peut imaginer que HoxB4 induit la division symétrique en favorisant la ségrégation uniforme de déterminants cellulaires ce qui génère deux cellules souches filles identiques. Bien que ce mécanisme de ségrégation différentielle soit bien documenté chez les cellules souches neuronales de drosophile, cette hypothèse reste à valider au niveau des cellules souches hématopoïétiques.

Le rôle de HoxB4 dans l'autorenouvellement est aussi mis en évidence par l'inactivation de *Meis1*, un cofacteur des gènes Hox, qui est létale au stade embryonnaire et cause une diminution du nombre de cellules dans le foie fœtal. De plus, la compétitivité des cellules *Meis1*^{-/-} est réduite par rapport à des cellules de type sauvage en transplantation (Hisa et al. 2004) suggérant que *Meis1* soit aussi impliqué dans la division symétrique des cellules souches, probablement par son interaction avec le facteur de transcription HoxB4.

1.2.3.2.5. Survie cellulaire

La capacité des cellules hématopoïétiques à répondre à leur environnement est essentiel à leur maintien, tel que démontré par l'induction de l'apoptose dans les cellules privées de facteurs de croissance. La régulation de la survie des cellules souches est donc un aspect crucial dont il faut tenir compte dans la compréhension de leur maintien. L'importance de la survie des cellules souches est mise de l'avant dans l'analyse des souris surexprimant Bcl-2, un régulateur négatif de l'apoptose (Domen et al. 2000). En effet, ces souris possèdent un pool plus élevé de cellules souches et la compétitivité de ces cellules est accrue en transplantation. L'augmentation de la survie des cellules souches *Bcl-2*^{tg} est inversement proportionnelle à leur capacité à entrer dans le cycle cellulaire. Par ailleurs, la protéine à doigt de zinc Zfx est aussi un régulateur de la survie des cellules souches : sa perte de fonction est associée à une diminution du nombre de cellules souches et à une réduction de leur compétitivité en transplantation due à une augmentation de l'apoptose au niveau de cette population (Galan-Caridad et al. 2007). D'autre part, la famille de facteur de transcription ForkheadO (FOXO) est impliquée dans plusieurs processus biologiques

dont l'arrêt du cycle cellulaire, la résistance au stress et l'apoptose (Greer and Brunet 2005). Dans les cellules souches hématopoïétiques, il a été démontré que la perte des protéines FOXO entraîne une diminution du nombre de cellules souches ainsi qu'une diminution de leur capacité de reconstitution à long terme (Tothova et al. 2007). Ce défaut est spécifiquement associé à une augmentation de l'apoptose, une diminution de la quiescence et une augmentation de la sensibilité aux radicaux libres.

1.2.3.3. Résumé

Ces résultats démontrent clairement que le destin des cellules souches est la conséquence de la relation étroite existant entre l'environnement et le profil génétique d'une cellule. Il devient de plus en plus évident que ces deux aspects ne peuvent se découpler, mais plutôt s'entre-régulent. En effet, l'environnement peut influencer le profil d'expression cellulaire, tout comme les régulateurs intrinsèques peuvent moduler la sensibilité à l'environnement en régulant l'expression de récepteurs spécifiques. Ces résultats démontrent aussi l'extrême complexité de la régulation des cellules souches et donc la hauteur des défis rencontrés lors de leur étude. En effet, la régulation de leurs fonctions biologiques varie en fonction du stade de développement et du contexte cellulaire. De plus, l'implication d'une même protéine au niveau de fonctions biologiques différentes dans un même type de cellules dépeint l'importance d'étudier les protéines en terme de complexes protéiques. En effet, en fonction de ses partenaires, une protéine va activer des programmes génétiques différents et donc induire des réponses biologiques différentes. Aussi, d'une toute aussi grande importance est l'étude des médiateurs de la formation de ces différents complexes, et ici le rôle de l'environnement est prédominant, étant donné qu'une protéine, en fonction du contexte environnemental peut générer une réponse différente. Encore une fois, ces observations démontrent l'interaction intime existant entre l'environnement cellulaire et les régulateurs intrinsèques, et démontre qu'une meilleure compréhension de la biologie des cellules hématopoïétiques nécessite obligatoirement de considérer ces deux aspects comme un tout indissociable (Figure 1.6).

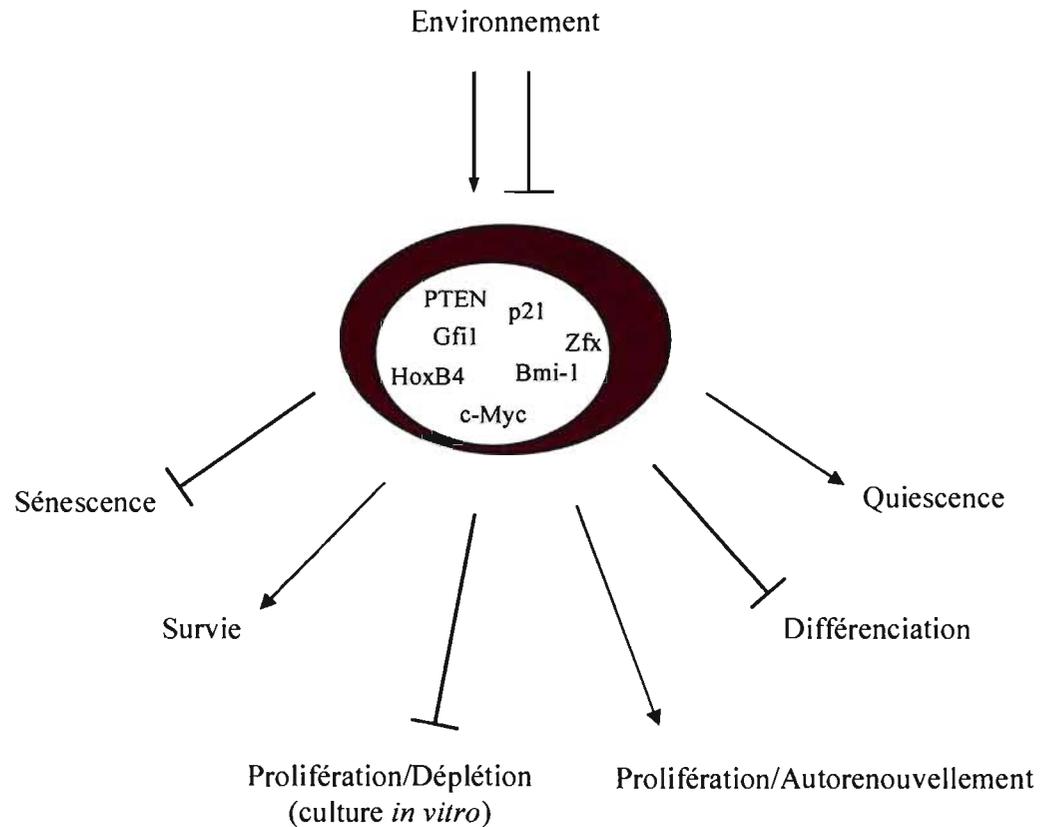


Figure 1. 7: Résumé des différentes fonctions biologiques impliquées dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques.

C'est l'interaction entre l'environnement cellulaire et les facteurs intrinsèques qui sont responsables de l'activation ou de la répression des diverses fonctions biologiques au niveau des cellules souches hématopoïétiques. Le maintien de ces dernières est favorisé par la quiescence, l'autorenouveaulement et la survie, tandis que la différenciation, la sénescence et la prolifération *in vitro* sont des régulateurs négatifs de leur maintien.

1.3. Le gène *Stem Cell Leukemia (Scl)*

1.3.1. Expression et fonctions de *Scl* dans l'hématopoïèse

Le gène *Stem Cell Leukemia (Scl)* code pour un facteur de transcription tissu-spécifique de la famille bHLH, dont plusieurs membres sont des régulateurs transcriptionnels importants contrôlant le destin cellulaire lors du développement (Massari and Murre 2000). Cette famille de protéines dimérise grâce à son domaine HLH et lie le sillon majeur de l'ADN à la séquence consensus CANNTG (boîte E) via les résidus de sa région basique (Ferre-D'Amare et al. 1993; Ellenberger et al. 1994; Ma et al. 1994). La liaison de SCL à l'ADN requiert son hétérodimérisation avec une classe spécifique de la famille bHLH, soit les protéines E qui inclut les produits des gènes E2A (E12 et E47), HEB et E2-2 exprimés de façon ubiquitaire (Hsu et al. 1991; Hsu et al. 1994). Bien qu'il ait été identifié au niveau de translocations chromosomiques, le patron d'expression de SCL suggère en effet qu'il contrôle des fonctions importantes au niveau de l'hématopoïèse normale. Durant le développement embryonnaire de la souris, SCL est exprimé au niveau du splanchnopleure (futur site de l'AGM) et dans le mésoderme extra-embryonnaire au jour 7.5 au moment où l'hématopoïèse apparaît dans les îlots sanguins du sac vitellin (Kallianpur et al. 1994; Silver and Palis 1997). L'expression de SCL est également détectée dans le foie foetal au jour 9.5 et subséquemment dans la moelle osseuse et la rate (Barton et al. 1999). Outre son expression dans le système hématopoïétique, SCL est aussi exprimé dans l'endothélium vasculaire et l'endocarde de même que dans le système neuronal (Green et al. 1992; Kallianpur et al. 1994).

1.3.1.1. Rôle de *Scl* dans les leucémies

Scl fût initialement identifié au niveau du point de brisure de la translocation chromosomique t(1;14) retrouvée dans les cellules d'un patient souffrant d'une leucémie lymphoblastique aigüe de type T (T-ALL) (Begley et al. 1989a; Begley et al. 1989b).

Cette translocation chromosomique impliquant le gène *Scl* n'est pas un cas isolé. En effet, *Scl* est la cible la plus fréquente dans les réarrangements chromosomiques causant des leucémies T-ALL ce qui mène à son expression ectopique dans la lignée lymphoïde, où son expression doit normalement être réprimée (Begley and Green 1999; Herblot et al. 2000). Malgré cela, il a été observé que la surexpression de *Scl* chez la souris soit ne cause pas de leucémies ou en cause avec un temps de latence élevé et une pénétrance variable (Robb et al. 1995b; Condorelli et al. 1996; Kelliher et al. 1996). Ces résultats suggèrent en effet la nécessité d'événements collaborateurs dans l'induction de la leucémie et sont en accord avec le modèle selon lequel la tumorigénèse est un processus multifactoriel. Dans ce sens, plusieurs groupes ont montré que *Scl* coopère in vivo avec d'autres gènes comme *Abl*, *Casein kinase II*, *p53*, *Ras* et *p16/p19* (Elwood et al. 1993; Condorelli et al. 1996; Kelliher et al. 1996; Curtis et al. 1997; Shank-Calvo et al. 2006). Les protéines à domaine LIM, LMO1 et 2 ont un patron d'expression qui corrèle avec SCL dans l'hématopoïèse et sont aussi des cibles de réarrangements chromosomiques dans les leucémies T-ALL. La coexpression de LMO1 ou 2 dans les cellules lymphoïdes des souris *Scl*^{tg} accélère de façon significative la latence et la pénétrance de la leucémie (Larson et al. 1996; Aplan et al. 1997; Chervinsky et al. 1999).

Les bases moléculaires de la fonction de SCL dans l'induction de la leucémie demeurent obscures et deux modèles ont été proposés. Le premier modèle suggère que l'expression aberrante de SCL peut mener à la formation de complexes ectopiques et à l'expression de gènes causant la dérégulation de la différenciation lymphoïde et ultimement la leucémie. La présence d'un complexe contenant SCL, de même que sa capacité à lier l'ADN et à transactiver un promoteur artificiel ont été décelés dans la lignée érythroleucémique de souris MEL et dans des lignées leucémiques dérivées de souris surexprimant LMO2 (Wadman et al. 1997; Grutz et al. 1998). De plus, il a été observé dans des lignées lymphoïdes leucémiques que SCL et LMO2 induisent l'expression des gènes *Talla-1* et *Raldh-2*, mais la validité biologique de ces derniers dans la leucémies n'a pas été démontrée (Ono et al. 1997; Ono et al. 1998).

En plus de causer l'expression inappropriée de gènes, SCL pourrait être impliqué dans les leucémies lymphoïdes par l'inhibition de la fonction des protéines E2A et HEB qui sont essentielles à la différenciation des cellules lymphoïdes. En effet, le dosage de ces deux protéines est essentiel pour la différenciation des thymocytes et les souris *E2a^{-/-}* et *Heb^{-/-}* présentent un phénotype semblable à celui observé chez les souris *Scf^{tg}Lmo1/2^{tg}*, soit un blocage de la différenciation des lymphocytes T (Chervinsky et al. 1999; Herblot et al. 2000; Tremblay et al. 2003). Par sa capacité à s'hétérodimériser avec E2A et HEB, il est possible que la présence de SCL au sein des complexes transcriptionnels impliquant E2A ou HEB perturbe ces complexes en les rendant inactifs. L'utilisation d'essais de transactivation où des gènes rapporteur sont sous le contrôle des promoteurs de gènes cibles de E2A et HEB a en effet permis de démontrer que l'activation de la transcription par E2A et HEB est inhibée en présence de SCL (Doyle et al. 1994; Park and Sun 1998; Herblot et al. 2000; Tremblay et al. 2003). Cette inhibition pourrait être causée par la séquestration de E2A et HEB par SCL, étant donné que la surexpression d'un mutant de SCL ne possédant pas de domaine de liaison à l'ADN est suffisante pour causer un blocage de la différenciation lymphoïde et des leucémies (O'Neil et al. 2001; Goardon et al. 2002). Par contre, l'observation que SCL, E2A et HEB occupent le promoteur du *préT-alpha*, un gène cible de E2A et HEB n'est pas en accord avec le modèle de la séquestration (Herblot et al. 2000; Tremblay et al. 2003). Ces données suggèrent plutôt que SCL inhibe l'activité de E2A et HEB en empêchant le recrutement des partenaires de E2A et HEB ou bien par sa capacité à recruter des corépresseurs réprimant la transcription dépendante de E2A ou HEB.

1.3.1.2. Rôle de *Scf* dans l'embryogénèse

L'inactivation du gène *Scf* chez la souris a permis de révéler son rôle essentiel dans le système hématopoïétique. En effet, les embryons déficients pour *Scf* ne possèdent pas de système hématopoïétique et meurent au jour embryonnaire 9.5 (Robb et al. 1995a; Shivdasani et al. 1995). L'apparence normale des autres tissus suggère fortement que la

mortalité de ces embryons soit spécifiquement causée par l'absence d'hématopoïèse primitive et définitive. L'incapacité des cellules ES *Scf*^{-/-} à contribuer à l'hématopoïèse dans des souris chimériques exclue la possibilité d'un rôle pour SCL dans l'environnement des cellules hématopoïétiques (Porcher et al. 1996; Robb et al. 1996) et les corps embryonnaires dérivés des cellules ES *Scf*^{-/-} n'expriment aucun gène hémato-spécifique (Elefanty et al. 1997). Des études *in vitro* utilisant des cellules ES *Scf*^{-/-} où l'expression de *Scf* est induite par le tamoxifène, ont servi à démontrer son rôle essentiel au niveau de l'hématopoïèse définitive (Endoh et al. 2002). Combinés, ces résultats démontrent le rôle crucial et non redondant de *Scf* dans le développement des cellules hématopoïétiques.

La promiscuité du développement hématopoïétique et endothélial tel que discuté dans la section 1.1 est aussi mis en évidence dans les études d'inactivation de *Scf* où on observe non seulement une absence de cellules hématopoïétiques, mais aussi une déficience au niveau des vaisseaux sanguins du sac vitellin (Robb et al. 1995a). En effet, l'expression de *Scf* sous le contrôle d'éléments de régulation hémato-spécifiques dans les souris *Scf*^{-/-} permet de restaurer l'hématopoïèse mais non la formation de vaisseaux sanguins dans le sac vitellin (Visvader et al. 1998). D'autre part, les cellules ES *Scf*^{-/-} sont incapables de générer de BL-CFC (blast colony-forming cells), un précurseur identifié lors de la différenciation des cellules ES possédant un potentiel hématopoïétique et endothélial (Robertson et al. 2000). *Scf* semble donc contrôler la spécification de l'hémangioblaste à partir du mésoderme, un rôle qui n'est pas sans rappeler celui des autres membres de la famille bHLH tel que MyoD et NeuroD qui sont des régulateurs maître au niveau de la détermination du tissu musculaire et neuronal.

1.3.1.3. Rôle de *Scf* chez l'adulte

Les études du patron d'expression de *Scf* suggèrent en effet qu'il puisse être aussi un régulateur important au niveau de l'hématopoïèse chez l'adulte. En effet, plusieurs études d'expression génique ont permis d'observer que l'expression de *Scf* est plus élevée

au niveau des cellules souches adultes comparativement aux cellules souches fœtales suggérant que *Scf* joue un rôle important au niveau des HSC adultes (Phillips et al. 2000; Venezia et al. 2004; Bowie et al. 2007b). L'expression de *Scf* diminue avec la différenciation terminale à l'exception des lignées érythroïdes, mégakaryocytaires et des mastocytes (Green et al. 1991; Visvader et al. 1991; Brady et al. 1995; Elefanty et al. 1998; Herblot et al. 2000; Herblot et al. 2002; Ramalho-Santos et al. 2002). En effet, l'expression ectopique de *Scf* dans la moelle osseuse primaire et dans des lignées hématopoïétiques favorise la différenciation érythroïde (Aplan et al. 1992; Hoang et al. 1996; Elwood et al. 1998; Valtieri et al. 1998). Il a aussi été démontré que la surexpression de *Scf* dans des cellules primaires favorise la différenciation myéloïde, mais restreint la différenciation lymphoïde, tandis que l'inverse est observé lors de l'expression d'un dominant négatif de SCL (Kunisato et al. 2004).

La possibilité d'induire l'inactivation de gènes au niveau du système hématopoïétique chez la souris (Kuhn et al. 1995) a permis de contourner la mort embryonnaire des souris *Scf*^{-/-} et d'étudier son rôle chez la souris adulte. Deux groupes indépendants ont généré des souris où le gène *Scf* est flanqué de site LoxP et dont la recombinase *Cre* est sous le contrôle du promoteur Mx1 sensible à l'interféron (Mikkola et al. 2003; Curtis et al. 2004). La délétion de *Scf* est donc induite lors du traitement des souris au plpC, un inducteur de l'interféron. Ces deux études convergent dans un premier temps et démontrent que, en concordance avec son patron d'expression, *Scf* est essentiel pour la différenciation des cellules érythroïdes et des mégakaryocytes.

Or, les travaux de Mikkola et al. démontrent que *Scf* n'est pas indispensable pour la formation des progéniteurs, ni pour la fonction des cellules souches hématopoïétiques adultes. Les auteurs ont utilisé un essai de transplantation en compétition et l'analyse à 4 mois post-transplantation révèle que la perte de *Scf* ne cause aucun effet au niveau de la reconstitution de la moelle totale, des progéniteurs ou de la population KSL, enrichie en cellules souches. De même, la transplantation dans un hôte secondaire, ne permet pas

d'attribuer de rôle pour *Scf* dans l'autorenouveau des cellules souches. Étant donné le rôle non redondant de *Scf* au niveau de l'embryogénèse (Robb et al. 1995a; Shivdasani et al. 1995; Robb et al. 1996) et son patron d'expression chez l'adulte, la publication de cette étude démontrant que *Scf* n'est pas requis dans la fonction des cellules souches chez l'adulte fût surprenante. Ces résultats suggèrent donc que *Scf* est essentiel au niveau de la génération des cellules souches hématopoïétiques durant le développement, mais qu'une fois le système hématopoïétique établi, la fonction de *Scf* n'est plus nécessaire.

D'autre part, les résultats de Curtis et al. démontrent que l'induction de la délétion de *Scf* chez l'adulte cause une déficience au niveau des cellules souches responsables de la reconstitution à court terme. En effet, les auteurs de cette étude observent une diminution de la capacité de reconstitution des cellules *Scf*^{-/-} lors de leur transplantation en compétition. Ce défaut étant visible après seulement 4 semaines et ne s'aggravant pas en fonction du temps ou en transplantation secondaire, les auteurs concluent que *Scf* est requis pour la fonction des cellules souches responsables de la reconstitution à court terme, et non au niveau de leur capacité à s'autorenouveler.

La divergence des résultats obtenus par ces deux équipes de recherche provient probablement des procédures expérimentales à la base de ces deux études. En effet, dans le cas du groupe de Mikkola et al., ceux-ci ont induit la délétion de *Scf* 4 semaines post-transplantation, alors que le groupe de Curtis et al. a transplanté les cellules après avoir préalablement induit la délétion de *Scf*. Il est possible que l'induction de la délétion de *Scf* à 4 semaines post-transplantation explique l'absence de phénotype. Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que *Scf* favorise la quiescence des cellules souches et prévient leur réponse excessive en présence de signaux mitogéniques ce qui empêche la déplétion précoce du réservoir de cellules souches (Chapitre II). La transplantation provoque effectivement une pression proliférative majeure au niveau des cellules souches (Annexe 2) et il est probable que *Scf* soit requis tôt dans le processus contrant l'activation excessive de cellules souches. La présence de *Scf* durant les quatre premières semaines suivants la

transplantation est peut-être suffisante pour que *Scl* exerce sa fonction anti-proliférative et pourrait expliquer pourquoi le groupe de Mikkola et al. n'observe pas de phénotype en absence de *Scl*.

L'étude du rôle de *Scl* au niveau des cellules humaines ajoute aussi à la controverse, car ces études sont en faveur d'un rôle pour *Scl* dans la fonction à long terme et l'autorenouvellement des cellules souches. En effet, la surexpression de *Scl* par intégration lentivirale dans des cellules humaines suivie de leur transplantation dans des souris NOD/SCID cause une augmentation du nombre de cellules souches ainsi que de leur capacité d'autorenouvellement (Reynaud et al. 2005). De plus, cette étude démontre aussi qu'une forme dominante négative de SCL cause une diminution de la capacité de reconstitution en transplantation. Aussi, une autre étude du même groupe de recherche démontre que la diminution des niveaux protéiques de SCL par shRNA dans des cellules humaines et murines cause une diminution de leur potentiel de reconstitution lors de leur transplantation dans des souris NOD/SCID (Brunet de la Grange et al. 2006). Ce défaut s'accroît en fonction du temps et suggère que *Scl* soit requis au niveau de la fonction à long terme des cellules souches hématopoïétiques adultes.

La divergence des résultats obtenus concernant le rôle de *Scl* dans les cellules souches adultes reflète dans un premier temps les différences expérimentales entre les différentes études, que ce soit au niveau des techniques utilisées ou du système étudié. Mais les dissimilitudes observées révèlent hors de tout doute la complexité du rôle de *Scl* au niveau des cellules souches de même que la complexité de la régulation de ces cellules en général. Étant donné le rôle crucial des cellules souches qui doivent supporter l'hématopoïèse tout au long de la vie, des mécanismes très robustes et finement régulés doivent les contrôler et il existe certainement plusieurs mécanismes de protection et de compensation.

1.3.2. SCL comme régulateur transcriptionnel

Bien qu'il soit établi que SCL soit un des régulateurs les plus importants du système hématopoïétique, on connaît peu de chose concernant ses cibles transcriptionnelles. Par contre, les données disponibles suggèrent que SCL soit impliqué dans la coordination de la transition entre l'état hautement prolifératif des progéniteurs et leur différenciation terminale.

Le récepteur tyrosine kinase c-Kit est essentiel à la survie et la prolifération des progéniteurs et des travaux de notre laboratoire démontrent que le gène codant pour ce récepteur est une cible transcriptionnelle directe de SCL (Lecuyer et al. 2002). De plus, nous avons observé que la perte de fonction de SCL altère la survie de la ligné cellulaire TF-1 spécifiquement en réponse au ligand de c-Kit (KrosI et al. 1998). Par ailleurs, mes travaux ont permis de démontrer la validité biologique de l'interaction entre *ScI* et c-Kit dans les progéniteurs hématopoïétiques primaires (Lacombe et al., en préparation (voir Chapitre III)). D'autre part, nous avons démontré que la glycophorine A (GPA), un constituant majeur de la membrane des érythrocytes, est aussi une cible transcriptionnelle de SCL (Lahlil et al. 2004). Combinées, ces études révèlent que SCL forme des complexes protéiques différents selon le gène qu'il régule. En effet, la capacité de SCL à activer la transcription de la GPA est accentuée en association avec GATA-1 plutôt que GATA-2 et l'inverse est vrai en ce qui concerne la transcription de c-kit. Par ailleurs, ces données corrélient avec l'expression de c-Kit qui est maximale au niveau des progéniteurs pour diminuer avec la différenciation terminale. Au contraire, l'expression de la glycophorine A est induite durant la maturation des érythrocytes. L'aptitude de SCL à interagir avec différents partenaires modifie sa susceptibilité à activer certains gènes et suggère donc que le remaniement au niveau de ses partenaires modifie la réponse biologique induite par SCL.

De plus, des changements stochiométriques dans le complexe SCL au niveau du promoteur *p21* et *Gpa* démontre le rôle critique des partenaires de liaison de SCL dans sa

fonction antiproliférative au niveau de la différenciation terminale (Goardon et al. 2006). En effet, il a été démontré à l'aide de lignées cellulaires de progéniteurs que la présence du répresseur transcriptionnel ETO2 sur les promoteurs *p21* et *Gpa* corrèle avec la faible expression de ces gènes. Or, la différenciation érythroïde se caractérise par une augmentation de l'expression de *p21* et de la GPA, de même que par une diminution de l'enrichissement de ETO-2 au niveau de ces promoteurs. ETO2 semble donc agir comme un commutateur moléculaire au sein du complexe SCL pour coordonner l'équilibre entre la prolifération et la différenciation.

En somme, ces résultats suggèrent que les différentes fonctions de SCL dans l'hématopoïèse sont le reflet de ses interactions avec différents partenaires transcriptionnels. En effet, au niveau des progéniteurs, l'induction de c-Kit par SCL favorise leur survie et la répression de l'activité SCL sur les promoteurs *p21* et *Gpa* facilite leur expansion au détriment de leur différenciation. Par contre, lors de la maturation, SCL diminue le potentiel prolifératif des cellules tout en favorisant leur différenciation en activant *p21* et *Gpa*. L'implication de SCL au niveau de plusieurs fonctions biologiques (survie, prolifération, différenciation) démontre effectivement son rôle en tant que régulateur maître de l'hématopoïèse.

1.3.2.1. E2A, un partenaire essentiel de SCL

Tel que mentionné précédemment, SCL a la capacité de réprimer ou d'activer la transcription selon son intégration dans divers complexes multifactoriels (Lecuyer et al. 2002; Lahlil et al. 2004; Goardon et al. 2006). Par contre, l'aptitude de SCL à lier l'ADN requiert son hétérodimérisation avec les protéines E dont fait partie E2A (Hsu et al. 1991; Hsu et al. 1994). D'ailleurs, la présence de E2A est absolument essentielle à la capacité de SCL à réguler la transcription (Lecuyer et al. 2002; Lahlil et al. 2004).

1.3.2.1.1. Expression et fonctions dans l'hématopoïèse

Le gène *E2a* code pour deux protéines, E12 et E47, qui sont générées par épissage alternatif (Murre et al. 1989; Sun and Baltimore 1991). Les produits du gène *E2a* sont des facteurs de transcription de la famille bHLH plus particulièrement de la classe des protéines E dont fait aussi partie E2-2 et HEB. E2A est exprimé tôt dans l'embryogenèse et dans la majorité des tissus chez le rat adulte (Roberts et al. 1993). Son expression transcriptionnelle est considérablement élevée au niveau de la moelle osseuse et du thymus (Xin et al. 1993; Rutherford and LeBrun 1998). L'utilisation de souris où le gène codant pour la protéine GFP a été inséré dans le locus *E2a* a permis de démontrer que E2A est exprimé au niveau des cellules souches et que son expression diminue lors de la différenciation myéloïde (Greenbaum and Zhuang 2002). Dans le système lymphoïde, E2A est faiblement exprimé au niveau des progéniteurs T et B les plus immatures et son expression augmente lors de l'initiation du réarrangement des immunoglobulines dans la lignée B et le réarrangement du TCR dans la lignée T (Herblot et al. 2000; Engel et al. 2001; Greenbaum and Zhuang 2002). L'expression de E2A diminue dans ces deux lignées une fois les réarrangements terminés. L'inactivation de *E2a* chez la souris se caractérise par une absence complète de lymphocytes B dû à un blocage à un stade précoce de leur différenciation soit avant le réarrangement des immunoglobulines (Bain et al. 1994; Zhuang et al. 1994). Par contre, chez ces souris on observe la présence de lymphocytes T, bien qu'il y ait un blocage partiel de leur différenciation et un dérèglement au niveau du réarrangement du TCR (Bain et al. 1997; Tremblay et al. 2003).

Bien que E2A soit exprimé dans les cellules souches, les progéniteurs et la lignée érythroïde, on sait peu de choses quant au rôle de E2A dans ces cellules. Par contre, E2A est essentiel à l'expression de c-Kit, un récepteur impliqué dans la survie des cellules souches et des progéniteurs, ce qui suggère que E2A est un joueur important dans ces cellules. De plus, sa présence est indispensable à la régulation de l'expression de la glycophorine A, ce qui suggère aussi un rôle pour cette protéine dans les cellules

érythroïdes. Par contre, le rôle de E2A dans la fonction des cellules immatures et au niveau de la lignée érythroïde reste à valider.

1.3.2.1.2. Rôle de *E2a* dans le cycle cellulaire

Il a été démontré que E2A joue un rôle important dans le cycle cellulaire. En effet, la surexpression de E2A en transfection transitoire dans des 293T cause une augmentation de l'expression de p21 tant au niveau protéique que transcriptionnel (Prabhu et al. 1997). De même, E2A est capable d'activer le promoteur p21 dans les fibroblastes et cette régulation de p21 par E2A est associée à une diminution de la prolifération dans ces cellules (Prabhu et al. 1997). Par ailleurs, des résultats de notre laboratoire ont démontré que E2A et p21 ont le même patron d'expression lors de la différenciation des lymphocytes B et que la perte d'un allèle de E2A diminue les niveaux d'expression de p21 de deux fois et augmente de façon significative le nombre de cellules en cycle (Herblot et al. 2002). Ces résultats suggèrent donc que E2A régule aussi l'expression de p21 dans les lymphocytes B. Ce rôle antiprolifératif de E2A est en accord avec sa fonction de suppresseur tumoral mise en évidence par l'apparition de lymphomes T dans les souris déficientes pour E2A.

1.3.2.1.3. Rôle opposé de *Scl* et *E2a* dans la lignée lymphoïde

La surexpression de *Scl* ou l'inactivation de *E2a* cause le même phénotype au niveau de la différenciation des lymphocytes B et T. En effet, la surexpression de *Scl* chez la souris induit un blocage de la différenciation des lymphocytes T au stade où les cellules transitent de l'état $CD4^-CD8^-$ à $CD4^+CD8^+$, phénotype aussi observé dans les souris déficientes pour *E2a* (Chervinsky et al. 1999; Herblot et al. 2000; Tremblay et al. 2003). De plus, la surexpression de *Scl* ou bien la perte d'un allèle fonctionnel de *E2a* provoque une diminution du nombre de lymphocytes B matures dû à un blocage au stade proB, une phase précoce du développement des cellules B (Herblot et al. 2002). Ces résultats supportent le rôle inhibiteur de SCL au niveau de la fonction de E2A dans la progression de la leucémie T-ALL. Par contre, ces observations contrastent avec les données

précédentes démontrant que SCL et E2A collaborent transcriptionnellement en agissant au sein des mêmes complexes dans les progéniteurs et la lignée érythroïde (Lecuyer et al. 2002; Lahlil et al. 2004). L'ensemble de ces données démontre clairement que le contexte cellulaire est un modulateur crucial des fonctions de SCL et E2A et appuie l'idée que les facteurs de transcription agissent dans des complexes protéiques dont la régulation spatio-temporelle permet l'expression différentielle des gènes et donc des réponses biologiques différentes.

1.3.3. Régulation du gène *Scl*

Comme la réponse biologique induite par *Scl* dépend de ses partenaires d'interaction, identifier les modulateurs de ces différentes interactions est essentiel à la compréhension du rôle de *Scl* dans l'hématopoïèse. En effet, une meilleure connaissance de la régulation de l'expression de *Scl* est une prémisses majeure pour répondre à cette question.

Au stade de l'érythropoïèse primitive, il a été démontré que *Scl* agit en aval du VEGF. En effet, les embryons déficients pour *flk-1*, le récepteur du VEGF, expriment faiblement *Scl* et montre un phénotype semblable à celui des embryons *Scl*^{-/-}, c'est-à-dire une absence de cellules endothéliales et hématopoïétiques dans le sac vitellin (Shalaby et al. 1995; Shalaby et al. 1997; Ema et al. 2003). La surexpression de *Scl* dans les cellules ES *flk-1*^{-/-} permet d'améliorer leur capacité à former des BL-CFC et des cellules hématopoïétiques, démontrant le rôle de *Scl* en aval du VEGF dans l'hémangioblaste (Ema et al. 2003). Ces résultats sont supportés par une étude de notre laboratoire démontrant que le transgène *Scl* permet de corriger les défauts hématopoïétiques associés à l'expression d'une forme hypomorphe du *Vegf* chez la souris (Martin et al. 2004).

Au niveau de l'érythropoïèse définitive, d'autres travaux du laboratoire démontrent que l'expression de *Scl* est régulée par l'environnement, soit par la voie de l'érythropoïétine (EPO) (Lahlil et al. en préparation). En effet, l'absence du récepteur de l'érythropoïétine

durant le développement embryonnaire se traduit par une mort *in utero* due à une absence totale d'hématopoïèse définitive (Lin et al. 1996). Bien que la surexpression de *Scl* chez ces souris ne permette pas de rétablir leur survie, on observe tout de même l'apparition de cellules hématopoïétiques attribuée au rôle antiapoptotique de *Scl* dans ces cellules. Ces résultats démontrent que l'expression de *Scl* est régulée au niveau traductionnel par l'EPO, mais que d'autres signaux sont requis pour la génération d'une hématopoïèse définitive fonctionnelle.

D'autre part, il a aussi été observé que la stimulation de progéniteurs érythroïdes avec le ligand de c-kit, induit une augmentation de l'expression de *Scl*, suggérant que *Scl* puisse aussi être régulé par cette voie de signalisation. En effet, mon travail a permis de démontrer que l'expression de *Scl* est régulée par l'activation du récepteur c-Kit au niveau des progéniteurs hématopoïétiques primaires et que *Scl* est requis pour la survie induite par le ligand de c-Kit (Lacombe et al., en préparation (voir Chapitre III)). En effet, la surexpression de *Scl* dans les souris $W^{A1}W^{A1}$ dont le récepteur c-Kit est hypofonctionnel permet de corriger leurs défauts hématopoïétiques.

La présence de *Scl* en aval de plusieurs voies de signalisation, tel que démontré par plusieurs études dans notre laboratoire, démontre le rôle primordial de l'environnement sur un facteur de transcription tissu spécifique. Ces résultats démontrent le lien intime existant entre les facteurs environnementaux et intrinsèques dans l'établissement d'un système organisé tel que le système hématopoïétique.

1.4. Hypothèse

Les cellules hématopoïétiques peuvent adopter différents destins cellulaires et la capacité de choisir entre ces destins est gérée par deux facteurs extrêmement importants : l'environnement cellulaire et le profil génique d'une cellule. Il est maintenant clair que ces deux facteurs ne sont pas mutuellement exclusifs, mais agissent l'un sur l'autre. Dans ma thèse de doctorat, je me suis intéressée à ces deux aspects de la biologie cellulaire en étudiant le facteur de transcription SCL.

Chapître II : Rôle du facteur de transcription SCL dans les cellules souches hématopoïétiques

Bien que *Scf* soit essentiel à la formation des cellules hématopoïétiques au stade embryonnaire, une fois le système hématopoïétique établi, son rôle au niveau des cellules souches hématopoïétiques demeure controversé. En effet, certaines études suggèrent que son rôle est mineur ou inexistant dans les cellules souches hématopoïétiques adultes (Mikkola et al. 2003; Curtis et al. 2004). Par contre, *Scf* est exprimé à des niveaux plus élevés dans les cellules souches adultes comparativement aux cellules embryonnaires (Phillips et al. 2000; Venezia et al. 2004; Bowie et al. 2007b), et *Scf* est impliqué dans l'expression du récepteur c-Kit (Lecuyer et al. 2002), un récepteur essentiel à la survie des cellules souches. Combinées, ces observations suggèrent que *Scf* joue un rôle important dans les cellules souches hématopoïétiques adultes. En utilisant un modèle de souris possédant seulement un allèle fonctionnel de *Scf*, j'ai étudié son rôle au niveau des cellules souches hématopoïétiques par des essais de transplantation en compétition. Par ailleurs, j'ai aussi étudié le rôle de *E2a* dans ces cellules afin d'appuyer la fonction de SCL, sachant que E2A est essentiel à la liaison de SCL à l'ADN ainsi qu'à l'expression transcriptionnelle de c-Kit.

Chapitre III : Rôle de SCL en aval du récepteur c-Kit au niveau des progéniteurs hématopoïétiques.

Scl et *c-kit* sont coexprimés au niveau des progéniteurs hématopoïétiques et il a été observé que la capacité de survie induite par Steel Factor, le ligand de c-Kit, dans les cellules hématopoïétiques humaines CD34+ corrèle avec l'expression de *Scl* (Caceres-Cortes et al. 2001). Aussi, SCL est essentiel à la survie dépendante de Steel Factor dans la lignée cellulaire TF-1 (Krosi et al. 1998). Afin d'étudier la validité biologique de cette interaction, j'ai généré des souris surexprimant *Scl* sur un fond génétique hypomorphe pour c-Kit ($W^{A1}W^{A1}$) et évaluer la capacité de *Scl* à corriger les défauts hématopoïétiques des souris $W^{A1}W^{A1}$. Cette approche génétique a été combinée à la biologie cellulaire et moléculaire pour déterminer les fonctions biologiques contrôlées par *Scl* dans ce contexte.

Chapître II: Résultats. Section 1

***Scl* sustains the quiescence and self-renewal of
hematopoietic stem cells**

Julie Lacombe^{1,4}, Sabine Herblot^{1,4}, André Haman¹, Norman N. Iscove², Guy Sauvageau¹
and Trang Hoang^{1,3}

Submitted to *Cell Stem Cell*

From the ¹Institute of Research in Immunology and Cancer (IRIC); ²The Ontario Cancer
Institute, Toronto, Ontario; and the ³Departments of Pharmacology and Biochemistry,
University of Montreal

⁴ These authors contributed equally to the work.

2.1. Summary

Long-term self-renewal and quiescence are two distinctive properties of adult haematopoietic stem cells (HSCs). Here we provide evidence for an important role for the SCL transcription factor in controlling both stem cell attributes. Indeed, adult HSCs are mostly in G0 and infrequently divide to self-renew or generate differentiation-committed daughter cells. We show that *Scl* is highly expressed in quiescent HSC and decreases with cell cycle. When SCL protein levels were lowered by gene targeting or by RNA interference, more HSCs transit through G0-G1 and their self-renewal capacity is severely impaired under conditions of exacerbated proliferative demand. We further show that SCL directly controls *Cdkn1a* gene expression in HSCs. Taken together, our observations indicate that sustained HSC self-renewal is linked to negative cell cycle control by *Scl* at the G0-G1 transition. Moreover, our observations support the hypothesis that the proliferative history of HSCs determines their capacity for sustained self-renewal.

2.2. Introduction

The life-long production of blood cells depends on the regenerative capacity of a small population of hematopoietic stem cells (HSCs) that reside normally in the bone marrow, in the adult. This property forms the basis of HSC assays in which grafted donor cells are tested for their capacities for long-term reconstitution in all blood lineages of a transplanted host. Differentiating hematopoietic cells have limited proliferative lifespans. The long-term persistence of clones initiated by HSCs therefore depends critically on their ability to generate daughter cells that remain primitive, a property called "self-renewal". Sustained self-renewal over time and over multiple HSC divisions ensures the continuing presence of HSCs within HSC-derived clones and thus their capacity for life-long blood cell production. HSCs with reconstituting potential that do not sustain self-renewal activity generate clones that eventually lose stem cell activity and are detectable as transient reconstitutions in transplantation assays (reviewed in (Coulombel 2004)). Despite its widely recognized importance, the molecular basis for self-renewal and the mechanisms that sustain it remain to be further elucidated since only a few genes have been implicated in this process (reviewed by (Akala and Clarke 2006)).

In the adult, HSCs mostly reside in G0 and are triggered into cycling by chemotoxic injuries (Hellman et al. 1978; Harrison and Lerner 1991; Quesniaux et al. 1993), by exposure to cytokines *in vitro* (Trevisan et al. 1996), or by transplantation *in vivo* (Nilsson et al. 1997). Thus, the state of quiescence in HSCs differs from the irreversible quiescence associated with senescence. This also differs from quiescence induced by growth factor deprivation since HSCs that normally reside in the hematopoietic niche are exposed to environmental stimuli (Wilson and Trumpp 2006), suggesting the existence of mechanisms that actively maintain HSCs in G0. Such regulation is critical for long-term stem cell function. Indeed, *Gfi1*-deficient mice exhibit premature HSC depletion upon serial transplantations, associated with increased cycling in a population enriched in stem cell activity (Hock et al. 2004; Zeng et al. 2004). Furthermore, deficiency in CDKN1A, a G1

checkpoint regulator, also results in premature stem cell exhaustion (Cheng et al. 2000). While it remains possible that *Cdkn1a* deficiency affects more downstream progenitors (reviewed in (Cheng 2004)), these observations further support the proposition that regulation of the G0 state is important for HSC long-term integrity. Despite its importance, little is known about the transcriptional circuitry that actively maintains HSC quiescence (Passegue and Wagers 2006). In contrast to GF11, the Ets transcription factor MEL/ELF4 normally functions to facilitate G0 exit in HSCs (Lacorazza et al. 2006). Thus, HSC quiescence is maintained by the opposing activities of GF11 and MEF.

Cell cycle and quiescence are actively controlled at critical transition points in the hematopoietic hierarchy. Unlike HSCs, hematopoietic progenitors actively cycle and undergo substantial expansion from a limited numbers of HSCs. Following this proliferative phase, transition to terminal differentiation is coupled with growth arrest. The molecular mechanism governing this transitional stage remains to be elucidated. In the erythroid lineage for example, progenitors are highly proliferative (Iscove 1977; Gregory and Eaves 1978) and progressively lose their proliferative potential with terminal differentiation. An important role for the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor SCL in the erythroid lineage (Hall et al. 2003; Mikkola et al. 2003) was previously ascribed to its capacity to activate the expression of erythroid genes (Xu et al. 2003; Anguita et al. 2004; Lahlil et al. 2004) or to suppress apoptosis (Martin et al. 2004). In addition, we recently showed that SCL controls the transition stage between proliferation and commitment to differentiation and governs the expression of CDKI in erythroid progenitors (Goardon et al. 2006).

During ontogeny, SCL is required for the generation of all hematopoietic lineages as SCL specifies mesoderm to a hematopoietic and vascular fate (Robb et al. 1995; Shivdasani et al. 1995; Elefanty et al. 1997; Gering et al. 1998; Porcher et al. 1999). The critical role of SCL in generating HSCs during development is well documented but there is controversy with regards to its function in regulating HSC activity in the adult. For example,

conditional knock-out experiments suggest that SCL may be dispensable (Mikkola et al. 2003; Curtis et al. 2004) and possibly redundant with other factors (Capron et al. 2006), whereas decreasing SCL function by delivery of a dominant negative SCL or Scl-directed shRNA in human cells impaired their SCID-repopulating ability (Reynaud et al. 2005; Brunet de la Grange et al. 2006). Nonetheless, gene profiling of HSC (Sca1⁺Lin⁻ side population) under different conditions allowed the identification of a quiescence signature that is characterized by increased Scl and Cdkn1a expression (Venezia et al. 2004).

Because of the correlation between Scl levels and HSC quiescence (Venezia et al. 2004) and its important anti-proliferative function at the onset of terminal erythroid differentiation (Goardon et al. 2006), we address in the present study the role of SCL in HSC quiescence control and their long-term functions. We reasoned that HSC properties are best revealed under limiting conditions and therefore, estimated their potential in long term competition assays and under conditions of transplantation of ~1 HSC per mouse.

2.3. Results

***Scl* transcripts are expressed in adult LT-HSCs and decline in cycling cells.**

SLAM-KSL represent one of the most enriched populations in HSCs endowed of long term reconstituting ability (LT-HSCs), i.e. in the proportion of 1/2 to 1/3 (Kiel et al. 2005) (Sauvageau, unpublished observations) (Figure 2.1A). The KSL (Kit⁺Scal⁺Lin⁻) population is more heterogeneous than the SLAM-KSL population and includes both short-term (ST) and LT-HSCs whereas progenitors devoid of stem cell activity are Kit⁺Scal⁻Lin⁻ (KL), and could be further fractionated into myeloid or erythroid progenitors (CMP, GMP and MEP) (Kondo et al. 1997; Akashi et al. 2000) (Figure 2.1A). We measured cell cycle parameters in HSCs and progenitors using the DNA dye Hoechst 33342 and the RNA dye PyroninY to distinguish the G0 and G1 phases. We observe that 75-80% of LT-HSCs (SLAM-KSL) in the adult is in G0 (Figure 2.1B), consistent with published results (Bowie et al. 2007). In comparison, the KSL population exhibits a much higher proportion of cells in G1 (60-75%) while progenitors (KL) are mostly cycling cells. Thus, within the Kit⁺Lin⁻ population, only LT-HSCs are quiescent cells.

We next assessed *Scl* levels by qRT-PCR and observed that *Scl* transcripts were high in SLAM-KSL cells and reproducibly much lower in KSL cells and in all progenitors, including lymphoid progenitors (CLP) (Kondo et al. 1997) (Figure 2.1C). LT-HSCs are also defined by their capacity to exclude Rhodamine (Benveniste et al. 2003) and by CD49b surface expression (Wagers et al. 2002), two characteristics not found in ST-HSCs (Figure 2.1A). *Scl* was readily detected in the Rho^{low}CD49b⁺KSL fraction at steady-state (Figure 2.1D). Moreover, *Scl* levels decrease ten-fold after *in vitro* cytokine stimulation when these cells enter mitosis, consistent with the reported presence of *Scl* within the HSC quiescence signature (Venezia et al. 2004). *Scl* expression in HSCs is therefore associated with low cell cycling activity (Figure 2.1A-D). To assess this possibility, we subdivided the SLAM-KSL population into non-cycling (G0) and cycling fractions (G1/S/G2/M) based on

Hoechst 33342 and Pyronin Y staining and found that *Scl* expression is higher in the G0 fraction and lower in cycling cells (Figure 2.1E). This expression pattern was also observed with *Cdkn1a*, a negative regulator of the cell cycle. Together, our observations indicate that *Scl* expression is highest in resting LT-HSCs, whilst its expression is downregulated with cell cycle entry, either upon cytokine stimulation or when HSCs lose the SLAM markers that are associated with long term activity.

Reducing *Scl* level impairs HSC function under limiting conditions

To assess the role of *Scl* in HSC activity, we took advantage of the *Scl*^{+/-} mouse (Elefanty et al. 1998) in which one allele of *Scl* is disrupted by *LacZ* insertion. This resulted in a two-fold decrease of both p42 and p22 SCL protein isoforms (arrows, Figure 2.1F) in lineage depleted bone marrow cells, whilst E47 and PTP1D protein levels remained unchanged when compared to wild type littermates. Decreased SCL protein levels did not affect the number of progenitors in *Scl*^{+/-} mice at steady state (colony assays shown in Supplemental Figure S1A), nor their proliferative potential when compared to their *Scl*^{+/+} counterparts (Supplemental Figure S1B). Similarly, the SLAM-KSL frequency was not affected in *Scl*^{+/-} mice (Figure 2.2A and B). Finally, using limiting dilution analysis in quantitative repopulating assays, we found that 8 months old adult *Scl*^{+/-} mice have normal HSC numbers (CRU, Figure 2.2C and D), consistent with published results (Mikkola et al. 2003). Their mean repopulating abilities (MRA) however, were two-fold decreased when compared to *Scl*^{+/+} HSCs under limiting conditions (transplantation of ~ 1 HSC per mice) (Figure 2.2E). Thus, despite a normal stem cell pool size, *Scl*^{+/-} HSCs exhibit impaired repopulating potential in transplantation.

Thus, while steady state hematopoiesis appears normal in *Scl*^{+/-} mice, HSC activity in limiting conditions is impaired, suggesting that these cells may be less competitive. We therefore compared the activity of *Scl*^{+/-} HSCs to that of wt littermates in competitive repopulation assays and serial transplantations. *Scl*^{+/-} bone marrow cells (CD45.2⁺) were mixed with wt competitor bone marrow cells (CD45.1⁺) at two ratio and transplanted in

congenic irradiated hosts (CD45.1⁺) (Figure 2.3A). The percentages of *Scl*^{+/-} cells in the peripheral blood, bone marrow and thymus of grafted mice were assessed at 4 and 8 months following transplantation (Figure 2.3B, D and E) and the relative competitive advantage (RCA) for *Scl*^{+/-} or wt cells was calculated as described in Experimental Procedures. At 4 months, reconstitution within the KSL population by *Scl*^{+/-} and *Scl*^{+/+} cells was similar, but it dramatically decreased after 8 months (Figure 2.3B). Consistent with these results, the contribution of *Scl*^{+/-} cells to all hematopoietic lineages in the peripheral blood, bone marrow and thymus was reduced after 8 months in primary recipient as compared to 4 months (Figure 2.3D and E). In line with these results, *Scl*^{+/-} cells harvested at 4 months post transplantation were severely impaired in their ability to reconstitute secondary recipients (Figure 2.3C). Further experiments ruled out a possible non cell autonomous contribution to the phenotype observed in *Scl*^{+/-} HSCs. Indeed, the capacity of HSCs to reconstitute hematopoiesis was similar when wt cells were transplanted into wt or *Scl*^{+/-} irradiated mice (Supplemental Figure S1C). In summary, our observations indicate that *Scl* sustains long term HSC activity.

Stem cell loss could be caused by increased differentiation into lineage progenitors. By comparing reconstitution in primitive cells (KSL) versus mature cells (Gr1⁺ granulocytes, CD11b⁺ myeloid cells, Ter119⁺ erythrocytes, B220⁺ lymphocytes and CD4⁺CD8⁺ thymocytes), we noticed that *Scl*^{+/-} cells were less competitive in repopulating the former compared to the latter (Figures 2.3B, D and E), suggesting that *Scl* haploidy more severely affects primitive (KSL) populations whereas later maturational processes were less affected. Together, our observations indicate that *Scl* haploidy does not cause increased differentiation, except in the lymphoid lineages where SCL normally antagonizes E protein activity (Herblot et al. 2002). Therefore, the competitive defect of *Scl*^{+/-} cells in the KSL population may due to a specific defect within the HSC population.

SCL restrains the cell cycle in LTR-HSCs

The long term maintenance of stem cells has been linked to quiescence control (reviewed by (Wilson and Trumpp 2006). Furthermore, our observations indicate a correlation between *Scf* levels and quiescence (Figure 2.1). We therefore addressed the question whether the cell cycle status of LTR-HSCs was affected by a reduced level of *Scf* expression. Hoechst and Pyronin Y staining (Figure 2.4A, upper panels) indicate that at steady state, 75% of wt SLAM-KSL are in G0 as reported (Cheshier et al. 1999) (Figure 2.4A, left panels). Reducing *Scf* levels reproducibly induced a decrease in the proportion of HSCs in G0 phase to 65-67% (n=5) (Figure 2.4A, right panels). These results were confirmed using DAPI (DNA) and Ki67 (cell proliferation) staining (Figure 2.4A, lower panels). Although DAPI staining revealed more cells in the S/G2/M fraction when compared to Hoechst staining, possibly due to dye exclusion in stem cells and their enrichment in the side population (Goodell et al. 1996), both protocols concur on the G0 fraction. Thus, *Scf*^{+/-} HSCs exhibit a modest decrease in the G0 fraction, and this was reproducibly and independently observed with both staining protocols. Cytokine stimulation for 24h triggers HSC proliferation and increases the proportion of cells in S/G2/M (Figure 2.4, compare A and B, left panels, *Scf*^{+/+}). Strikingly, *Scf*^{+/-} HSCs at 24h exhibit a two-fold decrease in the G0 fraction and two fold increase in the G1 fraction when compared to wt controls (Figure 2.4B), Therefore, cell cycle analysis at this early time point reveals that decreasing *Scf* levels facilitates the G0-G1 transition under steady state conditions, and this effect was further enhanced by cytokine stimulation.

During development, HSCs actively cycle until week 3 after birth and then switch to a quiescent state around week 4 throughout adult life (Bowie et al. 2007) (reviewed by (Williams et al. 2006). We therefore assessed the loss of one *Scf* allele on cell cycle in post natal HSCs. As shown in Figure 2.4C, postnatal HSCs are mostly in G1 and are not affected by *Scf* haploidy, unlike adult HSCs. Cytokine stimulation induced similar S phase progression in *Scf*^{+/+} and *Scf*^{+/-} HSCs (Figure 2.4C). Therefore, SCL does not control HSC

cell cycle at the postnatal stage. Consistent with this observation, we found that *Scl* mRNA increased steadily during development and is highest in adult HSCs, i.e. in non cycling cells (Supplemental Figure S2A). *Scl* was also more elevated in adult compared to fetal HSCs in three independent reports, either by global gene profiling (Phillips et al. 2000; Venezia et al. 2004) (Supplemental Figure S2B and C) or by qRT-PCR (Bowie et al. 2007). Our observations indicate that SCL specifically controls LT-HSC quiescence in the adult.

In contrast to adult HSCs, progenitors (c-Kit⁺Sca1⁻Lin⁻) or mature cells (Lin⁺) were both highly cycling and were not affected by *Scl* gene dosage (Figure 2.4D-F), in good agreement with lower *Scl* expression level in these cells as compared to HSCs (Figure 2.1C). We therefore conclude that decreasing *Scl* gene dosage facilitates the G0-G1 transition in adult LT-HSCs and that SCL specifically controls their quiescence state.

SCL shRNAs disrupt HSC cell cycle control *in vitro*

The above observations led us to take an independent approach to decrease *Scl* levels in HSCs, based on the shRNA technology (Chagraoui et al. 2006; Goardon et al. 2006) (Figure 2.5A). *Scl* directed shRNAs delivered by lentivirus efficiently knocked down protein levels in lineage negative bone marrow cells (Figure 2.5B). Analysis of cell cycle parameters in the SLAM-KSL population indicated that *Scl* shRNA infection resulted in elevated G1 entry (Figure 2.5C), concurring with results observed using *Scl*^{+/-} cells. This facilitation of the G0-G1 transition triggered by sh-*Scl* closely reproduces that observed with cytokine-stimulated *Scl*^{+/-} cells (Figure 2.4B). The same effects were observed with three different shRNAs as compared to a non targeting control shRNA, indicating that these were specifically due to decreased SCL protein levels. As observed in *Scl*^{+/-} cells, the cycling of populations that are enriched in hematopoietic progenitors (c-Kit⁺Sca1⁻Lin⁻) and mature cells (Lin⁺) were not affected by shRNA exposure (Figure 2.5D and E respectively).

Together, our observations indicate that *Scl* specifically hinders G1 entry in LT-HSCs.

SCL controls *Cdkn1a* (p21) gene expression in HSCs

Only a few genes are known to control HSC quiescence, MEF, GF11, and JUNB nuclear factors, as well as CDK inhibitors, i.e. *Cdkn2c* (p18^{Ink4c}) and *Cdkn1a* (p21) (Cheng et al. 2000; Hock et al. 2004; Yuan et al. 2004; Lacorazza et al. 2006; Passegue and Wagers 2006) whereas the effect of ID1 on the cell cycle may be indirect, due to increased myeloid commitment (Jankovic et al. 2007) We therefore assessed their expression levels in purified SLAM-KSL from *WT* and *Scl*^{+/-} mice (Figure 2.6A). This analysis confirmed that *Scl* mRNA was reduced by two-fold in the *Scl*^{+/-} SLAM-KSL population as compared to *WT* counterparts. *Mef*, *Gfi1* and *JunB* as well as *Cdkn2c* expression levels were not affected by decreased *Scl*, suggesting that these genes do not act downstream of *Scl*. In contrast, *Cdkn1a* was reproducibly decreased by ten-fold whereas *Pten* and *Id1* showed modest fluctuations only. The high sensitivity of *Cdkn1a* expression to *Scl* levels could be due to the weak affinity of *Scl* for *Cdkn1a* promoter as compared to other target, although this hypothesis remains to be confirmed as we did not test *Scl* relative binding affinity for this promoter. Thus, these results concur with the observations that *Cdkn1a*-deficient Lin⁻ cells exhibit increased proportion in G1 phase (Cheng et al. 2000), a phenotype very similar to *Scl*^{+/-} HSCs. We next performed chromatin immunoprecipitation of purified Lin⁻ cells. As shown in Figure 2.6B, *Cdkn1a* promoter sequences were specifically immunoprecipitated by the SCL antibody compared to control immunoglobulins whereas *Cdkn2c*, *Mef* and control *β-actin* promoter sequences were not. These results indicate that the SCL protein specifically occupies the *Cdkn1a* locus in immature hematopoietic cells. We conclude that *Cdkn1a* is a direct target of *Scl* and that *Cdkn1a* levels are significantly decreased when SCL protein levels are reduced by two-fold. Furthermore, *Cdkn1a* levels are decreased as HSCs progress into G1 (Figure 2.1E, right panel). Together, our data are consistent with the view that *Scl* controls the G0-G1 progression in HSCs by directly modulating *Cdkn1a* expression (Figure 2.6C).

2.4. Figures and Figures Legend

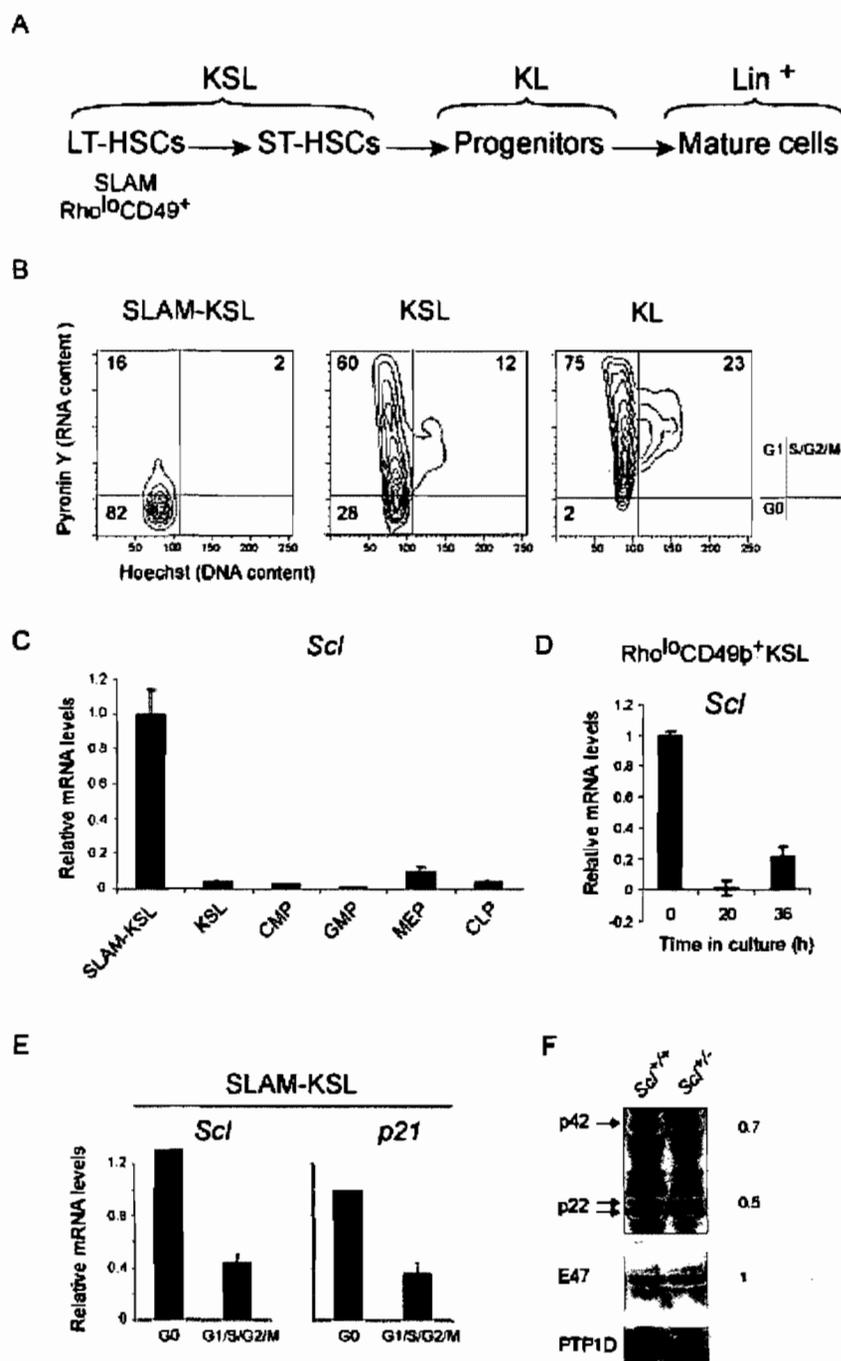


Figure 2.1: *Scl* expression in HSC correlates with quiescence

(A) Schematic diagram of the hematopoietic populations and their cell surface markers. HSCs are c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻ (KSL), which include LT-HSCs (SLAM-KSL) and ST-HSCs. Progenitors (devoid of stem cell activity) are Kit⁺Sca1⁻Lin⁻ (KL).

(B) Cell cycle status of SLAM-KSL, KSL and KL progenitors. Cell cycle parameters are analysed according to Hoechst 33342 (DNA) and PyroninY (RNA) staining. G0, G1 and S-G2-M are defined as shown (n=3)..

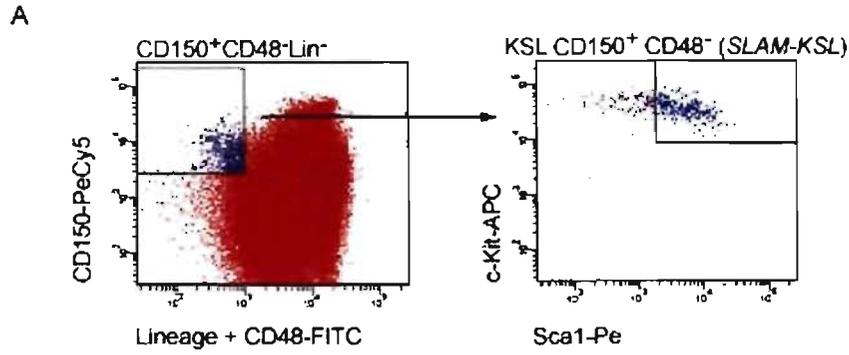
(C) *Scl* expression is highest in LT-HSCs. *Scl* mRNA levels in purified populations from adult mice were assessed by qRT-PCR and normalized using *Hprt*. Expression levels in SLAM-KSL cells were set as 1 (n=3).

(D) *Scl* expression decreases after *in vitro* cytokine stimulation. cDNAs from LT-HSCs (CD49b⁺Rho^{low}KSL) taken prior to (t=0) and after 20 and 36h of stimulation were analysed by quantitative RT-PCR. *Scl* mRNA levels were first normalized using *Hprt* and then compared to the level of expression at t=0 (n=3).

(E) *Scl* and *Cdkn1a* are expressed at higher levels in resting LT-HSCs. SLAM-KSL in G0 or in G1/S/G2/M were purified by flow cytometry and *Scl* (left panel) and *Cdkn1a* (right panel) expression levels were assessed by quantitative RT-PCR. mRNA levels were normalized using *Hprt* and compared to expression levels in the G0 SLAM-KSL population (n=2).

(F) Reduced SCL protein levels in lineage-depleted bone marrow cells from *Scl*^{+/-} mice. Western blotting was performed with antibodies against SCL and E2a. Anti-PTP1D was used as a loading control.

Data shown are the mean ± SD of n determinations



B

	SLAM-KSL (absolute number per mice)
<i>Scf</i> ^{+/+}	14 300 ± 3 600
<i>Scf</i> ^{+/-}	11 500 ± 3 100

D

	CRU Frequency
<i>Scf</i> ^{+/+}	1 in 42 357 ± 11 249
<i>Scf</i> ^{+/-}	1 in 44 392 ± 12 208

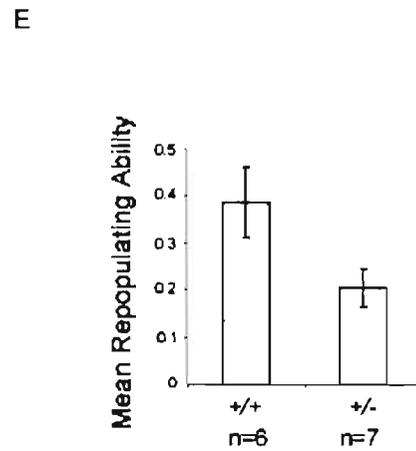
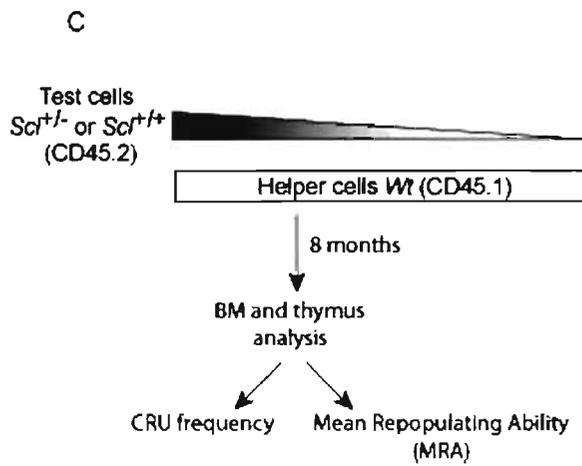


Figure 2.2: *Scl* haploidy does not affect stem cell numbers but decreases their mean repopulating ability

(A) Dotplots representing the SLAM-KSL stain for LT-HSCs.

(B) Reducing *Scl* level does not impair the frequency of SLAM-KSL cells in *Scl*^{+/-} mice compared to wild type littermates (means ± SD of 5 experiments).

(C) Diagrammatic representation of the competitive repopulating unit (CRU) assay used to quantify HSCs.

(D) Loss of one allele of *Scl* does not alter bone marrow CRU frequency.

(E) The mean repopulating ability (MRA) of HSCs is decreased when *Scl* levels are reduced. MRA was calculated in mice receiving ~ 1 CRU, as described in Experimental Procedures. Data shown are the average ± SD from n mice.

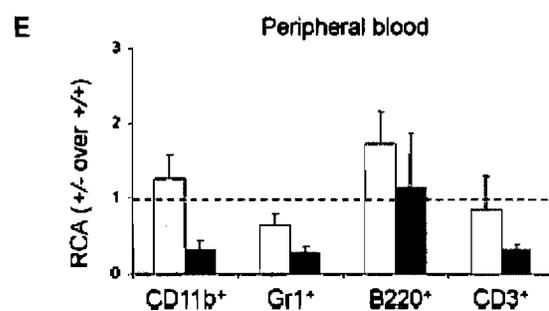
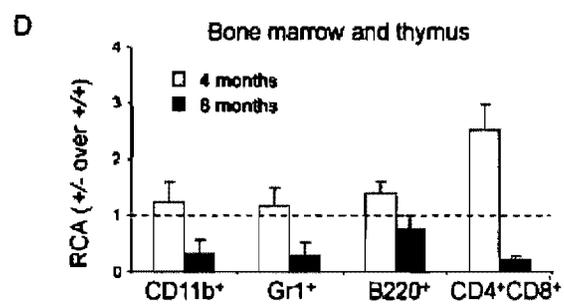
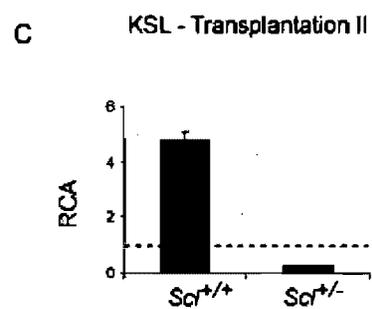
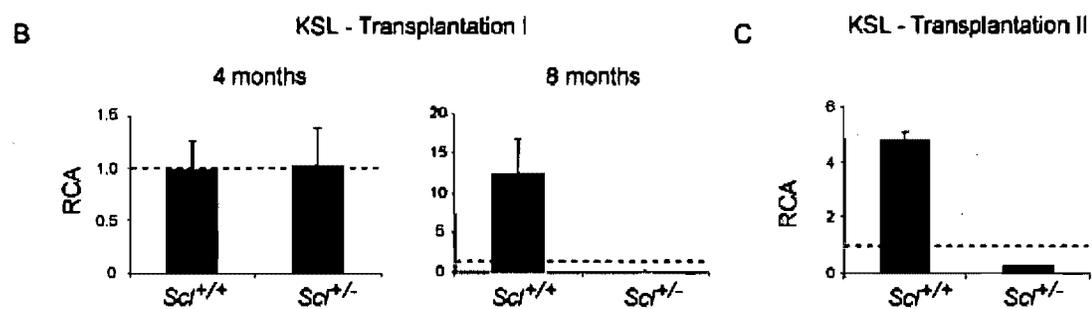
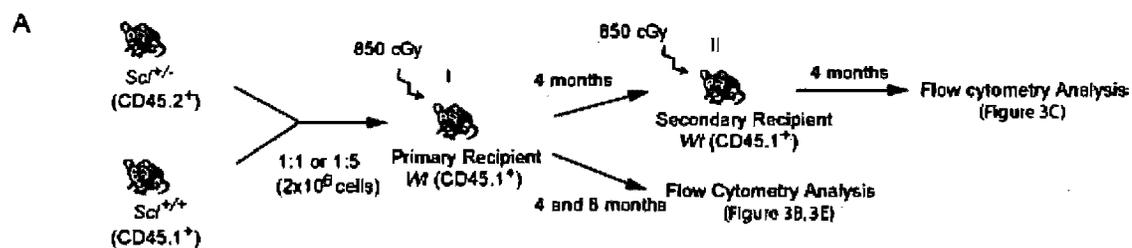


Figure 2.3: *Scl* is required for long-term maintenance of HSC.

(A) Diagram of the serial competitive transplantation strategy. *Scl*^{+/-} bone marrow cells (CD45.2⁺) were mixed with *Scl*^{+/+} competitor bone marrow cells (CD45.1⁺) at 1:1 or 1:5 ratio and 2x10⁶ cells were transplanted in congenic irradiated hosts (CD45.1⁺) as described in Experimental Procedures

(B) Reducing *Scl* levels dramatically impairs the repopulating ability of HSCs. Reconstitution by *Scl*^{+/-} or *Scl*^{+/+} cells within the KSL population from five transplanted mice after 4 and 8 months was assessed by flow cytometry. The relative competitive ability (RCA) was calculated by comparing the contribution of *Scl*^{+/-} or *Scl*^{+/+} cells to hematopoiesis after and before transplantation. Values higher than 1 are associated to a competitive advantage, while values lower than 1 correspond to impaired competitiveness (median ± SD).

(C) Relative competitive ability of *Scl*^{+/-} HSCs within the KSL population in secondary transplantation (median RCA ± SD from 5 mice).

(D-E) Loss of one allele of *Scl* impairs long term reconstitution in all lineages. The relative competitive abilities of *Scl*^{+/-} cells are shown in the mature myeloid (CD11b, Gr1) and lymphoid (B220, CD3) populations from the bone marrow and thymus (D) or peripheral blood (E) (median ± SD from 5 mice).

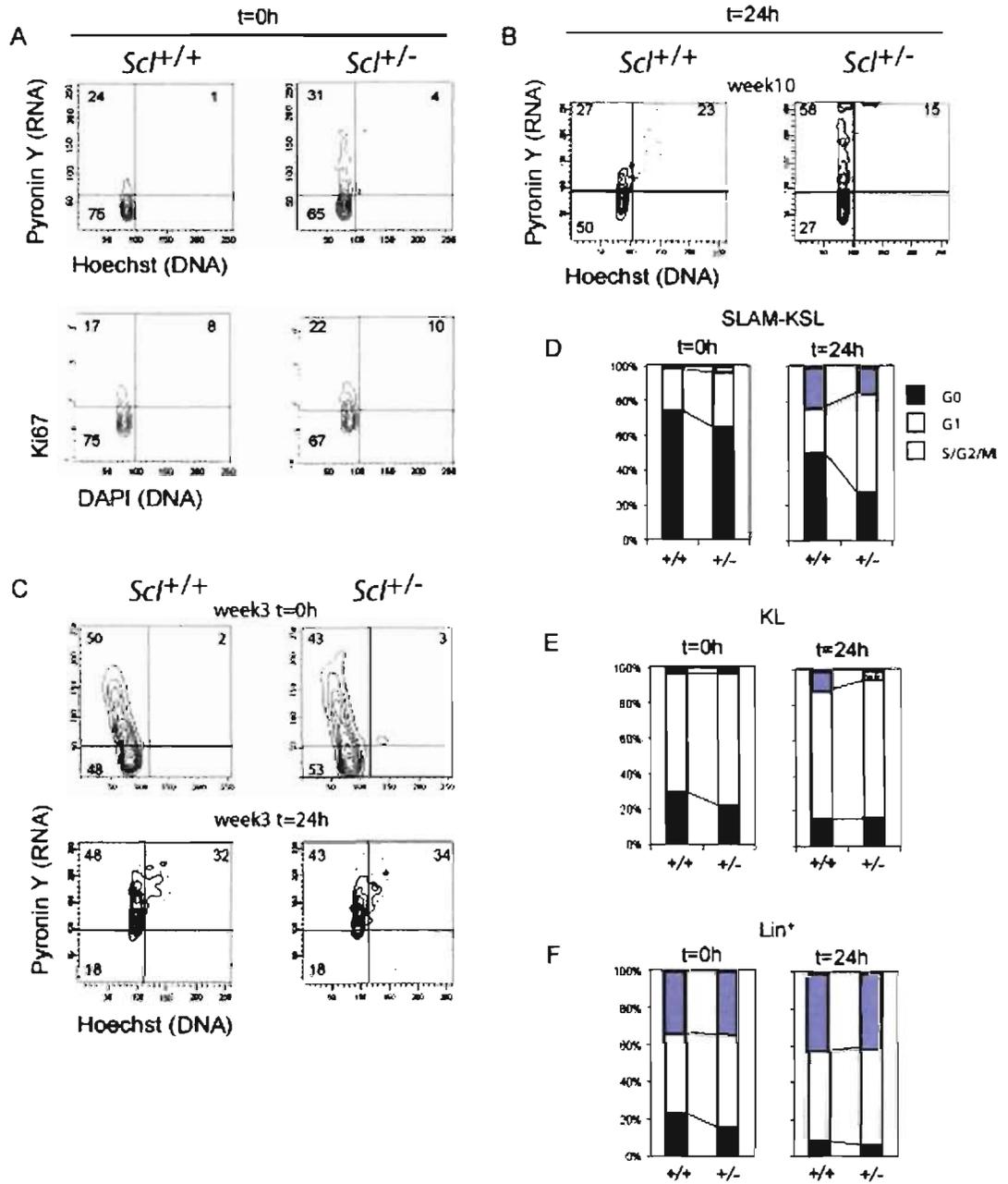


Figure 2.4: Cell cycle entry of HSCs is controlled by *Scf* gene dosage.

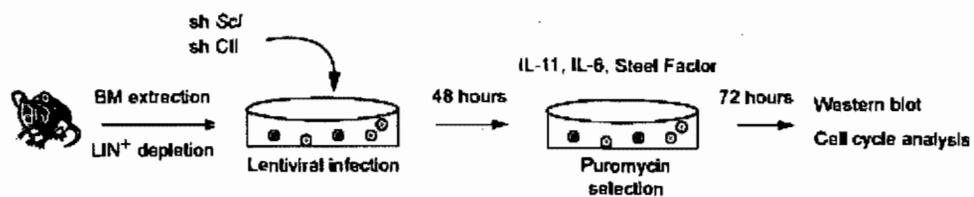
(A) Reduced *Scf* level favours the G0-G1 transition. LT-HSC cell cycle status was assessed by staining with Hoechst 33342 and Pyronin Y (upper panels) or Ki67 and DAPI (lower panels), combined to cell surface labelling with antibodies for SLAMF6 population analysis. Representative dot plots are shown for *Scf*^{+/+} and *Scf*^{+/-} bone marrow cells at steady-state (n=4 or 6). Data were analyzed by the Student's t test and differences between *Scf*^{+/+} and *Scf*^{+/-} SLAMF6 for G0 cell cycle phase are significant (p<0.05).

(B) *Scf* cell controls HSC cell cycle in response to cytokine stimulation. *Scf*^{+/+} and *Scf*^{+/-} lineage depleted bone marrow cells harvested from 3-week old and adult mice were cultured with Steel Factor, IL-11 and IL-6 for 24 hours prior to cell cycle analysis within the SLAMF6 population. Note that reducing *Scf* levels exacerbates the G0-G1 transition in response to cytokines within SLAMF6 population from adult mice (upper panels) without affecting the cell cycle profile from 3-week old mice (lower panels). Representative dot plots are shown for *Scf*^{+/+} and *Scf*^{+/-} bone marrow cells from 3-week old and adult mice after 24 hours of cytokine stimulation (n=4). Data were analyzed by the Student's t test and differences between *Scf*^{+/+} and *Scf*^{+/-} SLAMF6 for G0 cell cycle phase are significant (p<0.05).

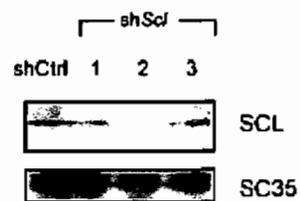
(C) Post natal HSCs are not affected by decreased SCL levels. Post natal LT-HSCs (week 3) have a lower fraction of G0 cells compared to adult mice (week 5 and later).

(D-F) The G0-G1 transition in response to cytokine stimulation is specifically increased in *Scf*^{+/-} SLAMF6. *In vitro* cytokine stimulation induced cell cycle progression of *Scf*^{+/+} SLAMF6 populations (compare left and right panels) and this effect is exacerbated by reduced *Scf* levels (D). Loss of one *Scf* allele modestly affects the progenitor population (E) and the mature cells (F) at steady-state (left panels). In contrast, upon cytokine stimulation, *Scf* haploidy specifically enhances the G0-G1 transition in the SLAMF6, but not in progenitor or mature populations (D, E and F, right panels). G0, black bars; G1, open bars; S/G2/M, shaded bars.

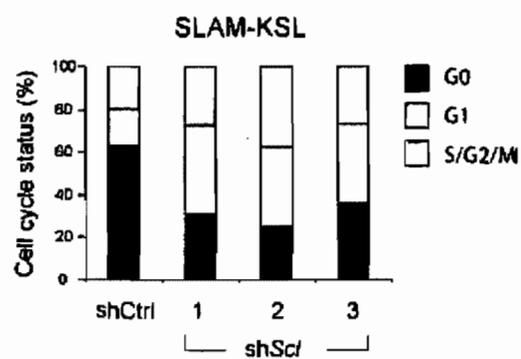
A



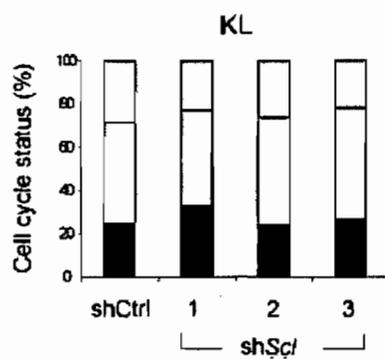
B



C



D



E

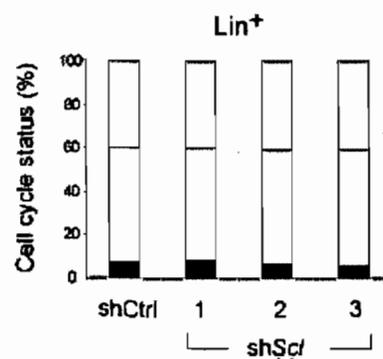


Figure 2.5: *Scl*-directed shRNAs facilitate the G0-G1 transition in culture.

(A) Schematic representation of shRNA lentiviral delivery in lineage depleted bone marrow cells.

(B) Efficient shRNA targeting of SCL protein levels in lineage negative bone marrow cells, assessed by western blot of nuclear extracts. SC35 was used as loading control (n=2).

(C-E) Reducing SCL level specifically facilitates the G0-G1 transition in the SLAM-KSL population. Cell cycle analyses of shRNA infected lineage depleted cells were performed using Hoescht 33342 and Pyronin Y. The SLAM-KSL population exhibited an increased proportion of cells in G1 and S/G2M when SCL levels were decreased while progenitors (c-Kit⁺Sca1⁻Lin⁻) (D) or lineage positive cells (Lin⁺) (E) were not affected (n=2). G0, open bars; G1, black bars; S/G2/M, shaded bars.

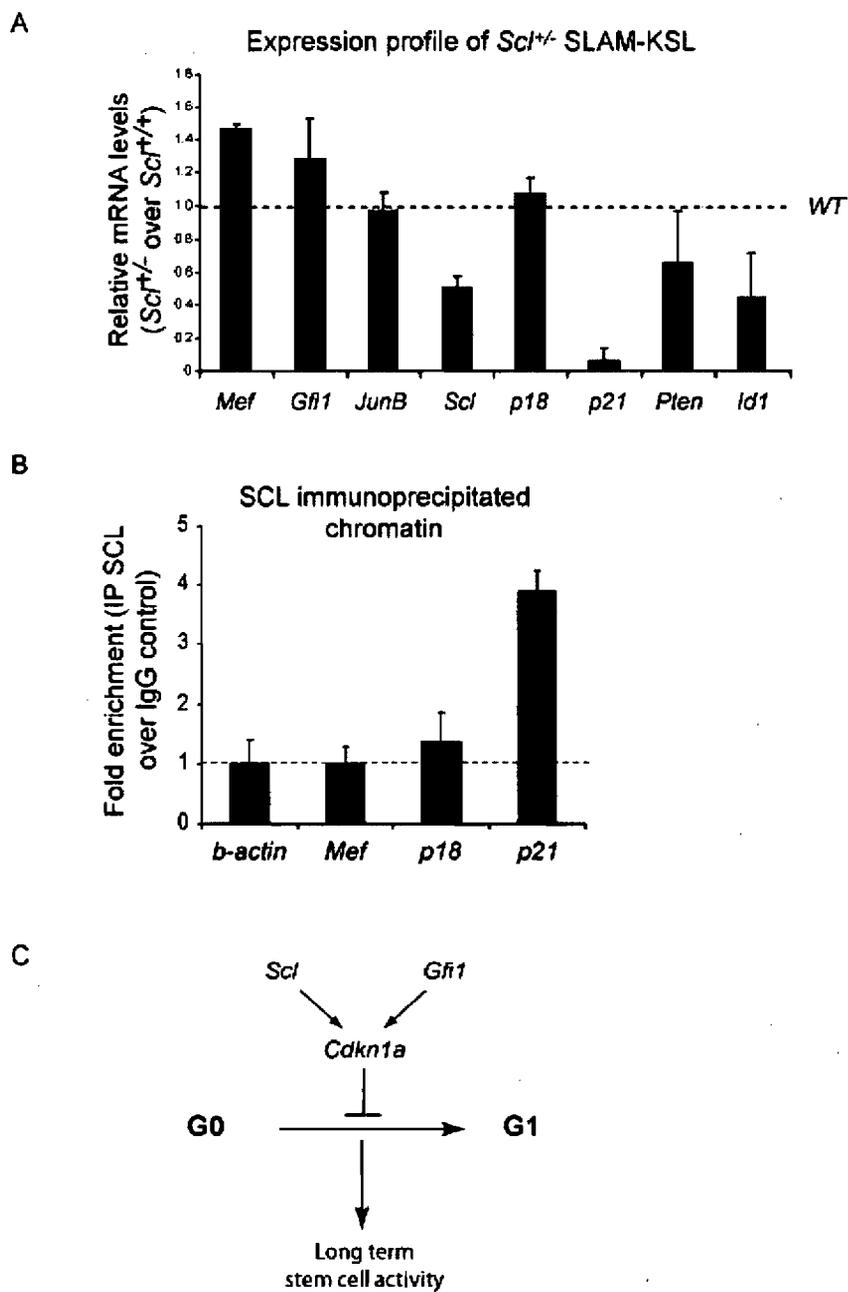


Figure 2.6: *Cdkn1a* is a direct target gene of *Scl* in immature hematopoietic cells.

(A) *Cdkn1a* expression is decreased in the *Scl*^{+/-} SLAM-KSL population. SLAM-KSL from *Scl*^{+/+} and *Scl*^{+/-} mice were purified by flow cytometry and gene expression was determined by qRT-PCR. mRNA levels of the indicated genes were first normalized using *hppt* as an internal control and second compared to expression levels in the *Scl*^{+/+} SLAM-KSL population, illustrated here as the dotted line (mean ± SD of two experiments performed in triplicate).

(B) SCL proteins occupy the *Cdkn1a* locus in immature cells. Chromatin from lineage depleted bone marrow cells was immunoprecipitated with an anti murine SCL antibody. Immunoprecipitated promoter sequences were analyzed by qRT-PCR (mean ± SD of two experiments).

(C) Diagram depicting *Scl* function in HSC cell cycle regulation. *Scl* and *Gfi1* both converge on *Cdkn1a* gene expression to prevent HSC cell cycle entry and preserve their long term function.

2.5. Experimental Procedures

Mice

Mice with one functional allele of *Scl* were generated by introducing the *LacZ* reporter gene into the coding sequence of *Scl* (Elefanty et al. 1998) and were a generous gift from Dr Glenn C. Begley (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA). These mice were maintained on a C57BL/6 background for more than 10 generations. We used B6.SJL-*Ptprc*^a *Pep3*^b/BoyJ mice from the Jackson laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) as host for transplantation assays. All mice were kept under pathogen-free conditions according to institutional animal care and use guidelines.

Flow cytometry analysis

For SLAM-KSL cell sorting (Kiel et al. 2005), lineage depleted bone marrow cells (Supplementary Procedures) were stained with c-Kit-APC, Sca1-Pe, CD150-PeCy5, CD48-FITC and FITC-conjugated antibodies for the lineage markers CD3, B220, Gr1, CD11b and TER119. For KSL, CMP, GMP and MEP purification (Akashi et al. 2000), lineage negative cells were stained with CD34-FITC, Sca1-Pe, c-Kit-APC, FcγR-PeCy7 and biotinylated antibodies for the following lineage markers: IL7-Rα, CD3, B220, FcαRI, Gr1, CD11b and TER119 (detected with PeCy5-conjugated streptavidin). For CLP sorting (Kondo et al. 1997), lineage depleted bone marrow cells were stained with Sca1-Pe, c-Kit-APC, IL-7Rα-PeCy5, Flt3-biotin (detected by streptavidin PeCy7) and FITC-conjugated antibodies for the following lineage markers: Thy1.2, CD3, B220, Gr1, CD11b and TER119. Dead cells were excluded by PI staining.

Absolute numbers of SLAM-KSL were calculated based on flow cytometry immunostaining without previous depletion. Analysis was performed on LSRII or FACS ARIA (BD Biosciences, Mississauga, ON).

Cell cycle analysis

Lineage depleted bone marrow cells prior to and after culture (24h) were incubated for 45 min at 37°C in DMEM supplemented with 2% FCS, 1mM HEPES pH7.4 and 10 µg/mL of Hoechst 33342 (Molecular Probes, Burlington, ON). 1µg/mL Pyronin Y (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) was then added for an additional 30 min at 37°C with agitation each 15 minutes. Cells were then washed in PBS supplemented with 2% FCS and stained for SLAM-KSL as described above. Cell cycle analysis were performed on FACS LSRII at low rate, Hoechst 33342 and Pyronin Y were visualised on a linear scale.

Cell cycle was also monitored by intracellular labelling with antibody against Ki67 (BD Biosciences, Mississauga, ON) coupled to DNA staining with DAPI (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Lineage depleted bone marrow cells were first labelled with antibodies for SLAM-KSL analysis, followed by fixation and permeabilisation using BD CytoPerm/CytoFix kit solutions (BD Biosciences, Mississauga, ON). Cells were then labelled for 3 hours at room temperature with anti Ki67-Pe and DNA was stained with DAPI just before the flow cytometry analysis at low rate on FACS LSRII cytometer. DNA content was visualised on linear scale.

Gene expression analysis and western blotting

For RT-PCR analysis, 10 000 cells were sorted on FACS ARIA (BD Biosciences, Mississauga, ON) and total RNA was extracted. Total RNA and reverse transcription were performed as previously described (Herblot et al., 2000). For quantitative RT-PCR, cDNAs were amplified with specific primers (Supplemental Procedures). Antibodies used for western blotting analysis of lineage-depleted bone marrow cells are described in Supplemental Procedures.

Rhodamine^{low} KSL cells were isolated (Benveniste et al. 2003), and further segregated into CD49b^{hi} fractions (Wagers et al. 2002). For preparation of amplified cDNA from freshly isolated cells, 50 cells were lysed in 4 µl lysis buffer and globally amplified cDNA

prepared as described (Iscove et al. 2002). Purified cells were also induced into active cycle by incubation with Steel Factor, IL-11, IL-7 and Flt3 ligand for 36 hr (Benveniste et al. 2003) followed by lysis of 50 - 70 cells and global amplification of cDNA.

Transplantation assays

Competitive repopulating assays were performed using total bone marrow cells pooled from three *Scl*^{+/-} mice (CD45.2⁺). *Scl*^{+/-} cells were injected into congenic lethally irradiated (850 cGy) mice (CD45.1⁺) at varying ratio (1:1 or 1:5) in competition with *Scl*^{+/+} age-matched bone marrow cells (CD45.1⁺). Five recipients were injected for each condition. Contribution of *Scl*^{+/-} cells to hematopoiesis was evaluated four and eight months post-transplantation by flow cytometry and the relative competitive ability (RCA) of *Scl*^{+/-} cells was calculated as follows:

$$\text{RCA} = [\text{output T/C}] / [\text{input T/C}]$$

in which T represents the percentage of *Scl*^{+/-} cells (CD45.2⁺) and C represents the percentage of *Scl*^{+/+} competitor cells (CD45.1⁺). The input mixture was assessed by flow cytometry prior to transplantation to obtain the exact input T/C ratio. Bone marrow cells from primary recipient were harvested 4 months after transplantation and 2×10^7 cells were injected into secondary recipient mice. Reconstitution of secondary recipients was analyzed 4 months after transplantation.

The frequency of competitive repopulating units (CRU) was evaluated by transplanting decreasing concentration of unfractionned bone marrow cells from either *Scl*^{+/+} or *Scl*^{+/-} mice (CD45.2⁺) with helper cells (CD45.1⁺) into irradiated recipient mice (CD45.1⁺). Eight months later, reconstitution of all lineages in bone marrow and thymus was analysed by flow cytometry and CRU frequency was calculated according to Poisson's statistics using L-CALC software (StemCell Technologies). The mean repopulating activity (MRA) of HSCs at limiting dilution (~ 1 CRU/mouse) is calculated according to the Harrison formula (Harrison et al. 1993; Ema and Nakauchi 2000):

$$\text{MRA} = [\text{T/C}] / \text{CRU}$$

Production of lentiviral vectors

293T cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with four lentiviral vectors: the packaging plasmid (pMDLg/pRRE), the VSVG-expressing vector (pMD.G), the REV-expressing vector (pRSV-Rev) and the shRNA containing vectors or control vectors (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Virus containing supernatants were collected every 2 days for 1 week and concentrated by ultracentrifugation at 24 000 rpm for 1h40min.

Delivery of shRNA in bone marrow cells

Lineage negative bone marrow cells were transduced with lentivirus containing either non targeting shRNA or SCL-directed shRNA for 48 hours in IMDM supplemented with 15% FCS, IL-11 (100ng/ml), Steel Factor (100ng/mL), IL-6 (10ng/mL), 5×10^{-5} M α -monothioglycerol and polybrene at a concentration of 1×10^6 cells/ml. Following infection, transduced bone marrow cells were selected for 3 days with puromycin (15ug/mL). At this point, total protein extracts was prepared for western blot analysis and remaining cells were used for flow cytometry cell cycle analysis with Hoechst 33342 and PyroninY as described previously.

Chromatin immunoprecipitation

Lineage negative bone marrow cell chromatin extracts were subjected to immunoprecipitations with anti-SCL antibody and species-matched control IgG. After cross-linking reversal, DNA from immunoprecipitated chromatin was subjected to quantitative RT-PCR analysis to detect the presence of the *p21*, *p18*, *Mef* and *β -actin* promoter sequences. The occupancy of region X by protein p relative to input chromatin was obtained as described: $p(X) = 2[Ct(IP) - Ct(input)]$ (Geisberg and Struhl 2004). Data

are shown as fold enrichments over the values obtained for species-matched control Ig. For primer sequences see Supplemental Table 2.1.

2.6. Discussion

In the present study, we show that SCL controls HSC quiescence and maintains their long term self-renewal capacity. Our data also suggest that SCL hinders the entry of HSCs in G1 by directly controlling the expression of the cell cycle regulator p21.

Scl is first required for the genesis of HSCs where it specifies mesoderm to a hematopoietic fate (Robb et al. 1995; Shivdasani et al. 1995; Gering et al. 1998; Mead et al. 1998; Mead et al. 2001; Ema et al. 2003; Martin et al. 2004). Here, we provide evidence that two-fold variations in Scl levels modestly affect HSC numbers but severely impair their long-term competitive potential, suggesting that the level rather than the mere presence or absence of Scl determines hematopoietic output.

Scl^{+/-} HSCs did not exhibit detectable deficit when reconstitution in primary recipients was analysed 4 months after transplantation, in good agreement with published results (Mikkola et al. 2003; Curtis et al. 2004; Kunisato et al. 2004). In contrast, the same mice analyzed at 8 months revealed a severe competitive disadvantage for Scl^{+/-} HSCs. This deficit also carries through in serial transplantations. Therefore, our analysis suggests that true estimation of long term HSC functions requires appraisal of grafted mice beyond four months, commonly used in mouse transplantation assays. Since long-term activity is a distinctive feature of HSCs, there is perhaps no satisfactory substitute to these long-term assays. In summary, our study reveals an important role for SCL when HSCs are subject to intense proliferative demand, either under limiting conditions (~ 1 CRU per mouse) or in long term reconstitution.

An essential hallmark of LT-HSCs is their capacity for sustained self-renewal. Indeed, ST-HSCs are also capable of undergoing self-renewal divisions, but are unable to maintain hematopoiesis in the long term. Hence sustainability is a true stem cell characteristic. Self-renewal divisions can lead to expansion (SR-E) as observed during

ontogeny when the stem pool increases in size, or to maintenance (SR-M) in the adult, preserving HSC numbers throughout the entire life span of the organism (Cellot and Sauvageau 2006). Very few genes are known to be involved in this long term maintenance. Our observations indicate that *Scl* specifically controls HSC cell cycle and long term repopulation capacity in the adult, and that *Scl* is a critical determinant of SR-M. During development, the dramatic expansion of HSC in the fetal liver is associated with a high cycling state (Lansdorp et al. 1993; Bowie et al. 2007). HSCs then switch from this proliferative state in the fetal liver to a quiescence state in the adult. This switch occurs between week 3 and 4 after birth but the molecular control remains unknown. Expression level for *Mef/Elf4* is decreased whereas *Bmi1* and *Gfi1* remain unchanged (Bowie et al. 2007) and *Scl* increases (Phillips et al. 2000; Venezia et al. 2004; Bowie et al. 2007) and shown here). It remains to be determined whether these genes control the fetal to adult switch, although our analysis of postnatal HSCs indicates that SCL does not control their cell cycle state.

How does SCL control long term sustainability in adult HSCs ? Stemness could be maintained by suppressing differentiation. Our analysis of transplanted mice indicates that *Scl*^{+/-} HSCs fail to reconstitute the KSL population, indicating that the defect is not due to increased differentiation but occurs within the stem cell population. Hematopoietic stem cells must achieve a balance between quiescence and rapid cell cycle entry upon conditions of stress, to fulfil immediate demands for mature hematopoietic cells without compromising the maintenance of the stem cell pool. Therefore, stemness in many systems is associated with low cycling, whereas differentiation-committed cells proliferate actively (reviewed in (Cheng 2004)). In line with this hypothesis, overexpression of *HoxB4* dramatically increase HSC self-renewal divisions in culture (Sauvageau et al. 1995), while restraining their cell cycle (Cellot et al. 2007). Along the same line, the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor controls both HSC quiescence and their long term maintenance (Cheng et al. 2000). While the role of p21 is subsequently disputed (van Os et al. 2007), both reports concur on the importance of p21 for HSCs under conditions of proliferative

demand. In the adult, *Gfi1* restricts HSC cell cycle and *Gfi1* deficiency cause increased proliferation associated with impaired competitive repopulation as well as premature exhaustion (Hock et al. 2004; Zeng et al. 2004). Together, these observations suggest an inverse relationship between HSC proliferation/expansion and their self-renewal capacity in that cells that proliferate the most are also compromised in their long term maintenance. It therefore appears that the control of HSC quiescence is a critical determinant of SR-M. HSC G0 state is distinct from the quiescence imposed by growth factor withdrawal (Coller et al. 2006) or induced by TGF β , since exposure of cord blood cells to TGF β increases the G0 fraction without improving its repopulation ability (Glimm et al. 2000). Quiescence is unique to LT-HSCs as progenitors that are devoid of stem cell activity are mostly in cycle, suggesting the existence of mechanisms that specifically restricts cell cycle entry in HSCs.

Our observations indicate that haploinsufficiency in the *Scl* gene is revealed by a severe *Cdkn1a* deficiency without affecting *Cdkn2c*, *Mef*, *Id1* or *Gfi1* expression in purified SLAM-KSL cells, as well as a facilitation of G0/G1 progression in vivo and in vitro within the same population. Interestingly, this activity is confined to HSCs without affecting non-stem cell populations. Our findings therefore suggest that HSC cell cycle and self-renewal may be intertwined and controlled by the same transcriptional network, in which *Scl* acts in parallel to or downstream of *Gfi1* to actively maintain HSC in G0 and sustain HSC self-renewal, whereas *Mef* facilitates G1 progression. At the molecular level, both *Scl* and *Gfi-1* operate upstream of *Cdkn1a* to set *Cdkn1a* levels in HSCs, thereby controlling HSC quiescence and long term maintenance (SR-M). Taken together, the observations are consistent with the view that increased cell proliferation impairs the long term self-renewal capacity of adult HSCs

2.7. Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research (T.H., G.S.), the Cancer Research Society Inc. (T.H.), the Canadian Cancer Society (T.H., G.S., N.N.I.), the Canadian Research Chair program (T.H., G.S.) and by studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (J.L.). The infrastructure is supported in part by an FRSQ group grant (IRIC). The authors wish to thank Dr Glenn C. Begley for kindly providing the *Scf*^{+/-} mice, Danièle Gagné for flow cytometry, Pierre Chagnon for the qPCR analysis and Annie Perreault as well as Véronique Mercille for the mouse colony.

2.8. References

- Akala, O.O. and Clarke, M.F. 2006. Hematopoietic stem cell self-renewal. *Curr Opin Genet Dev* **16**(5): 496-501.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**(6774): 193-197.
- Anguita, E., Hughes, J., Heyworth, C., Blobel, G.A., Wood, W.G., and Higgs, D.R. 2004. Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *Embo J* **23**(14): 2841-2852.
- Benveniste, P., Cantin, C., Hyam, D., and Iscove, N.N. 2003. Hematopoietic stem cells engraft in mice with absolute efficiency. *Nat Immunol* **4**(7): 708-713.
- Bowie, M.B., Kent, D.G., Dykstra, B., McKnight, K.D., McCaffrey, L., Hoodless, P.A., and Eaves, C.J. 2007. Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 5878-5882.
- Brunet de la Grange, P., Armstrong, F., Duval, V., Rouyez, M.C., Gordan, N., Romeo, P.H., and Pflumio, F. 2006. Low SCL/TAL1 expression reveals its major role in adult hematopoietic myeloid progenitors and stem cells. *Blood* **108**(9): 2998-3004.
- Capron, C., Lecluse, Y., Kaushik, A.L., Foudi, A., Lacout, C., Sekkai, D., Godin, I., Albagli, O., Poullion, I., Svinartchouk, F., Schanze, E., Vainchenker, W., Sablitzky, F., Bennaceur-Griscelli, A., and Dumenil, D. 2006. The SCL relative LYL-1 is required for fetal and adult hematopoietic stem cell function and B-cell differentiation. *Blood* **107**(12): 4678-4686.
- Cellot, S., Krosch, J., Chagraoui, J., Meloche, S., Humphries, R.K., and Sauvageau, G. 2007. Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in Hoxb4hiPbx1(10) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **35**(5): 802-816.
- Cellot, S. and Sauvageau, G. 2006. In vitro stem cell expansion: stepping closer towards self-renewal. *Gene Ther* **13**(23): 1617-1618.
- Chagraoui, J., Niessen, S.L., Lessard, J., Girard, S., Coulombe, P., Sauvageau, M., Meloche, S., and Sauvageau, G. 2006. E4F1: a novel candidate factor for mediating BM11 function in primitive hematopoietic cells. *Genes Dev* **20**(15): 2110-2120.

- Cheng, T. 2004. Cell cycle inhibitors in normal and tumor stem cells. *Oncogene* **23**(43): 7256-7266.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., and Scadden, D.T. 2000. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* **287**(5459): 1804-1808.
- Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X., and Weissman, I.L. 1999. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 3120-3125.
- Coller, H.A., Sang, L., and Roberts, J.M. 2006. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* **4**(3): e83.
- Coulombel, L. 2004. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* **23**(43): 7210-7222.
- Curtis, D.J., Hall, M.A., Van Stekelenburg, L.J., Robb, L., Jane, S.M., and Begley, C.G. 2004. SCL is required for normal function of short-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* **103**(9): 3342-3348.
- Elefanty, A.G., Begley, C.G., Metcalf, D., Barnett, L., Kontgen, F., and Robb, L. 1998. Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11897-11902.
- Elefanty, A.G., Robb, L., Birner, R., and Begley, C.G. 1997. Hematopoietic-specific genes are not induced during in vitro differentiation of scl-null embryonic stem cells. *Blood* **90**(4): 1435-1447.
- Ema, H. and Nakauchi, H. 2000. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* **95**(7): 2284-2288.
- Ema, M., Faloon, P., Zhang, W.J., Hirashima, M., Reid, T., Stanford, W.L., Orkin, S., Choi, K., and Rossant, J. 2003. Combinatorial effects of Flk1 and Tall on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev* **17**(3): 380-393.
- Geisberg, J.V. and Struhl, K. 2004. Quantitative sequential chromatin immunoprecipitation, a method for analyzing co-occupancy of proteins at genomic regions in vivo. *Nucleic Acids Res* **32**(19): e151.

- Gering, M., Rodaway, A.R., Gottgens, B., Patient, R.K., and Green, A.R. 1998. The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J* **17**(14): 4029-4045.
- Glimm, H., Oh, I.H., and Eaves, C.J. 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**(13): 4185-4193.
- Goardon, N., Lambert, J.A., Rodriguez, P., Nissaire, P., Herblot, S., Thibault, P., Dumenil, D., Strouboulis, J., Romeo, P.H., and Hoang, T. 2006. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *Embo J* **25**(2): 357-366.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**(4): 1797-1806.
- Gregory, C.J. and Eaves, A.C. 1978. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* **51**(3): 527-537.
- Hall, M.A., Curtis, D.J., Metcalf, D., Elefanty, A.G., Sourris, K., Robb, L., Gothert, J.R., Jane, S.M., and Begley, C.G. 2003. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 992-997.
- Harrison, D.E., Jordan, C.T., Zhong, R.K., and Astle, C.M. 1993. Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. *Exp Hematol* **21**(2): 206-219.
- Harrison, D.E. and Lerner, C.P. 1991. Most primitive hematopoietic stem cells are stimulated to cycle rapidly after treatment with 5-fluorouracil. *Blood* **78**(5): 1237-1240.
- Hellman, S., Botnick, L.E., Hannon, E.C., and Vignuelle, R.M. 1978. Proliferative capacity of murine hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(1): 490-494.
- Herblot, S., Aplan, P.D., and Hoang, T. 2002. Gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol Cell Biol* **22**(3): 886-900.

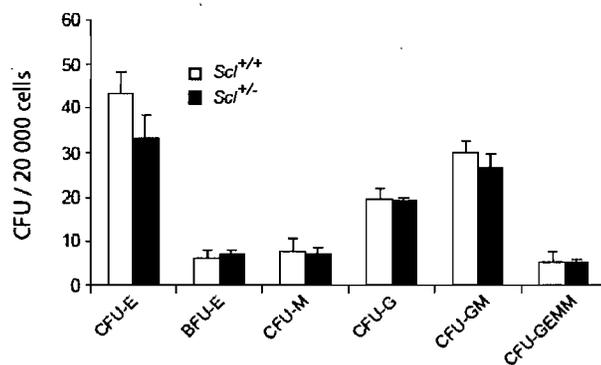
- Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Schindler, J.W., Saleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. 2004. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* **431**(7011): 1002-1007.
- Iscove, N.N. 1977. The role of erythropoietin in regulation of population size and cell cycling of early and late erythroid precursors in mouse bone marrow. *Cell Tissue Kinet* **10**(4): 323-334.
- Iscove, N.N., Barbara, M., Gu, M., Gibson, M., Modi, C., and Winegarden, N. 2002. Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picogram quantities of mRNA. *Nat Biotechnol* **20**(9): 940-943.
- Jankovic, V., Ciarrocchi, A., Boccuni, P., DeBlasio, T., Benezra, R., and Nimer, S.D. 2007. Id1 restrains myeloid commitment, maintaining the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(4): 1260-1265.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C., and Morrison, S.J. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**(7): 1109-1121.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**(5): 661-672.
- Kunisato, A., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Yamaguchi, T., and Hirai, H. 2004. Stem cell leukemia protein directs hematopoietic stem cell fate. *Blood* **103**(9): 3336-3341.
- Lacorazza, H.D., Yamada, T., Liu, Y., Miyata, Y., Sivina, M., Nunes, J., and Nimer, S.D. 2006. The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Cancer Cell* **9**(3): 175-187.
- Lahlil, R., Lecuyer, E., Herblot, S., and Hoang, T. 2004. SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol Cell Biol* **24**(4): 1439-1452.
- Lansdorp, P.M., Dragowska, W., and Mayani, H. 1993. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* **178**(3): 787-791.
- Martin, R., Lahlil, R., Damert, A., Miquerol, L., Nagy, A., Keller, G., and Hoang, T. 2004. SCL interacts with VEGF to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development* **131**(3): 693-702.

- Mead, P.E., Deconinck, A.E., Huber, T.L., Orkin, S.H., and Zon, L.I. 2001. Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development* **128**(12): 2301-2308.
- Mead, P.E., Kelley, C.M., Hahn, P.S., Piedad, O., and Zon, L.I. 1998. SCL specifies hematopoietic mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* **125**(14): 2611-2620.
- Mikkola, H.K., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T.M., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. 2003. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* **421**(6922): 547-551.
- Nilsson, S.K., Dooner, M.S., and Quesenberry, P.J. 1997. Synchronized cell-cycle induction of engrafting long-term repopulating stem cells. *Blood* **90**(11): 4646-4650.
- Passegue, E. and Wagers, A.J. 2006. Regulating Quiescence: New Insights into Hematopoietic Stem Cell Biology. *Developmental Cell* **10**(4): 415-417.
- Phillips, R.L., Ernst, R.E., Brunk, B., Ivanova, N., Mahan, M.A., Deanehan, J.K., Moore, K.A., Overton, G.C., and Lemischka, I.R. 2000. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* **288**(5471): 1635-1640.
- Porcher, C., Liao, E.C., Fujiwara, Y., Zon, L.I., and Orkin, S.H. 1999. Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* **126**(20): 4603-4615.
- Quesniaux, V.F., Graham, G.J., Pragnell, I., Donaldson, D., Wolpe, S.D., Iscove, N.N., and Fagg, B. 1993. Use of 5-fluorouracil to analyze the effect of macrophage inflammatory protein-1 alpha on long-term reconstituting stem cells in vivo. *Blood* **81**(6): 1497-1504.
- Reynaud, D., Ravet, E., Titeux, M., Mazurier, F., Renia, L., Dubart-Kupperschmitt, A., Romeo, P.H., and Pflumio, F. 2005. SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. *Blood* **106**(7): 2318-2328.
- Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R.P., Metcalf, D., and Begley, C.G. 1995. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15): 7075-7079.

- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C.J., Lawrence, H.J., Largman, C., Lansdorp, P.M., and Humphries, R.K. 1995. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* **9**(14): 1753-1765.
- Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. 1995. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* **373**(6513): 432-434.
- Trevisan, M., Yan, X.Q., and Iscove, N.N. 1996. Cycle initiation and colony formation in culture by murine marrow cells with long-term reconstituting potential in vivo. *Blood* **88**(11): 4149-4158.
- van Os, R., Kamminga, L.M., Ausema, A., Bystrykh, L.V., Draijer, D.P., van Pelt, K., Dontje, B., and de Haan, G. 2007. A Limited role for p21Cip1/Waf1 in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning. *Stem Cells* **25**(4): 836-843.
- Venezia, T.A., Merchant, A.A., Ramos, C.A., Whitehouse, N.L., Young, A.S., Shaw, C.A., and Goodell, M.A. 2004. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* **2**(10): e301.
- Wagers, A.J., Allsopp, R.C., and Weissman, I.L. 2002. Changes in integrin expression are associated with altered homing properties of Lin(-/lo)Thy1.1(lo)Sca-1(+)-kit(+) hematopoietic stem cells following mobilization by cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* **30**(2): 176-185.
- Williams, D.A., Xu, H., and Cancelas, J.A. 2006. Children are not little adults: just ask their hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* **116**(10): 2593-2596.
- Wilson, A. and Trumpp, A. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* **6**(2): 93-106.
- Xu, Z., Huang, S., Chang, L.S., Agulnick, A.D., and Brandt, S.J. 2003. Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol Cell Biol* **23**(21): 7585-7599.
- Yuan, Y., Shen, H., Franklin, D.S., Scadden, D.T., and Cheng, T. 2004. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol* **6**(5): 436-442.
- Zeng, H., Yucel, R., Kosan, C., Klein-Hitpass, L., and Moroy, T. 2004. Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J* **23**(20): 4116-4125.

2.9. Supplemental Figures and Table

A

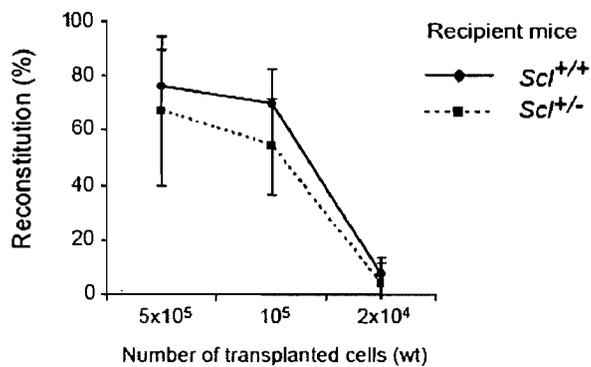


B

Number of secondary progenitors generated per primary multipotent progenitor

Genotype (n)	CFU-GEMM		BFU-E		CFU-GM	
	<i>Scf</i> ^{+/+} (113)	<i>Scf</i> ^{+/-} (20)	<i>Scf</i> ^{+/+} (113)	<i>Scf</i> ^{+/-} (20)	<i>Scf</i> ^{+/+} (113)	<i>Scf</i> ^{+/-} (20)
Average	14 ± 35	17 ± 37	15 ± 35	22 ± 42	18 ± 39	17 ± 27
Fold (<i>Scf</i> ^{+/-} over <i>Scf</i> ^{+/+})	1.2		1.4		0.9	

C



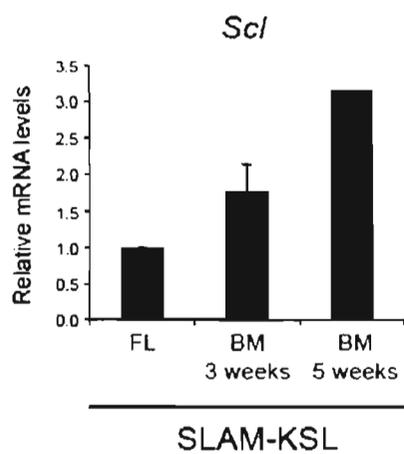
Supplemental Figure S2.1

(A) *Scl* gene dosage does not affect the number of progenitors in the bone marrow. Bone marrow cells from *Scl*^{+/+} and *Scl*^{+/-} mice were plated in methylcellulose for 7 days and then scored for colony formation.

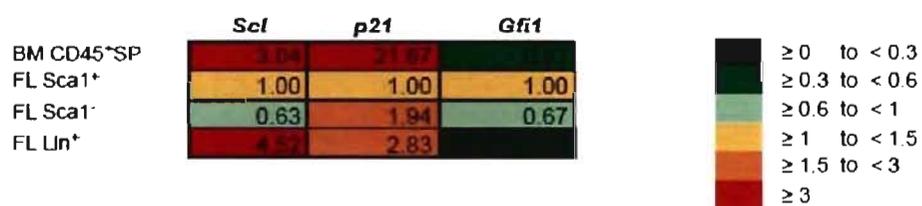
(B) Reducing *Scl* levels does not affect the self-renewal property of progenitors. CFU-GEMM from primary methylcellulose culture were replated in secondary culture for 7 days and then scored for colony formation.

(C) Normal bone marrow cells were transplanted in limiting dilutions into irradiated *Scl*^{+/+} or *Scl*^{+/-} recipient mice. Note that *Scl*^{+/-} microenvironment does not affect reconstitution of wt cells.

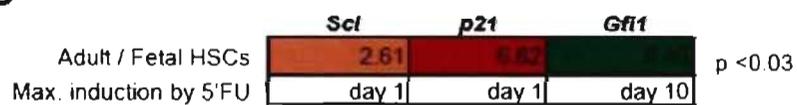
A



B



C



Supplemental Figure S2.2

(A) *Scl* expression in HSC during development. LT-HSCs were purified from the fetal liver and bone marrow from 3-week or 5-week old mice. *Scl* mRNA levels were quantified by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and normalized using *Hprt* as an internal control. The expression level in fetal liver LT-HSCs was set as 1 (n=2).

(B) *Scl* and *Cdkn1a* are highly expressed in adult HSCs. Expression profiles of different hematopoietic population. Note that *Scl* and *Cdkn1a* expression are highest in adult HSCs while their expressions decrease in fetal HSCs. These observations associate *Scl* and *Cdkn1a* expression to quiescence. These data were obtained from the stem cell database (Phillips et al. 2000).

(C) *Scl* and *Cdkn1a* are associated to quiescence signature of HSCs. *Scl* and *Cdkn1a* are expressed at high levels in adult HSCs as compared to fetal HSCs. Moreover *Scl* and *Cdkn1a* expression are induced at day 1 after 5-FU injection in mice. Day 1 following 5-FU treatment is characterized by superquiescence of HSCs. These data associate *Scl* and *Cdkn1a* to quiescence and are in agreement with the view that SCL and CDKN1A act in the same pathway to prevent cell cycle entry of HSCs. These data were derived from the study of Venezia et al. (2004).

Supplemental Table 2.1

Oligonucleotides used for RT-PCR and CHIP analysis

Gene name	Sequence	
	Forward	Reverse
<i>Cdkn1a</i>	aattggagtcaggcgcagat	gacgaagtcaaagttccaccgt
<i>Scl</i>	agggcacagcaactagagtg	tacgacactgacgcaaagtc
<i>Id1</i>	glcctgctctacgacatgaac	atactctgactcggacctcac
<i>Hprt</i>	gatgagcgcaagttgaatct	cgcagcaactgacatttcta
<i>Gfi1</i>	atgtgctgcaagacctc	acagtcaaagctgcttct
<i>Cdkn2c</i>	tgcgctgcaggttatgaaactgg	aacatcagcctggaactccagcaa
<i>Pten</i>	ggcacaagaggccctagatt	gcctctgactgggaattgtg
<i>Mef</i>	gaagccagtatggctattgctc	tgggaacactgaagggctt
<i>JunB</i>	gccagtcctccacctc	caatatgaattcagctctttgcag
<i>Mef</i> -CHIP	tccttgagtcagctggctct	ctccgtgccctaatacagcta
<i>Cdkn1a</i> -CHIP	ggtcagggacagaccataa	gggctattctctgtcacgc
<i>Cdkn2c</i> -CHIP	taaaggaagacgcgcaagt	gccactggccagttagttc
β - <i>actin</i> -CHIP	ttccttctgggatggaa	ccacgatccacacagagta

2.10. Supplemental Experimental Procedures

Immunomagnetic depletion of lineage positive cells

Bone marrow cells were harvested from 2-months old mice. For cell sorting, mature cells were first removed from bone marrow by immunomagnetic cell separation as described here. Blocking of non-antigen specific binding was achieved by incubating 2×10^7 cells in 50 μ l of blocking solution (IMDM, 2% FCS, 25 μ g/ml human γ -immunoglobulins (huIgG) at room temperature for 10 minutes. Cells were then labelled using hybridoma conditioned media containing rat anti-mouse antibodies directed against TER119 (Ly7.6), Gr1 (RB6-8C5) and CD11b (M1/70), and purified anti-B220, in a final volume of 200 μ l for 1 hour on ice. Cells were washed and then incubated with 1 ml of beads solution for 1 hour at 4°C. Prior to use, anti-rat-coupled Biomag beads (Qiagen, Mississauga, ON) were washed twice and resuspended in 1 ml of binding solution (IMDM, 10% FCS, 25 μ g/ml huIgG) for a minimum of 20 minutes on ice. Lineage marker expressing cells coupled to magnetic beads were removed by placing microcentrifuge tubes onto a MPC-S magnet (DynaL Biotech). Cells-beads complexes were gently washed to increase recovery of lineage-negative cells. Following depletion, cells were labelled with specific antibodies for cell sorting of different populations.

Gene expression analysis

Purified cells were either processed for gene expression analysis or plated in culture prior to analysis. For cell culture, lineage-depleted bone marrow cells were cultivated in medium containing 15% FCS, Steel Factor (100 ng/ml), IL-11 (100 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml) and 5×10^{-5} M α -monothioglycerol for 24 hours prior to labelling with antibodies for KSL-SLAM cell sorting.

cDNAs were amplified with specific primers for *Scl*, *Cdkn1a*, *Cdkn2b*, *Pten*, *Mef*, *Gfi1*, *JunB* and *Hprt* using the Sybr@green PCR master mix or the TaqMan PCR master mix

(Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative gene expression analysis was performed by real time PCR on MX3000 (Stratagene, La Jolla, CA) or ABI apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA). For primer sequences see Supplemental Table 1.

Western blotting

Total protein extracts were prepared on lineage negative bone marrow cells from *Scl*^{+/+} and *Scl*^{+/-} mice or *Scl*^{+/+} cells expressing SCL directed-shRNA. The rabbit polyclonal anti-mouse SCL antibody was generously provided by Dr. Catherine Porcher (Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, UK). Blots were reprobbed with E47 antibody (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) followed by a mouse anti-PTP1D or SC35 (BD Biosciences, Mississauga, ON) as a loading control. Quantifications were performed using ImageQuant software.

Chapître III: Résultats. Section 2

Genetic interaction between *Scl* and *c-Kit* in hematopoietic cell survival

Julie Lacombe¹, Gorazd Krosl³, Sabine Herblot¹, Sébastien Lemieux¹, Peter Aplan⁴, Guy Sauvageau¹, Trang Hoang¹⁻²

¹Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Montréal, Canada; ²Department of Pharmacology and Molecular Biology, University of Montréal, Montreal, Canada; ³Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Canada; ⁴Genetics Branch, National Cancer Institute, National Institutes for Health, Bethesda, MD, USA;

3.1. Summary

Environmental factors are mainly thought to sustain the survival of hematopoietic cells via the activity of ubiquitous transcription factors whereas cell differentiation is believed to be cell autonomous and controlled by cell type specific transcription factors. Primitive hematopoietic cells co-express the c-Kit tyrosine kinase receptor and the SCL/Tal1 (Stem Cell Leukemia) transcription factor. Here we show that SCL is functionally required to sustain the survival of hematopoietic progenitors within the c-Kit⁺Sca1⁻Lin⁻ cells. In multipotent progenitors, SCL sets thresholds for their response to Steel factor (or Kit ligand) without affecting their response to IL-3 or GM-CSF whilst the expression of a DNA binding mutant antagonizes both c-Kit-dependent survival and the expansion potential of multipotent progenitors. Accordingly, ectopic *Scl* expression in mice bearing a hypomorph c-Kit receptor bypasses c-Kit signaling and corrects for progenitor deficiency in these mice. Global gene profiling identifies a set 23 anti-apoptotic genes that are co-regulated by SCL and c-Kit, nine of which are rescued by the *Scl* transgene in purified megakaryocyte-erythroid progenitors from *W^{A1}W^{A1}* mice. We conclude that SCL operates downstream of c-Kit to support the survival and determine the clonal output of adult multipotent and erythroid progenitors.

3.2. Introduction

Hematopoiesis is the process in which all mature blood cells are generated from pluripotent hematopoietic stem cells (HSC). The capacity of HSC to differentiate towards a given hematopoietic lineage depends on the expression of specific transcription factors as well as on environmental cues. The importance of transcription factors has been demonstrated by studies in which targeted gene deletions abrogate blood cell differentiation (Pevny et al. 1991; Mikkola et al. 2003; Iwasaki et al. 2005). On the other hand, the role of the environment in hematopoiesis still remains debatable (reviewed by (D'Andrea 1994).

The permissive model proposes that cytokines allow the survival and growth of progenitors that are intrinsically committed to differentiation. In this model, hematopoiesis is basically driven by the differential expression of transcription factors that activate specific genetic programs through combinatorial and antagonizing interactions (Orkin 2000; Cantor and Orkin 2001). This model is supported by the observation that erythroid cells expressing the M-CSF receptor were still able to generate erythroid cells in response to M-CSF stimulation (McArthur et al. 1994). Accordingly, it was demonstrated that the prolactin receptor, growth hormone receptor or thrombopoietin receptor could all substitute for EPOR signaling during erythroid maturation (Socolovsky et al. 1997; Goldsmith et al. 1998). Furthermore, overexpression of *Bcl-2* in hematopoietic cell line was shown to induce differentiation independently of cytokine stimulation (Fairbairn et al. 1993).

The instructive model suggests that cytokine signaling is decisive in promoting lineage commitment and differentiation. Expression of lineage-restricted transcription factors in cell lines engineered to expressed lineage-restricted cytokine receptors argues in favor of this model (Just et al. 1991). It was also shown that the ectopic expression of IL-2 or GM-CSF receptor in the common lymphoid progenitor (CLP) promoted their differentiation towards the macrophage and granulocytes lineages when stimulated with IL-2 (Kondo et al. 2000). Likewise, introduction of the GM-CSF receptor in CLP from *IL-7R^{-/-}* mice was sufficient to drive myeloid differentiation upon GM-CSF stimulation, but did

not compensate for the lack of IL-7 signaling in T and B lymphopoiesis (Iwasaki-Arai et al. 2003). These results put forward the plasticity of progenitors and reveal the potential of cytokines in directing differentiation.

Transcription factors of the basic helix-loop-helix family (bHLH) are important determinants of cell fate, as exemplified by the essential role of *Scl/Tal1* (Stem Cell Leukemia) in blood cell development. Namely, *Scl*^{-/-} embryos lack all primitive and definitive hematopoietic lineages (Robb et al. 1995; Shivdasani et al. 1995). In the adult, *Scl* is expressed in multipotent and erythroid progenitors (Brady et al. 1995; Elefanty et al. 1998) as well as in populations endowed with hematopoietic stem cell activity (Mouthon et al. 1993; Akashi et al. 2000; Ramalho-Santos et al. 2002). Its expression declines with maturation of most blood cells, except in the erythroid, megakaryocytic and mastocytic lineages (Green et al. 1991; Visvader et al. 1991). Both loss and gain of function of *Scl* in hematopoietic cells support an essential and sufficient role for this transcription factor in erythroid and megakaryocytic lineages (Aplan et al. 1992; Elwood et al. 1998; Valtieri et al. 1998; Hall et al. 2003; Mikkola et al. 2003; Curtis et al. 2004). Finally, genetic interactions between *Scl* and *Flkl* or *Vegf* determine the onset of primitive erythropoiesis during development (Ema et al. 2003; Martin et al. 2004). An anti-apoptotic role for *Scl* was reported during mouse (Martin et al. 2004) and zebrafish development (Liao et al. 1998), suggesting that an important survival function for tissue-specific transcription factors

Steel Factor (SF; Kit ligand, stem cell factor or mast cell growth factor) (Copeland et al. 1990; Williams et al. 1990) is essential for the definitive hematopoietic lineage *in vivo* (Ogawa et al. 1993). Mutations in both the *Steel* locus (*Sl*) and the "dominant *White spotting*" (*W*) locus encoding the SF receptor c-kit (reviewed in (Fleischman 1993) cause stem cell deficiency and anemia (Russell 1979; Miller et al. 1997). This defect is caused by impaired survival, since c-Kit signaling has been shown to suppress apoptosis in CD34+ cells (Caceres-Cortes et al. 1994; Niwa et al. 1998; Caceres-Cortes et al. 2001) and to delay stem cell exhaustion observed during *in vitro* culture by sustaining HSC survival (Li and

Johnson 1994). It is worth noting that Steel factor preferentially supports the survival of primitive progenitors, whilst it does not largely affect the viability of more mature cells (Borge et al. 1997). Finally, our previous work indicated that CD34+ cells exposed to GM-CSF undergo myeloid differentiation and this activity is antagonized by Steel factor, further supporting the notion that the SF maintains cells in an undifferentiated state (Caceres-Cortes et al. 1994). Moreover, depending on the cell type, increased survival rates could be either Bcl-2 dependent or Bcl-2 independent (Carson et al. 1994; Gommerman and Berger 1998). Together, these findings suggest the existence of multiple pathways downstream of c-Kit although the molecular effectors involved in survival still remain to be determined. A better understanding of the key players involved in c-Kit dependent survival of primitive hematopoietic cells is crucial for improving our capacity to maintain and expand these cells *in vitro*.

The present study provides evidence that the tissue-specific transcription factor *Scl* acts downstream of c-Kit to promote the survival of multipotent and erythroid progenitors. Given that *Scl* is essential for proper erythroid maturation, the regulation of SCL by c-Kit highlights the instructive role of the environment.

3.3. Results

SCL is essential for cell survival in response to early-acting cytokines

SCL binds DNA in association with E2A (Hsu et al. 1991). We and others have previously shown that the SCL mutant lacking its basic domain (Δ bSCL) abrogates the binding of SCL/E2A heterodimers to DNA thereby exerting a “dominant-negative” effect on the wild-type protein (Aplan et al. 1992; Krosi et al. 1998). In order to clarify the importance of SCL function in primary hematopoietic cells, we expressed the wild-type SCL or the Δ bSCL mutant in mouse bone marrow cells using MSCVneo^r retroviral vectors. Upon infection and selection with G418, we monitored cell surface markers, apoptosis and cell cycle by flow cytometry. Both SCL and Δ bSCL were efficiently expressed in bone marrow cells as shown by SCL intracellular staining of infected cells (Figure 3.1A). Furthermore, protein levels of the wild-type and mutant forms of SCL appeared to be similar, as assessed by the mean fluorescence intensity, which enabled us to directly compare results obtained from SCL and Δ bSCL infected cells (Figure 3.1A). After infection, cells were plated in liquid culture under selective pressure and stimulated with either early acting cytokines (SF and IL-11) that expand and maintain CD34⁺ cells, or later acting cytokines (GM-CSF and IL-3) that induce myeloid differentiation. There was a massive induction of apoptosis in c-Kit⁺ cells expressing the DNA-binding defective mutant, Δ bSCL (60%), when compared to control cells harboring the empty vector or wild-type SCL in the presence of SF and IL-11 (18 and 8% of apoptosis) (Figure 3.1B, upper panels). In direct contrast to this finding, apoptosis level observed upon GM-CSF and IL-3 stimulation was similar in c-Kit⁺ cells expressing the Δ bSCL (7%), the empty vector (8%) or the wild type SCL (8%) (Figure 3.1B, lower panels). In contrast, CD11b⁺ cells were less affected by SCL function (data not shown). These results indicate that SCL function is specifically required for the survival of c-Kit⁺ cells stimulated with early-acting cytokines.

We then addressed the question whether SCL function is required for the survival of the most primitive c-Kit⁺ population which includes stem cells (i.e. the c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻

fraction (KSL)) or the population enriched in committed progenitors (i.e. the c-Kit⁺Sca1⁻Lin⁻ fraction). Mouse bone marrow cells were infected with control empty vector, SCL or Δ bSCL-GFP-MSCV constructs as above, excluding the possibility that apoptosis was induced by G418 itself. We observed that Δ bSCL modestly induced apoptosis in the KSL population (Figure 3.1C, left panel), whilst it induced a 4-fold increase of apoptotic rate in committed progenitors and this effect was maintain for two days (Figure 3.1C, right panel). Thus, our results demonstrate that *Scl* plays a preferential role in the survival of committed hematopoietic progenitors.

Δ bSCL induced-apoptosis could be due to a dominant negative effect on endogenous SCL or, alternatively, it could stem from the sequestration of another bHLH whose function is essential for the survival of hematopoietic progenitors. In order to discriminate between the aforementioned possibilities, we decided to take the following experimental approach. Firstly, we addressed the question whether the effect observed with Δ bSCL could be reproduced with a targeted antisense SCL (AS-SCL). Secondly, we sought to rescue both the Δ bSCL and the AS-SCL induced apoptosis with wild-type SCL. We observed that AS-SCL induced 45% apoptosis, which mirrored the effect of Δ bSCL (49%) (Figure 3.2A). In contrast, apoptosis in the SCL-YFP fraction was negligible (7%) and was comparable to that observed with the empty vector (12%). Finally, cells coexpressing either SCL and Δ bSCL or SCL and AS-SCL (GFP⁺YFP⁺) showed levels of viability comparable to controls (4 and 7%). These results confirmed the specificity of Δ bSCL mutant for endogenous SCL.

We then aimed to assess the functional consequences of the inhibition of SCL function in hematopoietic precursors by plating cells in liquid culture in the presence of G418, followed by clonal assays. Consistent with elevated apoptotic death in Δ bSCL-expressing progenitors stimulated by early cytokines (Figure 3.1), the number of multipotent hematopoietic progenitors (CFU-GEMM) was also found to be reduced in these conditions. After 3, 8 and 12 days of liquid culture, we observed a respective decrease

of 8-, 20- and 100-fold in the number of CFU-GEMM as assessed by colony forming assays (Figure 3.2B). Furthermore, colonies formed by Δ SCL-expressing cells were significantly smaller in size when compared to control colonies (MSCV) or to SCL-expressing colonies (Figure 3.2C). This is consistent with a decreased capacity for clonal expansion of cells expressing Δ SCL mutant. Together, these observations suggest that the abrogation of SCL activity results in massive loss of multipotent progenitors (up to 100-fold), severely limiting their expansion capacity, consistent with apoptotic cell death within the $c\text{-Kit}^+\text{Sca1}^-\text{Lin}^-$ population, upon loss of SCL function.

***Scl* interacts with *c-Kit* to drive the expansion of multipotent progenitors and sets threshold for their response to Steel Factor**

Scl expression is induced in maturing erythroid colonies (Miller et al. 1994) or CD34^+ cells (Caceres-Cortes et al. 2001) stimulated with SF for several days. To assess whether Scl induction in progenitors was a direct consequence of c-KIT activation, $c\text{-Kit}^+\text{Sca1}^-\text{Lin}^-$ progenitors were sorted and stimulated with either SF or the myeloid cytokine GM-CSF for 4 hours, before the onset of differentiation events. We observed that *Scl* mRNA expression level was upregulated by 4-fold upon SF stimulation which was not observed when the same cells were treated with GM-CSF (Figure 3.3A). Both SCL (Figure 3.1) and c-Kit are required for hematopoietic cell survival (Caceres-Cortes et al. 1994; Caceres-Cortes et al. 2001), suggesting that *c-Kit* and *Scl* operate within the same pathway. To address this possibility, we took advantage of *SCL* transgenic mice in which the expression of the *SCL* transgene is driven by the ubiquitous *SIL* promoter (Aplan et al. 1997), resulting in two-fold increase in SCL protein. We monitored the biological consequence of c-Kit signaling in multipotent progenitors from these *SCL* transgenic mice. The developmental potential of hematopoietic progenitors can be assessed by the size of colonies that grow in methylcellulose clonal cultures. Since SCL function determines colony size (Figure 3.3B), we reasoned that the effect of c-Kit signaling on colony size should not be additive to that of *SCL*, if the two genes were to operate within the same pathway. In wild-type mice, IL-3 stimulated the formation of multipotent colonies and the addition of SF significantly

increased colony size (Figure 3.3B, left panels). In comparison to their wild type littermates, multipotent colonies from *SCL* transgenic bone marrow cells were larger in IL-3 containing cultures and the addition of SF at saturating concentrations did not further enhance colony size. Thus, an increase in SCL levels mimics the effect of SF to favor the clonal expansion of multipotent progenitors.

We next determined whether elevating SCL levels would increase the responsiveness of multipotent progenitors to SF. We therefore compared SF dose-response curves between *WT* and *SCL^{tg}* mice. When multipotent progenitors (CFU-GEMM) were scored, the dose-response curve to SF stimulation for *Scl* transgenic cells was shifted to the left and the half effective concentration (EC50) was reproducibly 10-fold lower than that of cells from *WT* littermates (Figure 3.3C, left panel). In direct contrast, IL-3 dose-response curves exhibited similar EC50s for multipotent progenitors (CFU-GEMM) (Figure 3.3C, right panel) regardless of the presence or the absence of *SCL* transgene. Hence, elevating SCL levels in hematopoietic progenitors increased their sensitivity to SF whereas loss of SCL function severely impaired their response to SF. In contrast, levels of SCL did not affect the response of multipotent progenitors to stimulation with later acting cytokines which is consistent with the specific role of SCL downstream of c-Kit signaling.

***Scl* rescues the deficiency in hematopoietic progenitors in *W⁴¹W⁴¹* mice**

To further define the functional significance of SCL in the c-Kit pathway, we investigated the possibility that increasing *Scl* levels in transgenic mice could bypass the requirement for c-Kit signaling. *W⁴¹W⁴¹* mice have an hypomorph c-Kit receptor and consequently exhibit hematopoietic defects (Russell 1979). As assessed by colony assays, the frequency of multipotent (CFU-GEMMs) and both early (BFU-Es) and late (CFU-Es) erythroid progenitors were decreased by approximately two-fold in *W⁴¹W⁴¹* mice when compared to age-matched *WT* mice (Figure 3.4A,C,D). In contrast, myeloid progenitors (CFU-GMs) were not affected by reduced c-Kit activity, consistent with the specific role of c-Kit signaling in hematopoietic progenitors and in the erythroid lineage (Figure 3.4B). When the *Scl* transgene was introduced into the *W⁴¹W⁴¹* background, the hematopoietic

deficiencies in CFU-GEMMs (Figure 4A) as well as in BFU-Es and CFU-Es (Figure 3.4C-D) were rescued to their normal levels. These results indicate that increased SCL expression is sufficient to correct the defects caused by a hypomorphic *c-Kit* gene.

Taken together, our functional studies are consistent with the view that c-Kit and SCL operate within the same genetic pathway to determine the survival and developmental potential of multipotent and erythroid progenitors.

SCL controls the expression of survival genes in hematopoietic progenitors

To elucidate the molecular mechanisms that underlie the antiapoptotic function of SCL downstream of the c-Kit pathway, we set out to identify survival genes induced by the SCL transcription factor in response to SF stimulation. We first introduced either MSCV-GFP or MSCV- Δ bSCL-GFP in the hematopoietic cell line TF-1. Following overnight starvation, these cells were treated with either GM-CSF or SF for 6 hours, and gene expression profiles were determined using Affimetrix microarrays (Figure 3.5A). Genes of interest were selected by a dual approach: first, we identified c-KIT regulated genes by comparing the expression profiles of control cells under SF or GM-CSF stimulation; second, we selected SCL regulated genes by comparing the expression profiles of MSCV- Δ bSCL- and MSCV-infected cells under SF stimulation. The comparison of genes obtained in both analyses revealed that 23 survival genes are concomitantly induced by c-Kit and modulated by SCL function (Figure 3.5B). Expression levels for this gene set was then evaluated by qRT-PCR in purified primary megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) from *WT*, *W^{A1}W^{A1}* and *W^{A1}W^{A1}-Scl^{tg}* mice (Figure 3.5C). Of these, 17 could be detected by qPCR and 9 were significantly downregulated in *W^{A1}W^{A1}* mice when compared to *WT* MEP (Figure 3.5D). Moreover, when the *SCL* transgene was introduced in the *W^{A1}W^{A1}* background, gene expression levels were rescued to *WT* levels for 7 genes, and the remaining 3 genes were partially rescued. These findings indicate that SCL directly or indirectly controls the expression of survival genes in primary progenitors downstream of c-Kit signaling.

The antiapoptotic gene *Api-5* is directly controlled by SCL

In order to investigate whether these survival genes are SCL targets, we focused on the antiapoptotic gene *Api-5*. Notably, we found a GATA site at -35 in lieu of a TATA box (Figure 3.6A), which is typical of erythroid genes and of SCL targets (Lahlil 2004), as well as one E box within the proximal promoter of the *Api-5* gene. At this point, we decided to determine the expression pattern of *Scl* and *Api-5* in different hematopoietic progenitors as well as their response to SF stimulation. The KSL population enriched in stem cell activity as well as CMP, GMP, MEP and CLP progenitors were purified and *Api5* mRNA expression levels were determined by quantitative RT-PCR. As shown in Figure 3.6B, *Scl* levels (left panel) correlated with *Api-5* levels (right panel) and the highest mRNA levels for both genes were detected in MEP cells, in agreement with an important role for *Scl* in erythroid and megakaryocytic lineages (Hall et al. 2003; Mikkola et al. 2003). Moreover, when progenitors (c-Kit⁺Sca1⁻Lin⁻) were stimulated with SF, we observed that both *Scl* (Figure 3.6C, left panel) and *Api-5* (Figure 3.6C, right panel) expression were induced. Thus, the expression patterns of *Api-5* parallel the expression of *Scl* in primary cells and their expression levels appear to be coregulated in response to c-Kit activation. These findings support the view that SCL controls *Api-5* expression thereby sustaining the survival of primary progenitors.

We then addressed the question whether *Api-5* is a direct target of SCL. First, using semi-quantitative RT-PCR, we confirmed that *Api-5* mRNA expression was specifically induced by activation of the c-Kit signaling in TF1 cells. Furthermore, this induction was prevented by the expression of a dominant negative form of SCL, thus emphasizing the role of SCL mediated regulation of *Api-5* expression downstream of c-Kit (Figure 3.6D, left panel). Conversely, overexpression of SCL in TF-1 cells increased *Api-5* expression regardless of SF stimulation (Figure 3.6D, right panel). These observations indicate that SCL controls *Api-5* expression, downstream of c-Kit. Finally, our chromatin immunoprecipitation experiments revealed that SCL specifically binds the *Api-5* promoter region, as we observed a five-fold enrichment of SCL occupancy on *Api-5* promoter

sequences *in vivo* as compared to *Api-5* 3' negative control region or *Hprt* promoter (Figure 3.6E), thus demonstrating that *Api-5* is a direct target of SCL.

Combined, these results indicate that SCL supports the survival of multipotent and erythroid progenitors by directly regulating the expression of anti-apoptotic genes, such as *Api-5*.

3.4. Figures and Figure Legends

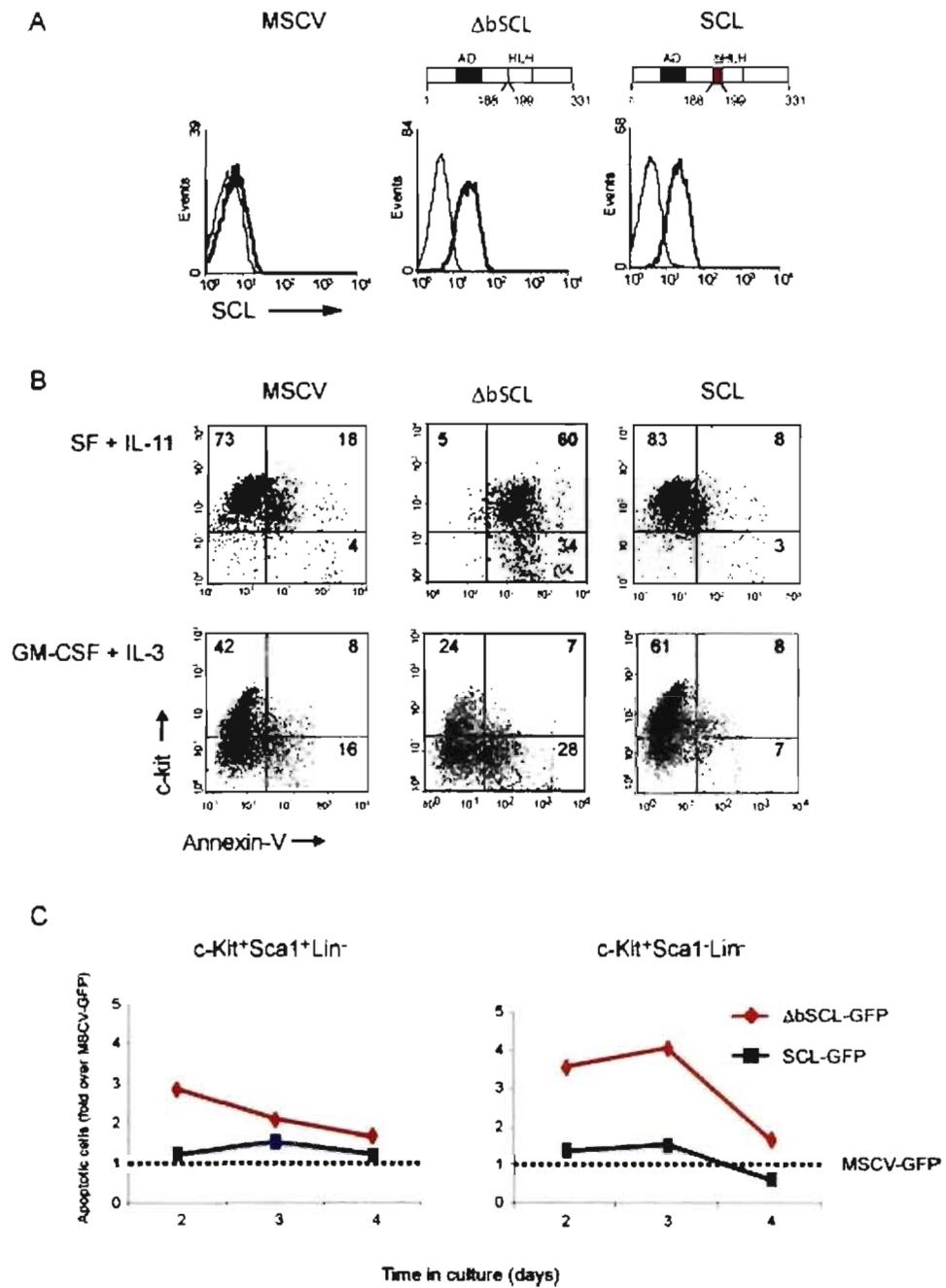


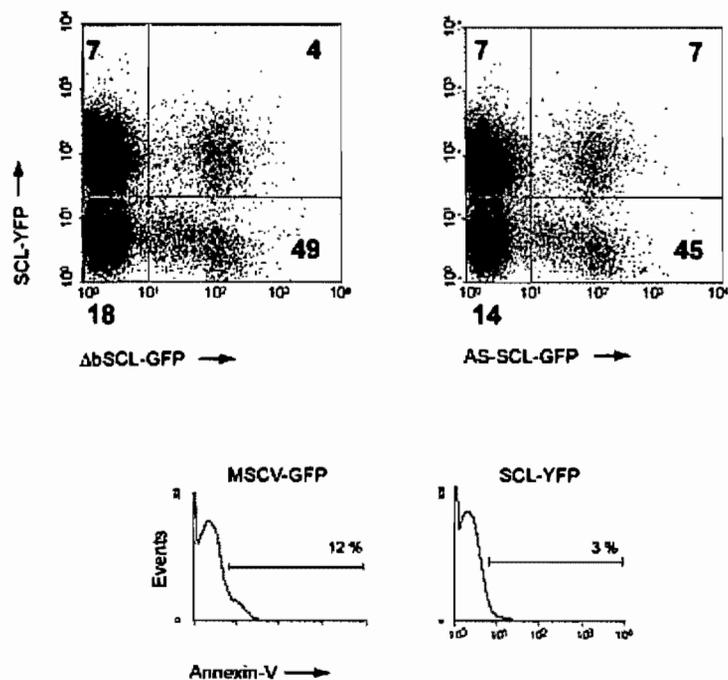
Figure 3.1: SCL function is required for the survival of c-Kit⁺ cells.

(A) Efficient retroviral mediated gene transfer into primary hematopoietic cells. c-Kit⁺ mouse bone marrow cells were infected with MSCV-neo^r retrovirus coding for the human SCL or a DNA binding defective mutant ($\Delta bSCL$), or with the control empty vector for 2 days. Cells were further selected with the antibiotic (G418) for two days and analyzed for the presence of human SCL by immunofluorescence staining with a monoclonal mouse anti-human SCL (thick line). Staining with the secondary antibody alone (goat anti-mouse) served as negative control (thin line). Note that both SCL and $\Delta bSCL$ were equally stained with the antibody while control cells (MSCV) remained negative.

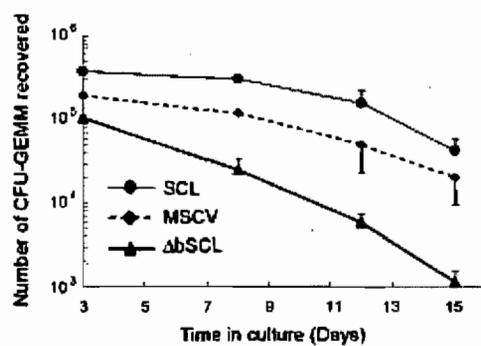
(B) After retroviral infection, cells were stimulated with either early acting cytokines (SF + IL-11) or myeloid cytokines (GM-CSF + IL-3) for 2 days, prior to staining with c-Kit antibodies and Annexin-V (20-25% infection efficiency). Cells were selected with the antibiotic (G418) as specified above. Dead cells were excluded from analysis on the basis of staining with propidium iodide. The percentage of cells within each quadrant is shown.

(C) *WT* bone marrow cells were infected with MSCV-GFP retrovirus carrying human SCL, $\Delta bSCL$ or empty vector. 2, 3 and 4 days post-infection, apoptosis was monitored in the population endowed of stem cell activity (c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻) and in progenitors (c-Kit⁺Sca-1⁻Lin⁻) based on staining with AnnexinV and exclusion of PI⁺ cells by flow cytometry. Represented here is the proportion of apoptotic cells in $\Delta bSCL$ or SCL expressing cells over the control empty vector in the GFP⁺ populations (dashed line represents apoptosis level in control cells normalized to 1).

A



B



C

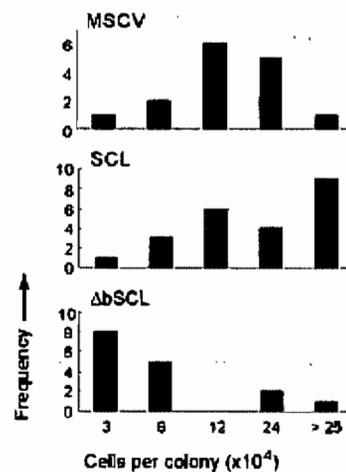


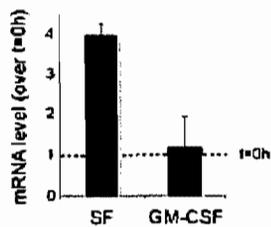
Figure 3.2: SCL is required for the clonal expansion and survival of multipotent progenitors.

(A) Δ bSCL and AS-SCL specifically target endogenous SCL. SCL and Δ bSCL (left panel) or SCL and AS-SCL (right panel) were co-delivered in *WT* bone marrow cells and apoptosis was monitored on day 4. To distinguish between the two transgenes, SCL was cloned in the YFP-MSCV vector, whereas AS-SCL and Δ bSCL were cloned in GFP-MSCV vectors. Numbers in the quadrant represent the proportion of AnnexinV positive cells (shown in red) within the quadrant. Overexpression of SCL-YFP, in Δ bSCL-GFP and AS-SCL-GFP expressing cells, reduced the number of apoptotic cells to levels that were comparable to those detected in the control cells expressing the empty vector.

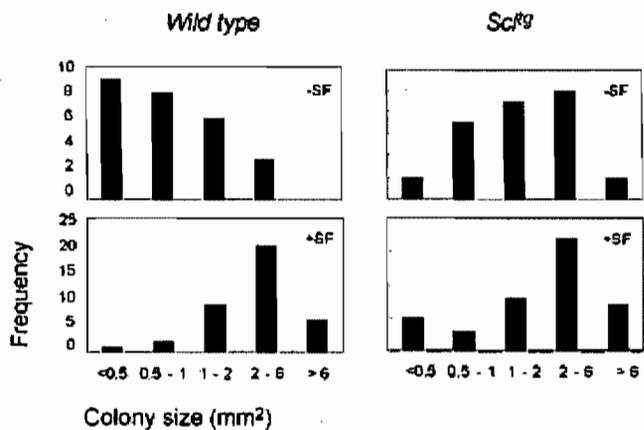
(B) *WT* bone marrow cells expressing either SCL, Δ bSCL or control empty vector were plated in suspension culture with SF and IL-11 and selected with the antibiotic (G418). To determine the survival rates of multipotent progenitors, samples were taken at the indicated times, plated in methylcellulose and colonies were scored 9 days later. Represented here is the number of multipotent progenitors (CFU-GEMM) recovered at each time point. Expression of Δ bSCL abrogated the long-term maintenance of multipotent progenitors *in vitro* compared to SCL or control infected bone marrow cells.

(C) Infected bone marrow cells were plated in methylcellulose and multipotent colonies were aspirated 9 days later, dispersed into single cell suspensions and counted to determine colony size. Ectopic expression of *Scl* significantly increased the cellularity of multipotent colonies while loss of SCL function via expression of Δ bSCL markedly decreased colony size.

A



B



C

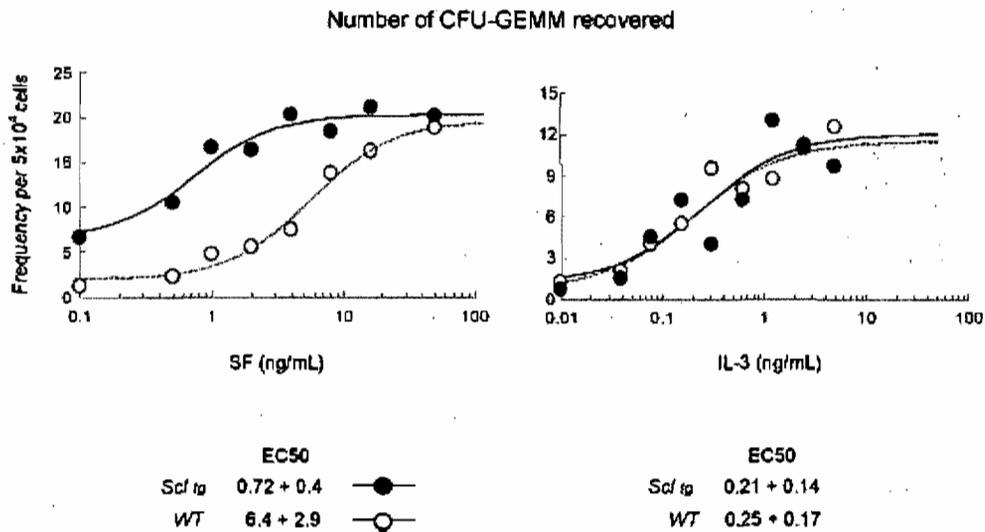


Figure 3.3: SCL level determines the output of hematopoietic progenitors.

(A) Hematopoietic progenitors defined as $c\text{-Kit}^+\text{Sca-1}^-\text{Lin}^-$ were purified and stimulated with either SF or GM-CSF. SCL mRNA expression was assessed 4 hours post-stimulation by quantitative RT-PCR. mRNA levels were first normalized using HPRT as an internal control and then compared to the expression levels at $t=0\text{h}$ (dashed line represents $t=0$ normalized to 1). The average of three experiments is shown with standard deviations.

(B) Bone marrow cells from *SCL* transgenic mice (right panels) or wild type littermates (left panels) were plated in the presence of IL-3 and Epo, with (+SF) or without (-SF) Steel Factor. The size of multipotent colonies was assessed using the Northern Eclipse Image analysis software.

(C) Bone marrow cells from heterozygous *SCL*^{tg} mice and *WT* littermates were cultured in methylcellulose in the presence of increasing concentrations of SF (left panel) or IL-3 (right panel). CFU-GEMM were scored 9 days later. Data were obtained from three independent experiments performed in duplicate or quadruplicate cultures. Data were analyzed using a non-linear regression curve fitting routine (ALLFIT). Results are presented as the mean value \pm SD. Shown under each panel are estimates of the half effective concentrations (EC50) of the different ligands on progenitors obtained from *SCL*^{tg} mice or their *WT* littermates.

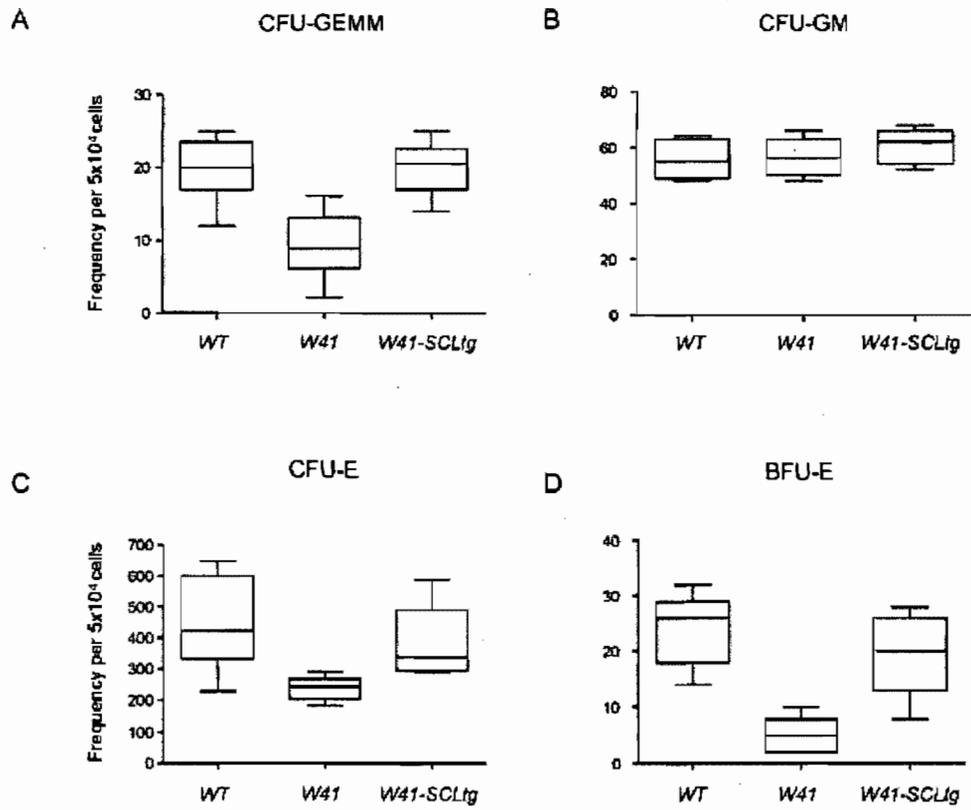
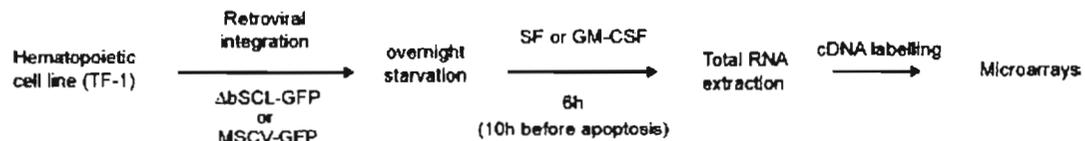


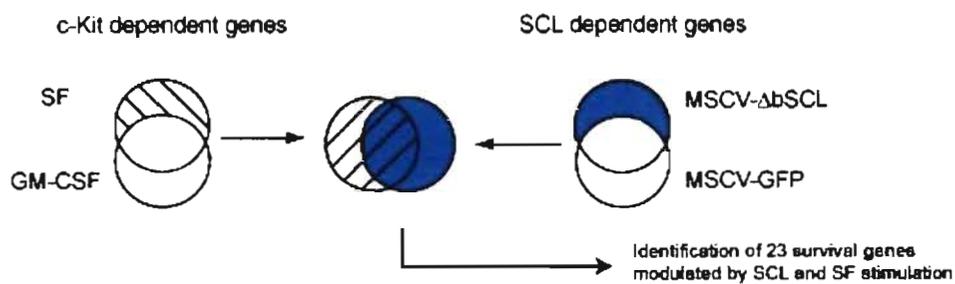
Figure 3.4: Genetic interaction between c-kit and *Scl*.

(A-D) Bone marrow cells from *WT*, *W^{A1}W^{A1}* and *W^{A1}W^{A1}-SCL^{tg}* mice were cultured in methyl-cellulose and the frequency of early (BFU-E) and late erythroid progenitors (CFU-E) as well as multipotent (CFU-GEMM) and myeloid progenitors (CFU-GM) was determined respectively. Cultures were performed with mice from two different litters. Data are represented as box-plots: the horizontal dashes represent the median of each distribution, while the boxes represent 25% to 75% of colony distribution. Vertical lines represent 95% of colony distribution. Decreasing c-Kit activity significantly impairs the formation of multipotent (A) and erythroid progenitors (C,D) without affecting the myeloid lineage (B). Note that overexpressing *SCL* in the *W^{A1}W^{A1}* background completely rescues these hematopoietic defects (A,C,D). Data were analyzed by the Student's t test. For CFU-GEMM, CFU-E and BFU-E the differences between *WT* and *W^{A1}W^{A1}*, and between *W^{A1}W^{A1}* and *W^{A1}W^{A1}-Scl^{tg}* were significant ($p < 0.05$). In contrast, the number of colonies obtained from *W^{A1}W^{A1}-Scl^{tg}* and *WT* mice was not significantly different ($p > 0.1$).

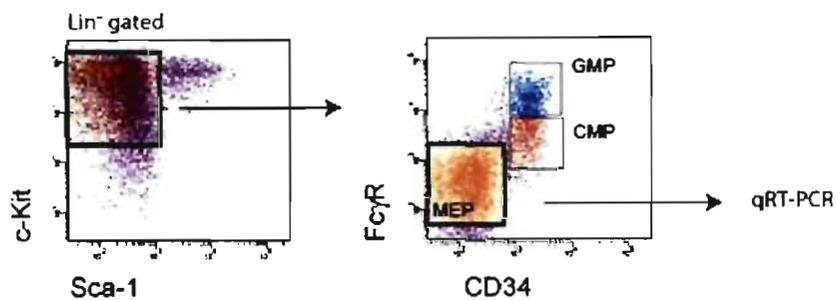
A



B



C



D

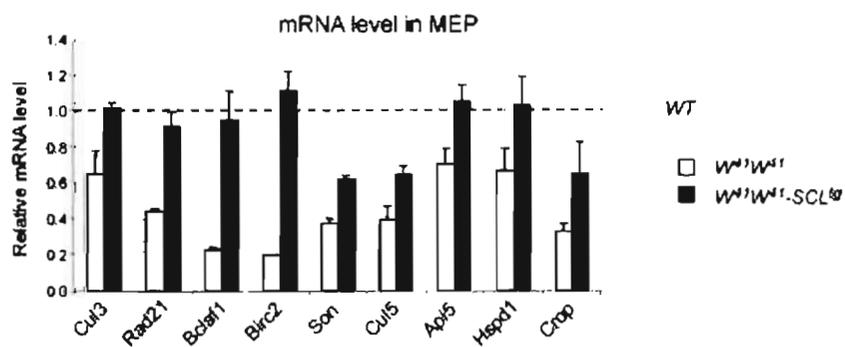


Figure 3.5: SCL regulates the expression of survival genes in erythroid progenitors.

(A) Strategy used to identify genes controlled by SCL in the c-Kit pathway. TF-1 cells expressing MSCV-GFP or MSCV- $\Delta bSCL$ were starved overnight and then stimulated with either SF or GM-CSF. RNA was extracted after 6h, before the onset of apoptosis, to identify direct SCL target genes. Expression profiles were determined using Affymetrix DNA microarrays.

(B) Schematic diagram representing our approach to analyse microarray data. We performed a paired comparison between TF-1 cells stimulated with either SF or GM-CSF and TF-1 cells harboring either the empty vector or the $\Delta bSCL$ under SF treatment. 23 survival genes in the c-Kit pathway were found to be specifically regulated by SCL.

(C) Megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) from *WT*, *W⁴¹W⁴¹* and *W⁴¹W⁴¹-SCL^{tg}* were purified by flow cytometry. Expression levels of genes identified in B were determined by quantitative RT-PCR.

(D) Decreasing c-Kit activity in mice impedes the expression of 9 survival genes by the microarray approach. The introduction of *SCL* transgene in *W⁴¹W⁴¹* mice restores their expression. mRNA levels were first normalized using *Hprt* as an internal control and then compared to the expression levels in *WT* MEP (dashed line represents *WT* values normalized to 1). The average of two experiments performed in triplicate is shown with bars representing standard deviations.

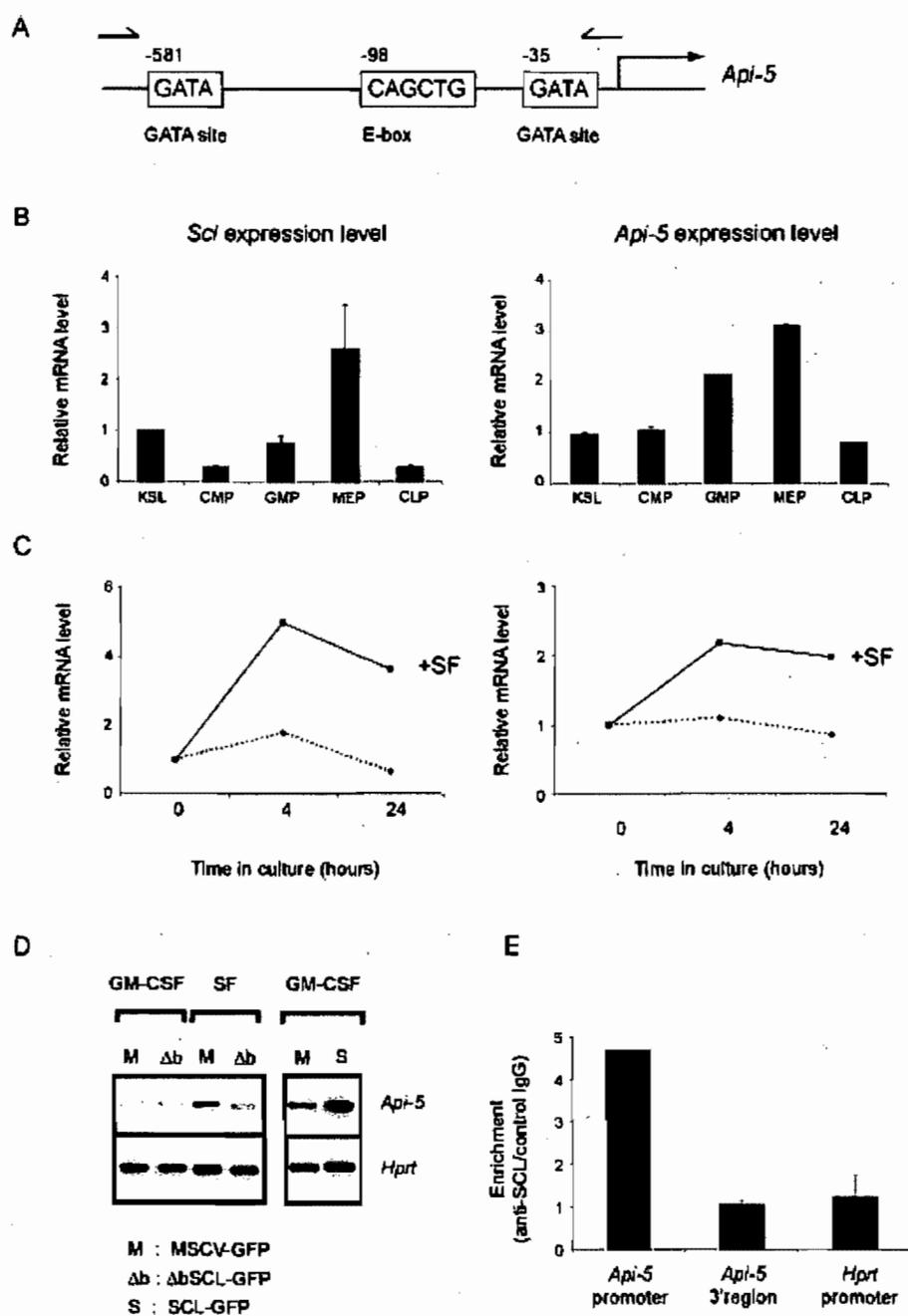


Figure 3.6: The antiapoptotic gene *Api-5* is a direct target of SCL.

(A) Schematic diagram of the *Api-5* proximal promoter. Shown are the positions of consensus GATA sites and the E box. Arrows represent the position of the oligonucleotides used in the ChIP assay.

(B) The KSL population enriched in stem cell activity as well as CMP, GMP, MEP and CLP progenitors were sorted from *WT* bone marrow. *Scl* (left panel) and *Api-5* (right panel) expression levels were analysed by quantitative RT-PCR. mRNA levels were first normalized using *hprt* as an internal control and then compared to expression levels in the most primitive population (KSL). The average of three experiments is shown with bars representing standard deviations. Note that the highest levels of *Api-5* expression were detected in erythroid progenitors, correlating with high *Scl* expression.

(C) *WT* primary progenitors (c-Kit⁺Sca-1⁻Lin⁻) were purified and stimulated with either Steel Factor or serum alone. *Scl* (left panel) and *Api-5* (right panel) expression were determined at different time points by quantitative RT-PCR (full line represents SF stimulation and dashed line represents serum alone). mRNA levels were first normalized using *Hprt* as an internal control and then compared to expression levels at t=0.

(D) SCL function is specifically required for *Api-5* expression downstream of the c-Kit pathway in TF1 cells. The dominant negative form of SCL abrogates c-Kit induced *Api-5* expression as shown here by semi-quantitative RT-PCR. Consistently, overexpression of SCL induces *Api-5* expression regardless of SF stimulation.

(E) SCL occupies the *Api-5* regulatory regions. TF-1 cell chromatin extracts were subjected to immunoprecipitation with SCL antibody or with species-matched control IgG. Fold enrichments were calculated as described in Materials and Methods.

3.5. Experimental Procedures

Mice

All mice were housed in pathogen free animal facility according to institutional animal care and use guidelines. Transgenic mice expressing the short form of *Scl* (Aplan et al. 1997) have been backcrossed onto a C57BL/6 background for more than 8 generations. Mice were genotyped by PCR as described (Herblot et al. 2000). C57BL/6 and *W^{fl}W^{fl}* mice were purchased from Jackson laboratories (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA).

Cell Line

The TF-1 cell line (Kitamura et al., 1989) was a gift from Dr. T. Kitamura (DNAX, Palo Alto, CA). The cells were maintained in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with 10% FCS (Fetal Calf Serum) and 5 ng/ml human GM-CSF. The cells were passaged every second day at 1.5×10^5 /ml.

Vectors

The MSCV neo^r (Hawley et al., 1994) plasmids containing either human *SCL* or human *ΔbSCL* coding sequences were described previously (Krosi et al. 1998). The MSCV-YFP and MSCV-GFP plasmids have the neo^r gene replaced by the YFP and GFP genes, respectively. The MSCV-GFP-AS-SCL plasmid was produced by subcloning *SCL* into the EcoRI site in an antisense orientation. High titer helper-free recombinant retroviruses were produced using the GP+E-86 ecotropic virus packaging cell line (Markowitz et al. 1988).

Gene transfert into bone marrow cells

Bone marrow cells from 5'Fluorouracil (150 mg/kg) injected mice were plated in suspension culture in IMDM with 15% FCS, 100 ng/mL murine SF, 10 ng/mL human IL-6,

100 ng/ml human IL-11 and 5 ng/mL murine IL-3, at a concentration of 1×10^6 cells/mL. All cytokines were produced in COS cell supernatants and were calibrated against recombinant standards. After 48h of prestimulation, bone marrow cells were overlaid on irradiated (1500 cGy) virus producing GP+E-86 cells in the presence of 0.8 μ g/mL of polybrene for 48h. In the double infection strategy, a mixture of GP+E-86 cells producing MSCV-EYFP-*SCL* and MSCV-EGFP- Δb *SCL* retroviruses was seeded for infection. The GP+E-86 producer mixture was calculated such that target cells were exposed to similar viral titers for both viruses.

Flow cytometry analysis and cell sorting

All antibodies were purchased from Pharmingen and e-Biosciences, Annexin V (FITC or Cychrome) from Biotest and used at concentrations determined by titration. The monoclonal anti-*SCL* antibody (BTL73) was a generous gift from Dr. Danièle Mathieu-Mahul (INSERM, France). Flow cytometry analysis was performed on the FACStar or FACScalibur flow cytometers (Becton-Dickinson) using double laser excitation.

c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻ (KSL) and c-Kit⁺Sca1⁻Lin⁻ (KL) were stained as previously described (Akashi et al. 2000). Briefly, freshly isolated bone marrow cells were stained with c-Kit-APC, Sca1-PE and biotinylated antibodies for the following lineage markers: IL7-R α , CD3, B220, FcR α I, Gr1, CD11b and TER119. Lin-biotin cells were revealed by PeCy5 coupled streptavidin. Dead cells were excluded using propidium iodide (PI). When apoptosis was investigated, lineage markers were coupled with PeCy7 and Annexin V-biotin revealed by streptavidin-PeCy5.

For KSL, CMP, GMP, MEP cell sorting, total bone marrow was depleted of lineage positive cells using magnetic beads and the remaining cells were stained with CD34-FITC, Sca1-PE, c-kit-APC, Fc γ RII/III-PeCy7 and biotinylated antibodies for the following lineage markers: IL7-R α , CD3, B220, FcR α I, Gr1, CD11b and TER119. Lineage-positive cells were detected with PeCy5-conjugated streptavidin. For CLP sort, lineage depleted

bone marrow cells were stained with Sca1-PE, c-kit-APC, IL-7R α -PeCy5, Flt3-biotin (detected by streptavidin PeCy7) and FITC-conjugated antibodies for the lineage markers (Thy1.2, CD3, B220, Gr1, CD11b and TER119). Dead cells were excluded by PI staining.

Methyl-cellulose assays

Following infection with MSCV neo^r virus, cells were plated at different concentrations ranging from 1500 to 6000 cells/ml in methyl cellulose culture consisting of 1% methyl cellulose (Fluka Chemie), 10% FBS, 200 μ g/ml transferrin, 0.2% bovine serum albumin (BSA), 5×10^{-5} M α -Monothioglycerol, 50 ng/mL SF, 5 ng/mL IL-3, 10 ng/mL IL-6, and 1 U/mL Erythropoietin (Epo) in IMDM, in the presence or absence of 0.8 mg/mL G418 to assess the infection efficiency. Unfractionated bone marrow cells from *WT*, *W^{fl}W^{fl}* and *W^{fl}W^{fl}-Scf^{flg}* mice were plated at concentration varying from 10 000 to 50 000 cells/mL in methyl-cellulose culture media as described above. Colonies were scored 9 days later.

Cytokine response titration

Bone marrow cells from heterozygote *Scf^{flg}* mice (line A(5)3SCL) and wild type littermates were plated in methyl cellulose culture with increasing concentrations of SF (0-100 ng/mL) or IL-3 (0-5 ng/mL) and in the presence of Epo (1 U/mL). Colonies were scored 9 days later.

Microarrays analysis

TF-1 cells expressing either MSCV-GFP or MSCV-GFP- Δ bSCL were stimulated with GM-CSF (5 ng/mL) or SF (20ng/mL). RNA was extracted 6 hours post-stimulation by column purification using Qiagen RNeasy Mini Kit (P/N 741104) and resuspended in 5ul of RNase free water at a concentration of 0.05ug/ul. cDNA synthesis and hybridization to DNA chip was performed by the Ottawa Genome Centre as follows: cDNA was first labelled using the GeneChip Eukaryotic Small Sample Target Labelling protocol developed by Affymetrix and then hybridized to the probe array HG-U133A (Affymetrix). Raw data

were analysed by the Bioinformatics Facility at IRIC and genes selected based on their role in apoptosis.

Gene Expression

Total RNA extraction, preparation of cDNA and specific PCR amplifications were performed as previously described (Herblot et al. 2000). Quantitative gene expression analysis was performed by real time PCR on MX3000 (Stratagene) or ABI apparatus (ABI) using quantitect SYBR green PCR kit (Qiagen) or TaqMan PCR master mix (ABI) according to the manufacturer's instructions. Semi-quantitative gene expression analysis were performed after 28 cycles of amplification and 10 ul of each reaction mixture were loaded on a 1.2% agarose gel, transferred on a nylon membrane and hybridized with a ³²P labelled internal probe. Hybridization signals were analysed on a PhosphorImager apparatus. Primer sequences are available upon request.

Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed essentially as described previously (Lecuyer et al. 2002), using TF-1 cell extracts. Briefly, TF-1 cell chromatin extracts were subjected to immunoprecipitation with SCL antibody and species-matched control IgG. After cross-linking reversal, DNA from immunoprecipitated chromatin was subjected to quantitative RT-PCR analysis to detect the presence of the hAPI-5 and hHPRT promoter sequences, as well as the 3'UTR region of hAPI-5 mRNA. The occupancy of region X by protein p relative to input chromatin was obtained as described: $p(X) = 2[Ct(IP) - Ct(input)]$ (Geisberg and Struhl 2004). Data are shown as fold enrichments over the values obtained for species-matched control Ig.

3.6. Discussion

SCL and cell survival

All normal hematopoietic cells, including stem cells and their differentiated progeny, require signaling from the environment for their survival. This is illustrated by the stem cell deficiency of *W* and *Sl* mutant mice (Russell 1979; Miller et al. 1997). We have previously shown that *c-kit* is a target of transcriptional regulation by SCL (Krosi et al. 1998; Lecuyer et al. 2002). Interestingly, this function does not depend on the capacity of SCL to bind DNA. In this context, SCL appears to function as a nucleation factor that recruits other factors such as E2A, GATA1/2 and Sp1, which all possess DNA binding activity. In the present study, we show that SCL plays a pivotal role in maintaining the survival of adult hematopoietic progenitors. Notably, the DNA binding function of SCL was essential to fulfill this role, as ectopic expression of $\Delta bSCL$ clearly induced apoptosis in the aforementioned cells. Thus, our study provides a cellular and molecular explanation for the inability of DNA binding defective SCL mutant to rescue definitive hematopoiesis (Porcher et al. 1999). We therefore propose a model of positive feedback between SCL and c-Kit that consolidates the development of c-Kit⁺ cells at the onset of, and during definitive erythropoiesis. In contrast to its role in cell survival, SCL can induce leukemia in the absence of DNA binding (O'Neil et al. 2001). Since leukemogenesis induced by SCL may be due to inhibition of E2A activity (Chervinsky et al. 1999; Herblot et al. 2000), it is conceivable that a DNA-binding defective SCL mutant can still inhibit E2A activity in an Id-like manner. Therefore, the multiple functions of the SCL transcription factor are determined by its modular nature, i.e. by its capacity to interact with other proteins via its HLH domain, and/or its ability to bind DNA via its basic domain.

In the present study, we address the role of SCL in primary hematopoietic cells, through modulation of SCL levels and/or function using different approaches: retroviral mediated gene transfer of WT SCL or a dominant negative SCL mutant as well as ectopic *Scf* expression in transgenic mice. Our observations revealed a unique biological specificity

of SCL in directing the response of multipotent progenitors to early acting cytokines (SF and Il-11) but not to myeloid cytokines (GM-CSF and IL-3). Importantly, this biological specificity was not observed in the studies that were conducted on cell lines. Namely, the ectopic expression of SCL in myeloid (32D) or lymphoid cells (Jurkat) was shown to increase cell growth in response to IL-3 or serum factors, respectively (Concorelli et al. 1997; Bernard et al. 1998). Contrary to studies in cell lines, we show that elevating SCL levels, either through retroviral mediated gene transfer or in transgenic mice in which *Scl* was integrated in the genome at low copy numbers (Aplan et al. 1997) does not significantly enhance cell proliferation. In contrast, decreasing SCL activity induces apoptosis and impairs cell growth in the c-Kit⁺ population. Furthermore, increasing SCL levels was sufficient to bypass c-Kit signaling. We, therefore, conclude that SCL has an essential anti-apoptotic function that specifically governs the response of multipotent progenitors and erythroid progenitors to Steel Factor.

The role of *Scl* in the survival of progenitors was further revealed by the demonstration that *Scl* controls the expression of multiple survival genes within the c-Kit pathway. Accordingly, *Scl* was shown to directly control the expression of the *apoptosis inhibitor-5* gene (*Api-5*) coding for a protein highly conserved from plants to mammals (Morris et al. 2006). *Api-5* was initially identified by its capacity to promote survival upon serum deprivation (Tewari et al. 1997). Furthermore, *Api-5* is highly expressed in transformed cell lines (Kim et al. 2000; Van den Berghe et al. 2000; Clegg et al. 2003) and this depends on p53 activity, i.e. wild-type p53 but not mutant p53 repressed *Api-5* expression (Scian et al. 2004). More recently, *Api-5* was identified as a suppressor of E2F-dependent apoptosis *in vivo* (Morris et al. 2006). Here we report that *Scl* controls *Api-5* expression downstream of c-Kit.

In addition to *Api5*, several genes controlling apoptosis were identified in our functional screen. CUL3 and CUL5 are E3 ligases that regulate caspase 3 activation (Arama et al. 2007) and p53 degradation (Harada et al. 2002), respectively. Caspase cleavage product of Rad21/cohesin promotes apoptosis in budding yeast and mammalian

cells (Chen et al. 2002; Pati et al. 2002; Yang et al. 2008). BCLAF1 is a BCL2-associated factor (Kasof et al. 1999). Birc2 null mutants in zebrafish show endothelial cell apoptosis (Santoro et al. 2007). SON is a DNA binding protein identified in yeast as an antagonist of BAX (Greenhalf et al. 1999) and found by phosphoproteomic analysis of the mitotic spindle in mammalian cells (Nousiainen et al. 2006). HSPD1 (HSP60) is a mitochondrial molecular chaperone that stabilizes the pool of mitochondrial survivin and restricts p53 function in cancer cells (Ghosh et al. 2008). CROP is a nuclear protein expressed in cisplatin-resistant cells (Nishii et al. 2000) and is part of a protein network phosphorylated by ATM-ATR in response to DNA damage (Matsuoka et al. 2007). Gene expression levels for these genes were decreased in MEP in which c-Kit is hypofunctional and were rescued by the *Scl* transgene, suggesting that c-Kit and SCL regulate a network of cell survival genes, hence their importance in maintaining the pool of erythroid progenitors in vivo.

The regulation of apoptotic death is central to the development of hematopoietic cells. Master regulators such as PU.1 and C/EBP α determine the fate of myeloid cells by driving the expression of cell surface receptors that are critical for cell survival in the macrophage and granulocytic lineages (Zhang et al. 1994; Zhang et al. 1997), respectively. Similarly, in the absence of *Gata-1*, erythroblasts undergo apoptotic death (Weiss and Orkin 1995). Furthermore, loss of one allele of *Gata-2* was shown to cause apoptosis in the KSL population (Rodrigues et al. 2005). Finally, SCL is important both for *c-Kit* expression (Lecuyer et al. 2002) and based on the data presented here, c-Kit function. Together, these data are consistent with the hypothesis that hematopoietic transcriptional regulators coordinate the gene expression program that defines lineage specificity, and at the same time secure the survival of the specified cell types.

Signaling from the environment to tissue-specific transcription factors

Hematopoietic cytokines are essential for cell survival and, in some instances, for proper maturation along specific lineages. The question that still remains largely elusive is how this signaling specificity, which drives the appropriate gene expression patterns across a given lineage, is achieved. It was previously demonstrated that the G-CSF signaling regulates C/EBP ϵ expression and function (Nakajima and Ihle 2001) to favor granulocytic differentiation at the expense of macrophages. This is thought to be due to the G-CSF induced alteration in C/EBP ϵ /PU.1 ratio (Dahl and Simon 2003). Moreover, during embryogenesis, SCL interacts with the VEGF receptor Flk1 to sustain the survival of the hemangioblast at the onset of primitive hematopoiesis (Ema et al. 2003; Martin et al. 2004).

Mast cells require c-Kit signaling for cell survival and proliferation. Interestingly, this signaling cascade results in the stabilization of MiTF, a bZip transcription factor which is specific for a restricted number of cell types such as melanocytes, mastocytes and osteoclasts (Wu et al. 2000). In melanocytes, c-Kit signaling was shown to regulate the transcriptional activity of MiTF to sustain their survival and differentiation (Hemesath et al. 1998; Price et al. 1998; Wu et al. 2000), thereby demonstrating that the c-Kit pathway can directly modulate cell fate. However, nuclear effectors of c-Kit signaling in hematopoietic progenitors are less well understood. In this study, we show that SCL levels are limiting for the clonal expansion of multipotent progenitors and that *Scf* gene dosage specifically determines the threshold of cellular response to SF. It was previously demonstrated that SCL is an essential factor for erythroid maturation in adult mice (Hall et al. 2003; Mikkola et al. 2003). Here we report that SCL has the capacity to rescue the hematopoietic deficiency in $W^{fl}W^{fl}$ mice, which strongly suggests that this transcription factor is required to support both survival and differentiation of the progenitors. Thereby, Steel Factor consolidates the lineage choice by modulating SCL dosage. This supports the instructive role of the environment on cell differentiation. We hypothesize that the elevation of SCL expression can induce the formation of specific protein complexes able to promote the

proper maturation of progenitors. By modulating *Scl* expression, the c-Kit signaling pathway may regulate the formation of such complexes, thereby influencing cell fate. These observations warrant future studies aimed at addressing the signaling pathways that influence the function of tissue-specific transcriptional regulators.

In summary, we propose that the modulation of lineage-restricted transcription factors by a ligand/receptor pair determines their signaling specificity and influences cell fate in the hematopoietic system.

3.7. Acknowledgements

We thank Dr Danièle Mathieu-Mahul (INSERM, Marseille, France) for the anti-SCL monoclonal antibody, Nathalie Tessier, Éric Massicotte and Danièle Gagné for assistance with cell sorting, Annie Perreault and Véronique Mercille for mouse husbandry, André Haman for mouse genotyping and Christian Charbonneau for image acquisition. We also thank Pierre Chagnon and Raphaëlle Lambert for quantitative RT-PCR. The infrastructure is funded in part by a group grant from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (IRIC). This work was funded by grants from the Canadian Institutes for Health Research, the National Cancer Institute and the Canada Research Chair program (T.H.). J.L. is supported by studentships from the University of Montreal and the Fonds d'Aide aux Chercheurs et à la Recherche, S.H. a post doctoral fellowship from the Leukemia Research Fund of Canada.

3.8. References

- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**(6774): 193-197.
- Aplan, P.D., Jones, C.A., Chervinsky, D.S., Zhao, X., Ellsworth, M., Wu, C., McGuire, E.A., and Gross, K.W. 1997. An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J* **16**(9): 2408-2419.
- Aplan, P.D., Nakahara, K., Orkin, S.H., and Kirsch, I.R. 1992. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J* **11**(11): 4073-4081.
- Arama, E., Bader, M., Rieckhof, G.E., and Steller, H. 2007. A ubiquitin ligase complex regulates caspase activation during sperm differentiation in *Drosophila*. *PLoS Biol* **5**(10): e251.
- Bernard, M., Delabesse, E., Novault, S., Hermine, O., and Macintyre, E.A. 1998. Antiapoptotic effect of ectopic TAL1/SCL expression in a human leukemic T-cell line. *Cancer Res* **58**(12): 2680-2687.
- Borge, O.J., Ramsfjell, V., Cui, L., and Jacobsen, S.E. 1997. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood* **90**(6): 2282-2292.
- Brady, G., Billia, F., Knox, J., Hoang, T., Kirsch, I.R., Voura, E.B., Hawley, R.G., Cumming, R., Buchwald, M., and Siminovitch, K. 1995. Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol* **5**(8): 909-922.
- Caceres-Cortes, J., Rajotte, D., Dumouchel, J., Haddad, P., and Hoang, T. 1994. Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* **269**(16): 12084-12091.
- Caceres-Cortes, J.R., Krosl, G., Tessier, N., Hugo, P., and Hoang, T. 2001. Steel factor sustains SCL expression and the survival of purified CD34+ bone marrow cells in the absence of detectable cell differentiation. *Stem Cells* **19**(1): 59-70.
- Cantor, A.B. and Orkin, S.H. 2001. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* **11**(5): 513-519.

- Carson, W.E., Haldar, S., Baiocchi, R.A., Croce, C.M., and Caligiuri, M.A. 1994. The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16): 7553-7557.
- Chen, F., Kamradt, M., Mulcahy, M., Byun, Y., Xu, H., McKay, M.J., and Cryns, V.L. 2002. Caspase proteolysis of the cohesin component RAD21 promotes apoptosis. *J Biol Chem* **277**(19): 16775-16781.
- Chervinsky, D.S., Zhao, X.F., Lam, D.H., Ellsworth, M., Gross, K.W., and Aplan, P.D. 1999. Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice. *Mol Cell Biol* **19**(7): 5025-5035.
- Clegg, N., Ferguson, C., True, L.D., Arnold, H., Moorman, A., Quinn, J.E., Vessella, R.L., and Nelson, P.S. 2003. Molecular characterization of prostatic small-cell neuroendocrine carcinoma. *Prostate* **55**(1): 55-64.
- Condorelli, G.L., Tocci, A., Botta, R., Facchiano, F., Testa, U., Vitelli, L., Valtieri, M., Croce, C.M., and Peschle, C. 1997. Ectopic TAL-1/SCL expression in phenotypically normal or leukemic myeloid precursors: proliferative and antiapoptotic effects coupled with a differentiation blockade. *Mol Cell Biol* **17**(5): 2954-2969.
- Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Cho, B.C., Donovan, P.J., Jenkins, N.A., Cosman, D., Anderson, D., Lyman, S.D., and Williams, D.E. 1990. Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* **63**(1): 175-183.
- Curtis, D.J., Hall, M.A., Van Stekelenburg, L.J., Robb, L., Jane, S.M., and Begley, C.G. 2004. SCL is required for normal function of short-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* **103**(9): 3342-3348.
- D'Andrea, A.D. 1994. Hematopoietic growth factors and the regulation of differentiative decisions. *Curr Opin Cell Biol* **6**(6): 804-808.
- Dahl, R. and Simon, M.C. 2003. The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol Dis* **31**(2): 229-233.
- Elefanty, A.G., Begley, C.G., Metcalf, D., Barnett, L., Kontgen, F., and Robb, L. 1998. Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11897-11902.

- Elwood, N.J., Zogos, H., Pereira, D.S., Dick, J.E., and Begley, C.G. 1998. Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood* **91**(10): 3756-3765.
- Ema, M., Faloon, P., Zhang, W.J., Hirashima, M., Reid, T., Stanford, W.L., Orkin, S., Choi, K., and Rossant, J. 2003. Combinatorial effects of Flk1 and Tall on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev* **17**(3): 380-393.
- Fairbairn, L.J., Cowling, G.J., Reipert, B.M., and Dexter, T.M. 1993. Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell* **74**(5): 823-832.
- Fleischman, R.A. 1993. From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development. *Trends Genet* **9**(8): 285-290.
- Geisberg, J.V. and Struhl, K. 2004. Quantitative sequential chromatin immunoprecipitation, a method for analyzing co-occupancy of proteins at genomic regions in vivo. *Nucleic Acids Res* **32**(19): e151.
- Ghosh, J.C., Dohi, T., Kang, B.H., and Altieri, D.C. 2008. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem* **283**(8): 5188-5194.
- Goldsmith, M.A., Mikami, A., You, Y., Liu, K.D., Thomas, L., Pharr, P., and Longmore, G.D. 1998. Absence of cytokine receptor-dependent specificity in red blood cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 7006-7011.
- Gommerman, J.L. and Berger, S.A. 1998. Protection from apoptosis by steel factor but not interleukin-3 is reversed through blockade of calcium influx. *Blood* **91**(6): 1891-1900.
- Green, A.R., Salvaris, E., and Begley, C.G. 1991. Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. *Oncogene* **6**(3): 475-479.
- Greenhalf, W., Lee, J., and Chaudhuri, B. 1999. A selection system for human apoptosis inhibitors using yeast. *Yeast* **15**(13): 1307-1321.
- Hall, M.A., Curtis, D.J., Metcalf, D., Elefanty, A.G., Sourris, K., Robb, L., Gothert, J.R., Jane, S.M., and Begley, C.G. 2003. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 992-997.
- Harada, J.N., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Pallas, D.C., and Berk, A.J. 2002. Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J Virol* **76**(18): 9194-9206.

- Hemesath, T.J., Price, E.R., Takemoto, C., Badalian, T., and Fisher, D.E. 1998. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* **391**(6664): 298-301.
- Herblot, S., Steff, A.M., Hugo, P., Aplan, P.D., and Hoang, T. 2000. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* **1**(2): 138-144.
- Hsu, H.L., Cheng, J.T., Chen, Q., and Baer, R. 1991. Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **11**(6): 3037-3042.
- Iwasaki-Arai, J., Iwasaki, H., Miyamoto, T., Watanabe, S., and Akashi, K. 2003. Enforced granulocyte/macrophage colony-stimulating factor signals do not support lymphopoiesis, but instruct lymphoid to myelomonocytic lineage conversion. *J Exp Med* **197**(10): 1311-1322.
- Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E.A., Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., Fenyus, M.L., Elf, S., Chan, S., Kastner, P., Huettner, C.S., Murray, R., Tenen, D.G., and Akashi, K. 2005. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* **106**(5): 1590-1600.
- Just, U., Stocking, C., Spooncer, E., Dexter, T.M., and Ostertag, W. 1991. Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. *Cell* **64**(6): 1163-1173.
- Kasof, G.M., Goyal, L., and White, E. 1999. Btf, a novel death-promoting transcriptional repressor that interacts with Bcl-2-related proteins. *Mol Cell Biol* **19**(6): 4390-4404.
- Kim, J.W., Cho, H.S., Kim, J.H., Hur, S.Y., Kim, T.E., Lee, J.M., Kim, I.K., and Namkoong, S.E. 2000. AAC-11 overexpression induces invasion and protects cervical cancer cells from apoptosis. *Lab Invest* **80**(4): 587-594.
- Kondo, M., Scherer, D.C., Miyamoto, T., King, A.G., Akashi, K., Sugamura, K., and Weissman, I.L. 2000. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* **407**(6802): 383-386.
- Krosil, G., He, G., Lefrancois, M., Charron, F., Romeo, P.H., Jolicoeur, P., Kirsch, I.R., Nemer, M., and Hoang, T. 1998. Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J Exp Med* **188**(3): 439-450.
- Lecuyer, E., Herblot, S., Saint-Denis, M., Martin, R., Begley, C.G., Porcher, C., Orkin, S.H., and Hoang, T. 2002. The SCL complex regulates c-kit expression in

- hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* **100**(7): 2430-2440.
- Li, C.L. and Johnson, G.R. 1994. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood* **84**(2): 408-414.
- Liao, E.C., Paw, B.H., Oates, A.C., Pratt, S.J., Postlethwait, J.H., and Zon, L.I. 1998. SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev* **12**(5): 621-626.
- Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. 1988. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* **167**(2): 400-406.
- Martin, R., Lahlil, R., Damert, A., Miquerol, L., Nagy, A., Keller, G., and Hoang, T. 2004. SCL interacts with VEGF to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development* **131**(3): 693-702.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P., and Elledge, S.J. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**(5828): 1160-1166.
- McArthur, G.A., Rohrschneider, L.R., and Johnson, G.R. 1994. Induced expression of c-fms in normal hematopoietic cells shows evidence for both conservation and lineage restriction of signal transduction in response to macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **83**(4): 972-981.
- Mikkola, H.K., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T.M., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. 2003. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* **421**(6922): 547-551.
- Miller, B.A., Floros, J., Cheung, J.Y., Wojchowski, D.M., Bell, L., Begley, C.G., Elwood, N.J., Kreider, J., and Christian, C. 1994. Steel factor affects SCL expression during normal erythroid differentiation. *Blood* **84**(9): 2971-2976.
- Miller, C.L., Rebel, V.I., Helgason, C.D., Lansdorp, P.M., and Eaves, C.J. 1997. Impaired steel factor responsiveness differentially affects the detection and long-term maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* **89**(4): 1214-1223.

- Morris, E.J., Michaud, W.A., Ji, J.Y., Moon, N.S., Rocco, J.W., and Dyson, N.J. 2006. Functional identification of Api5 as a suppressor of E2F-dependent apoptosis in vivo. *PLoS Genet* **2**(11): e196.
- Mouthon, M.A., Bernard, O., Mitjavila, M.T., Romeo, P.H., Vainchenker, W., and Mathieu-Mahul, D. 1993. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* **81**(3): 647-655.
- Nakajima, H. and Ihle, J.N. 2001. Granulocyte colony-stimulating factor regulates myeloid differentiation through CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *Blood* **98**(4): 897-905.
- Nishii, Y., Morishima, M., Kakehi, Y., Umehara, K., Kioka, N., Terano, Y., Amachi, T., and Ueda, K. 2000. CROP/Luc7A, a novel serine/arginine-rich nuclear protein, isolated from cisplatin-resistant cell line. *FEBS Lett* **465**(2-3): 153-156.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* **12**(13): 2048-2060.
- Nousiainen, M., Sillje, H.H., Sauer, G., Nigg, E.A., and Korner, R. 2006. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14): 5391-5396.
- O'Neil, J., Billa, M., Oikemus, S., and Kelliher, M. 2001. The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. *Oncogene* **20**(29): 3897-3905.
- Ogawa, M., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Hayashi, S., Kunisada, T., Nakao, J., Kina, T., Sudo, T., and Kodama, H. 1993. Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development* **117**(3): 1089-1098.
- Orkin, S.H. 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* **1**(1): 57-64.
- Pati, D., Zhang, N., and Plon, S.E. 2002. Linking sister chromatid cohesion and apoptosis: role of Rad21. *Mol Cell Biol* **22**(23): 8267-8277.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. 1991. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* **349**(6306): 257-260.

- Porcher, C., Liao, E.C., Fujiwara, Y., Zon, L.I., and Orkin, S.H. 1999. Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* **126**(20): 4603-4615.
- Price, E.R., Ding, H.F., Badalian, T., Bhattacharya, S., Takemoto, C., Yao, T.P., Hemesath, T.J., and Fisher, D.E. 1998. Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. *J Biol Chem* **273**(29): 17983-17986.
- Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R.C., and Melton, D.A. 2002. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* **298**(5593): 597-600.
- Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R.P., Metcalf, D., and Begley, C.G. 1995. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15): 7075-7079.
- Rodrigues, N.P., Janzen, V., Forkert, R., Dombkowski, D.M., Boyd, A.S., Orkin, S.H., Enver, T., Vyas, P., and Scadden, D.T. 2005. Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* **106**(2): 477-484.
- Russell, E.S. 1979. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* **20**: 357-459.
- Santoro, M.M., Samuel, T., Mitchell, T., Reed, J.C., and Stainier, D.Y. 2007. Birc2 (cIap1) regulates endothelial cell integrity and blood vessel homeostasis. *Nat Genet* **39**(11): 1397-1402.
- Scian, M.J., Stagliano, K.E., Ellis, M.A., Hassan, S., Bowman, M., Miles, M.F., Deb, S.P., and Deb, S. 2004. Modulation of gene expression by tumor-derived p53 mutants. *Cancer Res* **64**(20): 7447-7454.
- Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. 1995. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* **373**(6513): 432-434.
- Socolovsky, M., Dusanter-Fourt, I., and Lodish, H.F. 1997. The prolactin receptor and severely truncated erythropoietin receptors support differentiation of erythroid progenitors. *J Biol Chem* **272**(22): 14009-14012.
- Tewari, M., Yu, M., Ross, B., Dean, C., Giordano, A., and Rubin, R. 1997. AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal. *Cancer Res* **57**(18): 4063-4069.

Chapître IV : Discussion

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de clarifier le rôle de *Scl* au niveau de l'hématopoïèse adulte, plus particulièrement dans les cellules souches et les précurseurs hématopoïétiques. En effet, nous avons démontré la fonction cruciale de *Scl* dans la préservation à long terme des cellules souches hématopoïétiques par sa capacité à les maintenir quiescentes. Par ailleurs, nous avons aussi observé que *Scl* est essentiel pour soutenir la survie des progéniteurs hématopoïétiques. Nos résultats indiquent que *Scl* exerce ces différents rôles en réponse à l'environnement, ce qui révèle le rôle décisif des facteurs extrinsèques sur le destin cellulaire. De plus, ces études démontrent le caractère multifonctionnel de SCL qui varie en fonction de son niveau d'expression.

4.1. Rôle de *Scl* dans les cellules souches hématopoïétiques

Nous avons étudié le rôle de *Scl* au niveau des cellules souches hématopoïétiques adultes en utilisant un modèle de souris possédant un seul allèle fonctionnel de *Scl* (Elefanty et al. 1998). L'analyse de la cinétique de reconstitution suite à la transplantation en compétition des cellules *Scl*^{+/-} a permis de révéler le rôle essentiel de *Scl* au niveau des HSC responsables de la reconstitution à long terme. À 4 mois post-transplantation, la perte d'un allèle de *Scl* ne compromet pas la capacité de reconstitution des cellules souches hématopoïétiques. Par contre, l'analyse à 8 mois révèle une diminution importante de la compétitivité de la population KSL *Scl*^{+/-}, ce qui se traduit par une réduction de la proportion de cellules *Scl*^{+/-} dans les cellules différenciées de la moelle, du thymus et du sang. Cette défaillance des HSC *Scl*^{+/-} est aussi visible en transplantation secondaire démontrant le rôle capital de *Scl* dans le maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques. De plus, nous avons aussi observé que la surexpression de *Scl* cause une augmentation de la population KSL CD34⁻ lors de la transplantation de cellules *Scl*^{tg} en compétition avec des cellules *WT* (Annexe 1). Les phénotypes inverses obtenus avec le gain et la perte de fonction de *Scl* indiquent clairement que *Scl* est essentiel à la préservation du potentiel à long terme des cellules souches hématopoïétiques adultes.

4.1.1. *Scl* est-il une *condition* nécessaire dans les cellules souches ?

Nos travaux démontrent le rôle capital de *Scl* au niveau de la fonction à long terme des cellules souches hématopoïétiques adultes. Par contre, des études précédentes utilisant un modèle de souris dont la délétion complète de *Scl* est induite chez l'adulte sont en désaccord avec nos observations (Mikkola et al. 2003; Curtis et al. 2004) et ces divergences s'expliquent probablement par les différentes approches expérimentales.

Le potentiel des cellules souches est évalué par leur capacité à reconstituer les différentes populations hématopoïétiques après transplantation. Par contre, il est primordial de connaître le nombre de cellules souches que l'on transplante afin d'évaluer leur potentiel adéquatement. Dans le cadre de notre étude, nous avons d'abord vérifié si la perte de *Scl* influençait le nombre de cellules souches en utilisant deux approches : 1) quantification phénotypique de la population SLAM-KSL par cytométrie en flux dans les souris *Scl*^{+/-} et *WT* en condition normale et 2) quantification fonctionnelle par transplantation de cellules *Scl*^{+/-} et *WT* en dilution limite (CRU). La diminution des niveaux de *Scl* n'altère pas de manière significative la fréquence des cellules souches et confirme que la diminution importante de la compétitivité des cellules souches *Scl*^{+/-} en transplantation est directement causée par une réduction de leur potentiel et non de leur nombre. Par contre, les études de Mikkola et al. et Curtis et al. ne semblent pas tenir compte de l'effet de la délétion de *Scl* sur la fréquence des cellules souches lors de l'analyse de leur potentiel de reconstitution. Or, l'induction de la perte complète de *Scl* chez la souris adulte cause une expansion de quatre fois de la population KSL enrichie en cellules souches (Curtis et al. 2004). Lors de leur étude, Mikkola et al. ainsi que Curtis et al. ont transplanté des cellules de moelle *Scl*^{-/-} en compétition avec des cellules *WT* et ont analysé le potentiel de reconstitution de ces deux populations entre 4 et 6 après la transplantation. La capacité de reconstitution de la population *Scl*^{-/-} a été calculé en assumant que la fréquence de cellules souches dans la fraction *Scl*^{-/-} et *WT* était la même ce qui n'est pas le cas. Si on considère que la fréquence de cellules souches est quatre fois plus élevée dans la moelle *Scl*^{-/-}, il semble que la perte de *Scl* défavorise clairement les cellules souches hématopoïétiques adultes. Effectivement,

une augmentation de quatre fois de leur nombre ne suffit pas pour compétitionner avec les cellules *WT*.

À première vue, l'augmentation de la proportion de cellules KSL provoquée par l'absence de *Scf* peut sembler en désaccord avec nos résultats (Curtis et al. 2004). Or, étant donné son rôle dans le cycle cellulaire, il est possible que la réduction des niveaux de *Scf* cause des effets différents en fonction du temps. À court terme, l'absence de *Scf* est susceptible de provoquer une augmentation du nombre de cellules souches causée par l'accroissement de la fréquence de division de ces cellules. Par contre, une fois qu'une cellule souche est activée celle-ci est rapidement sollicitée pour se différencier et ne fait donc plus partie du réservoir disponible pour soutenir la reconstitution à long terme. Une augmentation de l'entrée en G1 se caractérise donc par une incapacité des cellules souches à se maintenir à long terme. Un phénomène similaire a été observé dans le cas de la perte de *Gfi1*, un facteur essentiel au maintien de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques (Hock et al. 2004; Zeng et al. 2004). En fait, défavoriser la quiescence des cellules souches semble se caractériser par une augmentation de leur nombre à court terme causant une défaillance de leur maintien à long terme.

Ces résultats illustrent la difficulté d'analyser les cellules souches étant donné qu'elles sont étudiées indirectement, c'est-à-dire par leur fonction de multipotentialité et d'autorenouvellement en transplantation. Ces observations indiquent aussi que le choix de l'approche expérimentale est un paramètre important à considérer pour les analyser adéquatement. Dans notre cas, l'utilisation d'une souris hétérozygote se justifie par le fait que l'ablation totale de *Scf* est létale au stade embryonnaire et qu'aucune cellule hématopoïétique n'est formée dans ces embryons (Robb et al. 1995a; Shivdasani et al. 1995). Par contre, en comparaison avec la délétion inductible, la perte d'un allèle à partir du développement embryonnaire est plus susceptible de permettre l'apparition de mécanismes compensatoire pouvant masquer le rôle de *Scf*. En effet, l'expansion de la population KSL observée après l'ablation conditionnelle de *Scf* chez l'adulte n'est pas visible dans la souris *Scf^{+/+}* utilisée lors de notre étude, ce qui peut s'expliquer par la

présence d'un allèle fonctionnel de *Scl* dans ces souris ou par des mécanismes de compensation mis en place au cours du développement.

4.1.2. Rôle de *Scl* dans la quiescence

La déficience des cellules souches *Scl*^{+/-} ne s'accompagne pas d'une augmentation de la différenciation étant donné que nous n'observons pas d'expansion au niveau des cellules matures lors de leur analyse après transplantation. Par contre, nos travaux ont permis de révéler le rôle crucial de *Scl* dans le contrôle de l'entrée des cellules souches dans le cycle cellulaire. Ces résultats démontrent que l'incapacité des cellules souches *Scl*^{+/-} à se maintenir en fonction du temps est causée par une déficience au niveau du contrôle de leur quiescence plutôt que de leur différenciation. À l'aide de deux techniques différentes permettant de distinguer la phase G0 de la phase G1, nous avons évalué l'effet de la perte d'un allèle de *Scl* sur le cycle cellulaire au niveau de la population SLAM-KSL hautement enrichie en cellules souches (Kiel et al. 2005). De cette manière, nous avons observé que la réduction des niveaux d'expression de *Scl* facilite la transition G0-G1 au niveau des cellules souches hématopoïétiques sans affecter les progéniteurs. De plus, nos données suggèrent que *Scl* contrôle la transition G0-G1 à deux niveaux : 1) en conditions physiologique, *Scl* freine l'activation des cellules souches pour favoriser leur maintien à long terme, et 2) en présence de signaux prolifératifs, *Scl* limite l'entrée des HSC en G1 pour prévenir leur réponse excessive et empêcher la déplétion précoce du réservoir de cellules souches.

Afin de déterminer le rôle de *Scl* dans l'activation des HSC, nous avons évalué l'effet de la perte d'un allèle de *Scl* sur le cycle cellulaire des cellules souches après leur passage en culture avec un cocktail de cytokines (IL-11, Steel Factor, IL-6). En effet, la facilité des cellules souches *Scl*^{+/-} à transiter de G0 vers G1 est accentuée après 24 heures de stimulation avec des cytokines, ce qui démontre le rôle de *Scl* dans le maintien de la quiescence en réponse aux signaux prolifératifs. Ces résultats corrélerent avec nos observations révélant que malgré le nombre normal de cellules souches dans les souris

Scl^{+/-} en condition physiologique, leur potentiel est grandement diminué en fonction du temps écoulé depuis leur transplantation. En effet, la transplantation impose une pression proliférative majeure sur les cellules souches (Annexe 2), car celles-ci doivent reconstituer l'hématopoïèse de la souris irradiée et ces conditions permettent de révéler le rôle de *Scl* dans la reconstitution hématopoïétique post-transplantation.

Bien que nous ayons confirmé que les niveaux protéiques de SCL sont diminués dans les cellules hématopoïétiques des souris *Scl*^{+/-}, nous nous sommes assuré que le phénotype de ces cellules est spécifiquement causé par la perte de *Scl*. Dans cette optique, nous avons traité des cellules de moelle osseuse *WT* avec des shRNA dirigés spécifiquement contre SCL et analysé l'effet de la diminution de SCL sur le cycle cellulaire des cellules SLAM-KSL. En utilisant cette approche, nous avons exprimé différents shRNA réduisant efficacement l'expression de SCL ce qui nous a permis d'observer une diminution de 50% de la proportion de cellules souches en G0. Au cours de ces manipulations, les cellules ont été en culture durant cinq jours avant l'analyse du cycle cellulaire, ce qui a permis d'observer un effet plus robuste contrairement aux cellules *Scl*^{+/-} fraîchement isolées. Bien que ces différences puissent être causées par une diminution plus importante des niveaux de SCL en utilisant les shRNA, ces résultats suggèrent que *Scl* est requis empêcher l'activation excessive des cellules souches et ainsi prévenir leur déplétion.

Les résultats précédents démontrent le rôle majeur de *Scl* au niveau de la transition G0-G1 lorsque les cellules souches sont soumises à une pression proliférative importante. De plus, l'analyse des niveaux d'ARNm de *Scl* démontre que son expression diminue dans les cellules souches lorsque celles-ci sont en culture, suggérant ainsi que l'expression de *Scl* doit être réprimée pour permettre l'activation des cellules souches. En fait, on peut penser que la diminution des niveaux de *Scl* dans les cellules souches initierait la mise en place des mécanismes présents lorsque ces cellules sont stimulées *in vitro* expliquant leur plus grande susceptibilité à entrer dans le cycle cellulaire. En effet, l'expression de *p21* est fortement diminuée dans les cellules souches *Scl*^{+/-} de même que dans les cellules *WT* en cycle. Par ailleurs, l'expression de *Scl* diminue lorsque les cellules souches mûrent pour devenir des

progéniteurs. Ces cellules étant hautement prolifératives, cette observation suggère aussi que l'expression de *Scl* doit diminuer pour permettre l'entrée dans le cycle cellulaire et associe l'expression de *Scl* à la quiescence.

4.1.2.1. *Scl* et la réponse au stress

Scl a aussi été associé à la quiescence par un autre groupe de recherche ce qui appuie nos résultats (Venezia et al. 2004). Pour en arriver à cette conclusion, cette équipe a utilisé une combinaison de deux approches : soit 1) la comparaison du profil d'expression des cellules souches adultes et fœtales et 2) la comparaison du profil d'expression des cellules souches adultes en condition normale et soumises à un traitement au 5'FU. Durant le développement embryonnaire, les cellules souches résident dans le foie fœtal où elles s'expandent avant de coloniser la moelle osseuse avant la naissance. En plus de proliférer davantage que les cellules souches adultes, les cellules du foie fœtal expriment aussi des marqueurs de surface différents tels que Mac1 et AA4.1 (Jordan et al. 1990; Morrison et al. 1995). Les cellules souches hématopoïétiques adultes sont majoritairement en quiescence et l'injection de 5'FU chez la souris tue les cellules en cycle et les cellules souches quiescentes ainsi épargnées sont amenées à proliférer pour reconstituer la moelle déplétée (Randall and Weissman 1997). En plus de ces changements prolifératifs, les cellules souches soumises au 5'FU se caractérisent par l'expression de Mac1 et AA4.1 (Szilvassy and Cory 1993; Randall and Weissman 1997). La présence de stress semble donc permettre la réactivation des programmes présents durant l'embryogénèse.

Ces observations ont donc permis à Venezia et al. de développer une stratégie permettant de mieux connaître les mécanismes régulant la quiescence et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Suite au traitement au 5'FU, les cellules souches prolifèrent pour atteindre un pic 5-6 jours après le traitement et retournent à leur état normal après dix jours. Les gènes dont l'expression change lorsque les cellules souches prolifèrent plus sont associés à la prolifération tandis que les gènes dont l'expression change au moment où les cellules prolifèrent moins sont associés à la quiescence. Afin de

valider cette association et de raffiner leur analyse, les auteurs ont comparé ces groupes de gènes à ceux différentiellement exprimés entre les cellules souches hématopoïétiques adultes et foetales. Cette approche a permis d'identifier un groupe de gènes associé à la quiescence dont *Stat3* et *Gata2* qui sont tout deux essentiels à la préservation des cellules souches (Oh and Eaves 2002; Rodrigues et al. 2005). De plus, cette stratégie a aussi permis d'identifier *p21*, un gène indispensable au maintien de la quiescence dans les cellules souches hématopoïétiques (Cheng et al. 2000b), ainsi que *Scl* dont nous avons démontré le rôle essentiel dans la quiescence et le maintien des HSCs. Le traitement au 5'FU se caractérise par une pause où les cellules sont superquiescentes juste avant le pic de prolifération ce qui permettrait aux cellules de survivre au stress cytotoxique et de se préparer pour reconstituer l'hématopoïèse. Les auteurs de cette étude observent que l'expression de *Scl* et *p21* est maximale au jour 1 suite au traitement au 5'FU. Ces observations sont en accord avec nos résultats démontrant que *Scl* est requis tôt pour empêcher une activation excessive des cellules souches et suggèrent que *Scl* soit requis pour protéger les HSC en réponse au stress.

4.1.2.2. *Scl* et le contrôle de la transition des HSC du stade foetal vers le stade adulte

Le travail de Venezia et al. démontre que l'expression de *Scl* est plus élevée dans les cellules souches adultes contrairement aux cellules souches foetales suggérant que *Scl* puisse aussi être impliqué au niveau de la transition développementale des HSC du stade foetal vers le stade adulte qui se caractérise par l'entrée en G0 des HSC. Ces résultats sont corroborés par un autre groupe de recherche (Bowie et al. 2007b) qui s'intéresse à ce switch développemental des cellules souches hématopoïétiques embryonnaire vers le stade adulte. Les données de ce laboratoire indiquent que les cellules souches présentes chez la souris après la naissance possèdent des propriétés foetales et que la transition vers le stade adulte se fait entre la troisième et la quatrième semaine après la naissance. La transplantation de cellules de foie foetal ou de cellules de moelle osseuse de souris âgées de 3, 4 ou 12 semaines démontrent que la fréquence de cellules souches est semblable pour le foie foetal et la moelle osseuse de 3 semaines, tandis qu'elle diminue significativement à 4 semaines

pour rester constante au moins jusqu'à la douzième semaine. Les auteurs de cette étude ont aussi observé que les cellules souches fœtales répondent plus rapidement à leur environnement, étant donné qu'en culture ces cellules commencent à se diviser plus tôt que les cellules adultes bien que la vitesse de division soit la même dans les deux cas. Les cellules souches fœtales et adultes se caractérisent par des propriétés différentes au niveau de l'état de leur cycle cellulaire ce qui corrèle avec le passage d'un autorenewement d'expansion dans le foie fœtal vers un autorenewement de maintenance dans la moelle osseuse adulte. Cependant, les gènes qui contrôlent cette transition ne sont pas connus, mais l'expression plus élevée de *Scl* au niveau des cellules souches adultes, c'est-à-dire après la transition développementale, suggère que *Scl* puisse être impliqué dans cette transition et donc à l'acquisition de la propriété de quiescence des cellules souches adultes.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons évalué le rôle de *Scl* au niveau du cycle cellulaire des cellules souches provenant de souris âgées de trois semaines, c'est-à-dire avant la transition développementale vers le stade adulte et nous avons observé que la perte d'un allèle de *Scl* ne facilite pas l'entrée dans le cycle cellulaire des HSC de souris âgées de trois semaines avant ou après leur stimulation avec des cytokines. Sachant que *Scl* est peu ou pas exprimé à ce stade, il est normal de constater que la diminution de *Scl* ne cause aucun effet dans ces conditions. Ainsi, nos résultats démontrent la fonction spécifique de *Scl* au niveau du cycle cellulaire des cellules souches adultes et suggèrent que *Scl* puisse jouer un rôle important dans la progression des cellules souches du stade fœtal vers le stade adulte bien que cette hypothèse reste à être confirmée. Il serait évidemment important de vérifier si la surexpression de *Scl* chez les jeunes souris provoque la transition prématurée des cellules souches vers le stade adulte. Or, des résultats préliminaires indiquent qu'une surexpression de *Scl* dans la moelle de souris adultes diminue le pourcentage de cellules en S/G2/M (Annexe 3), suggérant que cette expérience transposée dans des cellules souches fœtales pourrait donner les mêmes résultats.

4.1.2.3. *Scl* parmi les régulateurs du cycle cellulaire

Afin de comprendre comment *Scl* régule l'entrée dans le cycle cellulaire des cellules souches, nous avons analysé le profil d'expression génique des cellules souches *Scl*^{+/-} et *WT*. Ces analyses suggèrent que *Scl* contrôle directement l'expression transcriptionnelle de *p21*, un joueur essentiel au maintien de la quiescence des cellules souches (Cheng et al. 2000b). *p21* est un inhibiteur du cycle cellulaire dont la perte de fonction cause une déplétion du pool de cellules souches hématopoïétiques provoquée par une diminution du maintien de ces cellules en G0. Bien que ce rôle pour *p21* ait été remis en question par une étude subséquente (van Os et al. 2007), la perte de fonction de gènes favorisant la quiescence (*Gfi1*, *Cdc42*, *Wnt*) et donc le maintien à long terme des cellules souches se caractérise par une diminution de l'expression de *p21* (Hock et al. 2004; Zeng et al. 2004; Yang et al. 2007; Fleming et al. 2008). La sous-famille de facteur de transcription FoxO contrôle l'expression de *p21* (Seoane et al. 2004), et la délétion de certains de ces membres au niveau des cellules souches hématopoïétiques cause une diminution du nombre de ces cellules associée à une augmentation de leur entrée en cycle (Miyamoto et al. 2007; Tothova et al. 2007). Il semble donc que *p21* ait un rôle central à jouer dans la régulation de la quiescence et donc dans la fonction à long terme des cellules souches. Par contre, la validité biologique de la diminution de l'expression de *p21* dans les cellules souches *Scl*^{+/-} reste à confirmer. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de générer des souris *Scl*^{+/-}*p21*^{-/-} et de déterminer si l'absence de *p21* exacerbe l'effet de la perte de *Scl* en transplantation de même qu'au niveau de la transition G0-G1. De plus, si *Scl* agit en amont de *p21*, la perte d'un allèle de *Scl* dans les cellules souches *p21*^{-/-} ne devrait pas aggraver leur phénotype, bien qu'il n'est pas certain que l'effet de *Scl* soit exclusivement médié par *p21*. Alors que *Gfi1* et *Scl* convergent pour moduler l'activité de *p21* afin de maintenir les cellules souches en quiescence, l'expression de *Gfi1* ne semble pas régulée par *Scl* étant donné que son expression n'est pas perturbée dans les cellules souches *Scl*^{+/-}. Ces observations suggèrent que *Scl* et *Gfi1* régulent *p21* de façon indépendante ou bien que la fonction de *Scl* se situe en aval de *Gfi1*. La surexpression de *Gfi1* dans les cellules *Scl*^{+/-} pourrait permettre de répondre à cette interrogation. Si *Scl* agit en aval de *Gfi1*, la

surexpression de *Gfi1* dans les cellules *Scl*^{+/-} devrait amener une restauration des niveaux de *Scl* et rétablir l'expression de *p21* dans les cellules souches *Scl*^{+/-} de même que favoriser leur retour en G0. Par contre, si la surexpression de *Gfi1* ne permet pas de corriger les défauts des cellules *Scl*^{+/-}, c'est que *Scl* et *Gfi1* sont tous les deux requis indépendamment pour activer l'expression de *p21* et maintenir les cellules souches en quiescence.

Nos analyses d'expression géniques sont biaisées dans la mesure où nous nous sommes attardés aux gènes dont le rôle dans le maintien de la quiescence est documenté. Nous ne pouvons donc pas exclure que *Scl* soit impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes dont le rôle au niveau de cette fonction n'est pas encore connu. Afin de répondre à cette interrogation, nous proposons de trier des cellules souches *WT* en G0 et G1 et de comparer leur profil d'expression par une analyse non biaisée utilisant les micropuces d'ADN. De cette manière, nous serons en mesure d'identifier plusieurs gènes susceptibles de contrôler cette transition. Ensuite, la comparaison des gènes modulés lors du passage G0-G1 dans les cellules souches *WT* et *Scl*^{+/-} permettra d'identifier des gènes potentiellement régulés par *Scl* au niveau de cette transition.

Par contre, en ce qui concerne les mécanismes menant à la régulation de *Scl*, nous avons pour l'instant très peu d'indices. Il a été démontré récemment que c-Kit est requis pour le maintien de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques (Thoren et al. 2008). Nos résultats montrent que *Scl* agit en aval de c-kit dans les progéniteurs hématopoïétiques et certaines données préliminaires suggèrent que ce soit aussi le cas dans les cellules souches (section 4.2.1). Il est donc possible que c-Kit favorise la quiescence des HSC par sa capacité à activer l'expression de *Scl*. Étant donné que *Scl* est impliqué dans le maintien de la quiescence, il est probable que les voies de signalisation menant à l'induction de son expression sont celles qui sont actives dans les cellules souches hématopoïétiques se trouvant dans la niche sachant que l'interaction avec la niche est essentielle au maintien de la quiescence. En effet, il a été démontré que les cellules souches expriment le récepteur Tie-2 et que l'interaction de ce récepteur avec son ligand Ang-1

exprimé par les ostéoblastes médie l'interaction des cellules souches avec la niche et donc maintient les cellules en quiescence (Arai et al. 2004). Sachant que *Scl* est essentiel pour maintenir les cellules en quiescence, il est possible que *Scl* agisse en aval du récepteur Tie-2. Si tel est le cas, l'augmentation de la proportion de cellules en quiescence observée lors du traitement de HSC *WT* avec Ang-1 devrait être réduite lorsque des cellules souches *Scl*^{+/-} sont traitées à l'angiopoïétine. De plus, la stimulation de HSC *WT* avec Ang-1 devrait causer une augmentation de l'expression de *Scl* dans ces cellules. La voie de Wnt est aussi connue pour maintenir les cellules souches en quiescence. En effet, il a été démontré que l'expression spécifique au niveau des ostéoblastes d'un inhibiteur de la voie de Wnt, *Dkk1*, cause une diminution spécifique de l'activité de la voie de Wnt dans les cellules souches ainsi qu'une augmentation de leur entrée en cycle (Fleming et al. 2008). Cette diminution de la quiescence s'accompagne aussi d'une diminution de l'expression de *p21*. Étant donné que la diminution des niveaux de *Scl* cause un phénotype semblable à l'inhibition de la voie de Wnt, il est possible que *Scl* soit régulé par cette voie de signalisation. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait déterminer si les niveaux d'expression de *Scl* sont diminués dans les cellules souches des souris exprimant *Dkk1*. Si tel est le cas, on pourrait aussi vérifier si la surexpression de *Scl* dans les souris exprimant l'inhibiteur de Wnt permet de restaurer la quiescence et l'expression de *p21* dans les cellules souches hématopoïétiques.

4.1.2.3. Rôle antiprolifératif de *E2a* dans les cellules souches hématopoïétiques

Sachant que SCL doit s'hétérodimériser avec E2A pour lier l'ADN et activer la transcription (Hsu et al. 1991; Hsu et al. 1994), nous avons aussi étudié le rôle de *E2a* dans les cellules souches hématopoïétiques afin de solidifier nos conclusions concernant le rôle de *Scl* dans ces cellules. Comme SCL et E2A agissent ensemble pour contrôler l'expression transcriptionnelle de c-Kit, un récepteur essentiel à la survie des cellules souches hématopoïétiques (Lecuyer et al. 2002), il est fort probable que *E2a* soit aussi impliqué dans la fonction de ces cellules. De plus, une étude antérieure de notre laboratoire a démontré le rôle antiprolifératif de *E2a* dans les lymphocytes B et suggère que ce rôle soit

médié par *p21* (Herblot et al. 2002). À l'aide d'essais de transplantation en série, nous avons observé que les cellules *E2a*^{-/-} ne peuvent pas reconstituer l'hématopoïèse d'une souris irradiée à la quatrième transplantation, tandis que les cellules *WT* possèdent toujours ce potentiel (Annexe 4A-B). Ces résultats démontrent que *E2a* est essentiel au maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques et corrélient avec le rôle de *Scl* dans ces cellules. Nous avons évalué l'effet de la perte d'un allèle de *E2a* au niveau de la fréquence des cellules souches dans la moelle osseuse et nous n'avons observé aucune différence comparativement aux souris *WT* (Annexe 4C-D). Par ailleurs, la diminution des niveaux protéiques de E2A, que ce soit par la perte d'un allèle ou par l'utilisation de shRNA, facilite la transition G0-G1 au niveau des cellules souches hématopoïétiques (Annexe 5-6). Bien que la diminution des niveaux de E2A semble aussi affecter les cellules progénitrices et matures, l'effet au niveau des cellules souches est plus accentué (Annexe 5B et 6C). De surcroît, les cellules souches possédant un seul allèle fonctionnel de *E2a* se caractérisent par une faible expression de *p21* par rapport aux cellules souches *WT* (Annexe 7). Combinés, ces résultats démontrent clairement que *E2a* n'est pas impliqué dans le contrôle de la grosseur du réservoir de cellule souches, mais plutôt dans la modulation du potentiel des HSC en limitant leur sortie du cycle cellulaire. La similitude des phénotypes observés en diminuant les niveaux de SCL ou E2A, suggère que ces deux facteurs de transcription interagissent au sein des mêmes complexes au niveau des cellules souches pour les garder en G0 et favoriser leur maintien à long terme.

Bien que la perte de fonction complète de *E2a* soit létale, les embryons *E2a*^{-/-} possèdent un foie fœtal qui contient des cellules souches (Bain et al. 1994; Zhuang et al. 1994), ce qui contraste avec la perte de fonction de *Scl* où les embryons ne possèdent aucune cellule hématopoïétique (Robb et al. 1995a; Shivdasani et al. 1995). De plus, on doit effectuer quatre transplantations pour constater la déficience de reconstitution des cellules *E2a*^{-/-}, tandis que la défaillance des cellules *Scl*^{+/-} est visible à la première transplantation. Or, si SCL et E2A agissent comme partenaire dans les cellules souches hématopoïétiques, la déficience provoquée par leur perte devrait causer le même phénotype lors des essais de transplantation. Bien que cette divergence puisse s'expliquer par la

présence de cellules compétitrices *WT* lors de la transplantation de cellules *Scl*^{+/-} contribuant ainsi à révéler leurs défauts plus rapidement, il se peut aussi que SCL interagisse avec d'autres protéines pour assurer ses fonctions et qu'il y ait une certaine redondance au niveau de la fonction de *E2a*. Dans cette optique, nous avons évalué le rôle de *Heb* dans le contrôle du cycle cellulaire des cellules souches, HEB étant un facteur de transcription de la même famille que *E2A* pouvant lier l'ADN au sein d'un complexe protéique contenant SCL (Tremblay et al. 2003). Nous avons donc analysé le cycle cellulaire des cellules souches de moelle osseuse possédant un seul allèle fonctionnel de *Heb* et observé une diminution spécifique de la proportion de cellules en G0 dans la population de cellules souches comparativement aux cellules plus matures (Annexe 8). Bien que le rôle de HEB au niveau de la fonction des cellules souches reste à confirmer par transplantation, ces données préliminaires suggèrent que SCL puisse interagir aussi bien avec *E2A* ou HEB pour favoriser la quiescence des HSCs.

4.1.3. Quiescence et longévité

En présence de conditions limitantes certains animaux vont entrer en état de dormance (hibernation, torpeur, estivation, diapause) pour minimiser leur besoin énergétique et augmenter leur chance de survie jusqu'à ce que les conditions redeviennent favorables. Cet état restrictif est associé à une augmentation de la longévité chez plusieurs organismes. Par exemple, chez *C. elegans*, une réduction de la demande énergétique induit une modification de l'expression génique et s'accompagne d'une diminution du métabolisme et du vieillissement qui coïncide avec l'entrée en quiescence. En effet, le stade larvaire durable chez *C. elegans* est un état quiescent où le métabolisme est réduit de 50% et ces larves peuvent vivre jusqu'à 6 mois, tandis que la durée de vie des adultes actifs est de 3 semaines (Stuart and Brown 2006). De plus, chez la souris, la diminution de l'apport calorique peut induire des période de torpeur (quiescence) et augmente la longévité de 50% (Koizumi et al. 1992). Cette augmentation de la durée de vie suite à l'entrée en quiescence semble être causée par une augmentation de la résistance au stress physiologique. En effet, la sélection de *D. melanogaster* selon leur résistance à divers

stress physiologiques amène l'apparition de souches dont la longévité est accrue (Rose et al. 1992). De même, le croisement sélectif de *C. elegans* selon la résistance à la chaleur amène l'apparition de populations qui vivent plus longtemps (Munoz 2003; Munoz and Riddle 2003).

Au niveau cellulaire, la quiescence se caractérise par la sortie du cycle cellulaire en réponse au stress ou à des conditions où les ressources énergétiques sont plus rares. Cette entrée en G0 se caractérise par une diminution de la transcription, de la traduction, du métabolisme et une réduction de la taille cellulaire. Bien que l'on croyait initialement que la quiescence était une voie adoptée par défaut en absence de signal induisant la croissance et la division cellulaire, il semble en fait que la quiescence soit contrôlée transcriptionnellement. L'analyse du profil d'expression de lymphocytes T et B a révélé que leur activation requiert l'induction de l'expression de gènes contrôlant la croissance, mais aussi la répression des gènes maintenant un programme de quiescence (Yusuf and Fruman 2003). De plus, d'autres études d'expression génique ont démontré que différents programmes transcriptionnels étaient activés dépendamment de l'événement initiant la quiescence (Coller et al. 2006). Bien que ces observations indiquent que la quiescence soit contrôlée transcriptionnellement, il n'en demeure pas moins que peu de facteurs de transcription ont été impliqués dans cette fonction jusqu'à maintenant.

4.1.3.1. La résistance au stress

Au niveau de plusieurs systèmes biologiques (peau, muscles, neurones), il a été observé que les cellules souches à la base de ces systèmes sont majoritairement en quiescence. Plus particulièrement dans le système hématopoïétique, il a été démontré que les cellules quiescentes sont responsables de la reconstitution à long terme de l'hématopoïèse (Morrison and Weissman 1994; Huttman et al. 2001). En fait, la capacité de ces cellules à entrer en quiescence cause probablement une augmentation de leur longévité en favorisant leur résistance au stress tels que les radicaux libres, l'irradiation, les agents chimiques et carcinogènes. Plusieurs études associent effectivement la quiescence

des cellules souches hématopoïétiques à la résistance au stress ; faciliter leur entrée dans le cycle cellulaire cause effectivement une augmentation de leur sensibilité à l'irradiation ou au traitement au 5'FU (Cheng et al. 2000b; Zeng et al. 2004; Lacorazza et al. 2006). De plus, certains régulateurs connus de la résistance au stress et de la longévité contrôlent ces fonctions au niveau des cellules souches hématopoïétiques (Zhang et al. 2006; Miyamoto et al. 2007; Tothova et al. 2007).

La sous-famille de facteur de transcription FOXO joue un rôle important dans plusieurs processus dont l'arrêt du cycle cellulaire, la réponse au stress et l'apoptose (Greer and Brunet 2005). En absence de facteur de croissance ou en présence de stress, FOXO est séquestré au noyau et active plusieurs gènes dont *p21* et *p27* pour promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire (Medema et al. 2000; Kops et al. 2002b; Seoane et al. 2004). Les protéines FOXO sont aussi impliquées dans la réponse au stress oxydatif en induisant entre autre *MnSOD*, *catalase* et *Gadd45* (Kops et al. 2002a; Nemoto and Finkel 2002; Tran et al. 2002). Au niveau du système hématopoïétique, l'ablation génique de *FoxO1/3/4* cause une augmentation de l'apoptose dans les cellules souches hématopoïétiques et une augmentation de leur contenu en radicaux libres qui corrèle avec une déficience de reconstitution à long terme (Tothova et al. 2007). Par ailleurs, un autre groupe de recherche a démontré que l'inactivation de *FoxO3a* cause une diminution de la quiescence des cellules souches de même qu'une augmentation de leur sensibilité au 5'FU (Miyamoto et al. 2007).

La voie de signalisation mTOR contrôle la croissance cellulaire et la survie par sa sensibilité aux facteurs de croissance et aux nutriments et chez la levure, l'inhibition de cette voie provoque l'entrée en quiescence (Barbet et al. 1996; Hardwick et al. 1999). Cette voie de signalisation est régulée entre autre par la PI3Kinase dont l'activité est contrôlée par la phosphatase PTEN. Sachant que la présence de *Pten* est essentielle à la quiescence des cellules souches hématopoïétiques et à leur maintien à long terme (Zhang et al. 2006), ceci suggère que mTOR puisse aussi y jouer un rôle. En effet, il est possible que la perte de

Pten en provoquant l'activation excessive de la voie PI3Kinase-Akt converge vers mTOR et favorise l'entrée dans le cycle cellulaire.

Les observations précédentes suggèrent que les mécanismes impliqués dans la régulation de la quiescence et de la longévité sont conservés au niveau des cellules souches hématopoïétiques. Les travaux présentés dans cette thèse démontrent que *Scf* est impliqué dans le maintien à long terme des HSC en contrôlant leur entrée dans le cycle cellulaire. Bien que SCL soit un facteur de transcription tissu-spécifique, il est probable que les voies de signalisation contrôlant son expression et son activité soient ubiquitaires. La voie de signalisation contrôlée par la PKA doit être réprimée pour permettre la quiescence et son activation est décisive pour l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire (Jiang et al. 1998; Pedruzzi et al. 2003). Il a précédemment été démontré que SCL est phosphorylé au niveau de la sérine 172 par la PKA et que cette phosphorylation est associée à une diminution de capacité de SCL à lier l'ADN (Prasad et al. 1995; Prasad and Brandt 1997). Il est donc possible que l'activation de la PKA favorise la prolifération des cellules souches hématopoïétiques par son action inhibitrice au niveau de la fonction de SCL en diminuant sa capacité à activer ses gènes cibles (*p21*) responsables du maintien des cellules en quiescence. Bien que l'on ait démontré que l'expression transcriptionnelle de *Scf* diminue lorsque les cellules entrent en cycle, cela n'exclue pas qu'il puisse aussi exister des mécanismes de régulation post-traductionnelles qui modulent l'activité de SCL et donc la quiescence.

4.1.3.2. Quiescence et transition fœtale-adulte

La quiescence est un mécanisme où les fonctions biologiques sont réduites au minimum ce qui permet de maintenir l'intégrité cellulaire en conditions défavorables. L'induction de la quiescence au niveau des cellules souches hématopoïétiques est associée à la transition du stade fœtal vers le stade adulte (Bowie et al. 2006). Sachant que les mécanismes impliqués dans la résistance au stress contrôlent aussi la quiescence dans les HSC, il est donc intéressant de se demander si la quiescence induite chez l'adulte n'est pas

une réponse à un environnement moins favorable. Bien que la moelle osseuse est un environnement riche en cytokines et facteurs de croissance permettant la prolifération des précurseurs et la différenciation des cellules matures, cet environnement ne semble pas favoriser l'expansion des cellules souches hématopoïétiques. En effet, il a été démontré que les cellules souches fœtales responsables de la reconstitution à long terme sont majoritairement en G1/S/G2/M tandis que dans la moelle osseuse adulte ces cellules sont principalement dans la phase G0 (Bowie et al. 2006). De plus, la fréquence et la compétitivité des cellules souches sont plus élevées dans le foie fœtal comparativement à la moelle osseuse (Rebel et al. 1996; Harrison et al. 1997) et la capacité des cellules souches fœtales à répondre plus rapidement à leur environnement en est probablement la cause (Bowie et al. 2007b). Par ailleurs, la fréquence de CRU dans le foie fœtal préalablement transplanté dans une souris irradiée est similaire à la fréquence observée chez la souris adulte ce qui démontre que le passage des cellules souches fœtales dans la moelle osseuse cause une diminution de leur potentiel d'expansion (Bowie et al. 2007b). Il semble donc que la moelle osseuse ne soit pas un environnement aussi permissif que le foie fœtal en ce qui a trait à l'expansion des cellules souches ce qui indique que l'environnement adulte restreint le potentiel prolifératif de ces cellules. L'activation des mécanismes favorisant la quiescence serait donc une réponse à cet environnement moins favorable et permettrait d'augmenter la longévité des cellules souches et de favoriser leur maintien tout au long de la vie.

Par contre, bien que l'entrée dans le cycle cellulaire provoqué par la transplantation chez l'adulte se traduise par une déplétion du pool de cellules souches, l'activité proliférative au niveau des cellules souches fœtales est associée à leur expansion. La raison de cette divergence doit certainement résider dans les différents mécanismes gouvernant la division cellulaire dans le foie fœtal et la moelle osseuse. Plus précisément, l'environnement fœtal doit favoriser la division symétrique générant deux cellules souches filles, tandis que lors de transplantation, l'environnement adulte doit plutôt supporter la division cellulaire générant deux cellules plus matures. Il semble donc que l'expansion des

cellules souches soit un attribut du stade fœtal que l'environnement adulte ne permet pas de supporter de façon soutenue.

4.2. *Scl* et la réponse à l'environnement

Le récepteur c-Kit régule la survie et la différenciation des mélanocytes en contrôlant l'activité du facteur de transcription MiTF révélant la capacité de cette voie de signalisation à moduler activement le destin cellulaire (Hemesath et al. 1998; Price et al. 1998; Wu et al. 2000). Au niveau du système hématopoïétique, des études précédentes ont démontrées que l'expression de *Scl* est associée à la capacité du ligand de c-Kit (Steel Factor) à supporter la survie des cellules CD34⁺, une population contenant les cellules souches (Caceres-Cortes et al. 2001). De plus, la perte de fonction de *Scl* dans la lignée cellulaire TF-1 induit l'apoptose spécifiquement lors de la stimulation par Steel Factor, suggérant que *Scl* soit requis en aval de c-Kit (Krosi et al. 1998). Les résultats présentés au troisième chapitre valident l'interaction biologique entre *Scl* et *c-kit* en démontrant clairement que l'activation de la voie de c-Kit contrôle l'expression transcriptionnelle de *Scl* dont la présence est essentielle au maintien de la survie des progéniteurs hématopoïétiques. De plus, la modulation de l'activité de *Scl* influence l'intensité de la réponse des progéniteurs à la stimulation par le ligand de c-Kit. Par ailleurs, à l'aide d'une approche génétique, nous avons observé que la surexpression de *Scl* dans les souris dont le récepteur c-Kit est hypofonctionnel permet de corriger leurs défauts hématopoïétiques. Finalement, nos données suggèrent que *Scl* régule la survie des progéniteurs en contrôlant directement l'expression de gènes impliqués dans la survie dépendante de c-Kit.

Plus globalement, cette étude démontre que l'environnement cellulaire peut jouer un rôle instructif au niveau du destin cellulaire. SCL est un facteur de transcription tissu-spécifique dont la présence est essentielle à la différenciation érythroïde et mégakaryocytaire chez la souris adulte (Hall et al. 2003; Mikkola et al. 2003). De plus, les niveaux d'expression de *Scl* influencent la différenciation au niveau de l'embranchement myélo-lymphoïde (Kunisato et al. 2004). Donc en régulant l'expression de *Scl*, l'activation

de la voie de c-Kit permet non seulement de supporter la survie des progéniteurs, mais influence aussi leur potentiel de différenciation. Or, cette étude démontre le rôle polyvalent de *Scl* qui soutient la survie des cellules dont il influence le potentiel. D'autres études de notre laboratoire ont aussi démontré que *Scl* est un effecteur essentiel à certaines voies de signalisation importantes dans le système hématopoïétique. Plus particulièrement, *Scl* est requis au niveau de l'hématopoïèse primitive en aval du récepteur du VEGF pour permettre la survie de l'hémangioblaste (Martin et al. 2004), et au niveau de l'érythropoïèse adulte pour soutenir la survie dépendante de l'EPO (Lahlil et al., en préparation).

Combinés ces résultats démontrent donc que *Scl* est une cible de plusieurs voie de signalisation et que la modulation de l'activité de ces voies influence son expression et donc ses activités biologiques. De façon plus importante, ces données révèlent que le destin cellulaire est régulé par la relation étroite existant entre l'environnement et les facteurs intrinsèques.

4.2.1. c-Kit et la niche hématopoïétique

Bien que nous ayons démontré que *Scl* est requis en aval de c-Kit au niveau des progéniteurs hématopoïétiques, il n'en demeure pas moins qu'il est possible que cette interaction ait aussi lieu dans les cellules souches. Plusieurs raisons laissent supposer que cette hypothèse puisse être vraie. En effet, l'expression d'un dominant négatif de SCL dans la population KSL enrichie en cellules souches induit l'apoptose au niveau de ces cellules. Par ailleurs, la diminution de l'activité kinase du récepteur c-Kit se traduit par une déficience au niveau des cellules souches responsables de la reconstitution à long terme (Boggs et al. 1982; Harrison and Astle 1991) ce qui corrèle avec la diminution du maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques des souris possédant seulement un allèle fonctionnel de *Scl*.

Le ligand de c-kit existe sous deux formes, soit les formes soluble (sSF) et transmembranaire (tmSF) et certaines évidences suggèrent que ces deux formes ont des fonctions indépendantes. En effet, la souris *Sl^d/Sl^d* possède une mutation causant la

délétion du domaine transmembranaire et cytoplasmique de Steel Factor ce qui entraîne la production de SF soluble exclusivement (Brannan et al. 1991; Flanagan et al. 1991). Ces souris sont viables, mais souffrent d'anémie sévère, possèdent moins de mastocytes, sont stériles et ont des défauts de pigmentation indiquant que la forme soluble ne peut compenser pour l'absence de la forme transmembranaire qui possède des fonctions uniques *in vivo* (Russell 1979). La transplantation de moelle osseuse de type sauvage dans ces souris cause des défauts au niveau de leur prolifération et de leur différenciation. Par contre, la transplantation de cellules Sf^d/Sf^d provenant de nouveaux-nés permet de reconstituer l'hématopoïèse d'une souris irradiée de façon normale démontrant que les défauts hématopoïétiques des souris Sf^d/Sf^d sont causés par une carence environnementale (McCulloch et al. 1965). Or, lors de la transplantation de cellules Sf^d/Sf^d provenant de souris adultes, une diminution de 50% de leur compétitivité est observée ce qui suggère que la forme transmembranaire de SF est essentielle pour le maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques (McCulloch et al. 1965). Des expériences *in vitro* indiquent que la présence de tmSF permet de supporter l'hématopoïèse pendant une période beaucoup plus longue que sSF (Toksoz et al. 1992) probablement à cause de l'activation plus transitoire du récepteur c-Kit par la forme soluble qui induit une désensibilisation plus rapidement (Miyazawa et al. 1995). De plus, il a été observé que la forme transmembranaire de Steel Factor est impliquée au niveau de l'interaction des cellules souches hématopoïétiques et de la matrice extracellulaire (Kinashi and Springer 1994). Plus récemment, il a été démontré que tmSF est essentiel à la localisation et au maintien des cellules souches à la niche hématopoïétique sans affecter leur migration à la moelle osseuse. En ce sens, on observe une diminution du nombre de cellules associées à l'os lors de la transplantation de cellules souches Sf^d/Sf^d comparativement aux cellules *WT* (Driessen et al. 2003). Dernièrement, il a aussi été démontré que la signalisation dépendante du récepteur c-Kit est requise pour maintenir les cellules souches en quiescence et favoriser leur préservation à long terme (Thoren et al. 2008).

4.2.1.1. *Scl*, un régulateur central au cœur de la niche ?

L'ensemble de ces données suggère que le récepteur c-Kit est impliquée dans le maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques en modulant directement leur adhésion à la niche. Par ailleurs, nos résultats ont permis de démontrer le rôle essentiel de *Scl* dans le maintien en quiescence et la préservation à long terme des cellules souches. Or, les cellules souches quiescentes sont en contact physique direct avec la niche et sont responsables de la reconstitution à long terme de l'hématopoïèse ce qui suggère que *Scl* pourrait avoir un rôle à jouer dans la niche hématopoïétique. De plus, la régulation transcriptionnelle de *c-Kit* par SCL révèle l'existence d'une boucle d'amplification au niveau de l'interaction entre SCL et c-Kit (Lecuyer et al. 2002) ce qui suggère que SCL puisse moduler directement l'interaction avec la niche. Il est donc possible que *Scl* contrôle le maintien des cellules souches en favorisant leur quiescence, leur survie et leur adhésion à la niche (Figure 4.2). À l'avenir, il serait intéressant de déterminer par des essais de transplantation si la surexpression de *Scl* permet de corriger la déficience des cellules souches dont le récepteur c-Kit est hypofonctionnel. De plus, il faudrait aussi vérifier si les cellules souches *Scl*^{+/-} sont moins susceptibles de s'associer à l'os par des études histologiques et déterminer l'effet de la perte de *Scl* sur l'expression de molécules d'adhésion essentielles au maintien des cellules souches dans la niche.

Conclusion

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a permis de révéler le caractère multifonctionnel de *Scl*. Dans un premier temps, nous avons démontré que *Scl* est essentiel au maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques. En effet, *Scl* favorise la quiescence de ces cellules et nos données suggèrent que cet effet serait médié par *p21*, un gène essentiel à cette fonction. L'augmentation de l'activité des cellules souches *Scl*^{+/-} ne s'accompagne pas d'une augmentation de leur différenciation ce qui nous amène à penser que la diminution des niveaux de *Scl* défavorise la survie des cellules souches en plus de faciliter leur transition de G0 vers G1. En effet, nous avons aussi démontré que *Scl* est essentiel à la survie des progéniteurs et certaines données préliminaires suggèrent que ce mécanisme est aussi à l'œuvre dans les cellules souches hématopoïétiques. Cette association de la quiescence et de la survie cellulaire est en accord avec le rôle de la quiescence dans la longévité et suggère que *Scl* préserve la longévité de cellules souches en les maintenant quiescentes. Les données présentées dans cette thèse démontrent aussi que le dosage de *Scl* est un déterminant majeur du destin cellulaire. En effet, des niveaux d'expression élevée de *Scl* favorisent la quiescence, tandis que des niveaux plus faibles sont suffisants pour permettre la survie des cellules hématopoïétiques. Bien que *Scl* soit un régulateur intrinsèque du destin cellulaire, ces études démontrent que son expression ainsi que son activité sont régulés par l'environnement. Le rôle de *Scl* en aval de c-kit dans la survie des progéniteurs, de même que sa fonction antiproliférative au niveau des cellules souches en présence de signaux mitogéniques dévoilent le rôle crucial de *Scl* dans la réponse à l'environnement. Par ailleurs, ces observations démontrent le rôle instructif de l'environnement sur le destin cellulaire en modulant directement l'activité du facteur de transcription tissu-spécifique SCL.

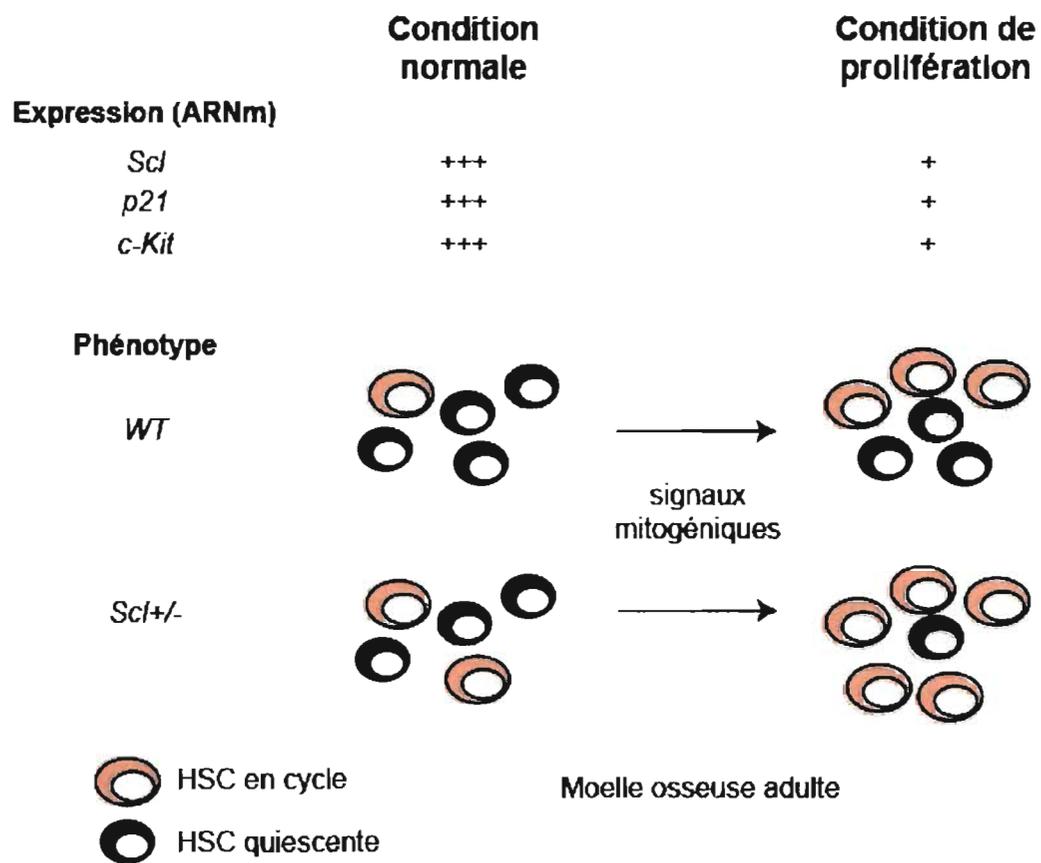
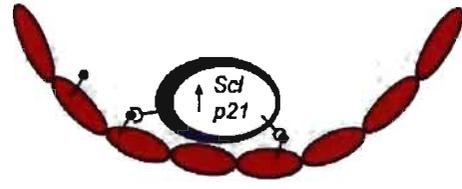


Figure 4. 1: Récapitulatifs des différentes fonctions contrôlées par *Scl*

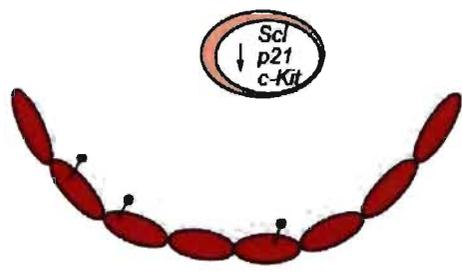
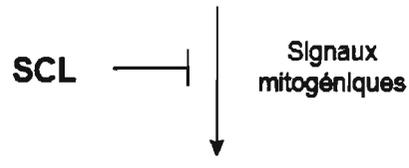
En conditions normales, les cellules souches hématopoïétiques adultes sont majoritairement en quiescence et se caractérisent par l'expression de *Scl*, *c-Kit* et *p21*. En présence de signaux prolifératifs, les cellules souches s'activent ce qui cause une diminution de l'expression des gènes *Scl*, *c-Kit* et *p21*. *Scl* est impliqué dans le contrôle de la transition G0-G1 en condition normale de même qu'en présence de signaux prolifératifs. En effet, les souris *Scl*^{+/-} se caractérisent par une diminution de la proportion de HSC en quiescence comparativement aux souris *WT*. Par ailleurs, cette réduction du nombre de cellules en G0 est accentuée en présence de cytokines ce qui révèle le rôle capital de *Scl* dans la prévention d'une réponse exacerbée aux signaux mitogéniques.

prolifération

quiescence et maintien



Condition normale



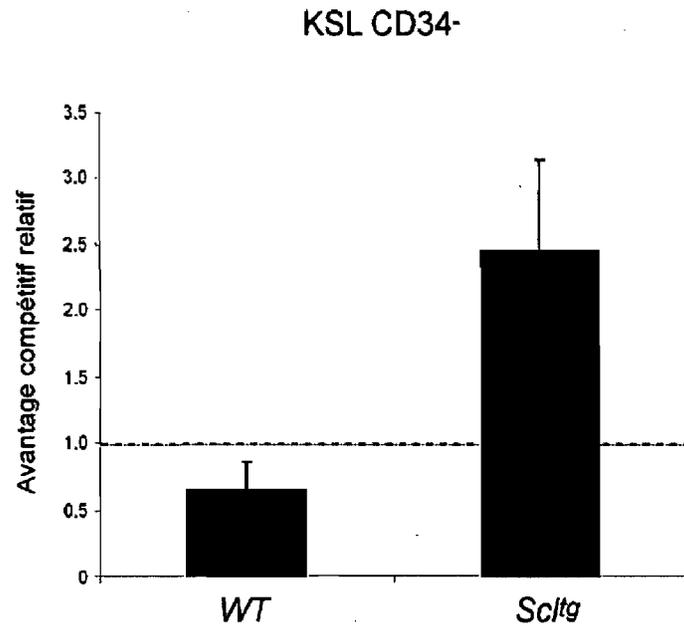
Condition de prolifération

-  HSC quiescentes
-  HSC en cycle
-  cellules stromales de la niche
-  microenvironnement adulte
-  tm Steel Factor
-  Récepteur c-Kit

Figure 4. 2 : Modèle suggéré illustrant le rôle de *Scl* dans la régulation des HSC.

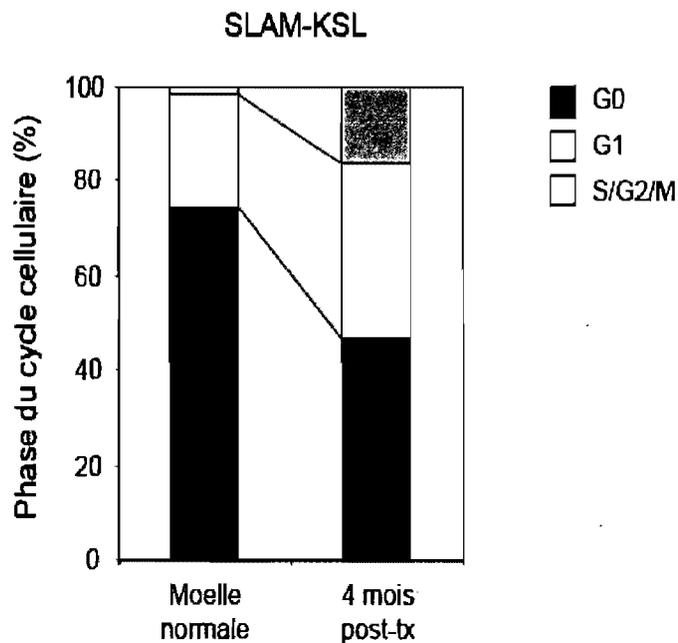
Les cellules souches hématopoïétiques adultes se caractérisent par l'expression de *Scl* qui contrôle la transcription des gènes *p21* et *c-Kit*, deux événements favorisant la quiescence et donc le maintien à long terme de ces cellules. En interagissant avec la forme transmembranaire de Steel Factor, *c-Kit* favorise l'interaction des cellules souches avec la niche ce qui contribue aussi à préserver les HSC à long terme. Cette interaction avec la niche est consolidée par l'existence d'une boucle d'amplification, car l'activation du récepteur *c-kit* contrôle l'expression transcriptionnelle de *Scl*.

En présence de signaux prolifératifs, l'expression de *Scl* diminue ce qui entraîne une réduction de *p21* et *c-Kit* dans les HSC. Cette baisse au niveau de l'expression du récepteur *c-Kit* défavoriserait l'interaction des HSCs avec la niche, un événement essentiel au maintien de la quiescence des cellules souches. De plus, la réduction de l'expression de *p21* favorise l'entrée en cycle des cellules ce qui contribue aussi à leur activation. Cette activation des HSC est essentielle pour permettre une reconstitution rapide de l'hématopoïèse que ce soit de façon contrôlée (cytokines, transplantation) ou de façon aléatoire (modèle stochastique d'activation des cellules souches). En contrôlant la transition G0-G1, *Scl* empêche une réponse exacerbée aux signaux mitogéniques, prévenant ainsi une déplétion précoce du réservoir de cellules souches.



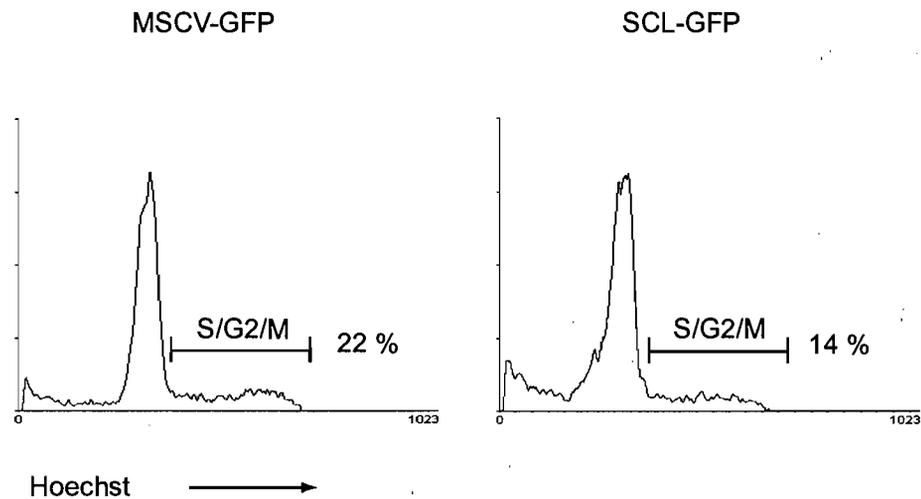
Annexe 1: L'augmentation des niveaux de *Scl* accroît la compétitivité des HSC.

Transplantation en compétition de cellules *Scl^{tg}* avec des cellules *WT*. Analyse par cytométrie en flux des souris hôtes 4 mois après la transplantation. Notez l'augmentation de la compétitivité de la population KSL CD34⁻ contenant les cellules souches responsables de la reconstitution à long terme.



Annexe 2: La transplantation induit une pression proliférative majeure sur les cellules souches hématopoïétiques.

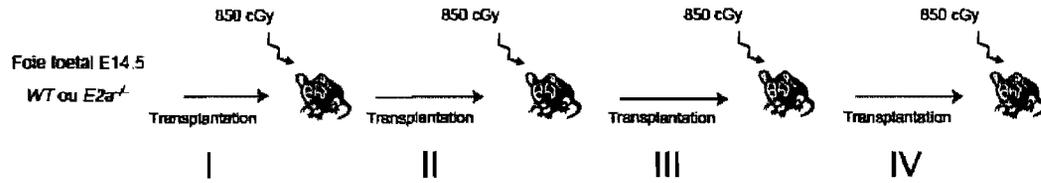
Analyse du cycle cellulaire des cellules SLAM-KSL provenant de la moelle osseuse en condition normale et 4 mois après transplantation. Notez l'augmentation du nombre de cellules en cycle suite à leur transplantation ce qui illustre la pression proliférative importante imposée à ces cellules afin de permettre la reconstitution de l'hématopoïèse.



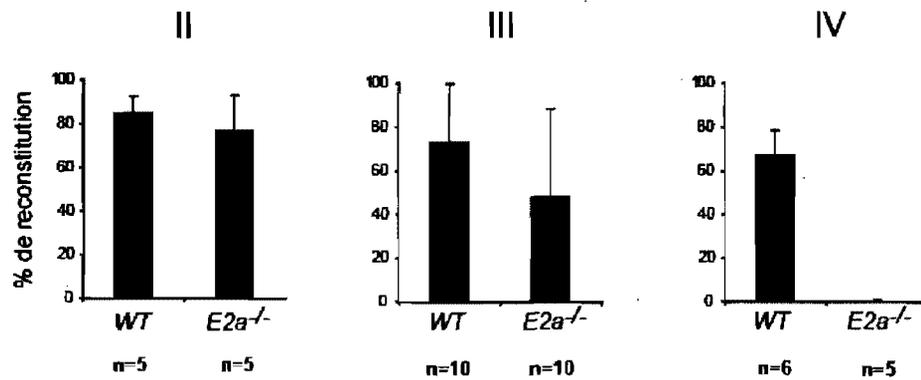
Annexe 3: *Scl* restreint la prolifération des cellules hématopoïétiques.

Surexpression de SCL par intégration rétrovirale dans des cellules de moelle osseuse. Analyse du cycle cellulaire par marquage au Hoechst 33342. L'augmentation de l'expression de SCL cause une diminution de la prolifération des cellules hématopoïétiques. Effectivement, la surexpression de SCL se caractérise par une diminution du nombre de cellules en S/G2/M.

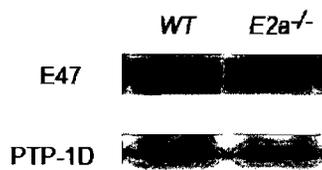
A



B



C

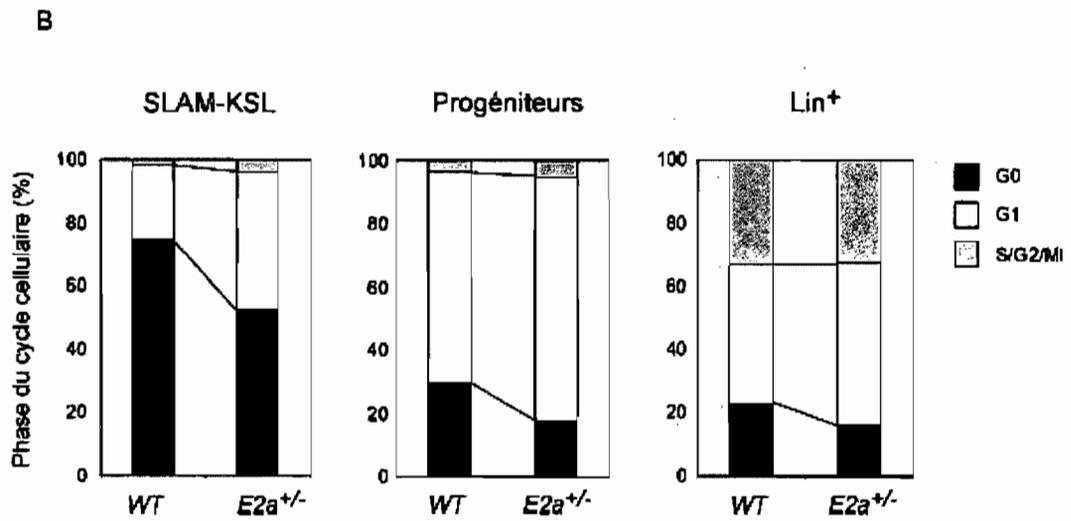
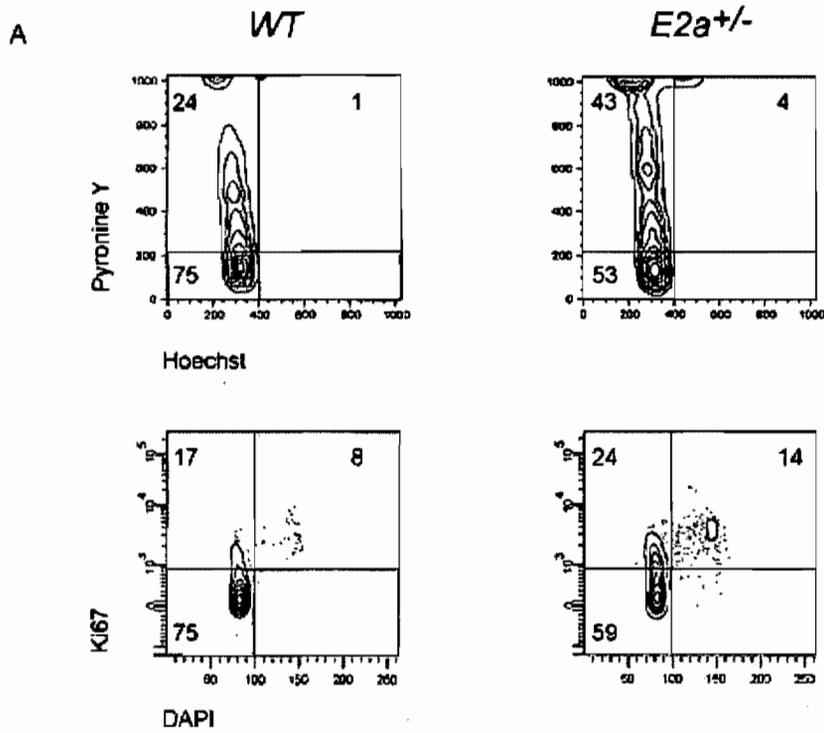


D

	SLAM-KSL (nombre absolu par souris)
WT	14 300 ± 3 600
$E2a^{+/-}$	14 600 ± 4 400

Annexe 4: *E2a* est essentiel au maintien à long terme des cellules souches.

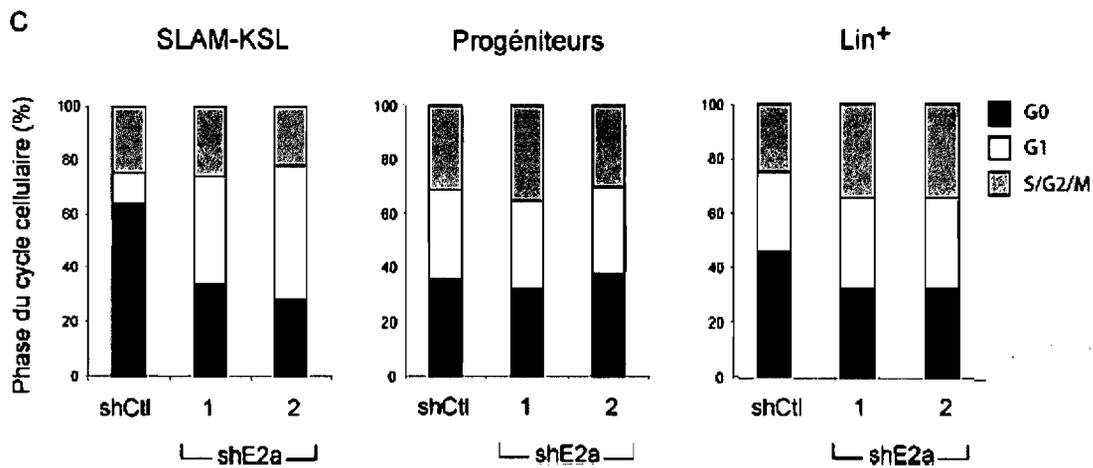
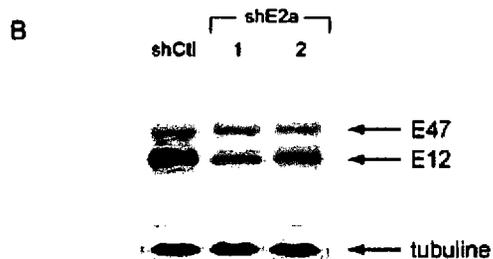
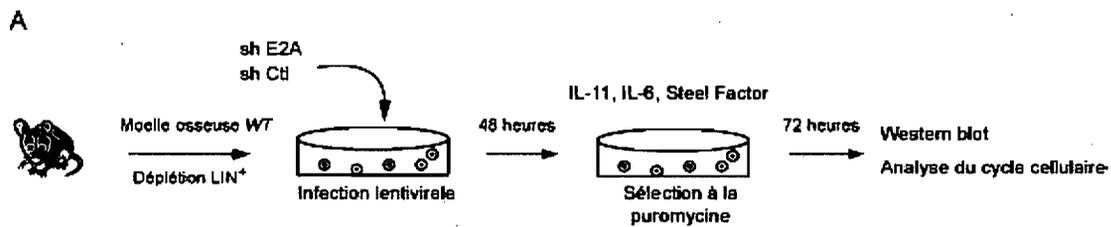
- (A) Représentation schématique de la stratégie utilisée pour évaluer le potentiel de *E2a* dans les cellules souches.
- (B) Transplantation en série de cellules de foie fœtal *E2a*^{-/-} ou *WT*. Notez que les cellules *E2a*^{-/-} ne contribuent pas à la reconstitution de la souris quaternaire tandis que les cellules *WT* ont toujours ce potentiel.
- (C) Détermination des niveaux protéiques de E2A par western blot dans les cellules Lin⁻ de la moelle osseuse des souris *E2a*^{+/-} et *WT*.
- (D) Quantification phénotypique du nombre de cellules souches dans la moelle des souris *E2a*^{+/-} et *WT* par cytométrie en flux. La diminution des niveaux protéiques de E2A n'influence pas le nombre de cellules dans la population SLAM-KSL hautement enrichie en cellules souches.



Annexe 5: *E2a* contrôle le cycle cellulaire des HSCs.

(A) Analyse du cycle cellulaire des cellules SLAM-KSL des souris *E2a*^{+/-} et *WT* par marquage au Hoechst 33342 et Pyronine Y (panneau du haut) ainsi que par marquage au DAPI et Ki67 (panneau du bas). Ces deux approches révèlent le rôle essentiel de *E2a* au niveau du contrôle de la transition G0-G1 dans les cellules souches tel que démontré par l'augmentation significative du nombre de cellules en G1 et la diminution en G0 dans la population SLAM-KSL *E2a*^{+/-}. Les données présentées ici proviennent d'une souris représentative pour chaque condition.

(B) Représentations graphiques illustrant le rôle de *E2a* au niveau du cycle cellulaire de différentes populations hématopoïétiques. Notez que la diminution de *E2a* facilite la transition G0-G1 de façon plus robuste dans la population SLAM-KSL enrichie en cellules souches (panneau de gauche) comparativement aux populations enrichies en progéniteurs (panneau du centre) ou en cellules matures (*Lin*⁺) (panneau de droite).

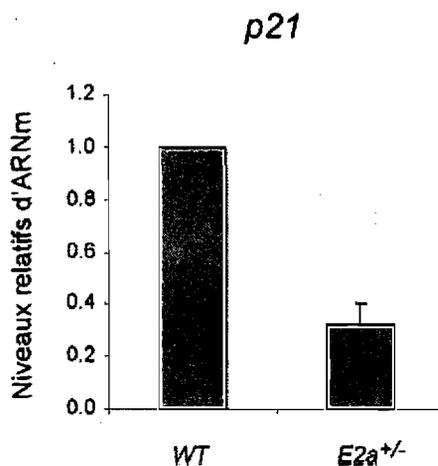


Annexe 6: *E2a* contrôle la réponse aux cytokines.

(A) Représentation schématique de la stratégie utilisée pour diminuer les niveaux protéiques de E2A dans les cellules souches hématopoïétiques. Brièvement, des cellules de moelle osseuse *WT* déplétées en cellules matures sont infectées durant deux jours avec des particules lentivirales contenant différents shRNA dirigés contre E2A. Les cellules infectées sont sélectionnées selon leur résistance à la puromycine durant 3 jours. À la suite de ce protocole, les niveaux protéiques de E2A sont évalués et le cycle cellulaire de la population SLAM-KSL est analysé par marquage au Hoechst 33342 et à la pyronin Y.

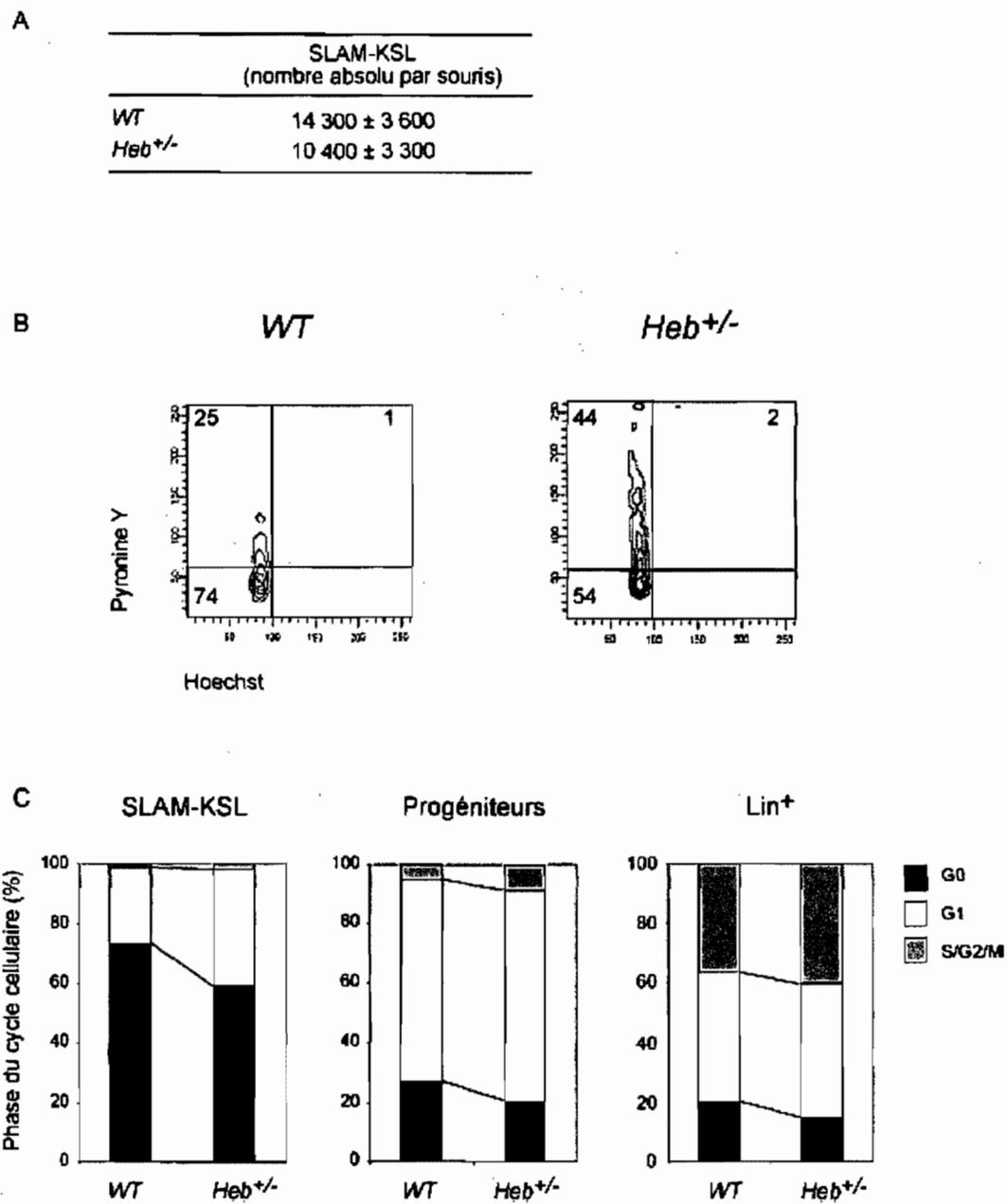
(B) Les shE2A ciblent efficacement E2A tel que démontré par la diminution des niveaux protéiques de E2A dans la lignée murine hématopoïétique MEL.

(C) Analyse du cycle cellulaire des cellules souches exprimant de faibles niveaux de E2A après cinq jours de culture. Notez que l'activation cellulaire observée suite à la diminution de E2A est spécifique à la population SLAM-KSL hautement enrichie en cellules souches. L'effet observé après le passage en culture est plus prononcé qu'en condition physiologique (Annexe 3) révélant le rôle de *E2a* en réponse aux cytokines.



Annexe 7: *E2a* contrôle l'expression transcriptionnelle de *p21*.

Les cellules SLAM-KSL de souris adulte *E2a*^{+/-} et *WT* ont été triées par cytométrie en flux et les niveaux d'ARNm de *p21* déterminé par RT-PCR quantitatif. Les cellules SLAM-KSL *E2a*^{+/-} se caractérisent par une faible expression de *p21* comparativement aux cellules *WT*. Ces données suggèrent que *E2a* peut réguler l'expression de *p21* tout comme *Scl*. L'expression de *p21* a d'abord été normalisée par rapport au contrôle endogène *Hprt* et ensuite par rapport à l'expression dans les cellules SLAM-KSL *WT*. Les résultats présentés dans cette figure proviennent de deux expériences indépendantes où les cellules SLAM-KSL de 5 souris ont été triées dans chaque cas.



Annexe 8: *Heb* contrôle le cycle cellulaire des cellules souches.

- (A) Quantification phénotypique du nombre de cellules souches dans la moelle des souris *Heb*^{+/-} et *WT* par cytométrie en flux. La perte d'un allèle de *Heb* n'influence pas la fréquence de cellules SLAM-KSL hautement enrichies en cellules souches.
- (B) Analyse du cycle cellulaire des cellules SLAM-KSL des souris *Heb*^{+/-} et *WT* par marquage au Hoechst 33342 et Pyronine Y. À noter que la perte d'un allèle de *Heb* facilite la transition G0-G1, de façon similaire à la perte de *E2a* et *Scl*.
- (C) Représentations graphiques illustrant le rôle de *Heb* au niveau du cycle cellulaire de différentes populations hématopoïétiques. Notez que la diminution de *Heb* facilite la transition G0-G1 de façon plus robuste dans la population SLAM-KSL enrichie en cellules souches (panneau de gauche) comparativement aux populations enrichies en progéniteurs (panneau du centre) ou en cellules matures (*Lin*⁺) (panneau de droite).

References

- Abkowitz, J.L., Catlin, S.N., McCallie, M.T., and Gutter, P. 2002. Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood* **100**(7): 2665-2667.
- Adams, G.B., Chabner, K.T., Alley, I.R., Olson, D.P., Szczepiorkowski, Z.M., Poznansky, M.C., Kos, C.H., Pollak, M.R., Brown, E.M., and Scadden, D.T. 2006. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* **439**(7076): 599-603.
- Adolfsson, J., Borge, O.J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S.E. 2001. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* **15**(4): 659-669.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**(6774): 193-197.
- Alcalay, M., Meani, N., Gelmetti, V., Fantozzi, A., Fagioli, M., Orleth, A., Riganelli, D., Sebastiani, C., Cappelli, E., Casciari, C., Scieurpi, M.T., Mariano, A.R., Minardi, S.P., Luzi, L., Muller, H., Di Fiore, P.P., Frosina, G., and Pelicci, P.G. 2003. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J Clin Invest* **112**(11): 1751-1761.
- Allsopp, R.C., Cheshier, S., and Weissman, I.L. 2001. Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **193**(8): 917-924.
- Alonso, L. and Fuchs, E. 2003. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**: 11830-11835.
- Aplan, P.D., Jones, C.A., Chervinsky, D.S., Zhao, X., Ellsworth, M., Wu, C., McGuire, E.A., and Gross, K.W. 1997. An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J* **16**(9): 2408-2419.
- Aplan, P.D., Nakahara, K., Orkin, S.H., and Kirsch, I.R. 1992. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J* **11**(11): 4073-4081.

- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. 2004. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**(2): 149-161.
- Bain, G., Engel, I., Robanus Maandag, E.C., te Riele, H.P., Volland, J.R., Sharp, L.L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D., and Murre, C. 1997. E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* **17**(8): 4782-4791.
- Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M., and et al. 1994. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* **79**(5): 885-892.
- Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F., and Hall, M.N. 1996. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* **7**(1): 25-42.
- Barton, L.M., Gottgens, B., and Green, A.R. 1999. The stem cell leukaemia (SCL) gene: a critical regulator of haemopoietic and vascular development. *Int J Biochem Cell Biol* **31**(10): 1193-1207.
- Becker, A.J., Mc, C.E., and Till, J.E. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**: 452-454.
- Begley, C.G., Aplan, P.D., Davey, M.P., Nakahara, K., Tchorz, K., Kurtzberg, J., Hershfield, M.S., Haynes, B.F., Cohen, D.I., Waldmann, T.A., and et al. 1989a. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(6): 2031-2035.
- Begley, C.G., Aplan, P.D., Denning, S.M., Haynes, B.F., Waldmann, T.A., and Kirsch, I.R. 1989b. The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(24): 10128-10132.
- Begley, C.G. and Green, A.R. 1999. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* **93**(9): 2760-2770.
- Belaousoff, M., Farrington, S.M., and Baron, M.H. 1998. Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo. *Development* **125**(24): 5009-5018.
- Benveniste, P., Cantin, C., Hyam, D., and Iscove, N.N. 2003. Hematopoietic stem cells engraft in mice with absolute efficiency. *Nat Immunol* **4**(7): 708-713.

- Berardi, A.C., Wang, A., Levine, J.D., Lopez, P., and Scadden, D.T. 1995. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* **267**(5194): 104-108.
- Bertrand, J.Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I., and Cumano, A. 2005. Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(1): 134-139.
- Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D.P., Williams, K.P., Chadwick, K., Ling, L.E., Karanu, F.N., and Bhatia, M. 2001. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* **2**(2): 172-180.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Kapp, U., Wang, J.C., Murdoch, B., and Dick, J.E. 1997. Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* **186**(4): 619-624.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., Murdoch, B., Wrana, J., Gallacher, L., and Dick, J.E. 1999. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **189**(7): 1139-1148.
- Blume-Jensen, P., Janknecht, R., and Hunter, T. 1998. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* **8**(13): 779-782.
- Boggs, D.R., Boggs, S.S., Saxe, D.F., Gress, L.A., and Canfield, D.R. 1982. Hematopoietic stem cells with high proliferative potential. Assay of their concentration in marrow by the frequency and duration of cure of W/W^v mice. *J Clin Invest* **70**(2): 242-253.
- Borge, O.J., Ramsfjell, V., Cui, L., and Jacobsen, S.E. 1997. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34⁺CD38⁻ bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood* **90**(6): 2282-2292.
- Bowie, M.B., Kent, D.G., Copley, M.R., and Eaves, C.J. 2007a. Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells. *Blood* **109**(11): 5043-5048.
- Bowie, M.B., Kent, D.G., Dykstra, B., McKnight, K.D., McCaffrey, L., Hoodless, P.A., and Eaves, C.J. 2007b. Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 5878-5882.

- Bowie, M.B., McKnight, K.D., Kent, D.G., McCaffrey, L., Hoodless, P.A., and Eaves, C.J. 2006. Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J Clin Invest* **116**(10): 2808-2816.
- Bradford, G.B., Williams, B., Rossi, R., and Bertocello, I. 1997. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol* **25**(5): 445-453.
- Brady, G., Billia, F., Knox, J., Hoang, T., Kirsch, I.R., Voura, E.B., Hawley, R.G., Cumming, R., Buchwald, M., and Siminovitch, K. 1995. Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol* **5**(8): 909-922.
- Brannan, C.I., Lyman, S.D., Williams, D.E., Eisenman, J., Anderson, D.M., Cosman, D., Bedell, M.A., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. 1991. Steel-Dickie mutation encodes a c-kit ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 4671-4674.
- Brown, J.P., Wei, W., and Sedivy, J.M. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**(5327): 831-834.
- Broxmeyer, H.E. 1984. Colony assays of hematopoietic progenitor cells and correlations to clinical situations. *Crit Rev Oncol Hematol* **1**(3): 227-257.
- Brunet de la Grange, P., Armstrong, F., Duval, V., Rouyez, M.C., Goardon, N., Romeo, P.H., and Pflumio, F. 2006. Low SCL/TAL1 expression reveals its major role in adult hematopoietic myeloid progenitors and stem cells. *Blood* **108**(9): 2998-3004.
- Caceres-Cortes, J., Rajotte, D., Dumouchel, J., Haddad, P., and Hoang, T. 1994. Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* **269**(16): 12084-12091.
- Caceres-Cortes, J.R., Krosel, G., Tessier, N., Hugo, P., and Hoang, T. 2001. Steel factor sustains SCL expression and the survival of purified CD34+ bone marrow cells in the absence of detectable cell differentiation. *Stem Cells* **19**(1): 59-70.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., Milner, L.A., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**(6960): 841-846.
- Camargo, F.D., Chambers, S.M., Drew, E., McNagny, K.M., and Goodell, M.A. 2006. Hematopoietic stem cells do not engraft with absolute efficiencies. *Blood* **107**(2): 501-507.

- Capel, B., Hawley, R.G., and Mintz, B. 1990. Long- and short-lived murine hematopoietic stem cell clones individually identified with retroviral integration markers. *Blood* **75**(12): 2267-2270.
- Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jimenez, F., and Chia, W. 1998. Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev* **12**(3): 304-315.
- Carson, W.E., Haldar, S., Baiocchi, R.A., Croce, C.M., and Caligiuri, M.A. 1994. The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16): 7553-7557.
- Cashman, J., Bockhold, K., Hogge, D.E., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. 1997. Sustained proliferation, multi-lineage differentiation and maintenance of primitive human haemopoietic cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood. *Br J Haematol* **98**(4): 1026-1036.
- Cellot, S., Kros, J., Chagraoui, J., Meloche, S., Humphries, R.K., and Sauvageau, G. 2007. Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in Hoxb4hiPbx1(10) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **35**(5): 802-816.
- Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., and Bhatia, M. 2003. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* **102**(3): 906-915.
- Chagraoui, J., Niessen, S.L., Lessard, J., Girard, S., Coulombe, P., Sauvageau, M., Meloche, S., and Sauvageau, G. 2006. E4F1: a novel candidate factor for mediating BMI1 function in primitive hematopoietic cells. *Genes Dev* **20**(15): 2110-2120.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Dombkowski, D., Stier, S., and Scadden, D.T. 2000a. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nat Med* **6**(11): 1235-1240.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., and Scadden, D.T. 2000b. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* **287**(5459): 1804-1808.
- Chervinsky, D.S., Zhao, X.F., Lam, D.H., Ellsworth, M., Gross, K.W., and Aplan, P.D. 1999. Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice. *Mol Cell Biol* **19**(7): 5025-5035.
- Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X., and Weissman, I.L. 1999. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 3120-3125.

- Christensen, J.L. and Weissman, I.L. 2001. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(25): 14541-14546.
- Clarke, D., Vegiopoulos, A., Crawford, A., Mucenski, M., Bonifer, C., and Frampton, J. 2000. In vitro differentiation of c-myb(-/-) ES cells reveals that the colony forming capacity of unilineage macrophage precursors and myeloid progenitor commitment are c-Myb independent. *Oncogene* **19**(30): 3343-3351.
- Coller, H.A., Sang, L., and Roberts, J.M. 2006. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* **4**(3): e83.
- Condorelli, G.L., Facchiano, F., Valtieri, M., Proietti, E., Vitelli, L., Lulli, V., Huebner, K., Peschle, C., and Croce, C.M. 1996. T-cell-directed TAL-1 expression induces T-cell malignancies in transgenic mice. *Cancer Res* **56**(22): 5113-5119.
- Coulombel, L. 2004. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* **23**(43): 7210-7222.
- Croisille, L., Auffray, I., Katz, A., Izac, B., Vainchenker, W., and Coulombel, L. 1994. Hydrocortisone differentially affects the ability of murine stromal cells and human marrow-derived adherent cells to promote the differentiation of CD34⁺/CD38⁻ long-term culture-initiating cells. *Blood* **84**(12): 4116-4124.
- Crotta, S., Nicolis, S., Ronchi, A., Ottolenghi, S., Ruzzi, L., Shimada, Y., Migliaccio, A.R., and Migliaccio, G. 1990. Progressive inactivation of the expression of an erythroid transcriptional factor in GM- and G-CSF-dependent myeloid cell lines. *Nucleic Acids Res* **18**(23): 6863-6869.
- Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. 2006. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **6**(3): 184-192.
- Cunningham, J.J. and Roussel, M.F. 2001. Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ* **12**(8): 387-396.
- Curtis, D.J., Hall, M.A., Van Stekelenburg, L.J., Robb, L., Jane, S.M., and Begley, C.G. 2004. SCL is required for normal function of short-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* **103**(9): 3342-3348.
- Curtis, D.J., Robb, L., Strasser, A., and Begley, C.G. 1997. The CD2-scl transgene alters the phenotype and frequency of T-lymphomas in N-ras transgenic or p53 deficient mice. *Oncogene* **15**(24): 2975-2983.

- de Bruijn, M.F., Speck, N.A., Peeters, M.C., and Dzierzak, E. 2000. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J* **19**(11): 2465-2474.
- de Haan, G. and Van Zant, G. 1997. Intrinsic and extrinsic control of hemopoietic stem cell numbers: mapping of a stem cell gene. *J Exp Med* **186**(4): 529-536.
- de Haan, G., Weersing, E., Dontje, B., van Os, R., Bystrykh, L.V., Vellenga, E., and Miller, G. 2003. In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Dev Cell* **4**(2): 241-251.
- Dieterlen-Lievre, F. 1975. On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol* **33**(3): 607-619.
- Domen, J., Cheshier, S.H., and Weissman, I.L. 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**(2): 253-264.
- Doyle, K., Zhang, Y., Baer, R., and Bina, M. 1994. Distinguishable patterns of protein-DNA interactions involving complexes of basic helix-loop-helix proteins. *J Biol Chem* **269**(16): 12099-12105.
- Driessen, R.L., Johnston, H.M., and Nilsson, S.K. 2003. Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp Hematol* **31**(12): 1284-1291.
- Drize, N.J., Keller, J.R., and Chertkov, J.L. 1996. Local clonal analysis of the hematopoietic system shows that multiple small short-living clones maintain life-long hematopoiesis in reconstituted mice. *Blood* **88**(8): 2927-2938.
- Eaves, C.J. and Eaves, A.C. 1978. Erythropoietin (Ep) dose-response curves for three classes of erythroid progenitors in normal human marrow and in patients with polycythemia vera. *Blood* **52**(6): 1196-1210.
- Elefanty, A.G., Begley, C.G., Metcalf, D., Barnett, L., Kontgen, F., and Robb, L. 1998. Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11897-11902.
- Elefanty, A.G., Robb, L., Birner, R., and Begley, C.G. 1997. Hematopoietic-specific genes are not induced during in vitro differentiation of scl-null embryonic stem cells. *Blood* **90**(4): 1435-1447.
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., and Harrison, S.C. 1994. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* **8**(8): 970-980.

- Elwood, N.J., Cook, W.D., Metcalf, D., and Begley, C.G. 1993. SCL, the gene implicated in human T-cell leukaemia, is oncogenic in a murine T-lymphocyte cell line. *Oncogene* **8**(11): 3093-3101.
- Elwood, N.J., Zogos, H., Pereira, D.S., Dick, J.E., and Begley, C.G. 1998. Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood* **91**(10): 3756-3765.
- Ema, H., Sudo, K., Seita, J., Matsubara, A., Morita, Y., Osawa, M., Takatsu, K., Takaki, S., and Nakauchi, H. 2005. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Dev Cell* **8**(6): 907-914.
- Ema, M., Faloon, P., Zhang, W.J., Hirashima, M., Reid, T., Stanford, W.L., Orkin, S., Choi, K., and Rossant, J. 2003. Combinatorial effects of Flk1 and Tall on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev* **17**(3): 380-393.
- Endoh, M., Ogawa, M., Orkin, S., and Nishikawa, S. 2002. SCL/tal-1-dependent process determines a competence to select the definitive hematopoietic lineage prior to endothelial differentiation. *EMBO J* **21**(24): 6700-6708.
- Engel, I., Johns, C., Bain, G., Rivera, R.R., and Murre, C. 2001. Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity. *J Exp Med* **194**(6): 733-745.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**(6916): 629-635.
- Ferre-D'Amare, A.R., Prendergast, G.C., Ziff, E.B., and Burley, S.K. 1993. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* **363**(6424): 38-45.
- Flanagan, J.G., Chan, D.C., and Leder, P. 1991. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* **64**(5): 1025-1035.
- Fleming, H.E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K.M., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. 2008. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* **2**(3): 274-283.
- Galan-Caridad, J.M., Harel, S., Arenzana, T.L., Hou, Z.E., Doetsch, F.K., Mirny, L.A., and Reizis, B. 2007. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. *Cell* **129**(2): 345-357.

- Geissler, E.N., McFarland, E.C., and Russell, E.S. 1981. Analysis of pleiotropism at the dominant white-spotting (W) locus of the house mouse: a description of ten new W alleles. *Genetics* **97**(2): 337-361.
- Geissler, E.N. and Russell, E.S. 1983. Analysis of the hematopoietic effects of new dominant spotting (W) mutations of the mouse. II. Effects on mast cell development. *Exp Hematol* **11**(6): 461-466.
- Gimeno, R., Weijer, K., Voordouw, A., Uittenbogaart, C.H., Legrand, N., Alves, N.L., Wijnands, E., Blom, B., and Spits, H. 2004. Monitoring the effect of gene silencing by RNA interference in human CD34+ cells injected into newborn RAG2-/-gammac-/- mice: functional inactivation of p53 in developing T cells. *Blood* **104**(13): 3886-3893.
- Glimm, H. and Eaves, C.J. 1999. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture. *Blood* **94**(7): 2161-2168.
- Goardon, N., Lambert, J.A., Rodriguez, P., Nissaire, P., Herblot, S., Thibault, P., Dumenil, D., Strouboulis, J., Romeo, P.H., and Hoang, T. 2006. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J* **25**(2): 357-366.
- Goardon, N., Schuh, A., Hajar, I., Ma, X., Jouault, H., Dzierzak, E., Romeo, P.H., and Maouche-Chretien, L. 2002. Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B- and T-lymphoid differentiation. *Blood* **100**(2): 491-500.
- Godin, I., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. 1995. Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(3): 773-777.
- Godin, I., Garcia-Porrero, J.A., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. 1999. Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J Exp Med* **190**(1): 43-52.
- Godin, I.E., Garcia-Porrero, J.A., Coutinho, A., Dieterlen-Lievre, F., and Marcos, M.A. 1993. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* **364**(6432): 67-70.
- Gommerman, J.L. and Berger, S.A. 1998. Protection from apoptosis by steel factor but not interleukin-3 is reversed through blockade of calcium influx. *Blood* **91**(6): 1891-1900.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**(4): 1797-1806.

- Gothot, A., Pyatt, R., McMahon, J., Rice, S., and Srour, E.F. 1997. Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0 /G1 phase of the cell cycle. *Blood* **90**(11): 4384-4393.
- . 1998. Assessment of proliferative and colony-forming capacity after successive in vitro divisions of single human CD34+ cells initially isolated in G0. *Exp Hematol* **26**(7): 562-570.
- Green, A.R., Lints, T., Visvader, J., Harvey, R., and Begley, C.G. 1992. SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. *Oncogene* **7**(4): 653-660.
- Green, A.R., Salvaris, E., and Begley, C.G. 1991. Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. *Oncogene* **6**(3): 475-479.
- Greenbaum, S. and Zhuang, Y. 2002. Regulation of early lymphocyte development by E2A family proteins. *Semin Immunol* **14**(6): 405-414.
- Greer, E.L. and Brunet, A. 2005. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**(50): 7410-7425.
- Grutz, G.G., Bucher, K., Lavenir, I., Larson, T., Larson, R., and Rabbitts, T.H. 1998. The oncogenic T cell LIM-protein Lmo2 forms part of a DNA-binding complex specifically in immature T cells. *EMBO J* **17**(16): 4594-4605.
- Guenechea, G., Gan, O.I., Dorrell, C., and Dick, J.E. 2001. Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol* **2**(1): 75-82.
- Hall, M.A., Curtis, D.J., Metcalf, D., Elefanty, A.G., Sourris, K., Robb, L., Gothert, J.R., Jane, S.M., and Begley, C.G. 2003. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 992-997.
- Hamaguchi, I., Huang, X.L., Takakura, N., Tada, J., Yamaguchi, Y., Kodama, H., and Suda, T. 1999. In vitro hematopoietic and endothelial cell development from cells expressing TEK receptor in murine aorta-gonad-mesonephros region. *Blood* **93**(5): 1549-1556.
- Hao, Q.L., Thiemann, F.T., Petersen, D., Smogorzewska, E.M., and Crooks, G.M. 1996. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood* **88**(9): 3306-3313.
- Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F., and Schreiber, S.L. 1999. Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 14866-14870.

- Harrison, D.E. 1980. Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity. *Blood* **55**(1): 77-81.
- Harrison, D.E. and Astle, C.M. 1982. Loss of stem cell repopulating ability upon transplantation. Effects of donor age, cell number, and transplantation procedure. *J Exp Med* **156**(6): 1767-1779.
- 1991. Lymphoid and erythroid repopulation in B6 W-anemic mice: a new unirradiated recipient. *Exp Hematol* **19**(5): 374-377.
- Harrison, D.E., Astle, C.M., and Delaittre, J.A. 1978. Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging. *J Exp Med* **147**(5): 1526-1531.
- Harrison, D.E., Lerner, C., Hoppe, P.C., Carlson, G.A., and Alling, D. 1987. Large numbers of primitive stem cells are active simultaneously in aggregated embryo chimeric mice. *Blood* **69**(3): 773-777.
- Harrison, D.E., Zhong, R.K., Jordan, C.T., Lemischka, I.R., and Astle, C.M. 1997. Relative to adult marrow, fetal liver repopulates nearly five times more effectively long-term than short-term. *Exp Hematol* **25**(4): 293-297.
- Hayflick, L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**: 614-636.
- Heberlein, C., Fischer, K.D., Stoffel, M., Nowock, J., Ford, A., Tessmer, U., and Stocking, C. 1992. The gene for erythropoietin receptor is expressed in multipotential hematopoietic and embryonal stem cells: evidence for differentiation stage-specific regulation. *Mol Cell Biol* **12**(4): 1815-1826.
- Hemesath, T.J., Price, E.R., Takemoto, C., Badalian, T., and Fisher, D.E. 1998. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* **391**(6664): 298-301.
- Herblot, S., Aplan, P.D., and Hoang, T. 2002. Gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol Cell Biol* **22**(3): 886-900.
- Herblot, S., Steff, A.M., Hugo, P., Aplan, P.D., and Hoang, T. 2000. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* **1**(2): 138-144.
- Hisa, T., Spence, S.E., Rachel, R.A., Fujita, M., Nakamura, T., Ward, J.M., Devor-Henneman, D.E., Saiki, Y., Kutsuna, H., Tessarollo, L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. 2004. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J* **23**(2): 450-459.

- Hoang, T., Paradis, E., Brady, G., Billia, F., Nakahara, K., Iscove, N.N., and Kirsch, I.R. 1996. Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* **87**(1): 102-111.
- Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Schindler, J.W., Saleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. 2004. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* **431**(7011): 1002-1007.
- Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Traver, D., Bronson, R.T., Cameron, S., and Orkin, S.H. 2003. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* **18**(1): 109-120.
- Holyoake, T.L., Freshney, M.G., McNair, L., Parker, A.N., McKay, P.J., Steward, W.P., Fitzsimons, E., Graham, G.J., and Pragnell, I.B. 1996. Ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin-11 augments both short-term recovery posttransplant and the ability to serially transplant marrow. *Blood* **87**(11): 4589-4595.
- Hsu, H.L., Cheng, J.T., Chen, Q., and Baer, R. 1991. Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **11**(6): 3037-3042.
- Hsu, H.L., Huang, L., Tsan, J.T., Funk, W., Wright, W.E., Hu, J.S., Kingston, R.E., and Baer, R. 1994. Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **14**(2): 1256-1265.
- Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C., and Enver, T. 1997. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* **11**(6): 774-785.
- Huang, H. and Auerbach, R. 1993. Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 10110-10114.
- Huttmann, A., Liu, S.L., Boyd, A.W., and Li, C.L. 2001. Functional heterogeneity within rhodamine123(lo) Hoechst33342(lo/sp) primitive hemopoietic stem cells revealed by pyronin Y. *Exp Hematol* **29**(9): 1109-1116.
- Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M., and Hirai, H. 2004. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* **10**(3): 299-304.
- Ikuta, K. and Weissman, I.L. 1992. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(4): 1502-1506.

- Iscoe, N.N. and Nawa, K. 1997. Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion. *Curr Biol* 7(10): 805-808.
- Ivanova, N.B., Dimos, J.T., Schaniel, C., Hackney, J.A., Moore, K.A., and Lemischka, I.R. 2002. A stem cell molecular signature. *Science* 298(5593): 601-604.
- Jankovic, V., Ciarrocchi, A., Bocconi, P., DeBlasio, T., Benezra, R., and Nimer, S.D. 2007. Id1 restrains myeloid commitment, maintaining the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(4): 1260-1265.
- Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H.E., Saito, Y., Waring, M.T., Dombkowski, D.M., Cheng, T., DePinho, R.A., Sharpless, N.E., and Scadden, D.T. 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 443(7110): 421-426.
- Jiang, Y., Davis, C., and Broach, J.R. 1998. Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway. *EMBO J* 17(23): 6942-6951.
- Jimenez, G., Griffiths, S.D., Ford, A.M., Greaves, M.F., and Enver, T. 1992. Activation of the beta-globin locus control region precedes commitment to the erythroid lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22): 10618-10622.
- Johansson, B.M. and Wiles, M.V. 1995. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* 15(1): 141-151.
- Jones, R.J., Celano, P., Sharkis, S.J., and Sensenbrenner, L.L. 1989. Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood* 73(2): 397-401.
- Jordan, C.T., Astle, C.M., Zawadzki, J., Mackarehtschian, K., Lemischka, I.R., and Harrison, D.E. 1995. Long-term repopulating abilities of enriched fetal liver stem cells measured by competitive repopulation. *Exp Hematol* 23(9): 1011-1015.
- Jordan, C.T. and Lemischka, I.R. 1990. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev* 4(2): 220-232.
- Jordan, C.T., McKearn, J.P., and Lemischka, I.R. 1990. Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells. *Cell* 61(6): 953-963.
- Kallianpur, A.R., Jordan, J.E., and Brandt, S.J. 1994. The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* 83(5): 1200-1208.

- Karsunky, H., Zeng, H., Schmidt, T., Zevnik, B., Kluge, R., Schmid, K.W., Duhrsen, U., and Moroy, T. 2002. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet* **30**(3): 295-300.
- Katayama, N., Shih, J.P., Nishikawa, S., Kina, T., Clark, S.C., and Ogawa, M. 1993. Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors. *Blood* **82**(8): 2353-2360.
- Kawashima, I., Zanjani, E.D., Almada-Porada, G., Flake, A.W., Zeng, H., and Ogawa, M. 1996. CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood* **87**(10): 4136-4142.
- Keller, G. and Snodgrass, R. 1990. Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *J Exp Med* **171**(5): 1407-1418.
- Kelliher, M.A., Seldin, D.C., and Leder, P. 1996. Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *EMBO J* **15**(19): 5160-5166.
- Keshet, E., Lyman, S.D., Williams, D.E., Anderson, D.M., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Parada, L.F. 1991. Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J* **10**(9): 2425-2435.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C., and Morrison, S.J. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**(7): 1109-1121.
- Kieran, M.W., Perkins, A.C., Orkin, S.H., and Zon, L.I. 1996. Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(17): 9126-9131.
- Kinashi, T. and Springer, T.A. 1994. Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion. *Blood* **83**(4): 1033-1038.
- King, A.G., Kondo, M., Scherer, D.C., and Weissman, I.L. 2002. Lineage infidelity in myeloid cells with TCR gene rearrangement: a latent developmental potential of proT cells revealed by ectopic cytokine receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4508-4513.
- Koizumi, A., Tsukada, M., Wada, Y., Masuda, H., and Weindruch, R. 1992. Mitotic activity in mice is suppressed by energy restriction-induced torpor. *J Nutr* **122**(7): 1446-1453.
- Kondo, M., Scherer, D.C., Miyamoto, T., King, A.G., Akashi, K., Sugamura, K., and Weissman, I.L. 2000. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* **407**(6802): 383-386.

- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**(5): 661-672.
- Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., and Burgering, B.M. 2002a. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419**(6904): 316-321.
- Kops, G.J., Medema, R.H., Glassford, J., Essers, M.A., Dijkers, P.F., Coffey, P.J., Lam, E.W., and Burgering, B.M. 2002b. Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol* **22**(7): 2025-2036.
- Koury, M.J. and Bondurant, M.C. 1990. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* **248**(4953): 378-381.
- Krosi, G., He, G., Lefrancois, M., Charron, F., Romeo, P.H., Jolicoeur, P., Kirsch, I.R., Nemer, M., and Hoang, T. 1998. Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J Exp Med* **188**(3): 439-450.
- Krosi, J., Austin, P., Beslu, N., Kroon, E., Humphries, R.K., and Sauvageau, G. 2003. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med* **9**(11): 1428-1432.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**(5229): 1427-1429.
- Kunisato, A., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Yamaguchi, T., and Hirai, H. 2004. Stem cell leukemia protein directs hematopoietic stem cell fate. *Blood* **103**(9): 3336-3341.
- Lacorazza, H.D., Yamada, T., Liu, Y., Miyata, Y., Sivina, M., Nunes, J., and Nimer, S.D. 2006. The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Cancer Cell* **9**(3): 175-187.
- Lahlil, R., Lecuyer, E., Herblot, S., and Hoang, T. 2004. SCL assembles a multifactorial complex that determines glycoprotein A expression. *Mol Cell Biol* **24**(4): 1439-1452.
- Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J.C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X.L., Kato, I., Williams, D.A., and Dick, J.E. 1996. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* **2**(12): 1329-1337.

- Larson, R.C., Lavenir, I., Larson, T.A., Baer, R., Warren, A.J., Wadman, I., Nottage, K., and Rabbitts, T.H. 1996. Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tall alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J* **15**(5): 1021-1027.
- Lassila, O., Eskola, J., Toivanen, P., Martin, C., and Dieterlen-Lievre, F. 1978. The origin of lymphoid stem cells studied in chick yolk sac-embryo chimaeras. *Nature* **272**(5651): 353-354.
- Lassila, O., Martin, C., Dieterlen-Lievre, F., Gilmour, D.G., Eskola, J., and Toivanen, P. 1982. Migration of prebursal stem cells from the early chicken embryo to the yolk sac. *Scand J Immunol* **16**(3): 265-268.
- Lecuyer, E., Herblot, S., Saint-Denis, M., Martin, R., Begley, C.G., Porcher, C., Orkin, S.H., and Hoang, T. 2002. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* **100**(7): 2430-2440.
- Leemhuis, T., Yoder, M.C., Grigsby, S., Agüero, B., Eder, P., and Srour, E.F. 1996. Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123. *Exp Hematol* **24**(10): 1215-1224.
- Lerner, C. and Harrison, D.E. 1990. 5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Exp Hematol* **18**(2): 114-118.
- Lessard, J. and Sauvageau, G. 2003. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* **423**(6937): 255-260.
- Li, C.L. and Johnson, G.R. 1992. Rhodamine123 reveals heterogeneity within murine Lin-, Sca-1+ hemopoietic stem cells. *J Exp Med* **175**(6): 1443-1447.
- . 1994. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood* **84**(2): 408-414.
- . 1995. Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization. *Blood* **85**(6): 1472-1479.
- Lin, C.S., Lim, S.K., D'Agati, V., and Costantini, F. 1996. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* **10**(2): 154-164.
- Lin, H. 2002. The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nat Rev Genet* **3**(12): 931-940.
- Liu, C.P. and Auerbach, R. 1991. In vitro development of murine T cells from prethymic and pre-liver embryonic yolk sac hematopoietic stem cells. *Development* **113**(4): 1315-1323.

- Lu, L.S., Wang, S.J., and Auerbach, R. 1996. In vitro and in vivo differentiation into B cells, T cells, and myeloid cells of primitive yolk sac hematopoietic precursor cells expanded > 100-fold by coculture with a clonal yolk sac endothelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14782-14787.
- Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H., and Pabo, C.O. 1994. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* **77**(3): 451-459.
- Martin, R., Lahlil, R., Damert, A., Miquerol, L., Nagy, A., Keller, G., and Hoang, T. 2004. SCL interacts with VEGF to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development* **131**(3): 693-702.
- Massari, M.E. and Murre, C. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**(2): 429-440.
- Matsui, Y., Zsebo, K.M., and Hogan, B.L. 1990. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* **347**(6294): 667-669.
- Matsuoka, S., Tsuji, K., Hisakawa, H., Xu, M., Ebihara, Y., Ishii, T., Sugiyama, D., Manabe, A., Tanaka, R., Ikeda, Y., Asano, S., and Nakahata, T. 2001. Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells. *Blood* **98**(1): 6-12.
- Matsuzaki, Y., Kinjo, K., Mulligan, R.C., and Okano, H. 2004. Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity* **20**(1): 87-93.
- Mazurier, F., Gan, O.I., McKenzie, J.L., Doedens, M., and Dick, J.E. 2004. Lentivector-mediated clonal tracking reveals intrinsic heterogeneity in the human hematopoietic stem cell compartment and culture-induced stem cell impairment. *Blood* **103**(2): 545-552.
- McCulloch, E.A., Siminovitch, L., Till, J.E., Russell, E.S., and Bernstein, S.E. 1965. The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype Sl-Sld. *Blood* **26**(4): 399-410.
- McKenzie, J.L., Gan, O.I., Doedens, M., Wang, J.C., and Dick, J.E. 2006. Individual stem cells with highly variable proliferation and self-renewal properties comprise the human hematopoietic stem cell compartment. *Nat Immunol* **7**(11): 1225-1233.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., and Burgering, B.M. 2000. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**(6779): 782-787.

- Medvinsky, A.L., Samoylina, N.L., Muller, A.M., and Dzierzak, E.A. 1993. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* **364**(6432): 64-67.
- Metcalf, D. 1980. Clonal analysis of proliferation and differentiation of paired daughter cells: action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on granulocyte-macrophage precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(9): 5327-5330.
- Mikkola, H.K., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T.M., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. 2003. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* **421**(6922): 547-551.
- Miller, B.A., Floros, J., Cheung, J.Y., Wojchowski, D.M., Bell, L., Begley, C.G., Elwood, N.J., Kreider, J., and Christian, C. 1994. Steel factor affects SCL expression during normal erythroid differentiation. *Blood* **84**(9): 2971-2976.
- Miller, C.L. and Eaves, C.J. 1997. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13648-13653.
- Miller, C.L., Rebel, V.I., Helgason, C.D., Lansdorp, P.M., and Eaves, C.J. 1997. Impaired steel factor responsiveness differentially affects the detection and long-term maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* **89**(4): 1214-1223.
- Miller, C.L., Rebel, V.I., Lemieux, M.E., Helgason, C.D., Lansdorp, P.M., and Eaves, C.J. 1996. Studies of W mutant mice provide evidence for alternate mechanisms capable of activating hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **24**(2): 185-194.
- Minegishi, N., Ohta, J., Yamagiwa, H., Suzuki, N., Kawauchi, S., Zhou, Y., Takahashi, S., Hayashi, N., Engel, J.D., and Yamamoto, M. 1999. The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood* **93**(12): 4196-4207.
- Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., and Hirao, A. 2007. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* **1**(1): 101-112.
- Miyazawa, K., Williams, D.A., Gotoh, A., Nishimaki, J., Broxmeyer, H.E., and Toyama, K. 1995. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood* **85**(3): 641-649.

- Moore, M.A. and Metcalf, D. 1970. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* **18**(3): 279-296.
- Morrison, S.J., Hemmati, H.D., Wandycz, A.M., and Weissman, I.L. 1995. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10302-10306.
- Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Akashi, K., Globerson, A., and Weissman, I.L. 1996. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med* **2**(9): 1011-1016.
- Morrison, S.J. and Weissman, I.L. 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* **1**(8): 661-673.
- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Jr., and Potter, S.S. 1991. A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* **65**(4): 677-689.
- Muller-Tidow, C., Steffen, B., Cauvet, T., Tickenbrock, L., Ji, P., Diederichs, S., Sargin, B., Kohler, G., Stelljes, M., Puccetti, E., Ruthardt, M., deVos, S., Hiebert, S.W., Koeffler, H.P., Berdel, W.E., and Serve, H. 2004. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* **24**(7): 2890-2904.
- Muller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. 1994. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* **1**(4): 291-301.
- Munoz, M.J. 2003. Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* **124**(1): 43-48.
- Munoz, M.J. and Riddle, D.L. 2003. Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity. *Genetics* **163**(1): 171-180.
- Murdoch, B., Chadwick, K., Martin, M., Shojaei, F., Shah, K.V., Gallacher, L., Moon, R.T., and Bhatia, M. 2003. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3422-3427.
- Murre, C., McCaw, P.S., and Baltimore, D. 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**(5): 777-783.
- Nemoto, S. and Finkel, T. 2002. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* **295**(5564): 2450-2452.

- Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Kawamoto, H., Yoshida, H., Kizumoto, M., Kataoka, H., and Katsura, Y. 1998. In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* **8**(6): 761-769.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* **12**(13): 2048-2060.
- North, T.E., de Bruijn, M.F., Stacy, T., Talebian, L., Lind, E., Robin, C., Binder, M., Dzierzak, E., and Speck, N.A. 2002. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity* **16**(5): 661-672.
- O'Neil, J., Billa, M., Oikemus, S., and Kelliher, M. 2001. The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. *Oncogene* **20**(29): 3897-3905.
- Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, I., and Peault, B. 2002. Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development* **129**(17): 4147-4157.
- Oguro, H., Iwama, A., Morita, Y., Kamijo, T., van Lohuizen, M., and Nakauchi, H. 2006. Differential impact of Ink4a and Arf on hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in Bmi1-deficient mice. *J Exp Med* **203**(10): 2247-2253.
- Oh, I.H. and Eaves, C.J. 2002. Overexpression of a dominant negative form of STAT3 selectively impairs hematopoietic stem cell activity. *Oncogene* **21**(31): 4778-4787.
- Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Miura, Y., and Suda, T. 1991. Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood* **78**(7): 1706-1712.
- . 1992. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* **80**(12): 3044-3050.
- Ono, Y., Fukuhara, N., and Yoshie, O. 1997. Transcriptional activity of TAL1 in T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) requires RBTN1 or -2 and induces TALLA1, a highly specific tumor marker of T-ALL. *J Biol Chem* **272**(7): 4576-4581.
- . 1998. TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3. *Mol Cell Biol* **18**(12): 6939-6950.
- Orlic, D., Anderson, S., Biesecker, L.G., Sorrentino, B.P., and Bodine, D.M. 1995. Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors

for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4601-4605.

- Orr-Urtreger, A., Avivi, A., Zimmer, Y., Givol, D., Yarden, Y., and Lonai, P. 1990. Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus. *Development* **109**(4): 911-923.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. 1996a. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**(5272): 242-245.
- Osawa, M., Nakamura, K., Nishi, N., Takahasi, N., Tokuomoto, Y., Inoue, H., and Nakauchi, H. 1996b. In vivo self-renewal of c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol* **156**(9): 3207-3214.
- Park, C., Afrikanova, I., Chung, Y.S., Zhang, W.J., Arentson, E., Fong Gh, G., Rosendahl, A., and Choi, K. 2004. A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development* **131**(11): 2749-2762.
- Park, D.J., Vuong, P.T., de Vos, S., Douer, D., and Koefler, H.P. 2003a. Comparative analysis of genes regulated by PML/RAR alpha and PLZF/RAR alpha in response to retinoic acid using oligonucleotide arrays. *Blood* **102**(10): 3727-3736.
- Park, I.K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M.W., Pihalja, M., Weissman, I.L., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. 2003b. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* **423**(6937): 302-305.
- Park, S.T. and Sun, X.H. 1998. The Tall oncoprotein inhibits E47-mediated transcription. Mechanism of inhibition. *J Biol Chem* **273**(12): 7030-7037.
- Passegue, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C., and Weissman, I.L. 2005. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* **202**(11): 1599-1611.
- Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., and De Virgilio, C. 2003. TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol Cell* **12**(6): 1607-1613.
- Pettengell, R., Luft, T., Henschler, R., Hows, J.M., Dexter, T.M., Ryder, D., and Testa, N.G. 1994. Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells. *Blood* **84**(11): 3653-3659.

- Petzer, A.L., Zandstra, P.W., Piret, J.M., and Eaves, C.J. 1996. Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med* **183**(6): 2551-2558.
- Pflumio, F., Izac, B., Katz, A., Shultz, L.D., Vainchenker, W., and Coulombel, L. 1996. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood* **88**(10): 3731-3740.
- Phelps, D.E., Hsiao, K.M., Li, Y., Hu, N., Franklin, D.S., Westphal, E., Lee, E.Y., and Xiong, Y. 1998. Coupled transcriptional and translational control of cyclin-dependent kinase inhibitor p18INK4c expression during myogenesis. *Mol Cell Biol* **18**(4): 2334-2343.
- Phillips, R.L., Ernst, R.E., Brunk, B., Ivanova, N., Mahan, M.A., Deanehan, J.K., Moore, K.A., Overton, G.C., and Lemischka, I.R. 2000. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* **288**(5471): 1635-1640.
- Pietrzyk, M.E., Priestley, G.V., and Wolf, N.S. 1985. Normal cycling patterns of hematopoietic stem cell subpopulations: an assay using long-term in vivo BrdU infusion. *Blood* **66**(6): 1460-1462.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., and Koff, A. 1994. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* **8**(1): 9-22.
- Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W., and Orkin, S.H. 1996. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* **86**(1): 47-57.
- Potten, C.S. and Loeffler, M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**(4): 1001-1020.
- Prabhu, S., Ignatova, A., Park, S.T., and Sun, X.H. 1997. Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol Cell Biol* **17**(10): 5888-5896.
- Prasad, K.S. and Brandt, S.J. 1997. Target-dependent effect of phosphorylation on the DNA binding activity of the TAL1/SCL oncoprotein. *J Biol Chem* **272**(17): 11457-11462.
- Prasad, K.S., Jordan, J.E., Koury, M.J., Bondurant, M.C., and Brandt, S.J. 1995. Erythropoietin stimulates transcription of the TAL1/SCL gene and phosphorylation of its protein products. *J Biol Chem* **270**(19): 11603-11611.

- Price, E.R., Ding, H.F., Badalian, T., Bhattacharya, S., Takemoto, C., Yao, T.P., Hemesath, T.J., and Fisher, D.E. 1998. Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. *J Biol Chem* **273**(29): 17983-17986.
- Purton, L.E., Dworkin, S., Olsen, G.H., Walkley, C.R., Fabb, S.A., Collins, S.J., and Chambon, P. 2006. RARgamma is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *J Exp Med* **203**(5): 1283-1293.
- Qiu, F.H., Ray, P., Brown, K., Barker, P.E., Jhanwar, S., Ruddle, F.H., and Besmer, P. 1988. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J* **7**(4): 1003-1011.
- Rajotte, D., Sadowski, H.B., Haman, A., Gopalbhai, K., Meloche, S., Liu, L., Krystal, G., and Hoang, T. 1996. Contribution of both STAT and SRF/TCF to c-fos promoter activation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **88**(8): 2906-2916.
- Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R.C., and Melton, D.A. 2002. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* **298**(5593): 597-600.
- Randall, T.D. and Weissman, I.L. 1997. Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood* **89**(10): 3596-3606.
- Rebel, V.I., Dragowska, W., Eaves, C.J., Humphries, R.K., and Lansdorp, P.M. 1994. Amplification of Sca-1+ Lin- WGA+ cells in serum-free cultures containing steel factor, interleukin-6, and erythropoietin with maintenance of cells with long-term in vivo reconstituting potential. *Blood* **83**(1): 128-136.
- Rebel, V.I., Miller, C.L., Eaves, C.J., and Lansdorp, P.M. 1996. The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. *Blood* **87**(8): 3500-3507.
- Reith, A.D., Rottapel, R., Giddens, E., Brady, C., Forrester, L., and Bernstein, A. 1990. W mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the c-kit receptor. *Genes Dev* **4**(3): 390-400.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I.L. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**(6938): 409-414.

- Reynaud, D., Ravet, E., Titeux, M., Mazurier, F., Renia, L., Dubart-Kupferschmitt, A., Romeo, P.H., and Pflumio, F. 2005. SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. *Blood* **106**(7): 2318-2328.
- Reynolds, B.A. and Weiss, S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**(5052): 1707-1710.
- Rhyu, M.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. 1994. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* **76**(3): 477-491.
- Robb, L., Elwood, N.J., Elefanty, A.G., Kontgen, F., Li, R., Barnett, L.D., and Begley, C.G. 1996. The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J* **15**(16): 4123-4129.
- Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R.P., Metcalf, D., and Begley, C.G. 1995a. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15): 7075-7079.
- Robb, L., Rasko, J.E., Bath, M.L., Strasser, A., and Begley, C.G. 1995b. scl, a gene frequently activated in human T cell leukaemia, does not induce lymphomas in transgenic mice. *Oncogene* **10**(1): 205-209.
- Roberts, V.J., Steenbergen, R., and Murre, C. 1993. Localization of E2A mRNA expression in developing and adult rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(16): 7583-7587.
- Robertson, S.M., Kennedy, M., Shannon, J.M., and Keller, G. 2000. A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1. *Development* **127**(11): 2447-2459.
- Rodrigues, N.P., Janzen, V., Forkert, R., Dombkowski, D.M., Boyd, A.S., Orkin, S.H., Enver, T., Vyas, P., and Scadden, D.T. 2005. Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* **106**(2): 477-484.
- Rose, M.R., Vu, L.N., Park, S.U., and Graves, J.L., Jr. 1992. Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* **27**(2): 241-250.
- Russell, E.S. 1979. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* **20**: 357-459.
- Rutherford, M.N. and LeBrun, D.P. 1998. Restricted expression of E2A protein in primary human tissues correlates with proliferation and differentiation. *Am J Pathol* **153**(1): 165-173.

- Sauvageau, G., Iscove, N.N., and Humphries, R.K. 2004. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* **23**(43): 7223-7232.
- Schofield, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**(1-2): 7-25.
- Seoane, J., Le, H.V., Shen, L., Anderson, S.A., and Massague, J. 2004. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**(2): 211-223.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W.L., Fischer, K.D., Schuh, A.C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. 1997. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* **89**(6): 981-990.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**(6535): 62-66.
- Shank-Calvo, J.A., Draheim, K., Bhasin, M., and Kelliher, M.A. 2006. p16Ink4a or p19Arf loss contributes to Tall-induced leukemogenesis in mice. *Oncogene* **25**(21): 3023-3031.
- Sherr, C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* **274**(5293): 1672-1677.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**(10): 1149-1163.
- Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. 1995. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* **373**(6513): 432-434.
- Silver, L. and Palis, J. 1997. Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood* **89**(4): 1154-1164.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A., and Till, J.E. 1963. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol* **62**: 327-336.
- Siminovitch, L., Till, J.E., and McCulloch, E.A. 1964. Decline in Colony-Forming Ability of Marrow Cells Subjected to Serial Transplantation into Irradiated Mice. *J Cell Physiol* **64**: 23-31.
- Snodgrass, R. and Keller, G. 1987. Clonal fluctuation within the haematopoietic system of mice reconstituted with retrovirus-infected stem cells. *EMBO J* **6**(13): 3955-3960.
- Socolovsky, M., Dusanter-Fourt, I., and Lodish, H.F. 1997. The prolactin receptor and severely truncated erythropoietin receptors support differentiation of erythroid progenitors. *J Biol Chem* **272**(22): 14009-14012.

- Spana, E.P., Kopczynski, C., Goodman, C.S., and Doe, C.Q. 1995. Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the *Drosophila* CNS. *Development* **121**(11): 3489-3494.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature* **414**(6859): 98-104.
- Srour, E.F., Zanjani, E.D., Brandt, J.E., Leemhuis, T., Briddell, R.A., Heerema, N.A., and Hoffman, R. 1992. Sustained human hematopoiesis in sheep transplanted in utero during early gestation with fractionated adult human bone marrow cells. *Blood* **79**(6): 1404-1412.
- Stiles, B., Groszer, M., Wang, S., Jiao, J., and Wu, H. 2004. PTENless means more. *Dev Biol* **273**(2): 175-184.
- Stoffel, R., Ziegler, S., Ghilardi, N., Ledermann, B., de Sauvage, F.J., and Skoda, R.C. 1999. Permissive role of thrombopoietin and granulocyte colony-stimulating factor receptors in hematopoietic cell fate decisions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2): 698-702.
- Stuart, J.A. and Brown, M.F. 2006. Energy, quiescence and the cellular basis of animal life spans. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **143**(1): 12-23.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**(6): 977-988.
- Sumner, R., Crawford, A., Mucenski, M., and Frampton, J. 2000. Initiation of adult myelopoiesis can occur in the absence of c-Myb whereas subsequent development is strictly dependent on the transcription factor. *Oncogene* **19**(30): 3335-3342.
- Sun, X.H. and Baltimore, D. 1991. An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* **64**(2): 459-470.
- Sutherland, H.J., Eaves, C.J., Eaves, A.C., Dragowska, W., and Lansdorp, P.M. 1989. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* **74**(5): 1563-1570.
- Sutherland, H.J., Lansdorp, P.M., Henkelman, D.H., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. 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**(9): 3584-3588.

- Szilvassy, S.J. and Cory, S. 1993. Phenotypic and functional characterization of competitive long-term repopulating hematopoietic stem cells enriched from 5-fluorouracil-treated murine marrow. *Blood* **81**(9): 2310-2320.
- Szilvassy, S.J., Humphries, R.K., Lansdorp, P.M., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. 1990. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(22): 8736-8740.
- Taichman, R.S. 2005. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* **105**(7): 2631-2639.
- Tan, J.C., Nocka, K., Ray, P., Traktman, P., and Besmer, P. 1990. The dominant W42 spotting phenotype results from a missense mutation in the c-kit receptor kinase. *Science* **247**(4939): 209-212.
- Taoudi, S., Morrison, A.M., Inoue, H., Gribi, R., Ure, J., and Medvinsky, A. 2005. Progressive divergence of definitive haematopoietic stem cells from the endothelial compartment does not depend on contact with the foetal liver. *Development* **132**(18): 4179-4191.
- Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J., Sun, T.T., and Lavker, R.M. 2000. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* **102**(4): 451-461.
- Thoren, L.A., Liuba, K., Bryder, D., Nygren, J.M., Jensen, C.T., Qian, H., Antonchuk, J., and Jacobsen, S.E. 2008. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol* **180**(4): 2045-2053.
- Till, J.E., McCulloch, E.A., and Siminovitch, L. 1964. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 29-36.
- Toksoz, D., Zsebo, K.M., Smith, K.A., Hu, S., Brankow, D., Suggs, S.V., Martin, F.H., and Williams, D.A. 1992. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7350-7354.
- Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., Armstrong, S.A., Passegue, E., DePinho, R.A., and Gilliland, D.G. 2007. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* **128**(2): 325-339.

- Traggiati, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.C., Lanzavecchia, A., and Manz, M.G. 2004. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* **304**(5667): 104-107.
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J., Jr., DiStefano, P.S., Chiang, L.W., and Greenberg, M.E. 2002. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* **296**(5567): 530-534.
- Tremblay, M., Herblot, S., Lecuyer, E., and Hoang, T. 2003. Regulation of pT alpha gene expression by a dosage of E2A, HEB, and SCL. *J Biol Chem* **278**(15): 12680-12687.
- Trevisan, M. and Iscove, N.N. 1995. Phenotypic analysis of murine long-term hemopoietic reconstituting cells quantitated competitively in vivo and comparison with more advanced colony-forming progeny. *J Exp Med* **181**(1): 93-103.
- Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., and Orkin, S.H. 1994. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* **371**(6494): 221-226.
- Tsai, F.Y. and Orkin, S.H. 1997. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* **89**(10): 3636-3643.
- Turpen, J.B., Kelley, C.M., Mead, P.E., and Zon, L.I. 1997. Bipotential primitive-definitive hematopoietic progenitors in the vertebrate embryo. *Immunity* **7**(3): 325-334.
- Ueda, T., Tsuji, K., Yoshino, H., Ebihara, Y., Yagasaki, H., Hisakawa, H., Mitsui, T., Manabe, A., Tanaka, R., Kobayashi, K., Ito, M., Yasukawa, K., and Nakahata, T. 2000. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* **105**(7): 1013-1021.
- Valtieri, M., Tocci, A., Gabbianelli, M., Luchetti, L., Masella, B., Vitelli, L., Botta, R., Testa, U., Condorelli, G.L., and Peschle, C. 1998. Enforced TAL-1 expression stimulates primitive, erythroid and megakaryocytic progenitors but blocks the granulopoietic differentiation program. *Cancer Res* **58**(3): 562-569.
- van Os, R., Kamminga, L.M., Ausema, A., Bystrykh, L.V., Draijer, D.P., van Pelt, K., Dontje, B., and de Haan, G. 2007. A Limited role for p21Cip1/Waf1 in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning. *Stem Cells* **25**(4): 836-843.
- Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W.S., and Bernstein, I.D. 2000. Pluripotent, cytokine-dependent,

hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* **6**(11): 1278-1281.

- Venezia, T.A., Merchant, A.A., Ramos, C.A., Whitehouse, N.L., Young, A.S., Shaw, C.A., and Goodell, M.A. 2004. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* **2**(10): e301.
- Visvader, J., Begley, C.G., and Adams, J.M. 1991. Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene* **6**(2): 187-194.
- Visvader, J.E., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. 1998. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev* **12**(4): 473-479.
- Wadman, I.A., Osada, H., Grutz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. 1997. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* **16**(11): 3145-3157.
- Walkley, C.R., Fero, M.L., Chien, W.M., Purton, L.E., and McArthur, G.A. 2005. Negative cell-cycle regulators cooperatively control self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* **7**(2): 172-178.
- Wallenfang, M.R. and Matunis, E. 2003. Developmental biology. Orienting stem cells. *Science* **301**(5639): 1490-1491.
- Wang, L., Yang, L., Filippi, M.D., Williams, D.A., and Zheng, Y. 2006. Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment. *Blood* **107**(1): 98-105.
- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A.H., and Speck, N.A. 1996. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3444-3449.
- Warren, A.J., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Smith, A.J., and Rabbitts, T.H. 1994. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* **78**(1): 45-57.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., 3rd, and Nusse, R. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**(6938): 448-452.
- Wilson, A., Murphy, M.J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M.D., Oser, G.M., Pasche, A.C., Knabenhans, C., Macdonald, H.R., and Trumpp, A. 2004. c-Myc controls the

balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* **18**(22): 2747-2763.

- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., and Hogan, B.L. 1995. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* **9**(17): 2105-2116.
- Worton, R.G., McCulloch, E.A., and Till, J.E. 1969. Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal. *J Exp Med* **130**(1): 91-103.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. 1995. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83**(1): 59-67.
- Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. 2000. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev* **14**(3): 301-312.
- Xin, X.Q., Nelson, C., Collins, L., and Dorshkind, K. 1993. Kinetics of E2A basic helix-loop-helix-protein expression during myelopoiesis and primary B cell differentiation. *J Immunol* **151**(10): 5398-5407.
- Yamada, Y., Warren, A.J., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R., and Rabbitts, T.H. 1998. The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3890-3895.
- Yang, L., Wang, L., Geiger, H., Cancelas, J.A., Mo, J., and Zheng, Y. 2007. Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(12): 5091-5096.
- Yarden, Y., Kuang, W.J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., and Ullrich, A. 1987. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* **6**(11): 3341-3351.
- Yoder, M.C. and Hiatt, K. 1997. Engraftment of embryonic hematopoietic cells in conditioned newborn recipients. *Blood* **89**(6): 2176-2183.
- Yoder, M.C., Hiatt, K., Dutt, P., Mukherjee, P., Bodine, D.M., and Orlic, D. 1997a. Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity* **7**(3): 335-344.
- Yoder, M.C., Hiatt, K., and Mukherjee, P. 1997b. In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6776-6780.

- Yu, H., Yuan, Y., Shen, H., and Cheng, T. 2006. Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18 INK4C and p21 Cip1/Waf1 in opposite manners. *Blood* **107**(3): 1200-1206.
- Yuan, Y., Shen, H., Franklin, D.S., Scadden, D.T., and Cheng, T. 2004. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol* **6**(5): 436-442.
- Yusuf, I. and Fruman, D.A. 2003. Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends Immunol* **24**(7): 380-386.
- Zandstra, P.W., Conneally, E., Petzer, A.L., Piret, J.M., and Eaves, C.J. 1997. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4698-4703.
- Zanjani, E.D., Flake, A.W., Rice, H., Hedrick, M., and Tavassoli, M. 1994. Long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells in sheep. *J Clin Invest* **93**(3): 1051-1055.
- Zeng, H., Yucel, R., Kosan, C., Klein-Hitpass, L., and Moroy, T. 2004. Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J* **23**(20): 4116-4125.
- Zhang, J., Grindley, J.C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X.C., Ross, J.T., Haug, J.S., Rupp, D., Porter-Westpfahl, K.S., Wiedemann, L.M., Wu, H., and Li, L. 2006. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* **441**(7092): 518-522.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., Harris, S., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., and Li, L. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**(6960): 836-841.
- Zhou, S., Morris, J.J., Barnes, Y., Lan, L., Schuetz, J.D., and Sorrentino, B.P. 2002. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12339-12344.
- Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., and Sorrentino, B.P. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* **7**(9): 1028-1034.
- Zhuang, Y., Soriano, P., and Weintraub, H. 1994. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* **79**(5): 875-884.