



Université de Montréal

**Caractérisation du rôle et des mécanismes d'action des  
gènes *Hoxa* dans l'hématopoïèse adulte**

par

Charles-Étienne Lebert-Ghali

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Microbiologie et Immunologie

Décembre 2013

© Charles-Étienne Lebert-Ghali, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Caractérisation du rôle et des mécanismes d'action des  
gènes *Hoxa* dans l'hématopoïèse adulte**

Présenté par :

Charles-Étienne Lebert-Ghali

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Martin Guimond, président-rapporteur

Janetta Bijl, directeur de recherche

Dr Julie Lessard, membre du jury

Dr Frédéric Barabé, examinateur externe

Dr Guillaume Lettre, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Chez les humains, un large pourcentage de leucémies myéloïdes et lymphoïdes exprime des gènes *Homéobox (Hox)* de façon aberrante, principalement ceux du groupe des gènes *Hoxa*. Cette dérégulation de l'expression des gènes *Hox* peut provenir directement des translocations impliquant des gènes *Hox* ou indirectement par d'autres protéines ayant un potentiel oncogénique. De plus, plusieurs études indiquent que les gènes *Hox* jouent un rôle essentiel dans l'initiation de diverses leucémies. Comprendre le fonctionnement des gènes *Hox* dans l'hématopoïèse normale est donc une condition préalable pour élucider leurs fonctions dans les leucémies, ce qui pourrait éventuellement conduire à l'élaboration de nouveaux traitements contre cette maladie. Plusieurs études ont tenté d'élucider les rôles exacts des gènes *Hox* dans l'hématopoïèse via l'utilisation de souris mutantes pour un seul gène *Hox*. Or, en raison du phénomène de redondance fonctionnelle chez cette famille de gènes, ces études ont été peu concluantes.

Il a été précédemment démontré que dans une population de cellules enrichies en cellules souches hématopoïétiques (CSH), les gènes du cluster *Hoxa* sont plus exprimés que les gènes *Hox* des autres clusters. Aussi, il a été établi que les gènes du cluster *Hoxb* sont non essentiels à l'hématopoïèse définitive puisque les CSH mutantes pour les gènes *Hoxb1-9* conservent leur potentiel de reconstitution à long terme. En nous basant sur ces données, nous avons émis l'hypothèse suivante : les gènes *Hoxa* sont essentiels pour l'hématopoïèse normale adulte. Pour tester notre hypothèse, nous avons choisi d'utiliser un modèle de souris comportant une délétion pour l'ensemble des gènes *Hoxa*.

Dans le cadre de cette recherche, nous avons démontré que les CSH, les progéniteurs primitifs et les progéniteurs des cellules B sont particulièrement sensibles au niveau d'expression des gènes *Hoxa*. Plus particulièrement, une baisse de la survie et une différenciation prématurée semblent être à l'origine de la perte des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> dans la moelle osseuse. L'analyse du profil transcriptionnel des CSH par séquençage de l'ARN a révélé que les gènes *Hoxa* sont capables de réguler un vaste réseau de gènes impliqués dans divers processus biologiques. En effet, les gènes *Hoxa* régulent l'expression de plusieurs gènes codant pour des récepteurs de cytokine. De plus, les gènes *Hoxa* influencent l'expression de

gènes jouant une fonction dans l'architecture de la niche hématopoïétique. L'expression de plusieurs molécules d'adhésion est aussi modulée par les gènes *Hoxa*, ce qui peut affecter la relation des CSH avec la niche hématopoïétique.

L'ensemble de ces résultats démontre que les gènes *Hoxa* sont d'importants régulateurs de l'hématopoïèse adulte puisqu'ils sont nécessaires au maintien des CSH et des progéniteurs grâce à leurs effets sur plusieurs processus biologiques comme l'apoptose, le cycle cellulaire et les interactions avec la niche.

Mots-clés : gènes *Hox*, hématopoïèse, cellules souches hématopoïétiques, facteurs de transcription.

## Abstract

In humans, a large percentage of myeloid and lymphoid leukemias exhibit aberrant *Homeobox (Hox)* genes expression, predominantly *Hoxa* genes. This aberrant expression is known to be caused by either translocations involving *Hox* genes or indirect activation of *Hox* genes. In addition, evidence now indicates a critical role for *Hox* genes in the initiation of leukemias. Clearly, understanding how *Hox* genes function in normal hematopoiesis is prerequisite to elucidate their involvement in leukemogenesis and this may eventually lead to new treatments for this disease. Attempts to determine the precise role(s) of *Hox* genes in normal hematopoiesis using single gene loss of function mutants have shown little success due to functional complementation by the remaining *Hox* genes.

We previously showed that the *Hoxa* genes are much higher expressed in enriched hematopoietic stem cell (HSC) populations than the other members of the *Hox* gene family. Moreover, *Hoxb* cluster genes were found to be dispensable for HSCs long-term repopulation of irradiated mice. Thus, we hypothesize that *Hoxa* genes are critical for normal adult hematopoiesis. We have used a multi-gene knockout (KO for the entire *Hoxa* cluster) approach to thoroughly evaluate this issue.

In this thesis, we showed that HSC, primitive progenitors and B cell progenitors are particularly sensitive to the levels of *Hoxa* gene expression. Furthermore, a lower survival and a premature differentiation account for the loss HSC *Hoxa*<sup>-/-</sup> in bone marrow. Differential expression profiling by RNASeq revealed that *Hoxa* genes are capable of regulating a broad array of genes involved in various biological processes. Indeed, *Hoxa* genes regulate the expression of several genes coding for cytokine receptors. Furthermore, *Hoxa* genes modulate the expression of genes implicated in the regulation and formation of the niche architecture. The expression of several adhesion molecules is also modulated by the *Hoxa* genes, which can affect the relationship of HSC with the hematopoietic niche.

Through their action on several biological processes such as apoptosis, cell cycle and niche interactions, *Hoxa* genes are necessary for maintenance of HSC and progenitors. Taken together, these results demonstrate that *Hoxa* genes are important regulators of adult hematopoiesis.

**Keywords** : *Hox* genes, hematopoiesis, hematopoietic stem cells, transcription factors

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xvii
Chapitre 1 : .....	1
Introduction.....	1
<b>1.1) Les généralités du système hématopoïétique.....</b>	<b>1</b>
1.1.1) L'ontogenèse du système hématopoïétique chez la souris .....	1
1.1.2) L'hématopoïèse définitive adulte.....	3
<b>1.2) Les cellules souches hématopoïétiques .....</b>	<b>6</b>
1.2.1) Les propriétés des cellules souches hématopoïétiques.....	6
1.2.2) Le phénotype et l'isolation des CSH murines.....	7
1.2.3) L'hétérogénéité du réservoir de CSH .....	10
1.2.3.1) Des CSH avec des potentiels d'autorenouvellement distincts .....	10
1.2.3.2) Les CSH promyéloïdes, les CSH prolymphoïdes et les CSH équilibrées .....	11
1.2.3.3) Les CSH dormantes (quiescentes) versus les CSH actives (en prolifération) .....	11
1.2.4) L'évolution des propriétés des CSH selon le stade de développement et l'âge .....	12
1.2.4.1) Les propriétés des CSH fœtales versus les CSH adultes .....	12
1.2.4.2) Les altérations des fonctions des CSH avec l'âge .....	14
<b>1.3) Méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des CSH et des progéniteurs.....</b>	<b>19</b>
1.3.1) Le test de cellules formant des colonies (CFC).....	19
1.3.2) Les méthodes de transplantation à long terme pour tester l'activité des CSH .....	21
1.3.3) L'unité de reconstitution hématopoïétique compétitive pour quantifier le nombre de CSH .....	21

<b>1.4) Les progéniteurs du système hématopoïétique</b> .....	<b>23</b>
<b>1.5) La niche hématopoïétique</b> .....	<b>24</b>
1.5.1) La composition et les propriétés de la niche hématopoïétique .....	24
1.5.2) La disposition spatiale des CSH dans la niche de la moelle osseuse .....	25
1.5.3) Les cellules et les facteurs régulant le maintien des CSH .....	26
1.5.4) La matrice extracellulaire .....	27
<b>1.6) La régulation moléculaire du système hématopoïétique</b> .....	<b>29</b>
1.6.1) La régulation des CSH par les cytokines hématopoïétiques classiques.....	29
1.6.2) L'incertitude entourant la régulation des CSH par des voies de signalisation du développement.....	30
1.6.3) Les facteurs de transcription essentiels aux CSH et progéniteurs.....	30
1.6.4) La régulation épigénétique des CSH .....	32
1.6.4.1) Le groupe des Polycomb.....	32
1.6.4.2) Le groupe des Trithorax .....	34
1.6.4.3) L'acétylation des histones .....	36
1.6.4.4) La méthylation de l'ADN .....	37
<b>1.7) Les généralités sur les gènes <i>Hox</i></b> .....	<b>39</b>
1.7.1) L'évolution et conservation des gènes <i>Hox</i> .....	39
1.7.2) Les gènes <i>Hox</i> dans l'embryogenèse.....	40
1.7.3) Les structures et cofacteurs de gènes <i>Hox</i> .....	41
1.7.4) Les cibles des protéines HOX et l'influence sur les processus cellulaires.....	43
<b>1.8) Le profil d'expression des gènes <i>Hox</i> dans l'hématopoïèse</b> .....	<b>45</b>
<b>1.9) La régulation des gènes et protéines HOX</b> .....	<b>46</b>
1.9.1) Les voies de signalisation affectant les gènes <i>Hox</i> .....	46
1.9.2) La régulation des gènes <i>Hox</i> par des régulateurs de la chromatine : les groupes Polycomb et Trithorax.....	46
1.9.3) Les facteurs de transcription régulant directement l'expression des gènes <i>Hox</i> .....	47
1.9.4) La régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle.....	47
<b>1.10) L'implication des gènes <i>Hox</i> dans les leucémies</b> .....	<b>49</b>
1.10.1) Les translocations impliquant les gènes <i>Hox</i> .....	50
1.10.2) La dérégulation de l'expression des gènes <i>Hox</i> dans plusieurs cas de leucémies .....	51
1.10.3) Les gènes <i>Hox</i> comme marqueur de pronostic.....	52
<b>1.11) Le rôle des gènes <i>Hox</i> dans l'hématopoïèse</b> .....	<b>53</b>



1.11.1) Les études sur la surexpression des gènes <i>Hox</i> dans les cellules hématopoïétiques	54
1.11.2) La mutation des gènes <i>Hox</i> et la redondance fonctionnelle.....	55
<b>1.12) Raisonnement, hypothèse et modèles murins utilisés dans cette thèse: .....</b>	<b>57</b>
1.12.1) Raisonnement et hypothèse.....	57
1.12.2) Modèles murins utilisés dans cette thèse :.....	58
<b>Chapitre 2 : Article #1.....</b>	<b>60</b>
<b>The HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells.....</b>	<b>60</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>62</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>63</b>
<b>MATERIAL &amp; METHODS.....</b>	<b>65</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>69</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>73</b>
<b>SUPPORT AND FINANCIAL DISCLOSURE DECLARATION .....</b>	<b>76</b>
<b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>76</b>
<b>AUTHORSHIP.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERENCE LIST .....</b>	<b>77</b>
<b>LEGENDS AND FIGURES .....</b>	<b>82</b>
<b>TABLES .....</b>	<b>91</b>
<b>SUPPLEMENTAL FIGURES.....</b>	<b>93</b>
<b>SUPPLEMENTAL TABLES.....</b>	<b>96</b>
<b>Chapitre 3 : Article #2.....</b>	<b>99</b>
<b><i>Hoxa</i> genes are critical for maintenance of adult hematopoietic stem cells and regulate their interaction with the niche .....</b>	<b>99</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>101</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>102</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>105</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>114</b>
<b>EXPERIMENTAL PROCEDURES .....</b>	<b>118</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>122</b>
<b>REFERENCE LIST .....</b>	<b>123</b>

<b>LEGENDS AND FIGURES</b> .....	<b>131</b>
<b>TABLES</b> .....	<b>140</b>
<b>SUPPLEMENTAL FIGURES</b> .....	<b>144</b>
<b>SUPPLEMENTAL TABLES</b> .....	<b>146</b>
<b>Chapitre 4 :</b> .....	<b>150</b>
<b>Discussion, conclusion et perspectives</b> .....	<b>150</b>
<b>4.1) Profil d'expression des gènes <i>Hoxa</i> dans les populations de CSH et de progéniteurs primitifs (Article 1)</b> .....	<b>150</b>
<b>4.2) Conséquences de l'ablation des gènes <i>Hoxa</i> sur les cellules hématopoïétiques : un effet dose dépendant (Article 1 et 2)</b> .....	<b>152</b>
4.2.1) L'effet de la perte des gènes <i>Hoxa</i> sur les cellules différenciées.....	153
4.2.2) Les progéniteurs de cellules B et les progéniteurs myéloïdes sont sensibles au niveau d'expression des gènes <i>Hoxa</i> .....	154
4.2.3) En situation d'homéostasie, les CSH et les progéniteurs primitifs sont aussi affectés par la perte des gènes <i>Hoxa</i> .....	156
4.2.4) Les rôles des gènes <i>Hoxa</i> dans les CSH.....	158
<b>4.3) Mécanismes d'action des gènes <i>Hoxa</i> (Article 2):</b> .....	<b>160</b>
4.3.1) Les gènes <i>Hoxa</i> affectent les voies des cytokines .....	161
4.3.2) Les gènes <i>Hoxa</i> sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose .....	162
4.3.3) Plusieurs facteurs de transcription ayant une fonction connue dans l'hématopoïèse sont régulés par les gènes <i>Hoxa</i> .....	164
4.3.4) Les gènes <i>Hoxa</i> influencent la relation des CSH avec leur niche .....	165
4.3.4.1) Les gènes <i>Hoxa</i> régulent des gènes participant à la formation ou au remodelage de la MEC .....	165
4.3.4.2) Des molécules d'adhésion sont affectées par la perte des gènes <i>Hoxa</i> .....	166
<b>4.4) Quels gènes du cluster <i>Hoxa</i> sont les plus importants pour la fonction des CSH adultes</b> .....	<b>168</b>
<b>4.5) Influence des séquences non codantes présentes dans le cluster <i>Hoxa</i></b> .....	<b>169</b>
<b>4.6) Compensation fonctionnelle du cluster <i>Hoxb</i></b> .....	<b>170</b>
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>172</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>174</b>

**Annexe 1.....i**  
**Liste des publications ..... i**

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Marqueurs phénotypiques ou colorations définissant les CSH et les progéniteurs .	9
<b>Tableau 2:</b> Méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des CSH et des progéniteurs .....	23
<b>Tableau 3 :</b> Résumé des phénotypes des diverses populations cellulaires chez les souris <i>Hoxa</i> <sup>+/-</sup> , <i>Hoxa</i> <sup>-/-</sup> et <i>Hoxa9</i> <sup>-/-</sup> .....	171

## Liste des figures

<b>Figure 1: L'ontogenèse du système hématopoïétique chez la souris.</b> .....	3
<b>Figure 2: L'hématopoïèse définitive adulte</b> .....	5
<b>Figure 3: Schématisation des changements fonctionnels des CSH au cours du développement embryonnaire et lors du vieillissement du système hématopoïétique.</b> .....	18
<b>Figure 4: Schématisation de la niche hématopoïétique</b> .....	28
<b>Figure 5: La régulation moléculaire du système hématopoïétique.</b> .....	38
<b>Figure 6: L'organisation des gènes <i>Hox</i> en clusters et leurs implications dans l'embryogenèse.</b> .....	40
<b>Figure 7: Structure d'un gène <i>Hox</i> et d'une protéine HOX.</b> .....	43
<b>Figure 8: La régulation des gènes et protéines HOX.</b> .....	49
<b>Figure 9: L'implication des gènes <i>Hox</i> dans les leucémies.</b> .....	53

## Liste des abréviations

AbdA : *Abdominal-A*

AbdB : *Abdominal-B*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AGM : *Aorta-gonade-mesonephros*

Antp : *Antennapedia*

APC : *Allophycocyanin*

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNnc: ARN non codant

ATP : Adénosine triphosphate

Bcl2l1 : *B-cell lymphoma 2 Like 1*

BFU-E : *Burst forming unit-erythroid*

Bmi1 : *B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1*

BMP : *Bone morphogenetic protein*

BrdU : Bromodéoxyuridine

Bx-C : *Bithorax*

C/EBPa : *ccat enhancer binding protein alpha*

CAFC : *Cobblestone area forming cell assay*

CBP/p300 : *CREB-binding protein/p300*

Ccl : *Chemokine (C-C Motif) ligand*

CD : *Cluster of differentiation* (famille d'antigènes de surface cellulaire)

CDX : *Caudal Type Homeobox*

CFC : *Colony forming cell*

CFU : *Colony-forming unit*

CFU-B : *Colony-forming unit B cells*

CFU-E : *Erythrocyte colony-forming unit*

CFU-G : *CFU-granulocyte*

CFU-GEMM : *CFU- granulocyte, erythroid, macrophage/monocyte, megakaryocyte*

CFU-GM : *CFU-granulocyte/macrophage*  
CFU-M : *CFU-monocyte/macrophage*  
CFU-Mk : *CFU- megakaryocyte*  
CITED2 : *Cbp/p300-interacting transactivator 2*  
C-kit : *Tyrosine-protein kinase Kit*  
CLP : Progéniteur commun lymphoïde  
CMP : Progéniteur commun myéloïde  
C-myb : *V-Myb Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog*  
C-myc : *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*  
Col : Collagène  
CRU : Unité de reconstitution hématopoïétique compétitive (*Competitive repopulating unit*)  
Csf2r : *Colony Stimulating Factor 2 Receptor*  
CSH : Cellule souche hématopoïétique  
CSH-Bal: CSH équilibrée  
CSH-IT : CSH- Moyen terme  
CSH-LT : CSH-Long terme  
CSH-Ly : CSH à dominance lymphoïde  
CSH-My : CSH à dominance myéloïde  
CSH-ST: CSH-Court terme  
CXCL12 : *C-X-C motif chemokine 12*  
CXCR4 : *C-X-C chemokine receptor type 4*  
Cybb : *Cytochrome b-245, beta polypeptide*  
Dfd : *Deformed*  
DNMT1 : *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1*  
E : *Embryonic day*  
EBF : *Early B cell factor*  
EMCN : *Endomucin*  
EPCR : *Endothelial protein C receptor*  
EPO : Érythropoïétine  
Erg : *Early growth response protein 1*  
ESAM1 : *Endothelial cell-selective adhesion molecule*

Evi1 : *Ecotropic virus integration site 1*  
Flk2 : *Fetal liver kinase-2*  
FLT3 : *Receptor-type tyrosine-protein kinase*  
FLT3-L : *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*  
FOG-1 : *Friend of GATA-1*  
G0: *Gap 0*  
G1: *Gap 1*  
Gata : *GATA Binding Protein*  
Gfi1: *Growth factor independent 1*  
GFP : *Protéine fluorescente verte*  
GMP : *Progéniteur des granulocytes et monocytes*  
Hes : *Hairy and enhancer of split*  
HOTAIRM1 : *HOX antisense intergenic RNA myeloid 1*  
Hox : *Homéobox*  
IL : *Interleukine*  
IL-10rb : *Interleukin 10 receptor, beta subunit*  
IL-18r : *Interleukin-18 receptor 1*  
IL-7R : *Récepteur de l'interleukine 7*  
Irak3 : *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 3*  
Itga : *Integrin alpha*  
Itgb : *Integrin beta*  
KO : *knockout*  
Lab : *Labial*  
Lin<sup>-</sup> : *lineage-negative*  
Lin28b : *Lin-28 Homolog B*  
LKS : *Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca<sup>-</sup>*  
LLA : *Leucémie lymphoblastique aiguë*  
LMA : *Leucémie myéloblastique aiguë*  
LMC : *Leucémie myéloïde chronique*  
Lmo2 : *LIM domain only 2*  
LSC : *Cytométrie à balayage laser*



LTC-IC : *Long-term culture-initiating cell assay.*

Map3k14 : *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 14*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MEC : *Matrice extracellulaire*

Meis : *Myeloid Ecotropic Viral Integration Site*

MENIN : *Multiple Endocrine Neoplasia I*

MEP : *Progéniteurs des mégacaryocytes et des cellules érythroïdes*

MLL : *Mixed-Lineage, Leukemia*

MMP : *Métalloprotéase matricielle*

MPP : *Progéniteur multipotent*

MxCre : *Mx1-cre; Système inductible de Recombinase Cre*

Nfkbid : *Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells Inhibitor, Delta*

NF-Y : *Nuclear transcription factor Y*

Npm1 : *Nucleophosmin1*

PAX5 : *Paired box 5*

Pb : *Proboscipedia*

Pbx : *Pre-B cell homeobox*

Pcgf1 : *Polycomb Group Ring Finger 1*

PCR : *Polymerase chain reaction*

PRC1/PRC2 : *Polycomb Repressive Complex 1/2*

Pdgfrb : *Beta-type platelet-derived growth factor receptor*

pIpC : *Polyriboinosinic:polyribocytidylic acid*

PKC : *Protein kinase C*

Q-RT-PCR : *Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*

RA : *Acide rétinoïque*

RbpJ : *Recombining binding protein suppressor of hairless*

RH-123 : *Rhodamine 123*

RNASEq : *RNA Sequencing*

ROS : *Dérivé réactif de l'oxygène*

Runx1 : *Runt-related transcription factor 1*

S phase : *Synthesis phase*  
Sca-1: *Stem cell antigen-1*  
SCF: *Stem cell factor*  
Scr : *Sex combs reduced*  
SHP1 : *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*  
SLAM : *Signaling lymphocytic activation molecule*  
SMAD : *Mothers against decapentaplegic homolog*  
Sox : *Sex determining region Y-box*  
SP : *Side population*  
Tal1/Scl : *T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1*  
TALE : *Three amino acid loop extension*  
TCF-1 : *T-Cell-Specific Transcription Factor 1*  
TCR : Récepteur des cellules T  
TEL/ETV6 : *Ets Variant 6*  
TGF : *Transforming growth factor*  
TGF- $\beta$  : *Transforming growth factor beta*  
TGF $\beta$ 2 : *Transforming growth factor beta receptor 2*  
TNF : *Tumor necrosis factors*  
TPO : Thrombopoïétine  
Transporteurs ABC : *ATP-binding cassette transporter*  
Trib1 : *Tribbles Pseudokinase*  
Ubx : *Ultrabithorax*  
VCL : *Vinculin*  
Vegfa : *Vascular endothelial growth factor*  
Vldlr : *Very-low-density-lipoprotein receptor*  
WW-IC : *Whitlock-Witte-initiating cells*

*À ma famille,*

## Remerciements

Le doctorat est un engagement personnel, néanmoins, sa réalisation est intimement liée au soutien scientifique, moral et financier de plusieurs personnes et organismes.

En tout premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Dr. Janetta Bijl, pour m'avoir accordé sa confiance et permis d'œuvrer sur un projet aussi passionnant. Tout au long de mon cheminement, son soutien scientifique, sa patience à transmettre ses connaissances et ses encouragements m'ont permis de persévérer et de faire croître en moi une réelle passion pour la recherche. Cela m'a permis d'acquérir une solide expérience en recherche scientifique.

Également, je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, Dr. Martin Guimond, Dr. Julie Lessard, Dr. Frédéric Barabé, Dr. Guillaume Lettre pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit ainsi que pour leurs intérêts envers mon objet de recherche.

Je tiens aussi à adresser mes remerciements aux membres de mon comité de suivis, Dr. Julie Lessard, Dr. Éric Milot et Dr. Sylvie Lesage, ainsi qu'à Dr. Gorazd Krosl pour leurs judicieux conseils et leur contribution active à ma formation scientifique lesquels m'ont permis d'approfondir mes réflexions.

De même, je remercie nos collaborateurs Dr. Glenda Dickson, Dr. Alexander Thompson et Dr. Guy Sauvageau ainsi que Dr. Marie Kmita et Dr. Denis Duboule pour nous avoir gracieusement donné le modèle de souris *Hoxa<sup>flax/flax</sup>*.

Aussi, je souhaite exprimer ma gratitude envers tous les membres du laboratoire, Mona Hassawi, Héloïse Frison, Gratianna Vaisson, Gloria Giono Chiang, Marilaine Fournier, Dr. Elena A. Shestakova, Félix Jules et François Desmeules. Je vous remercie chaleureusement pour votre enthousiasme et les discussions parfois enflammées qui ont su animer mon quotidien au laboratoire.

J'aimerais souligner la reconnaissance particulière que j'ai envers Mona Hassawi pour sa patience, sa bonne humeur et l'atmosphère joviale qu'elle a su apporter au laboratoire. Sa rhétorique hors du commun (et toujours en toute modestie) lors de nos discussions m'a toujours fait sourire. Je remercie Héloïse Frison qui a su partager sa passion débordante pour la musique et le cinéma, Gratianna Vaisson pour son surplus énergétique occasionnel qui a

animé le laboratoire ainsi que Gloria Giono Chiang pour son calme ainsi que son enthousiasme à partager la culture de son pays.

De plus, je ne pourrais passer sous silence mes collègues et les membres du Centre de Recherche HMR avec qui j'ai pu lier des amitiés. Vous avez participé à faire de ma formation scientifique une expérience mémorable.

Je remercie aussi le personnel des différentes plateformes du Centre de Recherche HMR. Un grand merci à Nathalie Henley et Martine Dupuis pour leur aide et leur patience. Merci aussi au personnel de l'animalerie pour leur travail remarquable, mais surtout pour leur bonne humeur au quotidien. Aussi, j'ai une petite pensée pour les souris qui ont participé à cette étude, sans elles rien n'aurait été possible.

J'aimerais aussi remercier les organismes subventionnaires, soit la « Société de leucémie et lymphome du Canada » et la « Société canadienne du cancer ». Sans leurs soutiens financiers, ce projet n'aurait pas pu aboutir. Je tiens personnellement à remercier le département de Microbiologie et d'Immunologie de l'Université de Montréal qui m'a octroyé un financement pendant plusieurs années ainsi que la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) qui m'a accordé une bourse de rédaction.

Je remercie aussi mes amis qui ont été d'un grand soutien moral durant toutes ces années. Ils ont su être une source d'équilibre dans ma vie pour l'aboutissement et la réussite de mon doctorat.

Finalement, tout au long de ce périple, deux personnes m'ont constamment épaulé quand j'en ai eu besoin. Je tiens donc à remercier tout particulièrement ma mère et ma sœur pour leur soutien inconditionnel. Merci d'avoir partagé ma passion pour la science et de vous être donné tant de mal à comprendre mon projet de recherche ainsi que de m'avoir encouragé toutes ces années !!! Je vous en suis très reconnaissant.

# **Chapitre 1 :**

## **Introduction**

### **1.1) Les généralités du système hématopoïétique**

#### **1.1.1) L'ontogenèse du système hématopoïétique chez la souris**

Chez la souris et l'humain, l'apparition du système hématopoïétique se déroule en plusieurs phases successives durant l'embryogenèse (Figure 1).

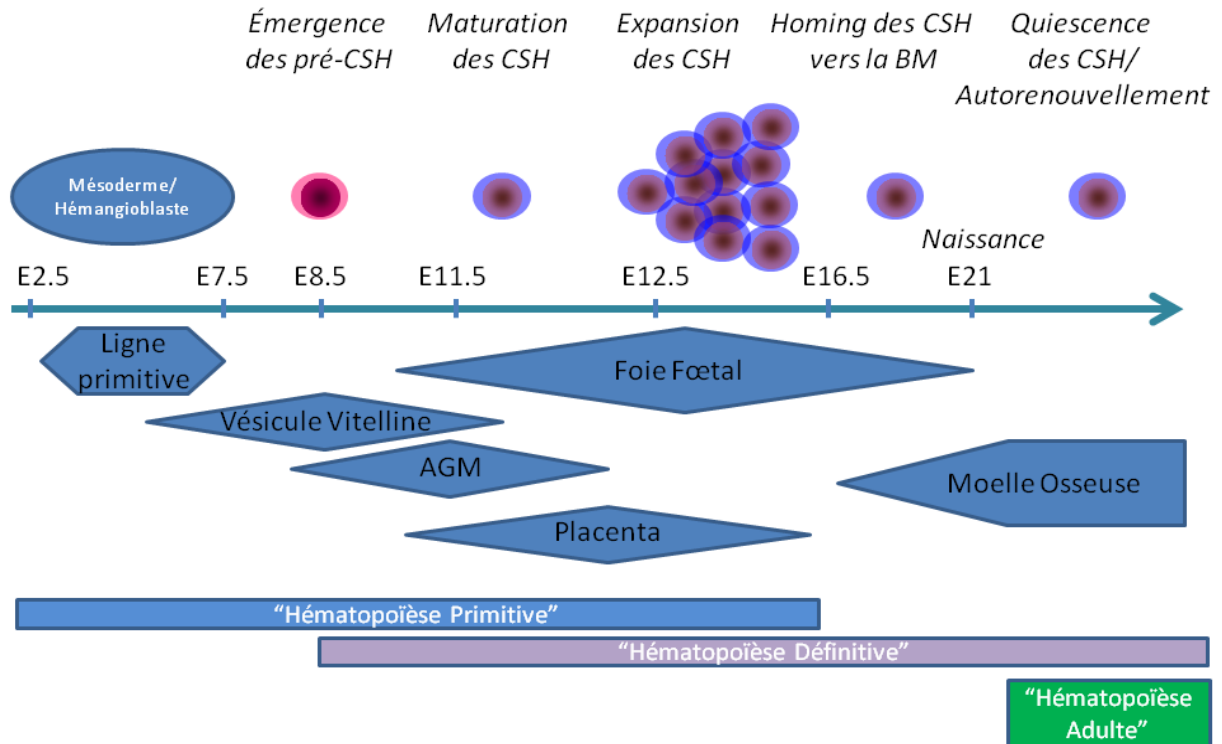
La mise en place du système hématopoïétique commence après la gastrulation au niveau de la ligne primitive (« primitive streak ») (Huber et al. 2004; Mikkola and Orkin 2006). L'hémangioblaste, un sous groupe de cellules spécialisées du mésoderme, donne naissance aux premières cellules sanguines ainsi qu'à des cellules endothéliales (Sabin 1917). S'ensuit la migration de ses précurseurs vers le sac vitellin qui devient alors un site majeur de l'hématopoïèse embryonnaire (Mikkola and Orkin 2006). En effet, ces précurseurs vont d'abord initier la production des premiers érythrocytes primitifs (E7.0-8.5) et puis la production de progéniteurs myéloérythroïdes définitifs (Cumano, Dieterlen-Lievre, and Godin 1996; McGrath and Palis 2005; Palis et al. 1999). Le sac vitellin n'est pas un environnement qui supporte la différenciation des progéniteurs myéloérythroïdes définitifs, ces derniers vont alors coloniser le foie foetal. Malgré l'importance du sac vitellin dans la production des premières cellules hématopoïétiques, il ne semble pas être le site ou du moins une source majeure d'où émergent les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Mikkola and Orkin 2006).

En effet, les progéniteurs hématopoïétiques (E8.5) qui donneront les CSH définitives apparaissent indépendamment dans une tout autre région anatomique appelée le splanchnopleura et qui deviendra par la suite l'aorta-gonade-mesonephros (AGM). Les premières CSH définitives produites nécessiteront d'autres étapes de maturation afin qu'elles acquièrent les propriétés des CSH de la moelle osseuse (Cumano, Dieterlen-Lievre, and Godin 1996; Jaffredo et al. 2005; Mikkola and Orkin 2006).

Il n'est pas encore clair si le placenta produit des CSH définitives, mais cet organe est impliqué dans l'expansion des CSH définitives (E11.5-12.5) provenant soit directement du placenta soit de l'AGM (Gekas et al. 2005; Mikkola and Orkin 2006).

S'ensuit alors une colonisation en deux phases du foie fœtal : (I) par des progéniteurs myéloérythroïdes provenant du sac vitellin (E9.5-10.5) et (II) par les CSH définitives issues de l'AGM et du placenta (E11.5). Le foie fœtal n'est pas un organe qui va produire des CSH définitives toutefois, il joue un rôle crucial puisqu'il représente le site principal de l'expansion et de la différenciation des CSH définitives (E11.5-16.5) (Johnson and Moore 1975; Mikkola and Orkin 2006). Les CSH définitives et les progéniteurs du foie fœtal vont alors commencer à migrer vers la moelle osseuse (~E15.5), le micro environnement qui deviendra le site principal de résidence des CSH adultes tout au long de la vie d'un individu (Christensen et al. 2004; Mikkola and Orkin 2006).

L'ontogenèse du système hématopoïétique est un processus complexe et s'effectue globalement à partir de deux sites anatomiques distincts. Les différents micro-environnements par lesquels les premières cellules hématopoïétiques transitent vont fournir les signaux nécessaires à leur expansion, leur maturation et leur différenciation dans le but ultime de produire les CSH définitives.



**Figure 1: L'ontogénèse du système hématopoïétique chez la souris.**

Adapté de (Mikkola and Orkin 2006)

### 1.1.2) L'hématopoïèse définitive adulte

L'hématopoïèse est le processus régulé qui permet la formation et le renouvellement des cellules du sang, et ce, à partir des CSH (Figure 2) (Godin and Cumano 2002). Par exemple, chez l'humain, environ  $10^{12}$  cellules sont remplacées quotidiennement (Doulatov et al. 2012). En effet, le sang est composé d'une large variété de cellules ayant diverses fonctions, mais une grande majorité d'entre elles ont une durée de vie limitée. Le remplacement de ces cellules est donc crucial pour la survie d'un individu puisqu'elles assurent des fonctions vitales comme, le transport de l'oxygène (érythrocyte), la coagulation (mégacaryocyte/thrombocyte), et la défense immunitaire contre des pathogènes (leucocytes) (Godin and Cumano 2002).

Les cellules matures proviennent de trois grandes lignées hématopoïétiques : (I) la lignée lymphoïde (II) la lignée myéloïde et (III) la lignée mégacaryocyte/érythrocyte. Les

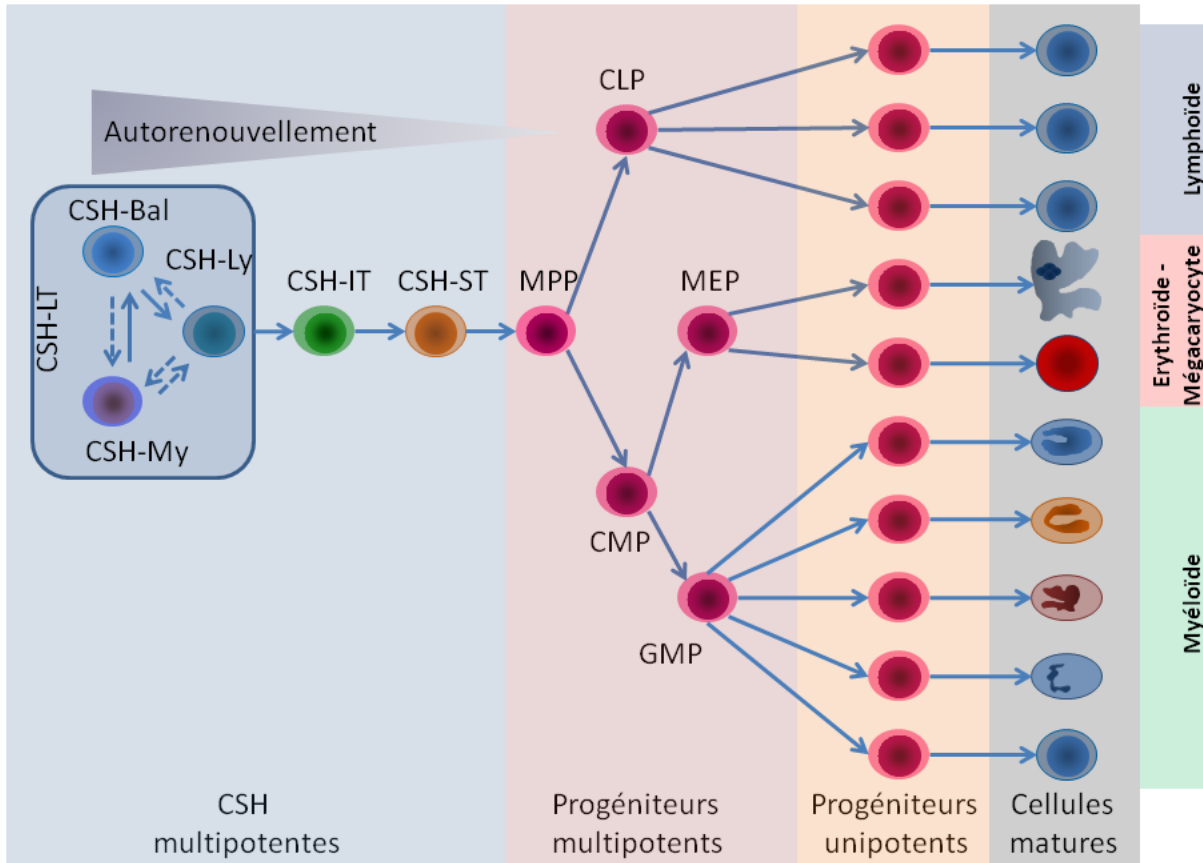


cellules matures des trois lignées vont dériver de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, lesquels sont issus de la différenciation des CSH (Orkin 2000).

Chez un individu sain, le site primaire de l'hématopoïèse est la moelle osseuse. Malgré qu'un faible pourcentage des CSH se retrouve dans la circulation ou d'autres organes de façon transitoire, les CSH résident et sont maintenues dans la moelle osseuse durant toute la vie d'un individu (Ugarte and Forsberg 2013). La moelle osseuse est aussi le compartiment d'où émergent les progéniteurs hématopoïétiques primitifs. Dépendamment du type de progéniteurs, leur différenciation continuera dans la moelle osseuse ou dans d'autres organes hématopoïétiques. C'est notamment le cas des cellules T qui seront générées dans le thymus après la migration des progéniteurs lymphoïdes dans cet organe (Bhandoola et al. 2007; Hardy and Hayakawa 2001; Iwasaki and Akashi 2007).

La rate, les ganglions et autres organes lymphoïdes secondaires (eg. les amygdales) sont principalement des sites de stockage de cellules immunitaires où ces dernières peuvent rencontrer des antigènes. Ces organes assurent plutôt des fonctions de défense immunitaire en permettant la prolifération et la différenciation de cellules immunitaires en cas d'infection. La rate joue aussi le rôle de la filtration du système sanguin en éliminant des cellules endommagées ou débris cellulaires (Mebius and Kraal 2005).

La production des cellules sanguines chez l'adulte s'effectue donc dans la moelle osseuse, mais la différenciation et la maturation finale de certaines cellules peuvent impliquer d'autres compartiments hématopoïétiques.



**Figure 2: L'hématopoïèse définitive adulte**

Lorsqu'une CSH « long terme » (CSH-LT) décide de se différencier, elle va générer des CSH « moyen terme » et « court terme » (CSH- IT/ST) qui se différencieront subséquemment en progéniteurs multipotents (progéniteurs multipotents, MPP; progéniteurs communs lymphoïdes, CLP; progéniteurs communs myéloïdes, CMP; progéniteurs des mégacaryocytes et des cellules érythroïdes, MEP et progéniteurs des granulocytes et monocytes, GMP). Ces progéniteurs multipotents donneront à leurs tours des progéniteurs unipotents lesquels s'engageront alors dans les stades finaux de la différenciation afin de donner des cellules matures spécialisées. Les cellules matures proviennent de trois grandes lignées hématopoïétiques : (I) la lignée lymphoïde (II) la lignée myéloïde et (III) la lignée mégacaryocyte/érythrocyte.

## **1.2) Les cellules souches hématopoïétiques**

### **1.2.1) Les propriétés des cellules souches hématopoïétiques**

Les chercheurs canadiens Till et McCulloch ont été des pionniers dans la recherche sur les cellules souches hématopoïétiques (Becker, Mc, and Till 1963; McCulloch and Till 1960; Siminovitch, McCulloch, and Till 1963). Par contre, plusieurs années ont été nécessaires pour définir clairement les propriétés fonctionnelles qui caractérisent les CSH.

Les CSHs sont caractérisées par (I) leur capacité à se différencier pour (re)générer toutes les cellules du sang (multipotentes) et (II) leur capacité à s'autorenouveler pour maintenir leur nombre (Godin and Cumano 2002). En effet, l'autorenouvellement est la capacité des cellules souches à se diviser en l'absence de différenciation cellulaire (pour au moins une cellule fille) afin que le bassin de cellules souches soit conservé. La prolifération est un terme plus général qui désigne l'augmentation du nombre de cellules par division cellulaire. Contrairement à l'autorenouvellement, la prolifération peut donc concerner tant les cellules souches que les progéniteurs et des cellules spécialisées (e.g. cellules T) et n'exclut pas la différenciation cellulaire. Dans le contexte dynamique du système hématopoïétique, un équilibre entre l'autorenouvellement, la prolifération et la différenciation des CSH est essentiel au maintien des CSH tout au long de la vie d'un individu.

L'autorenouvellement des CSH peut favoriser le maintien des CSH ou l'expansion des CSH. Dans le premier cas, une CSH se divise de façon asymétrique ce qui donnera une cellule fille avec des propriétés identiques à la CSH mère et une cellule fille destinée à se différencier. Cette situation d'autorenouvellement caractérise surtout les CSH adultes et permet de maintenir la taille du réservoir de CSH au niveau de la moelle osseuse. Dans le deuxième cas, une CSH peut effectuer une division symétrique où les deux cellules filles conservent les propriétés de cellules souches. Il en découle une expansion nette du nombre de CSH, une situation qui se rencontre au niveau du foie fœtal (E11.5-16.5) et lors de greffe de CSH pour rétablir le bassin de CSH et reconstituer la moelle osseuse. De plus, une CSH peut effectuer une division symétrique où les deux cellules filles choisissent la voie de différenciation. Cette situation va rapidement mener à l'épuisement du bassin de CSH, une situation rencontrée

lorsque les CSH sont cultivées *in vitro* dans les conditions actuellement disponibles (Tajbakhsh, Rocheteau, and Le Roux 2009).

Finalement, les CSH détiennent un potentiel d'autorenouvellement très élevé, mais pas illimité puisque des transplantations en série chez la souris sont possibles sur 4 à 6 passages *in vivo* avant d'épuiser totalement le bassin de CSH (Park, Morrison, and Clarke 2004).

### **1.2.2) Le phénotype et l'isolation des CSH murines**

Les premières tentatives pour isoler les CSH ont été conduites par le groupe de Till et McCulloch (Worton, McCulloch, and Till 1969, 1969) et de Van Bekkum (van Bekkum et al. 1979), mais à cette époque, la technologie disponible pour isoler les CSH était plutôt rudimentaire. Les progrès dans le domaine de la cytométrie en flux et des anticorps monoclonaux ont alors ouvert la porte à la purification de fractions hautement enrichies en CSH murines et humaines (Doulatov et al. 2012; Weissman 2002).

Les CSH murines représentent environ 0,008% de la moelle osseuse totale (Kiel et al 2005 Cell). Irving L. Weissman et son groupe ont été des pionniers dans la découverte des premiers marqueurs de surface pour purifier les CSH. Ils ont démontré que l'activité des CSH résidait uniquement dans la population Lin<sup>-</sup>Thy1<sup>lo</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> (où la fraction lin- représente l'absence des marqueurs de différenciation hématopoïétique B220<sup>-</sup>, Mac1<sup>-</sup>, Gr1<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup> et Ter119<sup>-</sup>) (Ikuta and Weissman 1992; Morrison and Weissman 1994; Muller-Sieburg, Whitlock, and Weissman 1986; Smith, Weissman, and Heimfeld 1991; Spangrude, Heimfeld, and Weissman 1988; Uchida and Weissman 1992). Par la suite, l'utilisation des marqueurs CD34, CD38 et Flk2/CD135 a permis de raffiner la purification des CSH (Christensen and Weissman 2001; Dagher et al. 1998; Osawa et al. 1996; Randall et al. 1996; Zhao et al. 2000). Cette combinaison de marqueurs (Lin/Sca-1/c-kit/ Thy1/Flk2/CD38/CD34) est donc devenue la méthode « classique » pour analyser et purifier les CSH pendant plus de 10 ans.

Par contre, la purification des CSH par ces marqueurs pose plusieurs problèmes : (I) la quantité de marqueurs à utiliser est grande, et (II) l'expression de Thy1 est restreinte qu'à certaines lignées de souris (Spangrude and Brooks 1992). De plus, (III) l'expression de CD34 et CD38 est régulée durant le développement embryonnaire/néonatal, (IV) l'état d'activation des CSH affecte l'expression de CD34 et CD38 (Higuchi, Zeng, and Ogawa 2003; Ito, Tajima, and Ogawa 2000; Matsuoka et al. 2001; Sato, Laver, and Ogawa 1999; Tajima et al. 2001), et

(V) l'utilisation de CD34 et CD38 est inefficace pour isoler les CSH mobilisées par des cytokines, prélevées chez les souris âgées ou chez des souris ayant reçu une greffe de CSH, ce qui rend ces deux marqueurs peu fiables (Liang, Van Zant, and Szilvassy 2005; Morrison, Wandycz, et al. 1996; Morrison et al. 1997; Morrison, Wright, and Weissman 1997; Sudo et al. 2000).

En 2005, une alternative est proposée par le groupe de Sean J. Morrison avec l'utilisation des marqueurs SLAM pour purifier les CSH (Kiel et al. 2005). L'utilisation de deux marqueurs, soit CD150<sup>+</sup>/CD48<sup>-</sup> est suffisante pour obtenir une purification équivalente à la fraction Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/Thy1<sup>lo</sup> (la fréquence en CSH = 1/5). L'alliance des marqueurs SLAM et 'classique' Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/CD150<sup>+</sup>/CD48<sup>-</sup> a permis d'obtenir le taux d'enrichissement le plus haut atteint à ce jour, avec une fréquence en CSH de 1 sur 2.1 (47%) (Kiel et al. 2005). Les SLAM permettent aussi de distinguer les CSH-LT des progéniteurs primitifs, ces derniers étant CD150<sup>-</sup>/CD48<sup>-</sup>/CD244<sup>+</sup> ou CD150<sup>-</sup>/CD48<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup> (Kiel et al. 2005; Oguro, Ding, and Morrison 2013; Van Zant 2006).

De plus, l'isolation des CSH avec les SLAM permet d'outrepasser les problèmes rencontrés avec l'utilisation des marqueurs « classiques » énumérés ci-haut. En effet, (I) la combinaison de marqueurs à utiliser est simple (Dadley-Moore 2005), (II) le taux d'enrichissement est le plus haut jamais atteint (la fréquence en CSH = 1/2.1) (Kiel et al. 2005) (III) et les SLAM permettent d'isoler avec un bon enrichissement les CSH provenant de sources variées (foie fœtal, moelle osseuse adulte, moelle osseuse de vieilles souris, CSH mobilisées et CSH prélevées chez les souris reconstituées) (Kim et al. 2006; Yilmaz, Kiel, and Morrison 2006). Ces nombreux avantages ont conférés aux SLAM une popularité exceptionnelle et ils sont rapidement devenus les marqueurs standards pour l'étude des CSH.

D'autres marqueurs de surface comme CD9 (Karlsson et al. 2013), EPCR (Balazs et al. 2006), Endoglin (Chen et al. 2003; Chen et al. 2002), ESAM1 (Forsberg et al. 2005; Ooi et al. 2009), CD49b (Benveniste et al. 2010; Wagers and Weissman 2006) peuvent être utilisés pour purifier les CSH. Par contre, leur popularité est moindre du fait qu'ils ne confèrent pas de réels avantages face aux marqueurs SLAM et aussi à cause de leurs récentes découvertes.

L'utilisation de colorant fluorescent permet aussi de purifier les CSH. On retrouve la Rhodamine 123 (Rh-123) qui se fixe aux mitochondries, ou le Hoechst 33342 qui se lie à l'ADN. Les CSH et progéniteurs primitifs sont capables d'excréter activement ces colorants à

l'extérieur de la cellule grâce aux transporteurs «ABC» (Zhou et al. 2001). Ces colorants sont donc retenus à une faible concentration dans les CSH. La population Rh-123<sup>lo/-</sup> est fortement enrichie en CSH et permet une reconstitution à long terme (Bertoncello, Hodgson, and Bradley 1985; Li and Johnson 1995; Spangrude and Johnson 1990; Zijlmans et al. 1995).

Le Hoechst 33342 est un colorant à large spectre d'émission et qui peut être lu à plusieurs longueurs d'ondes, notamment dans le bleu (~450µm) et le rouge (~675µm) (Watson et al. 1985). La lecture simultanée des cellules de moelle osseuse à ces deux longueurs d'ondes va permettre la démarcation d'une petite population distincte avec une forme effilée appelée « side population, SP ». Il a été démontré que cette population est largement enrichie en CSH toutefois, la SP ne réussit pas à « capturer » toutes les CSH et contient aussi des progéniteurs primitifs (Chen et al. 2003; Goodell et al. 1996). Un des avantages de cette technique est qu'elle permet d'effectuer une discrimination des CSH à dominance myéloïde versus les CSH à dominance lymphoïde (Challen et al. 2010; Weksberg et al. 2008).

L'utilisation de ces marqueurs et colorations a grandement facilité l'analyse des CSH (Tableau 1), et de ce fait, a amélioré notre compréhension des CSH et de l'hématopoïèse en général.

**Tableau 1:** Marqueurs phénotypiques ou colorations définissant les CSH et les progéniteurs

Marqueurs phénotypiques ou colorations	Population enrichie	Fréquence en HSC	Notes
Moelle osseuse totale	-	~1:20000	
Lin-	Progéniteurs et HSC	~1:2500	
Lin-Sca-1+c-kit+	Progéniteurs et HSC	~1:25	
Lin-Sca-1+c-kit+Thy1 <sup>lo</sup>	LT-HSC	~1:5	L'expression de Thy1 est restreinte à certaines lignées de souris
Lin-Sca-1+c-kit+Flk2-	LT-HSC	~1:10	
Lin-Sca-1+c-kit+Thy1 <sup>lo</sup> Flk2-	LT-HSC	~1:5	
Lin-Sca-1+c-kit+Flk2-CD34-	LT-HSC	~1:5	L'expression de CD34 varie durant le développement et l'état d'activation des HSC
CD150+CD48-	LT-HSC	~1:5	
Lin-Sca-1+c-kit+CD150+CD48-	LT-HSC	~1:2	Standard pour l'isolation des HSC murines
SP	Progéniteurs et HSC		
Lin-Rho-SP	LT-HSC	~1:4	
Lin-c-Kit+Sca1+SP <sup>lo</sup> (CD150+ou-)	My-HSC		La SP permet une discrimination fonctionnelle entre les My-HSC et Ly-HSC
Lin-c-Kit+Sca1+SP <sup>hi</sup> (CD150+ou-)	Ly-HSC		La SP permet une discrimination fonctionnelle entre les My-HSC et Ly-HSC
Lin-c-Kit+Sca1+Flk2-CD34- Rho <sup>lo</sup> CD49b <sup>lo</sup>	LT-HSC		CD49b permet la séparation entre les LT-HSC et IT-HSC
Lin-c-Kit+Sca1+Flk2-CD34- Rho <sup>hi</sup> CD49b <sup>hi</sup>	IT-HSC		CD49b permet la séparation entre les LT-HSC et IT-HSC
Lin-Sca-1+c-kit+Flk2-CD34+	ST-HSC		
Lin-Sca-1+c-kit+Flk2+CD34+	MPP		
Lin-Sca-1+c-kit+CD150-CD48-CD244+	MPP		
Lin-c-Kit+Sca1+IL-7R+Flk2+	CLP		
Lin-c-Kit+Sca1+IL-7R-CD34+CD16/32 <sup>lo</sup>	CMP		
Lin-c-Kit+Sca1+IL-7R-CD34+CD16/32 <sup>hi</sup>	GMP		
Lin-c-Kit+Sca1+IL-7R-CD34-CD16/32 <sup>lo</sup>	MEP		

### **1.2.3) L'hétérogénéité du réservoir de CSH**

Historiquement, les CSH étaient considérées comme une population de cellules homogènes. Or, plusieurs études ont démontré que cette vision est réductrice et que le réservoir de CSH est très hétérogène puisqu'il est composé de sous-types de CSHs ayant des propriétés fonctionnelles distinctes (Muller-Sieburg et al. 2012).

#### **1.2.3.1) Des CSH avec des potentiels d'autorenouvellement distincts**

La transplantation de CSH dans un hôte irradié représente la seule méthode permettant de s'assurer de la fonctionnalité d'une CSH. Cette méthode évalue d'une part la capacité de reconstitution des CSH sur une longue période de temps (autorenouvellement) et d'autre part si la reconstitution s'effectue au niveau des lignées myéloïdes et lymphoïdes (multipotences)(Schroeder 2010).

En se basant sur la cinétique de reconstitution qui reflète la capacité d'autorenouvellement, trois sous types de CSH ont été caractérisés. Les CSH-LTs sont capables de soutenir la production des cellules matures du sang pendant toute la durée de vie d'une souris. Le groupe de N. Iscove a récemment déterminé l'existence de CSH-IT. Ces dernières reconstituent le système hématopoïétique sur une longue période de temps (jusqu'à 24-32 semaines), mais s'épuisent et finissent par disparaître (Benveniste et al. 2010). Les CSH-ST sont les CSH avec le potentiel d'autorenouvellement le plus limité et elles ne procurent qu'une reconstitution passagère de ~12 semaines. Les MPP, quant à eux, ne procurent qu'une reconstitution sur un très court terme, de l'ordre de ~2-6 semaines (Christensen and Weissman 2001; Morrison et al. 1997; Morrison and Weissman 1994; Weissman 2002).

Une reconstitution minimale de 16 semaines a longtemps été considérée comme le reflet de la présence de CSH-LT, mais la récente découverte des CSH-IT capable de procurer une reconstitution jusqu'à 32 semaines remet en question ce critère de base. De façon optimale, ce critère devrait donc être revu à la hausse et s'étendre sur au moins 32 semaines pour s'assurer qu'il s'agit bien de la progéniture d'une CSH-LT (Benveniste et al. 2010; Schroeder 2010). Présentement, plusieurs groupes tendent à suivre une reconstitution sur 20-24 semaines pour s'assurer de la présence de CSH-LT, ce qui est quand même un critère largement accepté par la communauté scientifique pour juger de la présence des CSH. La

discrimination de ces trois sous types de CSH et des MPP peut se faire à l'aide des marqueurs de surface décrits ci-haut.

### **1.2.3.2) Les CSH promyéloïdes, les CSH prolymphoïdes et les CSH équilibrées**

La capacité d'isoler des CSH avec un haut taux d'enrichissement a permis de les étudier au niveau clonal. La transplantation d'une seule CSH permet donc d'analyser précisément les propriétés fonctionnelles d'une seule cellule et non pas celles d'un groupe de CSH.

En se basant sur la prédominance de la lignée mature myéloïde et/ou lymphoïde lors de la reconstitution d'une CSH transplantée, Muller-Sieburg et al ont évoqué la présence d'une reconstitution biaisée issue de certains clones (Muller-Sieburg et al. 2002). L'analyse plus poussée de la capacité et de la cinétique de reconstitution, ainsi que du potentiel de différenciation d'une CSH, a révélé la présence de divers sous types de CSH ayant des comportements distincts. Globalement, les CSH ont été classées en trois sous groupes, soit les CSH à dominance myéloïde (CSH-My), les CSH à dominance lymphoïde (CSH-Ly), et les CSH équilibrées (CSH-Bal), ces dernières ayant un ratio lymphoïde/myéloïde équilibré (Benz et al. 2012; Challen et al. 2010; Dykstra et al. 2007; Muller-Sieburg et al. 2004).

Bien que les mécanismes pouvant contrôler les divers sous types de CSH ne soient pas bien connus, le groupe de Margaret Goodell a démontré que la voie du TGF- $\beta$  était capable d'influencer l'équilibre entre les CSH à penchant myéloïde versus lymphoïde (Challen et al. 2010). L'hétérogénéité des CSH ne semble donc pas être le fruit du hasard, mais bien de l'expression d'un programme intrinsèque prédéterminé et propre à une CSH (Copley, Beer, and Eaves 2012; Muller-Sieburg et al. 2012).

### **1.2.3.3) Les CSH dormantes (quiescentes) versus les CSH actives (en prolifération)**

Chez l'adulte, la majorité des CSH sont dans un état de quiescence (G0) qui est caractérisé par une activité métabolique faible (Orford and Scadden 2008). Il a été proposé que l'état de quiescence des CSH est nécessaire pour éviter leur perte prématurée (Rossi et al. 2012). Plusieurs groupes se sont alors posés la question suivante : la moelle osseuse adulte est-elle composée d'une population de CSH qui prolifère régulièrement ou de deux populations de CSH, dont une qui reste quiescente pendant une longue période de temps ?



En utilisant la technique d'incorporation et de rétention du bromodéoxyuridine (BrdU, un analogue de la thymine) dans l'ADN, les premières analyses dans ce domaine ont exclu l'existence d'une population de CSH dormantes (Cheshier et al. 1999; Kiel et al. 2007). En effet, ces études ont démontré que les CSH murines rentraient fréquemment en cycle (6-8% des CSH rentrent en cycle quotidiennement) et que 99% d'entre elles se divisaient de manière asynchrone, en moyenne tous les 57 jours (Cheshier et al. 1999; Kiel et al. 2007).

Or, plus récemment deux groupes ont indépendamment réfuté ces conclusions et ont plutôt dépeint l'existence de deux sous groupes de CSH avec des cinétiques de divisions très différentes (Foudi et al. 2009; Wilson et al. 2008). En effet, les conclusions erronées des premières études peuvent s'expliquer par la mauvaise utilisation de la technique d'incorporation du BrdU, laquelle peut déclencher de façon artificielle l'entrée en cycle des cellules, biaisant ainsi les résultats (Raaijmakers and Scadden 2008). De plus, l'analyse phénotypique des CSH avec des marqueurs de l'époque définissait une population composée en majorité de progéniteurs (Copley, Beer, and Eaves 2012). Wilson et al. ont démontré l'existence d'une population de CSH dormantes se divisant environ tous les 145 jours et une population de CSH actives, entrant en cycle tous les 36 jours (Wilson et al. 2008). Leurs conclusions furent alors corroborées par l'utilisation d'un modèle de souris transgénique comportant une protéine fluorescente verte couplée à l'histone 2B (2B-GFP) ce qui permit le suivi des divisions cellulaires en se basant sur l'intensité de la fluorescence. De plus, ils ont démontré que les CSH dormantes sont dotées d'un vaste potentiel d'autorenouvellement à très long terme comparé aux CSH actives (Foudi et al. 2009; Wilson et al. 2008).

Dans la moelle osseuse adulte, le réservoir de CSH est donc composé de sous types de cellules ayant des comportements et propriétés fonctionnelles différents, démontrant ainsi l'hétérogénéité du bassin de CSH.

## **1.2.4) L'évolution des propriétés des CSH selon le stade de développement et l'âge**

### **1.2.4.1) Les propriétés des CSH fœtales versus les CSH adultes**

Un bon nombre de différences caractérisent les CSH embryonnaires et les CSH adultes (Figure 3). Les CSH provenant de foie fœtal (E12.5-16.5) sont en grande majorité en

prolifération. Les CSH restent en prolifération jusqu'à 3 semaines suivant la naissance ; une semaine plus tard, la plupart des CSH adultes deviennent quiescentes (Bowie et al. 2006; Fleming et al. 1993; Mikkola and Orkin 2006; Wilson et al. 2008). Lors de transplantations, les CSH fœtales présentent aussi un meilleur potentiel de reconstitution et une cinétique de reconstitution plus rapide que les CSH adultes. Cela démontre leur meilleure capacité d'autorenouvellement comparativement aux CSH adultes (Bowie, Kent, Dykstra, et al. 2007; Morrison et al. 1995). Par contre, une fois transplantée, les CSH fœtales acquièrent rapidement un phénotype de CSH adultes (Bowie, Kent, Dykstra, et al. 2007).

Pour proliférer *in vitro*, les CSH fœtales et les CSH adultes n'ont pas la même dépendance face à des facteurs de croissance. En effet, les CSH fœtales ont besoin d'une concentration plus faible du ligand de c-kit (« *Steel Factor* ») que les CSH adultes pour proliférer *in vitro* (Bowie, Kent, Copley, et al. 2007). Aussi, la génération de cellules B issue de CSH de foie fœtal est indépendante du récepteur de l'IL-7 alors que celle des cellules B provenant des CSH de la moelle osseuse est dépendante du récepteur de l'IL-7 (Kikuchi and Kondo 2006).

Le ratio des sous types de CSH change selon le stade de développement. En effet, les CSH provenant du foie fœtal sont en majorité des CSH équilibrées puisque ces dernières produisent une progéniture ayant un ratio lymphoïde/myéloïde équilibré (Benz et al. 2012). Dès la fin du développement embryonnaire, lorsque les CSH du foie fœtal migrent vers la moelle osseuse, le sous type de CSH commence à changer. En effet, on observe une plus grande proportion de CSH à dominance myéloïde et ce phénotype va continuer à s'accroître chez les nouveau-nés et durant toute la vie adulte (Benz et al. 2012). Ce changement s'effectue dès le transfert des CSH dans la moelle osseuse, ce qui suggère que des facteurs extrinsèques provenant de la moelle osseuse sont possiblement à l'origine de ce changement (Benz et al. 2012). De plus, ces différences au niveau des sous types de CSH vont influencer le ratio de la progéniture des CSH de foie fœtal et de CSH adultes (Benz et al. 2012; Bowie, Kent, Dykstra, et al. 2007).

Finalement, au niveau moléculaire, le profil de méthylation de l'ADN comprend quelques différences entre les CSH de foie fœtal et les CSH de jeune adulte. En effet, chez les CSH de jeune souris, plusieurs régions génomiques associées à la production de cellules sanguines présentent une perte de méthylation de l'ADN contrairement aux CSH fœtales

(Beerman et al. 2013). De plus, les CSH fœtales et adultes ont chacune un programme transcriptionnel distinct (Bowie, Kent, Dykstra, et al. 2007; Beerman et al. 2013). Les mécanismes à l'origine de la transition entre les CSH fœtales et les CSH adultes ne sont pas tous connus, mais il a été démontré que Sox17 et Lin28b sont deux facteurs qui semblent contrôler le passage des CSH fœtales aux CSH adultes (Kim, Saunders, and Morrison 2007; Yuan et al. 2012; Copley et al. 2013).

#### **1.2.4.2) Les altérations des fonctions des CSH avec l'âge**

De façon similaire aux autres organes, le système hématopoïétique montre des signes de vieillissement avec le temps et devient plus susceptible au développement de pathologies comme les leucémies (Linton and Dorshkind 2004; Rossi, Jamieson, and Weissman 2008).

Chez la souris, le vieillissement s'accompagne de changements phénotypiques et fonctionnels (Figure 3). Les individus âgés présentent une expansion du réservoir de CSH et une accumulation de CSH à dominance myéloïde (Dykstra et al. 2011; Harrison, Astle, and Stone 1989; Morrison, Wandycz, et al. 1996). De plus, lorsque transplantées, les vieilles CSH présentent une moins bonne capacité de reconstitution et d'autorenouvellement. Leur reconstitution est biaisée vers la lignée myéloïde comparativement aux jeunes CSH (Beerman et al. 2010; Cho, Sieburg, and Muller-Sieburg 2008; Dykstra et al. 2011; Rossi et al. 2005; Sudo et al. 2000). Le homing des vieilles CSH et leur capacité de croissance en coculture sur des cellules stromales sont aussi réduits comparativement aux jeunes CSH (Dykstra et al. 2011; Liang, Van Zant, and Szilvassy 2005; Morrison, Wandycz, et al. 1996). La majorité des détériorations observées avec l'âge proviennent de changements intrinsèques aux CSH. Il est possible que les altérations concernant la lymphopoïèse soient le fruit combiné des changements observés au niveau des CSH (augmentation des CSH à dominance myéloïde) ainsi que ceux se déroulant au niveau du microenvironnement vieillissant. Bien que les fonctions individuelles des CSH soient affectées avec l'âge, la fonction du bassin de CSH en tant que population reste maintenue (Snoeck 2013).

Au niveau transcriptionnel et moléculaire, plusieurs changements s'opèrent durant le vieillissement des CSH. Des études comparant le profil d'expression des gènes chez les vieilles CSH versus des jeunes CSH ont révélé que plusieurs gènes impliqués dans le développement myéloïde sont surexprimés alors que les gènes impliqués dans le

développement lymphoïde sont diminués, une constatation en accord avec la présence d'un plus haut pourcentage de CSH à prédominance myéloïde (Rossi et al. 2005). Aussi, plusieurs gènes associés à l'inflammation sont surexprimés alors que des gènes associés à la préservation de l'intégrité génomique et au remodelage de la chromatique subissent une diminution d'expression dans les vieilles CSH (Chambers, Shaw, et al. 2007; Rossi et al. 2005). Au niveau des marques épigénétiques, les vieilles CSH présentent une hyperméthylation de l'ADN spécifiquement au niveau de gènes régulés par le complexe Polycomb de répression 2 (PCR2) contrairement aux jeunes CSH (Beerman et al. 2013).

Le vieillissement est associé à une accumulation de dommages au niveau de l'ADN. Il a été démontré que les CSH résistent mieux que les progéniteurs aux dommages à l'ADN. En effet, plutôt que d'entrer en apoptose, les CSH favorisent la réparation de leur ADN afin de survivre (Mohrin et al. 2010). Malgré ces mécanismes de réparation, les CSH accumulent en vieillissant des mutations à l'ADN (Welch et al. 2012; Rossi et al. 2007; Mohrin et al. 2010). L'érosion des télomères est l'une des causes qui contribuent à l'accumulation de dommages à l'ADN durant le vieillissement. L'érosion des télomères s'observe chez les cellules somatiques et les progéniteurs et les CSH n'y font pas exception. Cette réduction de la taille des télomères au cours des divisions limite le nombre de réplifications cellulaires (Ju and Lenhard Rudolph 2008). Les CSH ont une activité télomérase qui ralentit l'érosion des télomères. Il a été démontré que l'activité télomérase est associée au potentiel d'autorenouvellement des CSH (Chiu et al. 1996; Morrison, Prowse, et al. 1996). L'importance de la télomérase a été mise en évidence lors de la délétion du gène *Terc* codant pour la télomérase. La délétion de *Terc* accélère l'érosion des télomères dans les CSH et affecte le potentiel de transplantation en série des CSH mutantes (Allsopp, Morin, DePinho, et al. 2003). À des niveaux physiologiques normaux, la télomérase est essentielle pour ralentir l'érosion des télomères sans toutefois la bloquer complètement, ce qui explique que les vieilles CSH ont des télomères plus courts que les jeunes CSH. Par contre, il a été démontré que le potentiel de répllication des CSH n'est pas seulement limité par la longueur des télomères, ce qui indique que d'autres mécanismes limitent la fonction des CSH au cours du vieillissement (Allsopp, Morin, Horner, et al. 2003).

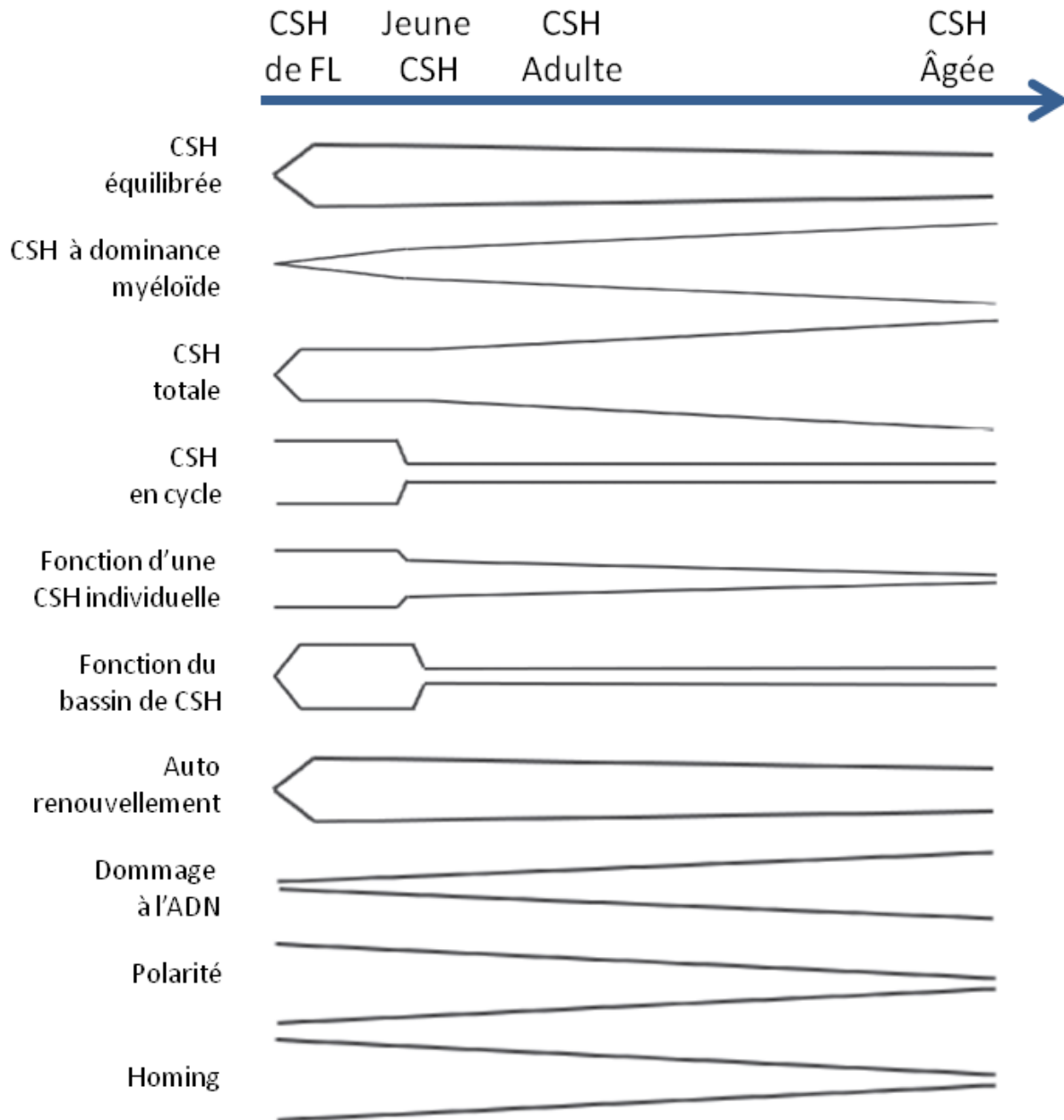
Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont produits de façon endogène par plusieurs processus métaboliques dans les cellules. À faible concentration, les ROS peuvent réguler une

variété de processus cellulaires qui incluent la quiescence, la prolifération et la différenciation des CSH (Shao et al. 2011). Plusieurs mécanismes (e.g. la superoxyde dismutase et la catalase) permettent aux CSH d'éliminer ou de séquestrer les ROS afin qu'elles puissent conserver leur intégrité (Friedman et al. 2001; Gupta, Karpatkin, and Basch 2006; Miao et al. 2013). Malgré ces mécanismes le taux de ROS augmente dans les vieilles CSH/progénérateurs (Ito et al. 2006). Une augmentation anormale de la concentration en ROS provoque un stress oxydatif qui est dommageable pour les CSH (dommage à l'ADN, dommage à des macromolécules et à des structures cellulaires). En effet, plusieurs études ont démontré qu'une incapacité à éliminer l'augmentation des ROS provoque une entrée en cycle plus fréquente et une augmentation de l'apoptose des CSH. De plus, une augmentation du niveau de ROS entraîne une diminution de la capacité d'autorenouvellement des CSH et leur différenciation plus précoce, ce qui ressemble à certaines caractéristiques du vieillissement des CSH (Ito et al. 2004; Liu et al. 2009; Takubo et al. 2010; Tothova et al. 2007). Un des mécanismes possibles à l'origine de l'augmentation des ROS dans les vieilles CSH est la diminution d'expression de *Sirt3* dans les CSH. En effet, il a été démontré que SIRT3 régule la réponse au stress oxydatif dans les CSH et permet de maintenir des niveaux bas de ROS dans les jeunes CSH (Brown et al. 2013).

Avec l'âge, l'expression des molécules d'adhésion à la surface des CSH change, ce qui influence plusieurs de leurs propriétés telles les interactions avec les autres cellules de la niche, ainsi que sur leur mobilité (Rossi et al. 2005; Xing et al. 2006). Par microscopie, il a été déterminé que les vieilles CSH/progénérateurs sont localisées à une plus grande distance de l'endosteum comparé aux jeunes CSH/progénérateurs (Kohler et al. 2009). Ces données corrélaient avec le fait que les vieilles CSH présentent une adhésion moins forte au stroma, ce qui explique qu'après un traitement au G-CSF, elles sont plus facilement mobilisées au niveau du sang périphérique (Kohler et al. 2009; Xing et al. 2006). Les propriétés d'adhésion influencent aussi le potentiel de homing. Les vieilles CSH ont un potentiel de homing qui est diminué par rapport aux jeunes CSH (Dykstra et al. 2011). Finalement, il a été démontré que les vieilles CSH présentaient une perte de polarité. Le processus moléculaire à l'origine de ces changements implique la RhoGTPase *cdc42* dont l'activité est plus élevée dans les CSH âgées (Florian et al. 2012; Xing et al. 2006).

Les raisons qui sont à l'origine du vieillissement des CSH ne sont pas encore clairement identifiées et comprises, mais il est fort possible que plusieurs mécanismes soient

impliqués dans ce vieillissement. Le foie fœtal est composé en majorité de CSH équilibrées, mais aussi de CSH à dominance myéloïde, ce qui indique que les deux types de CSH apparaissent très tôt durant le développement embryonnaire et avant la migration des CSH dans le microenvironnement de la moelle osseuse (Benz et al. 2012). Il semble donc que ces changements observés durant la vie adulte soient préprogrammés dans les CSH lors du développement embryonnaire (Benz et al. 2012). Afin de faire face à des situations de stress, les CSH sont dotées de mécanismes de protection intrinsèque tels des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, l'autophagie pour gérer leurs ressources énergétiques en période de stress métabolique, et des mécanismes de réduction/élimination des ROS (Ito et al. 2004; Mohrin et al. 2010; Simsek et al. 2010; Tothova et al. 2007; Warr et al. 2013). Ces mécanismes de protection vont favoriser la survie des CSH et leur maintien au cours du temps. Or, malgré le maintien des fonctions des CSH en tant que groupe de cellules, ces mécanismes vont permettre la survie de CSH ayant accumulé des dommages à l'ADN et dont les fonctions individuelles peuvent être compromises. L'accumulation de CSH ayant des fonctions individuelles compromises pourrait contribuer aux changements rencontrés lors du vieillissement des CSH et du système hématopoïétique (Snoeck 2013). De plus, il est possible que le microenvironnement (effet extrinsèque) de la moelle osseuse soit aussi à l'origine des changements observés lors du vieillissement des CSH (Woolthuis, de Haan, and Huls 2011). En effet, il a été démontré que le microenvironnement subit des modifications avec l'âge, ce qui comprend l'accumulation d'adipocytes qui régulent négativement le microenvironnement de la moelle osseuse (French et al. 2002; Naveiras et al. 2009). De plus, le stroma supporte moins bien les CSH (Hotta et al. 1980; Mauch et al. 1982). Il est probable que les changements observés lors du vieillissement du microenvironnement de la moelle osseuse peuvent avoir un impact sur les CSH. D'autres études sont donc nécessaires pour mieux cerner les raisons à l'origine du vieillissement des CSH, lesquelles semblent à la fois provenir de changements intrinsèques, mais aussi du microenvironnement.



**Figure 3: Schématisation des changements fonctionnels des CSH au cours du développement embryonnaire et lors du vieillissement du système hématopoïétique.**

Adapté de (Snoeck 2013).

« Adapted with permission from Lippincott Williams and Wilkins/Wolters Kluwer Health: [Current opinion in hematology] (Aging of the hematopoietic system), copyright (2013) »

### **1.3) Méthodes d'évaluation *in vitro* et *in vivo* des CSH et des progéniteurs**

Du fait de la nature plutôt malléable du système hématopoïétique, les CSH et les progéniteurs peuvent être extraits et manipulés en affectant de façon minimale leurs propriétés (Schroeder 2010). Cela a donc permis le développement et le raffinement de nombreuses méthodes de transplantation et de tests *in vitro* afin d'évaluer les caractéristiques et fonctions des progéniteurs et CSH (Bradley and Metcalf 1966; McCulloch and Till 1960; Purton and Scadden 2007). Bien que les progéniteurs et les CSH puissent être quantifiés phénotypiquement par cytométrie en flux, seuls des méthodes d'évaluation *in vitro* ou *in vivo* permettent de tester leurs propriétés fonctionnelles (Tableau 2) (Purton and Scadden 2007).

#### **1.3.1) Le test de cellules formant des colonies (CFC)**

Les analyses *in vitro* sont plus courtes et permettent de générer rapidement des données. Ils sont donc idéals pour faire des criblages, mais bien qu'informatifs, ils ne reflètent que l'activité des progéniteurs et ne permettent pas d'analyser avec certitude les CSH (Bock 1997; Coulombel 2004; Purton and Scadden 2007).

Le test CFC est une analyse clonogénique qui permet de comptabiliser le nombre et le type de progéniteurs présents dans un échantillon après la formation de colonies (Nakahata and Ogawa 1982, 1982; Nakahata et al. 1982). Ce test utilise un milieu semi-solide à base de méthylcellulose, de cytokines et de sérum afin de supporter la croissance des colonies. Ces dernières forment un amas de clones issus d'un unique progéniteur hématopoïétique. Par conséquent, le nombre de progéniteurs dans l'échantillon est directement lié au nombre de colonies. Plus précisément, la taille des colonies renseigne sur le potentiel de prolifération des progéniteurs. Par exemple, un progéniteur très primitif pourra proliférer plus abondamment et donner une colonie plus grosse qu'un progéniteur plus mature. De plus, le nombre de colonies permet de déterminer la fréquence des progéniteurs présents dans un échantillon. Finalement, le type de colonie qui pousse nous renseigne sur le potentiel de différenciation des progéniteurs. Cela pourra par exemple nous indiquer si un progéniteur est très primitif, ou s'il est déjà engagé vers une certaine lignée.



Comme c'est un test qualitatif qui permet de juger du potentiel de différenciation, on peut discriminer sept types de progéniteurs soit : (1) le BFU-E, (2) le CFU-E, (3) le CFU-G, (4) le CFU-M; (5) le CFU-MK et (6) le CFU-GM. Le progéniteur multipotent le plus primitif est (7) le CFU-GEMM qui peut être comptabilisé 10-12 jours après la mise en culture.

Il est bon de noter qu'en changeant le cocktail de cytokine et en utilisant un sérum favorisant le développement de cellules B, ce test peut être adapté pour évaluer le nombre de progéniteurs pre-B (CFU-B) dans un échantillon (Lemieux and Eaves 1996; Paige et al. 1984).

Ce milieu de culture supporte la croissance des CSH, mais la vaste majorité des cellules détectées sont issues de progéniteurs. Donc, bien qu'informatif sur la composition d'un échantillon en progéniteurs, cette méthode ne permet pas de juger pertinemment de la présence de CSH (Purton and Scadden 2007). D'autres méthodes de culture *in vitro* (*Long-term culture-initiating cell assay*, LTC-IC ; *Cobblestone area forming cell assay*, CAFC ; *Whitlock-Witte-initiating cells*, WW-IC) utilisent cette fois-ci des lignes de cellules stromales (S17, OP9, etc) afin de supporter la croissance à plus long terme des CSH ou de progéniteurs (Coulombel 2004). Ces méthodes sont plus longues, mais permettent de tester la fréquence, le potentiel de prolifération et le potentiel de différenciation de progéniteurs beaucoup plus primitifs que les progéniteurs CFC (Purton and Scadden 2007; van Os, Kamminga, and de Haan 2004; Whitlock and Witte 1982; Coulombel 2004). Ces tests intègrent la notion de dilution limite afin d'évaluer la fréquence en progéniteur immature. Ces tests consistent donc à cultiver dans des puits individuels un nombre de plus en plus faible de cellules. La proportion de puits positifs et négatifs pour la présence de colonies est définie et comparée au nombre de cellules initialement cultivées dans les puits. À l'aide de la loi statistique de Poisson, la fréquence en progéniteur immature peut ainsi être calculée (Coulombel 2004). Les cultures de LTC-IC et CAFC permettent d'identifier des progéniteurs plus primitifs que les CFC. Par contre, l'hétérogénéité du bassin de cellules étudiées permet seulement de donner une approximation du nombre de progéniteurs/CSH et non de définir hors de tout doute la fréquence en CSH (Coulombel 2004; Purton and Scadden 2007).

### **1.3.2) Les méthodes de transplantation à long terme pour tester l'activité des CSH**

Les transplantations sont des méthodes d'analyse plus complexes, plus longues, elles nécessitent l'utilisation d'animaux, et sont donc plus coûteuses. Par contre, elles ont l'avantage de donner de l'information sur les progéniteurs, mais surtout sur les CSH. Il existe plusieurs sortes de transplantation qui permettent de tester le potentiel fonctionnel des CSH et de déterminer la fréquence des CSH dans un échantillon (Purton and Scadden 2007).

Ces tests ont pour but de fournir de l'information sur le potentiel fonctionnel d'une source de CSH en la transplantant dans une souris préalablement irradiée. La transplantation peut se faire en compétition avec un nombre connu (ou prédit) de CSH (généralement de la moelle osseuse totale d'une souris congénique) (Harrison 1980). Le potentiel fonctionnel des CSH est alors défini en analysant, au niveau de la circulation sanguine, le taux de reconstitution des lignées myéloïdes (monocyte/granulocyte) et lymphoïdes (cellules B et T) provenant du donneur (et du compétiteur s'il y a lieu), et ce, sur une période de 16 semaines au minimum. Cette limite de 16 semaines a été fixée pour s'assurer que la reconstitution ne provienne pas des CSH-ST/MPP ou de leurs progénitures subséquentes qui s'épuisent avant 16 semaines (Schroeder 2010). Ces analyses fournissent une information qualitative sur les CSHs (Purton and Scadden 2007). La méthode de reconstitution hématopoïétique en compétition procure aussi une information semi-quantitative puisqu'elle permet de calculer le ratio entre le taux de reconstitution des cellules testées versus celui des cellules compétitrices (Harrison et al. 1993; Purton and Scadden 2007). Par contre, ce type de transplantation ne fournit aucune information sur le nombre absolu de CSH présentes dans l'échantillon (Coulombel 2004).

### **1.3.3) L'unité de reconstitution hématopoïétique compétitive pour quantifier le nombre de CSH**

Pour déterminer la fréquence des CSH dans un échantillon (ou l'unité de reconstitution hématopoïétique compétitive, CRU), il faut utiliser une variante de la transplantation en situation de compétition soit la transplantation par dilutions limites (Harrison 1980; Szilvassy et al. 1990). Dans ce test, une série de dilutions de l'échantillon testé est effectuée puis

transplantée en compétition avec un nombre prédéterminé de cellules de la moelle osseuse (généralement  $\sim 2 \times 10^5$ ) dans des souris irradiées de façon létale. Les cellules compétitrices permettent la survie des souris irradiées dans le cas où la dilution testée ne comprend pas assez de CSH ou progéniteurs pour offrir un effet radio protecteur (Jones et al. 1990). Il est important que plusieurs souris (entre 4-8) soient transplantées avec la même dose de cellules testées afin d'obtenir des données statistiques fiables. Une souris est alors considérée reconstituée lorsque, 16 semaines post transplantation, au moins 1% des cellules du sang périphérique sont issues du donneur et contribue à la fois à la reconstitution des lignées myéloïdes et lymphoïdes (Coulombel 2004). Le nombre de souris reconstituées par les cellules testées est alors défini pour toutes les doses, et la fréquence en CSH peut alors être déterminée en utilisant la loi statistique de Poisson. Cette loi considère qu'une seule CSH est à l'origine de la reconstitution du système hématopoïétique lorsque 37% des souris d'un groupe ne sont pas reconstituées par une dilution donnée (Coulombel 2004; Szilvassy et al. 1990). Cette méthode est donc la seule qui permet de déduire la quantité réelle de CSH présente dans un échantillon.

Les systèmes de transplantation utilisent généralement des souris congéniques CD45.1/CD45.2 (souris identiques sauf pour un locus). L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre les récepteurs CD45.1 ou CD45.2 couplés à la cytométrie en flux permet alors de discriminer les cellules de l'échantillon testé (donneur), des cellules compétitrices et des cellules du receveur (Purton and Scadden 2007).

Il est important de prendre en considération certains facteurs critiques (ex : capacité de homing des CSH) lors de l'analyse des données de transplantation afin de ne pas tirer des conclusions erronées sur les propriétés ou le nombre de CSH testées (Benveniste et al. 2003; Matsuzaki et al. 2004; Purton and Scadden 2007; Yang et al. 2005).

Combiner des analyses de transplantation à long terme, des tests *in vitro* et de la cytométrie en flux reste donc le meilleur moyen pour analyser précisément le nombre et les propriétés fonctionnelles des CSH et des progéniteurs.

**Tableau 2:** Méthodes d'évaluation *in vitro* et *in vivo* des CSH et des progéniteurs

Type de test	Temps	Nom du test	Abréviation	Durée	Populations testées
<i>In vitro</i>	A court terme	Colony-forming cell pour cellules myéloïdes	CFC-M	10-12 jours	progéniteurs myéloïdes
		Colony-forming cell pour cellules B	CFC-B	7 jours	progéniteurs pre-B
	A long terme	Cobblestone area-forming cell	CAFC	~4 semaines	progéniteurs primitifs/HSC
		Long-term culture-initiating cell	LTC-IC	~4 semaines	progéniteurs primitifs/HSC
		Whitlock–Witte culture	WW	2-3 semaines	progéniteurs de cellules B
<i>In vivo</i>	A court terme	Colony-forming-unit-spleen	CFU-S	8-12 jours	progéniteurs primitifs
		Transplantation sans compétition		4-8 mois	HSC
	A long terme	Competitive repopulation unit	CRU	4-8 mois	HSC
		Transplantation en série		4-8 mois/transplantation	HSC

## 1.4) Les progéniteurs du système hématopoïétique

Lorsqu'une CSH décide de se différencier, elle va générer des CSH-ST qui se différencieront subséquemment en MPP (Figure 2). Lors de la différenciation, les CSH perdent rapidement leur potentiel d'autorenouvellement puisque les CSH-ST et MPP ne peuvent s'autorenouveler que durant quelques semaines avant de s'épuiser (Morrison and Weissman 1994; Christensen and Weissman 2001). En contre partie, les CSH-ST et MPP rentrent dans une phase de prolifération rapide afin d'augmenter leur nombre (Morrison et al. 1997). Selon les besoins, les MPP s'engagent alors vers la voie lymphoïde ou la voie myéloïde en se différenciant respectivement en CLP ou en CMP (Akashi et al. 2000; Kondo, Weissman, and Akashi 1997). Les CLP et CMP sont des progéniteurs qui ont un potentiel de différenciation plus restreint et une capacité d'autorenouvellement pratiquement nulle (Akashi et al. 2000; Kondo, Weissman, and Akashi 1997). Les CLP donnent alors naissance aux progéniteurs de cellules T, de cellules B, de cellules tueuses et à certaines sous populations de cellules dendritiques (Traver et al. 2000; Manz et al. 2001). Quant aux CMP, ils ont la possibilité de se différencier en GMP ou en MEP (Akashi et al. 2000). Les progéniteurs unipotents qui en découlent s'engagent alors dans les stades finaux de la différenciation afin de donner des cellules matures spécialisées (Shizuru, Negrin, and Weissman 2005).

Le schéma de différenciation des progéniteurs n'est pas encore totalement compris puisque des controverses entourant l'origine de certaines cellules hématopoïétiques (ex : cellules T) persistent (Katsura 2002; Schlenner et al. 2010). Par exemple, des sous types de MPP auraient un potentiel lymphoïde beaucoup plus marqué au détriment du potentiel myéloïde (Mansson et al. 2007; Welner, Pelayo, and Kincade 2008; Adolfsson et al. 2005). De

plus, le groupe de Bhandoola a soulevé l'existence d'une voie de production des cellules T qui est indépendante des CLP (Allman et al. 2003; Bhandoola et al. 2007; Morrison and Weissman 1994). Il n'est donc pas exclu que notre vision de la différenciation hématopoïétique ne soit pas aussi linéaire qu'il n'y paraît.

Comme pour les CSH, le processus de différenciation des progéniteurs peut être suivi par l'expression de marqueurs de surface et aussi par des tests fonctionnels (Tableau 2). Les MPP sont discriminés phénotypiquement par les marqueurs suivants :  $\text{Lin}^-/\text{c-kit}^+/\text{Sca-1}^+/\text{Thy1}^-/\text{Flk2}^+/\text{CD34}^+/\text{CD150}^-/\text{CD48}^-/\text{CD244}^+/\text{CD239}^-$  (Kiel et al. 2005; Morrison and Weissman 1994; Oguro, Ding, and Morrison 2013). Quant à eux, les CLP sont  $\text{Lin}^-/\text{c-kit}^{\text{lo}}/\text{Sca-1}^{\text{lo}}/\text{Thy1}^-/\text{IL-7R}^+/\text{Flk2}^+$  (Adolfsson et al. 2001; Kondo, Weissman, and Akashi 1997). Pour les progéniteurs myéloïdes, les CMP sont décrits comme étant  $\text{Lin}^-/\text{c-kit}^+/\text{Sca-1}^-/\text{IL-7R}^-/\text{CD34}^+/\text{CD16}/32^{\text{lo}}$ , les MEP sont  $\text{Lin}^-/\text{c-kit}^+/\text{Sca-1}^-/\text{IL-7R}^-/\text{CD34}^-/\text{CD16}/32^{\text{lo}}$  et les GMPs sont  $\text{Lin}^-/\text{c-kit}^+/\text{Sca-1}^-/\text{IL-7R}^-/\text{CD34}^+/\text{CD16}/32^{\text{hi}}$  (Akashi et al. 2000). Des transplantations et des cultures *in vitro*, comme le CFC, permettent de tester leurs propriétés fonctionnelles.

Les progéniteurs ont donc une importance cruciale dans l'hématopoïèse puisque cette population cellulaire hétérogène permet de générer rapidement une source considérable de cellules matures. Cela a notamment été démontré à l'aide de transplantations où l'injection de progéniteurs procurait une protection pendant quelques semaines ce qui permettait la survie des souris avant que les CSH puissent participer activement à la production des cellules sanguines matures.

## **1.5) La niche hématopoïétique**

La niche hématopoïétique est un microenvironnement spécialisé qui contient les CSH, maintient leur nombre et régule leurs fonctions tout au long de la vie d'un individu (Figure 4) (Kiel and Morrison 2008). Le concept de niche a été introduit il y a plus de 30 ans (Schofield 1978), malgré cela, les cellules et les facteurs essentiels à la régulation des CSH dans la niche restent encore mal connus.

### **1.5.1) La composition et les propriétés de la niche hématopoïétique**

La niche hématopoïétique est un microenvironnement de la moelle osseuse qui est composé d'un groupe très hétérogène de cellules stromales, de cellules hématopoïétiques et de

cellules nerveuses (Kiel and Morrison 2008). Ces cellules vont interagir avec les CSH et progéniteurs via des récepteurs de surface et/ou produire des cytokines et des facteurs de croissance. De plus, elles vont aussi être responsables de produire et de décomposer les éléments de la matrice extracellulaire (Kiel and Morrison 2008; Krause, Scadden, and Preffer 2013; Ugarte and Forsberg 2013; Wilson and Trumpp 2006).

La niche est aussi constituée d'un ensemble de macromolécules extracellulaires qui forment la matrice extracellulaire (MEC). Cette matrice va fournir un soutien structural aux cellules et joue un rôle dans l'adhérence, le mouvement et la régulation des cellules (Krause, Scadden, and Preffer 2013).

La niche est aussi généralement considérée comme un milieu hypoxique où les CSH sont caractérisées par une faible accumulation de dérivé réactif de l'oxygène (ROS) dans le but de minimiser les dommages aux cellules (Eliasson and Jonsson 2010; Mohyeldin, Garzon-Muvdi, and Quinones-Hinojosa 2010; Nombela-Arrieta et al. 2013; Suda, Takubo, and Semenza 2011; Takubo et al. 2010).

La niche est donc un environnement complexe à étudier qui va fournir un vaste ensemble de signaux extrinsèques capables de réguler les CSH.

### **1.5.2) La disposition spatiale des CSH dans la niche de la moelle osseuse**

Ces dernières années, notre compréhension de la niche hématopoïétique s'est améliorée grâce aux avancées technologiques dans les domaines de la cytométrie et de l'imagerie de haute définition. L'étude de la localisation spatiale des CSH dans la moelle osseuse a révélé qu'elles s'accumulaient préférentiellement au niveau de l'endosteum (interface entre l'os et la moelle osseuse) et des cellules périvasculaires / cellules endothéliales sinusoidales (cellules autour des vaisseaux et composant les vaisseaux sanguins de la moelle osseuse) laissant croire à l'existence de plusieurs niches (Figure 4) (Ugarte and Forsberg 2013).

La proximité des CSH avec l'endosteum et les cellules endostéales suggèrent que ces cellules jouent un rôle de premier ordre dans la maintenance et la régulation des CSH (Nilsson, Johnston, and Coverdale 2001; Xie et al. 2009; Zhang et al. 2003). Or, l'endosteum est une région très vascularisée ce qui laisse croire que les cellules vasculaires peuvent aussi jouer un rôle important dans la maintenance et la régulation des CSH proches de l'endosteum

(De Bruyn, Breen, and Thomas 1970; Kiel and Morrison 2008). Cette affirmation a été renforcée lorsqu'en 2005, l'équipe de SJ Morrison localise, à l'aide des marqueurs SLAM, les CSH à proximité des cellules endothéliales sinusoidales (Kiel et al. 2005). Une étude de Wong et al (Wang et al. 2013) confirme l'observation de Morrison. Ils ont spécifiquement identifié une zone formant une poche (appelée hémosphère) entre les cellules périvasculaires et les cellules endothéliales sinusoidales, laquelle renferme des CSH. De plus, Nombela-Arrieta et al (Nombela-Arrieta et al. 2013) ont utilisé une nouvelle technique appelée la cytométrie à balayage laser (LSC), laquelle permet de visualiser et quantifier les CSH sur une large section de la moelle osseuse, donnant ainsi une vision plus globale de l'architecture de la moelle osseuse. En combinant la LSC et la microscopie confocale, cette étude a révélé que les CSH et progéniteurs se trouvaient préférentiellement dans la zone endostéale et en interaction avec les capillaires sanguins de la moelle osseuse.

Cette observation suggère donc que la niche endostéale et la niche vasculaire ne sont pas deux compartiments complètement distincts, mais coopèrent pour former une région vasculaire de l'endosteum qui maintient et régule les CSH (Kiel and Morrison 2008; Krause, Scadden, and Preffer 2013; Ugarte and Forsberg 2013). Il a été proposé que ces deux niches puissent supporter deux types de CSH fonctionnellement différentes, comme les CSH dormantes et les CSH en cycle (Krause, Scadden, and Preffer 2013; Wilson et al. 2007; Wilson and Trumpp 2006).

### **1.5.3) Les cellules et les facteurs régulant le maintien des CSH**

Étant donné la localisation spéciale des CSH au niveau de l'endosteum et de la zone vasculaire, il a été postulé que des cellules de cette région pouvaient réguler les CSH.

Des études génétiques chez la souris ont démontré que l'augmentation du nombre d'ostéoblastes induit une augmentation du nombre de CSH dans la moelle osseuse, suggérant que ces cellules puissent réguler les CSH (Calvi et al. 2003; Zhang et al. 2003). De plus, les ostéoblastes sécrètent des facteurs comme l'angiopoïétine et l'ostéopontine qui semblent respectivement réguler positivement ou négativement le nombre de CSH (Arai et al. 2004; Nilsson et al. 2005; Stier et al. 2005). Or, l'ablation des ostéoblastes ne provoque pas une perte drastique des CSH, mais plutôt celle des progéniteurs de cellules B. Cela suggère qu'*in vivo*, les ostéoblastes sont plus importants pour le maintien de progéniteurs de cellules B que celui

des CSH (Visnjic et al. 2004; Zou et al. 1998). Cette observation indique que d'autres cellules et/ou d'autres facteurs seraient importants dans la niche hématopoïétique.

Dans le passé, l'importance des voies SCF/C-KIT et CXCL12/CXCR4 dans la fonction des CSH a largement été illustrée, mais les cellules à l'origine de la production de ces ligands n'étaient pas déterminées (Broudy 1997; Chabot et al. 1988; Kimura et al. 2011; Nagasawa et al. 1996; Nie, Han, and Zou 2008; Williams et al. 1990; Zou et al. 1998). Une étude préliminaire de Sugiyama et al. a alors démontré que les CSH se trouvaient spécifiquement à proximité d'une fraction des cellules périvasculaires qui exprimait CXCL12 (Sugiyama et al. 2006). Le groupe de SJ Morrison (Ding and Morrison 2013; Ding et al. 2012) et de Daniel C Link (Greenbaum et al. 2013) ont alors précisément défini les cellules responsables de la production des SCF et de CXCL12. Ils ont indépendamment démontré que les cellules endothéliales vasculaires et les cellules périvasculaires étaient responsables de l'expression de SCF et CXCL12 et donc du maintien des CSH dans la niche. Quant aux ostéoblastes, ils permettent le maintien des progéniteurs lymphoïdes via l'expression de CXCL12 (Ding and Morrison 2013; Ding et al. 2012; Greenbaum et al. 2013).

D'autres cellules comme les cellules souches mésenchymateuses (Mendez-Ferrer et al. 2010), les macrophages (Chow et al. 2011; Winkler et al. 2010), les mégacaryocytes (Kacena, Gundberg, and Horowitz 2006; Li et al. 2001; Sacchetti et al. 2007), les adipocytes (Naveiras et al. 2009), et les cellules nerveuses (Katayama et al. 2006; Mendez-Ferrer et al. 2008) semblent aussi être capables de réguler les CSH par divers mécanismes, mais leur rôle est moins clair et a été moins étudié (Krause, Scadden, and Preffer 2013).

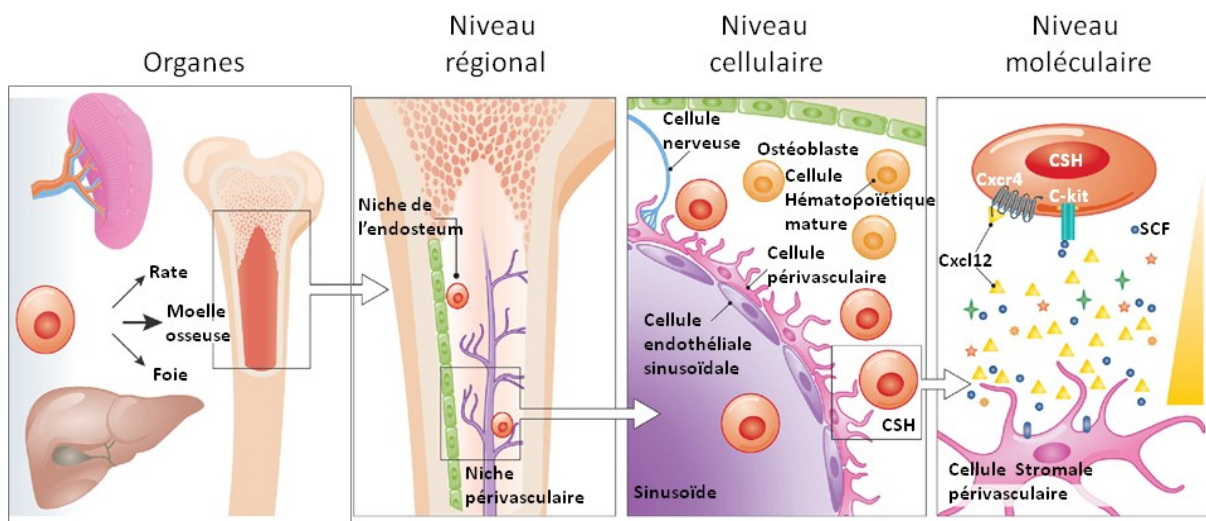
#### **1.5.4) La matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire de la moelle osseuse est composée de glycoprotéines (collagène type I et IV, de lamine, de fibronectine) et de glycosaminoglycanes (acide hyaluronique, sulfate d'héparine et du sulfate de chondroïtine). Ces constituants de la MEC sont produits par diverses cellules résidentes de la moelle osseuse (Clark and Keating 1995; Klein 1995; Krause, Scadden, and Preffer 2013; Whetton and Spooncer 1998). De plus, les métalloprotéases matricielles (MMP) sont des protéases qui vont aussi façonner la MEC en participant à sa dégradation. Aussi, les MMP régulent plusieurs protéines qui ne sont pas des constituants de la MEC (Stamenkovic 2003).



En plus de fournir un point d'ancrage aux cellules hématopoïétiques et stromales, la MEC représente une source de cytokine et de facteurs de croissance puisque ces derniers se retrouvent liés aux glycosaminoglycanes. L'adhésion à la MEC et le gradient de facteurs solubles vont alors influencer la croissance, la différenciation, la mobilité et la viabilité des cellules hématopoïétiques via CD44, les intégrines ou d'autres molécules d'adhésion (Krause, Scadden, and Preffer 2013; Wilson and Trumpp 2006).

En résumé, plusieurs cellules participent à la formation de la niche hématopoïétique au niveau de l'endosteum et autour des vaisseaux sanguins. De plus, l'adhésion des cellules à la MEC permet de garder les CSH et les cellules de la niche à proximité l'une de l'autre pour faciliter les interactions. Finalement, la niche fournit des signaux qui régulent les CSH et ainsi influence leur destin. De façon analogue à la synapse immunologique, Wilson et al ont alors proposé le terme « synapse CSH-niche », pour qualifier la nature complexe de l'interface entre les CSH et la niche hématopoïétique (Wilson and Trumpp 2006).



**Figure 4: Schématisation de la niche hématopoïétique**

Plusieurs cellules participent à la formation de la niche hématopoïétique au niveau de l'endosteum et autour des vaisseaux sanguins. La niche fournit des signaux qui régulent les CSH et ainsi influencent leur destin.

Adapté de (Ugarte and Forsberg 2013).

## **1.6) La régulation moléculaire du système hématopoïétique**

La régulation des CSH est conduite par plusieurs facteurs intrinsèques qui sont modulés à leur tour par des signaux extrinsèques provenant du microenvironnement (Figure 5). Plusieurs voies de signalisation peuvent alors influencer la survie, l'autorenouvellement ou la différenciation des CSH.

### **1.6.1) La régulation des CSH par les cytokines hématopoïétiques classiques**

Plusieurs études fonctionnelles chez la souris ont démontré qu'*in vivo*, plusieurs cytokines comme SCF, le ligand FLT3, IL-3, IL-6, IL-11, IL-7, l'érythropoïétine (EPO) et la thrombopoïétine (TPO) sont des régulateurs clés des CSH et des progéniteurs. En effet, ces cytokines sont capables d'influencer la survie, la prolifération ou la différenciation de plusieurs types de cellules hématopoïétiques (Broudy 1997; Chabot et al. 1988; Geissler, Ryan, and Housman 1988; Williams et al. 1990; Akdis et al. 2011; Gurney and de Sauvage 1996; Kimura et al. 1998; Kimura et al. 2011; Lantz et al. 1998; Lyman and Jacobsen 1998; Mackarehtschian et al. 1995; Maeurer and Lotze 1998; Matsunaga et al. 1998; McKenna et al. 2000; Nandurkar et al. 1997; Russell 1979; Sims et al. 2005; von Freeden-Jeffry et al. 1995; Wu et al. 1995).

Vu l'importance des cytokines dans la régulation *in vivo* des CSH, plusieurs groupes ont tenté d'induire *in vitro* l'expansion des CSH à l'aide d'un cocktail de cytokines (Blank, Karlsson, and Karlsson 2008; Sauvageau, Iscove, and Humphries 2004). En culture, dans la plupart des cas, une perte des CSH a été observée et seules certaines études ont relaté une modeste expansion des CSH *in vitro*. *In vitro*, les cytokines promeuvent donc principalement la différenciation des CSH/progéniteurs et non l'autorenouvellement des CSH, ce qui conduit à leur épuisement (Blank, Karlsson, and Karlsson 2008; Borge et al. 1996; Lyman and Jacobsen 1998; Pestina et al. 2001; Sauvageau, Iscove, and Humphries 2004). L'incapacité de maintenir en culture les CSH avec un cocktail de cytokines révèle que d'autres signaux sont impliqués dans leur régulation et leur maintenance *in vivo*.

## **1.6.2) L'incertitude entourant la régulation des CSH par des voies de signalisation du développement**

Les voies de signalisations du développement incluant Wnt, Notch, Hedgehog SMAD/TGF/BMP/Actinine, et l'acide rétinoïque (RA) sont indispensables lors de l'embryogenèse (Pires-daSilva and Sommer 2003; Zhang, Yang, and Wu 2007; Zon 2008). Ces voies sont essentielles pour l'hématopoïèse embryonnaire (Blank and Karlsson 2011; Chanda et al. 2013; Collins 2002; Luis et al. 2012; Mar et al. 2011; Pajcini, Speck, and Pear 2011) et sont capables d'influencer divers types de cellules souches adultes (Figure 5) (Holland et al. 2013).

Globalement, des études de gain de fonction ont démontré que certaines protéines des voies Wnt, Notch et SMAD/TGF/BMP/Actinine pouvaient influencer l'autorenouvellement des CSH et accroître leur nombre ce qui suggère que ces voies de signalisation sont impliquées dans la régulation fonctionnelle des CSH (Blank et al. 2006; Duncan et al. 2005; Kunisato et al. 2003; Reya et al. 2003; Stier et al. 2002; Varnum-Finney et al. 1998; Varnum-Finney et al. 2000).

*A contrario*, chez la souris, la mutation de gènes clés dans ces voies de signalisation, comme la B-catenin (Wnt), RbpJ (Notch), Smad1/5, Smoothed (Hedgehog) ou le récepteur RARalpha, ne semble pas avoir d'effet notable sur l'hématopoïèse et les CSH. Cela suggère qu'*in vivo*, aucune de ces voies n'est essentielle à la fonction des CSH ou à l'hématopoïèse en général (Cobas et al. 2004; Gao et al. 2009; Hofmann et al. 2009; Maillard et al. 2008; Mancini et al. 2005; Purton et al. 2006; Singbrant et al. 2010; Singbrant et al. 2006). Malgré cela, la modulation des voies Notch ou Wnt reste une avenue intéressante à exploiter pour l'expansion *ex vivo* des CSH dans un but clinique (Blank, Karlsson, and Karlsson 2008).

Une fois ces voies activées, une cascade de signaux sera déclenchée et relayée via plusieurs protéines qui cibleront des régulateurs transcriptionnels.

## **1.6.3) Les facteurs de transcription essentiels aux CSH et progéniteurs**

Les facteurs de transcription sont des protéines capables de se lier à l'ADN (Latchman 1997). Ils vont ainsi pouvoir activer ou réprimer l'expression de certains gènes et par le fait

même contrôler plusieurs processus cellulaires comme la survie, la prolifération et la différenciation des cellules du système hématopoïétique (Figure 5) (Zhu and Emerson 2002).

Les facteurs de transcription nécessaires à la génération des CSH fœtales ne sont pas obligatoirement requis pour le maintien des CSH adultes, par conséquent, le profil transcriptionnel des CSH varie selon le stade du développement. Par exemple, SCL/TAL1 et RUNX1/AML1 sont deux facteurs essentiels aux CSH durant le stade embryonnaire (Shivdasani, Mayer, and Orkin 1995; Wang et al. 1996), mais leur inactivation au stade adulte n'induit pas une perte des CSH, (Cai et al. 2011; Ichikawa et al. 2004; Ichikawa et al. 2008; Mikkola et al. 2003; Putz et al. 2006). Au niveau adulte, les facteurs de transcription comme C-MYC, C-MYB, GFI-1, TIFG, GATA3, et TEL/ETV6 sont essentiels à l'autorenouvellement ou à la survie des CSH adultes puisque leur délétion affecte de manière intrinsèque ces fonctions (Geissler, Ryan, and Housman 1988; Hock et al. 2003; Hock et al. 2004; Ku et al. 2012; Lieu and Reddy 2009; Wilson et al. 2004; Frelin et al. 2013).

Quant à lui, PU.1 est un régulateur clé à plusieurs niveaux. Son niveau d'expression varie tout au long de la différenciation dans l'hématopoïétique et va dicter l'engagement des progéniteurs vers les diverses lignées hématopoïétiques (Dakic et al. 2005; Iwasaki, Somoza, et al. 2005; Mak et al. 2011; Nerlov and Graf 1998; Staber et al. 2013).

D'autres facteurs de transcription agissent plus particulièrement sur le programme transcriptionnel des progéniteurs. La collaboration ou la compétition de plusieurs facteurs de transcription va alors influencer la différenciation d'un progéniteur vers une lignée particulière (Iwasaki and Akashi 2007).

Brièvement, il a été clairement démontré que E2A, EBF, PAX5, et SOX4 sont indispensables à la génération de la lignée des cellules B (Nutt and Kee 2007; Smith and Sigvardsson 2004). Une combinaison plus complexe est nécessaire pour la génération des progéniteurs lymphoïdes et lors de la thymopoïèse: PU.1, RUNX1, IKAROS, E2A, GFI-1, TCF-1, MYB ET GATA-3 (Rothenberg 2007, 2007; Staal et al. 2001). La lignée myéloïde est quant à elle dépendante de PU.1, C/EBP $\alpha$  et GFI-1 (Heath et al. 2004; Hock et al. 2003; Iwasaki and Akashi 2007; Rosenbauer and Tenen 2007; Zhang et al. 2004). Finalement, un des facteurs incontournables pour la différenciation de la lignée érythroïde/mégacaryocyte est GATA-1 (Kim and Bresnick 2007; Pevny et al. 1995; Pevny et al. 1991; Shivdasani et al. 1997). Ce facteur de transcription joue un rôle central puisqu'il pourra s'associer à diverses

protéines (ex : FOG-1) pour permettre la différenciation adéquate de cette lignée (Crispino et al. 1999; Kim and Bresnick 2007; Park, Morrison, and Clarke 2004). Certains de ces facteurs agiront soit tôt dans l'engagement des progéniteurs primitifs vers une lignée spécifique, tandis que d'autres seront nécessaires dans les étapes la différenciation terminale d'une cellule spécialisée. De plus, certains de ces facteurs ne vont pas seulement promouvoir l'expression de certains gènes associés à une lignée particulière, mais ils vont aussi inhiber l'engagement du progéniteur vers les autres lignées.

#### **1.6.4) La régulation épigénétique des CSH**

L'épigénétique est l'étude des modifications moléculaires réversibles touchant la chromatine (excluant donc l'altération de séquences nucléotidiques) et qui peuvent réguler l'expression des gènes de façon héréditaire. La régulation épigénétique s'effectue via des modifications telles que la méthylation de l'ADN, la modification d'histone et la modification de la structure de la chromatine (Sashida and Iwama 2012). Ces modifications s'effectuent via le recrutement de divers complexes protéiques ayant des activités enzymatiques et/ou une capacité à modifier la chromatine (Clapier and Cairns 2009) (Sashida G et al 2012 Int J Hematol).

##### **1.6.4.1) Le groupe des Polycomb**

Le groupe des Polycomb est composé de protéines capables de modifier l'état de compaction des histones et ils agissent comme des répresseurs transcriptionnels (Konuma, Oguro, and Iwama 2010; Radulovic, de Haan, and Klauke 2013). Du fait de leur implication dans plusieurs processus cellulaires, ces protéines jouent des rôles clés dans la régulation des CSH et dans le développement de cancer (Radulovic, de Haan, and Klauke 2013; Sauvageau and Sauvageau 2010). Les Polycomb ont d'abord été découvertes chez la drosophile comme d'importants régulateurs de l'expression des gènes *Hox* (Lewis 1978). Il existe deux complexes fonctionnellement distincts appelés complexe Polycomb de répressions 1 et 2 (PRC1 et PRC2). Bien que ces complexes aient des sous unités principales, il existe aussi des sous unités alternatives qui, selon le contexte, permettent d'avoir plusieurs versions du PRC1 et PRC2 (Konuma, Oguro, and Iwama 2010; Radulovic, de Haan, and Klauke 2013; Sauvageau and Sauvageau 2010). Ceci est souvent observé chez les mammifères (Kerppola

2009; Whitcomb et al. 2007). Le PRC2 est le complexe d'initiation de la répression. Chez les mammifères, il est composé de trois sous-unités principales soit SUZ12, un isoforme EED (EED1-4) et une histone méthyltransferase EZH (EZH1 ou EZH2). Le PRC2 est notamment responsable de catalyser la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) (Radulovic, de Haan, and Klauke 2013; Cao et al. 2002; Czermin et al. 2002; Kuzmichev et al. 2004; Kuzmichev et al. 2002). Le PRC2 est aussi capable de recruter plusieurs cofacteurs qui peuvent moduler son activité enzymatique (Cao et al. 2002; Nekrasov et al. 2007; Sarma et al. 2008; Shen et al. 2009). La triméthylation de H3K27 sert alors de point d'ancrage pour l'assemblage du PRC1 dans le but de renforcer la compaction de la chromatine (Cao et al. 2002; Bernstein et al. 2006; Wang, Brown, et al. 2004). Le PRC1 est composé de cinq sous-unités provenant chacune des groupes RING, PCGF, PHC, CBX et SCML (Levine et al. 2002; Radulovic, de Haan, and Klauke 2013). La sous-unité RING1 possède une activité E3 ubiquitine ligase qui est responsable de la monoubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub). Via son activité d'ubiquitination, le PRC1 va finaliser la répression en induisant le remodelage de la chromatine et la compaction des nucléosomes (Cao, Tsukada, and Zhang 2005; de Napoles et al. 2004; Wang, Wang, et al. 2004).

L'expression des gènes *Polycomb* dans les cellules hématopoïétiques varie selon le stade de différenciation et selon le *Polycomb* concerné (Akashi et al. 2003; Klauke et al. 2013; Lessard, Baban, and Sauvageau 1998; Mochizuki-Kashio et al. 2011). BMI1 est un Polycomb faisant partie du complexe PRC1, et chez la souris et l'humain, l'expression de *Bmi1* est restreinte aux cellules hématopoïétiques immatures (Akashi et al. 2003; Lessard, Baban, and Sauvageau 1998; Lessard et al. 1999; Park et al. 2003). L'étude des souris mutantes pour *Bmi1* a permis de démontrer que ce gène est essentiel pour le maintien des CSH adultes (mais pas pour les CSH fœtales) (Arranz et al. 2012; Lessard and Sauvageau 2003; Park et al. 2003; Iwama et al. 2004). En effet, BMI1 est important pour l'autorenouvellement des CSH adultes et des cellules souches leucémiques (Arranz et al. 2012; Lessard and Sauvageau 2003; Park et al. 2003). De plus, les études de gain de fonction supportent aussi le rôle de BMI1 dans l'autorenouvellement des CSH. En effet, la surexpression de *Bmi1* permet une expansion *ex vivo* des CSH ainsi qu'une meilleure capacité de reconstitution des CSH (Iwama et al. 2004). Le défaut affectant l'autorenouvellement des CSH *Bmi1*<sup>-/-</sup> est principalement attribué à une dérégulation du locus p16<sup>Ink4a</sup>/p19<sup>Arf</sup> qui entraîne un arrêt dans la progression du cycle

cellulaire, la sénescence prématurée et l'apoptose des CSH mutantes (Oguro et al. 2006; Iwama et al. 2004; Jacobs et al. 1999; Park et al. 2003). D'autres rôles sont aussi attribués à BMI1 tel que le maintien de la multipotence des CSH en réprimant l'engagement vers une lignée, la réponse face au stress oxydatif et la réparation des dommages à l'ADN (Arranz et al. 2012; Liu et al. 2009; Oguro et al. 2010). BMI1 est donc un régulateur essentiel de la fonction des CSH adultes puisqu'il est capable de contrôler plusieurs processus cellulaires.

Le rôle de plusieurs autres Polycomb a été exploré via des études de gain ou de perte de fonction. Les études de gain de fonction tendent à supporter que plusieurs *Polycomb* (tel que *Cbx2*, *-4 -7 et -8* ; *Mell18*, *Ezh2* etc.) régulent positivement ou négativement les CSH (Herrera-Merchan et al. 2012; Kajiume et al. 2004; Kamminga et al. 2006; Klauke et al. 2013; Scott et al. 2007). Or, les études de perte de fonction suggèrent parfois l'absence de rôle dans les CSH pour ces mêmes *Polycomb*, ce qui rend parfois difficile l'interprétation des résultats (Forzati et al. 2012; Iwama et al. 2004; Kajiume et al. 2004; Mochizuki-Kashio et al. 2011). La présence de différentes sous unités alternatives dans les complexes PRC1 et PRC2 n'exclut pas la possibilité de l'existence de redondances fonctionnelles entre plusieurs de ces sous unités, ce qui complique leurs études. Le rôle de plusieurs Polycomb au niveau des CSH adultes reste donc encore à être exploré.

#### **1.6.4.2) Le groupe des Trithorax**

Les protéines de la famille Trithorax peuvent se subdiviser en deux grandes classes, soit (1) les complexes pouvant méthyler la queue des histones et (2) les complexes effectuant le remodelage de la chromatine de façon ATP dépendante (Schuettengruber et al. 2011). Dans chacune des classes, une large variété de complexes Trithorax existe et comporte des fonctions différentes selon le contexte. Par contre, contrairement au Polycomb, les Trithorax favorisent généralement la transcription. (Krivtsov and Armstrong 2007; Schuettengruber et al. 2011).

Le gène *Mixed Lineage Leukemia (Mll)* est le représentant chez les mammifères du gène *Trithorax (Trx)* retrouvé chez la drosophile. *Mll* code pour une large protéine composée de plusieurs domaines, soit le domaine SET qui comporte l'activité méthyltransférase d'histones et le domaine PHD en doigt de zinc lequel permet les interactions avec d'autres protéines. L'action méthyltransférase de MLL permet de méthyler la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4), ce qui est généralement associé à une marque d'activation transcriptionnelle (Fair et

al. 2001; Milne et al. 2002; Popovic and Zeleznik-Le 2005). MLL n'agit pas seul et peut interagir avec plusieurs protéines afin de réguler l'expression de ses gènes cibles (Popovic and Zeleznik-Le 2005).

La délétion complète de *Mll* chez la souris a déjà été effectuée et est létale très tôt au niveau embryonnaire. La mutation de *Mll* est associée à une incapacité à maintenir l'expression des gènes *Hox* et engendre un défaut dans la segmentation au court de l'embryogenèse (Yu et al. 1998; Yu et al. 1995). Il a notamment été démontré que l'hématopoïèse embryonnaire est affectée dans les souris *Mll*<sup>-/-</sup> (Ernst, Fisher, et al. 2004; Ernst, Mabon, et al. 2004; Hess et al. 1997). Plus récemment, l'utilisation de mutant conditionnel a permis de définir le rôle de *Mll* dans l'hématopoïèse adulte. Il a été démontré que *Mll* est essentiel au maintien des CSH adultes étant donné que sa perte induit un défaut au niveau de l'autorenouvellement des CSH adultes (Jude et al. 2007; McMahon et al. 2007). La protéine MLL possède donc un rôle essentiel pour les CSH embryonnaires et les CSH adultes, possiblement en permettant le maintien de l'expression de gènes importants pour la fonction des CSH.

Les Polycomb et les Trithorax ont généralement des rôles antagonistes dans la régulation de l'expression des gènes. Ces deux groupes peuvent agir sur la même région de la chromatine et créer des zones dites bivalentes qui consiste à un chevauchement de marques de répression (H3K27me3) et la une marque d'activation (H3K4me3) sur les histones. Ces domaines de la chromatine ne sont pas dans un état stable de répression ou d'activation, mais plutôt en pause transcriptionnelle. Ces zones peuvent alors reprendre l'activation de transcription (perte des marques H3K27me3) lors de l'engagement vers une lignée ou stabiliser la répression en enlevant les marques H3K4me3 (Sashida and Iwama 2012; Oguro et al. 2010).

Les complexes BAF des mammifères (orthologues du complexe SWI/SNF chez la levure) effectuent le remodelage de la chromatine de façon ATP dépendant (Schuettengruber et al. 2011). Ils sont composés de sous unités principales et de sous unités variables qui forment des complexes d'environ 12 protéines. Dans ces complexes, BRM (Brahama) ou BRG sont des sous unités mutuellement exclusives qui détiennent l'activité catalytique ATPase (Wu, Lessard, and Crabtree 2009; Reisman, Glaros, and Thompson 2009). La combinaison de plusieurs unités alternatives va pouvoir conférer des fonctions spécifiques aux complexes BAF



dépendamment du type cellulaire concerné. Les complexes BAF vont pouvoir réguler l'expression de plusieurs gènes et ainsi influencer la prolifération, la différenciation et le développement de plusieurs types cellulaires (Schuettengruber et al. 2011).

Il été démontré que certaines protéines BAF jouent un rôle au niveau des CSH et du microenvironnement. En effet, la mutation de *Baf250a* ne semble pas avoir un effet sur les CSH fœtales, mais étonnamment, le stroma de foie fœtal des souris *Baf250a*<sup>-/-</sup> supporte mieux l'expansion des CSH que le stroma de souris contrôles (Krosl et al. 2010). Il a aussi été démontré que l'unité BAF53a est essentielle pour le maintien des CSH adultes puisqu'elle régule leur prolifération et leur survie (Krasteva et al. 2012). Finalement, certains gènes *Baf* peuvent être impliqués dans la prévention du développement de tumeur (BAF47) alors que d'autres sous unités sont essentielles pour le maintien des cellules leucémiques (BRG) (Buscarlet et al. 2014; Roberts et al. 2002). Ces études démontrent donc que plusieurs sous unités peuvent conférer des fonctions très spécifiques aux complexes BAF et agir sur la régulation des CSH mais aussi sur le développement de cancer.

#### **1.6.4.3) L'acétylation des histones**

L'acétylation des histones favorise la décondensations de la structure de la chromatine. Les zones acétylées de la chromatine sont donc généralement associées à un état d'activation de la transcription. L'état d'acétylation des histones peut être régulé par des histones acétyltransférases qui favorisent le transfère d'un groupement acétyle sur un résidu lysine des histones et par des histones désacétylases lesquels catalysent la perte des marques d'acétylation sur les histones (Eberharter and Becker 2002; Shahbazian and Grunstein 2007).

Les protéines CBP/p300 modulent la transcription de plusieurs gènes en favorisant l'acétylation des histones via son activité acétyltransférase (Bannister and Kouzarides 1996). CBP/p300 s'associant aussi à un large éventail de facteurs de transcription et de protéines capables de remodeler la chromatine (Bedford et al. 2010). Plusieurs études ont révélé que la mutation de CBP et p300 affecte aussi l'autorenouvellement des CSH adultes (Chan et al. 2011; Rebel et al. 2002). Des cofacteurs du complexe protéique CBP/p300 régulent aussi la fonction des CSH. C'est le cas de *CITED2*, dont la délétion induit une perte drastique des CSH (Kranc et al. 2009).

#### 1.6.4.4) La méthylation de l'ADN

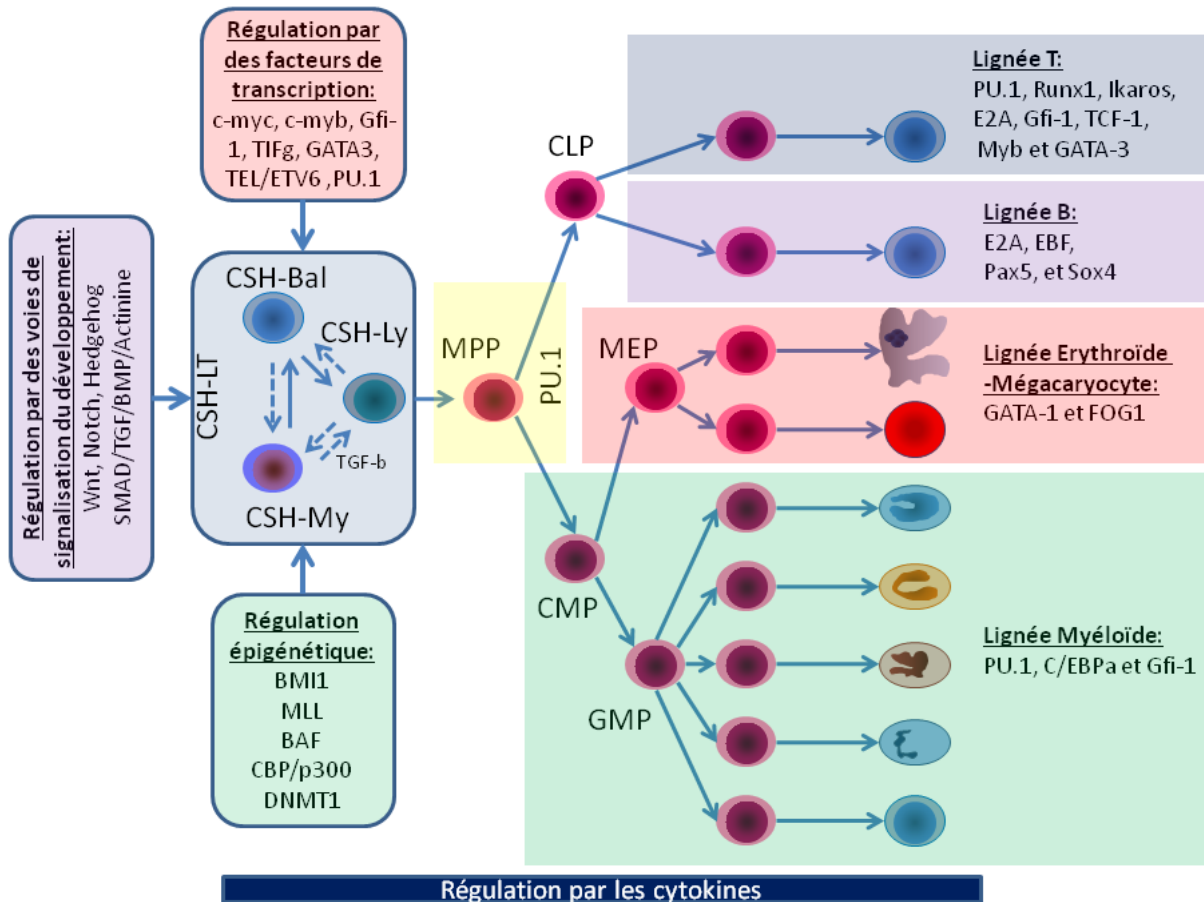
Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN au niveau des sites CpG est une modification épigénétique contrôlée par une famille de méthyltransférase d'ADN, soit DNMT1, DNMT3a et DNMT3b (Sashida and Iwama 2012). Généralement, une forte méthylation d'un promoteur d'un gène est associée à un état de répression transcriptionnelle (Suarez-Alvarez et al. 2012).

Le rôle de ces enzymes a été exploré au niveau des CSH adultes à l'aide de modèles de souris comportant une mutation conditionnelle. Il a été démontré que DNMT3b était non essentielle pour la fonction des CSH adultes (Tadokoro et al. 2007). Par contre, DNMT1 est essentielle au maintien des CSH adultes puisque la délétion de *Dnmt1* chez l'adulte affecte la capacité d'autorenouvellement des CSH et provoque leur perte (Broske et al. 2009; Trowbridge et al. 2009). De plus, il a été démontré que BMI1 était capable de coopérer avec DNMT1 dans un même complexe et donc réguler à la fois la méthylation de l'ADN et des histones (Negishi et al. 2007). Finalement, la délétion de *Dnmt3a* chez l'adulte affecte la différenciation des CSH et provoque leur accumulation dans la moelle osseuse des souris. DNMT3a est donc un import régulateur de la différenciation des CSH adultes (Challen et al. 2012; Tadokoro et al. 2007). Les enzymes DNMT1 et DNMT3a sont donc essentielles pour la régulation de la méthylation d'ADN dans les CSH, ce qui permet de conserver une expression normale de plusieurs gènes et donc maintenir les fonctions des CSH.

Plusieurs protéines impliquées dans la régulation épigénétique et le remodelage de la chromatine sont essentielles au maintien des CSH adultes. Ces protéines n'agissent pas seules et forment généralement des complexes qui vont activer ou réprimer l'expression de plusieurs gènes essentiels aux fonctions des CSH.

En conclusion, les CSH résident dans un environnement complexe où des signaux du microenvironnement peuvent interagir de façon synergique ou antagoniste pour influencer les fonctions des CSH. La régulation intrinsèque des CSH s'effectue par diverses protéines comme les facteurs de transcription, des complexes de remodelage de la chromatine ou même par des MicroARN (Garzon and Croce 2008). Un équilibre optimal de ces signaux extrinsèques et intrinsèques est essentiel dans le but de maintenir le bassin de CSH durant la

vie d'un individu. Un bris d'équilibre de ces signaux peut mener au développement de pathologie comme des leucémies.



**Figure 5: La régulation moléculaire du système hématopoïétique.**

La régulation de l'hématopoïèse s'effectue par plusieurs facteurs intrinsèques qui sont modulés à leur tour par des signaux extrinsèques provenant du microenvironnement. Plusieurs voies de signalisation peuvent alors influencer la survie, l'autorenouvellement ou la différenciation des CSH. Un équilibre optimal de ces signaux extrinsèques et intrinsèques est essentiel dans le but de maintenir le bassin de CSH durant la vie d'un individu.

## 1.7) Les généralités sur les gènes *Hox*

### 1.7.1) L'évolution et conservation des gènes *Hox*

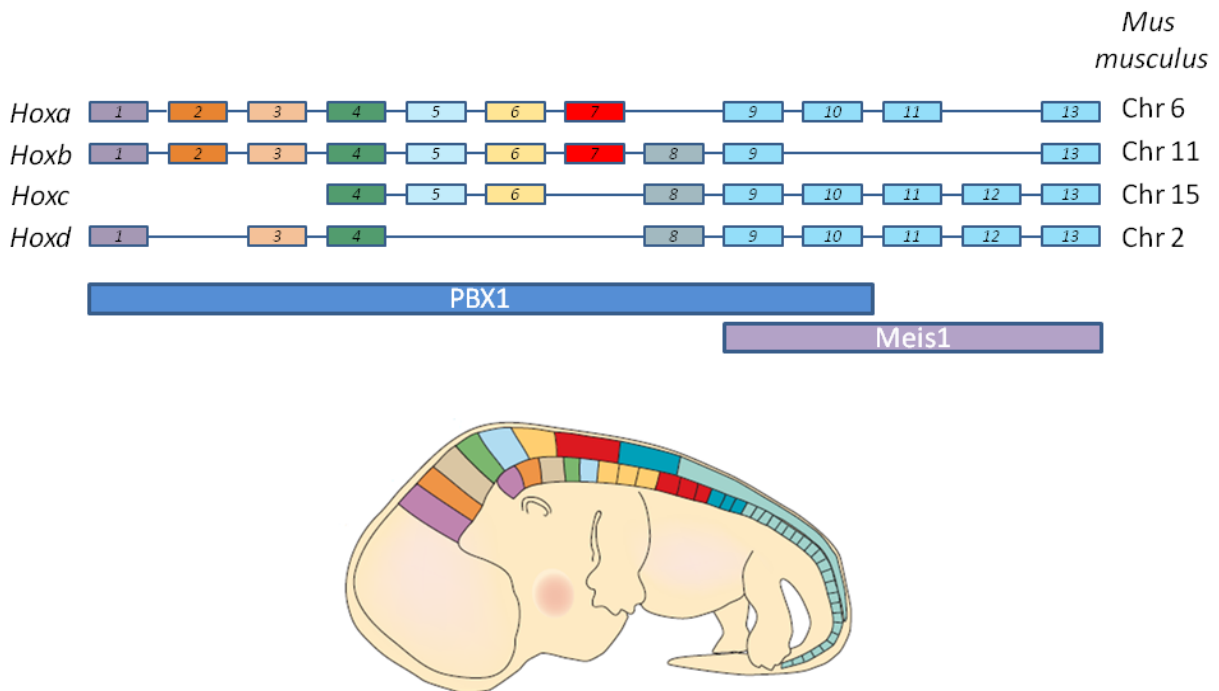
Des mutations retrouvées chez la mouche *Drosophila melanogaster* sont à l'origine de la découverte des gènes *Hox* (Bridges 1923). Ces mutations ont pour conséquence l'échange des segments corporels de la mouche démontrant par le fait même que ces gènes sont des régulateurs clés de l'embryogenèse et de l'organogénèse (Garcia-Bellido and Lewis 1976; Kaufman, Seeger, and Olsen 1990; Lewis 1978; Schneuwly, Kuroiwa, and Gehring 1987). Chez la drosophile, il existe deux complexes de gènes. Le complexe *Bithorax* (*Bx-C*), qui comprend trois gènes (*Ubx*, *AbdA* et *AbdB*), régule le développement des parties médianes et postérieures de la mouche. Le complexe *Antennapedia* (*Antp*), qui est composé de cinq gènes (*Lab*, *Pb*, *Dfd*, *Scr* et *Antp*) régule la formation des membres antérieurs du corps (Grier et al. 2005). Les orthologues de ces gènes chez les vertébrés sont les gènes *Hox*.

Les gènes *Hox* font partie de la famille des gènes *Homéobox* de classe I. Chez les mammifères, on compte 39 gènes *Hox* qui sont subdivisés en 4 groupes de gènes (A-D) ou clusters, lesquels sont localisés sur 4 chromosomes différents, soit respectivement 6, 11, 15 et 2 (chez la souris). Pour chaque cluster, les gènes *Hox* sont aussi assignés à 13 groupes paralogues en se basant sur la similarité de séquence homéotique et leur position au sein du cluster. Chaque cluster contient entre 9 et 11 membres paralogues (Figure 6) (Grier et al. 2005; McGonigle, Lappin, and Thompson 2008). Les clusters des gènes *Hox* contiennent aussi des ARN non codants (Mainguy et al. 2007).

Ces gènes sont hautement conservés au cours de l'évolution et ils codent pour des facteurs de transcription (Gehring, Affolter, and Burglin 1994). La similarité de séquence qui existe au sein des gènes *Hox* s'explique par le fait qu'ils se sont dupliqués au cours de l'évolution, d'abord en effectuant des duplications en tandem puis des duplications impliquant un groupe entier de gènes sur d'autres chromosomes (Brooke, Garcia-Fernandez, and Holland 1998; Duboule 1992; Gehring, Affolter, and Burglin 1994).

### 1.7.2) Les gènes *Hox* dans l'embryogenèse

Chez les mammifères, ces facteurs de transcription sont aussi d'importants régulateurs du développement embryonnaire puisqu'ils vont définir l'identité cellulaire le long de l'axe antéropostérieur (Figure 6) (Kmita et al. 2005; Krumlauf 1994). Une des particularités de ces gènes est que leur expression chez la drosophile ou les vertébrés est conforme au principe de colinéarité (Duboule 1998; Lewis 1978). En effet, au cours de l'embryogenèse leur expression s'effectue de façon séquentielle et suit l'ordre de positionnement des gènes dans les clusters. Les gènes en 3' vont alors être exprimés plus tôt que les gènes en 5'. De plus, les gènes antérieurs (3') sont exprimés préférentiellement dans les parties avant tandis que les gènes postérieurs (5') sont exprimés dans la région arrière de l'embryon. Cette expression contrôlée dans le temps et l'espace va permettre de définir le positionnement adéquat des membres du corps le long de l'axe antéropostérieur (Krumlauf 1994).



**Figure 6: L'organisation des gènes *Hox* en clusters et leurs implications dans l'embryogenèse.**

Chez les mammifères, on compte 39 gènes *Hox* qui sont subdivisés en 4 groupes de gènes (A-D) ou clusters, lesquels sont localisés sur 4 chromosomes différents, soit respectivement 6, 11, 15 et 2 (chez la souris). Chez les mammifères, ces facteurs de transcription sont aussi

d'importants régulateurs du développement embryonnaire puisqu'ils vont définir l'identité cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur. Les protéines HOX ont aussi des cofacteurs appartenant à la famille PBX (« pre-B cell homeobox ») et MEIS (« myeloid ecotropic insertion site »). PBX1 interagit préférentiellement avec les protéines HOX des paralogues 1 à 10 alors que MEIS1 se lie aux protéines HOX des paralogues 9 à 13. Des complexes trimériques HOX-PBX-MEIS peuvent aussi se former et se lier à l'ADN.

Adapté de (Pearson, Lemons, and McGinnis 2005).

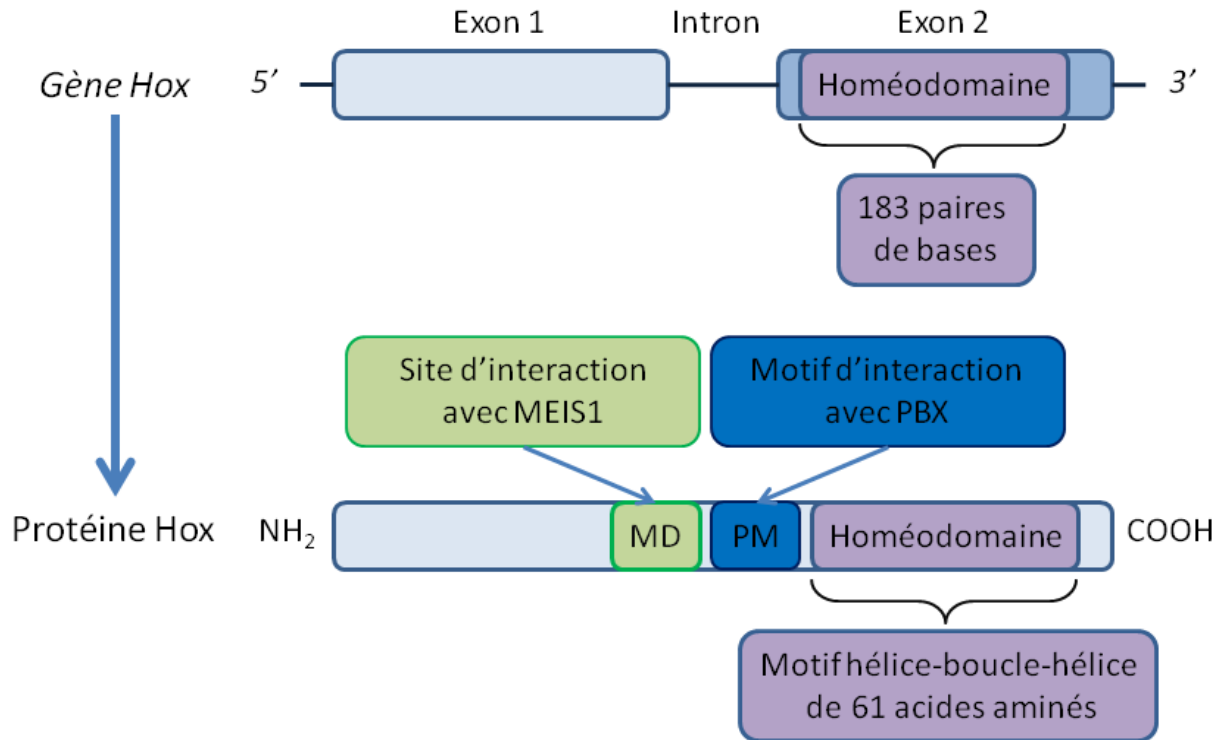
### 1.7.3) Les structures et cofacteurs de gènes *Hox*

Les gènes *Hox* sont typiquement composés de deux exons et d'un intron qui varie en taille d'un gène à l'autre (McGonigle, Lappin, and Thompson 2008). Les gènes *Hox* sont caractérisés par la présence dans le 2<sup>ème</sup> exon d'une séquence de 183 paires de bases. Cette séquence code pour l'homéodomaine, un motif hélice-boucle-hélice qui permet la liaison des protéines HOX à l'ADN (Figure 7) (Gehring, Affolter, and Burglin 1994; McGonigle, Lappin, and Thompson 2008). À cause de la similarité des homéodomains, plusieurs études visant à définir la spécificité de liaison des protéines HOX à l'ADN ont démontré qu'*in vitro*, les protéines HOX se lient faiblement à des régions consensus AT riches (TGAT, TAAT, TTAT et TTAC) (Affolter, Slattery, and Mann 2008; Berger et al. 2008; Pellerin et al. 1994).

Par contre, *in vivo*, les protéines HOX ont besoin d'accomplir des fonctions bien précises en se liant à des gènes cibles spécifiques. L'interaction avec des cofacteurs est un des moyens pour favoriser une spécificité d'action des protéines HOX sur des gènes cibles (Mann, Lelli, and Joshi 2009). Les cofacteurs des protéines HOX les mieux caractérisés chez les mammifères sont les membres des familles « pre-B cell homeobox » (PBX1, PBX2, PBX3, PBX4) (Mann and Chan 1996; Phelan, Rambaldi, and Featherstone 1995) et « myeloid ecotropic insertion site » (MEIS1, MEIS2, MEIS3, PREP1, et PREP2) (Moskow et al. 1995), qui comprennent respectivement 4 et 5 représentants (Mann, Lelli, and Joshi 2009). Ces cofacteurs font tous partie de la famille des protéines TALE (« three amino acid loop extension »). Ces protéines comportent aussi un homéodomaine et peuvent se lier à l'ADN (Moens and Selleri 2006). De plus, il a été démontré que PBX1 interagissait

préférentiellement avec les protéines HOX des paralogues 1 à 10 alors que MEIS1 se liait avec les protéines HOX des paralogues 9 à 13 (Shen et al. 1997). Par contre, il est connu que des complexes trimériques HOX-PBX-MEIS peuvent se former et se lier à l'ADN (Shen et al. 1999). De plus, afin d'activer ou réprimer des gènes spécifiques, les complexes HOX et PBX et/ou MEIS peuvent aussi interagir avec d'autres complexes protéiques, ce qui confère aux protéines HOX une plus haute spécificité de liaison (Choe et al. 2009; Mann and Affolter 1998). En effet, une étude récente a notamment démontré que dans des cellules leucémiques, HOXA9 et MEIS1 pouvaient se lier à des centaines de sites, dont la plupart sont éloignés des sites d'initiation de la transcription (Huang et al. 2012). À ces sites, HOXA9 et MEIS1 sont en mesure d'interagir avec des complexes amplificateurs de la transcription comme CBP/p300 et des facteurs de transcription comme PU.1. Ces données suggèrent donc que HOXA9 régule la transcription en interagissant avec des activateurs de la transcription connue dans l'hématopoïèse et les leucémies (Huang et al. 2012).

Les protéines HOX comprennent plusieurs motifs qui leur permettent de le lier à l'ADN et aussi d'interagir avec des cofacteurs comme MEIS et PBX (Figure 7). *In vivo*, des interactions avec d'autres protéines sont essentielles pour permettre aux protéines HOX d'avoir une spécificité d'action.



**Figure 7: Structure d'un gène *Hox* et d'une protéine HOX.**

Chez les gènes *Hox*, une séquence dans l'exon 2 code pour l'homéodomaine, un motif hélice-boucle-hélice lequel permet la liaison des protéines HOX à l'ADN. Les protéines HOX interagissent aussi avec des cofacteurs via des domaines spécifiques pour favoriser une spécificité d'action des protéines HOX sur des gènes cibles.

#### **1.7.4) Les cibles des protéines HOX et l'influence sur les processus cellulaires**

La caractérisation des gènes cibles des protéines HOX est essentielle pour comprendre leurs mécanismes d'action et déterminer les voies de signalisation qu'ils influencent lors de l'embryogenèse et de l'hématopoïèse.

Plusieurs cibles directes ou indirectes des protéines HOX sont connues dans le développement embryonnaire (Pearson, Lemons, and McGinnis 2005). En premier lieu, il a été démontré que les protéines HOX sont capables de réguler leur propre expression et celle d'autres gènes *Hox* (Gould et al. 1997; Maconochie et al. 1997; Popperl et al. 1995). Plusieurs études ont aussi établi que les protéines HOX pouvaient directement contrôler l'expression de



gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, l'adhésion et la migration des cellules durant l'embryogenèse (Pearson, Lemons, and McGinnis 2005; Taniguchi, Komatsu, and Moriuchi 1995).

Or, la liste des cibles des protéines HOX dans l'hématopoïèse reste plus limitée. Les cibles de HOXA9 sont les mieux caractérisées vu l'implication de cette protéine dans l'hématopoïèse normale et maligne (Argiropoulos and Humphries 2007). Lors de la lymphopoïèse et le développement des cellules B, il est connu que HOXA9 peut directement activer l'expression du gène codant pour le récepteur FLT3 (Gwin et al. 2010). Dans les cellules leucémiques, HOXA9 est capable d'influencer indirectement ou directement l'expression de plusieurs proto-oncogènes, incluant *Erg*, *Flt3*, *Lmo2*, *Myb*, et *Sox4* (Huang et al. 2012). Dans des circonstances variées, HOXA9 contrôle aussi l'expression de *Trib1*, *Evi1*, *Pim1* et *Cybb* (Bei, Lu, and Eklund 2005; Hu et al. 2007; Jin et al. 2007).

Le gène *Hoxa10* joue un rôle au niveau des CSH et dans la différenciation de cellules de la lignée Mégacaryocyte/érythrocyte. Entre autres, Magnusson et al. ont démontré que HOXA10 régulait directement les gènes *Hlf*, *Dkk-1*, et *Gata-1* dans une population LKS (Magnusson, Brun, Miyake, et al. 2007). De plus, dans un modèle de différenciation cellulaire d'une lignée myéloïde, HOXA10 contrôle directement l'expression du gène *Cdkn1a* qui encode p21 (Bromleigh and Freedman 2000).

Il est connu que la surexpression de *Hoxb4* promeut l'expansion des CSH (Argiropoulos and Humphries 2007; Sauvageau et al. 1995). Il a été montré que dans un modèle de cellules hématopoïétiques dérivées de cellules souches embryonnaires, HOXB4 cible directement des gènes essentiels pour le développement des CSH comme *Runx1*, *Scl/Tal1*, *Gata2*, et *Gfi1* (Oshima et al. 2011). De plus, dans la population de CSH/progéniteurs adultes, HOXB4 peut affecter plusieurs gènes et voies de signalisations impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose ou la différenciation (Schiedlmeier et al. 2007).

Dans l'hématopoïèse, les protéines HOX régulent directement ou indirectement l'expression de plusieurs gènes et peuvent ainsi affecter le cycle cellulaire, la différenciation, et l'apoptose. Par contre, malgré quelques candidats identifiés, le réseau de gènes cibles des protéines HOX au niveau des CSH adultes reste encore largement méconnu.

## 1.8) Le profil d'expression des gènes *Hox* dans l'hématopoïèse

Les gènes *Hox* ne sont pas seulement exprimés lors du développement embryonnaire, mais également dans certaines cellules hématopoïétiques chez l'adulte.

Les premiers rapports ont défini que plusieurs gènes *Hox* étaient exprimés dans diverses lignées cellulaires hématopoïétiques (Kongsuwan et al. 1988; Magli et al. 1991; Shen et al. 1989).

L'analyse de l'expression des gènes *Hox* a aussi été couverte au niveau des cellules hématopoïétiques murines et humaines. Ces études ont révélé que la majorité des gènes *Hox* des clusters A, B et C sont exprimés au niveau des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et du foie fœtal. La plupart de ces gènes sont préférentiellement exprimés au niveau des populations enrichies en CSH et progéniteurs primitifs. L'expression des gènes *Hox* va décroître avec la différenciation et la maturation des CSH et des progéniteurs. Ces études ont aussi démontré que les gènes *Hoxa* sont les plus exprimés au niveau des cellules hématopoïétiques primaires provenant de la moelle osseuse ou du foie fœtal, suivis des gènes du cluster *Hoxb* et *Hoxc*. Le cluster *Hoxd* ne pas semble être exprimé au niveau des cellules hématopoïétiques (Bijl et al. 2006; Giampaolo et al. 1995; Giampaolo et al. 1994; Kawagoe et al. 1999; Moretti et al. 1994; Pineault et al. 2002; Sauvageau et al. 1994; Taghon et al. 2003). De plus, dans un modèle *in vitro* de différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules hématopoïétiques, l'expression des gènes du cluster *Hoxa* prédomine aussi comparativement aux autres gènes *Hox* (Wheadon et al. 2011).

Ces données sur l'expression des gènes *Hox* sont confirmées par des analyses globales du profil d'expression des gènes (microarray) au niveau des CSH et des progéniteurs chez la souris et l'humain. Globalement, ces études ont démontré que *Hoxa10*, *Hoxa9*, *Hoxa5*, *Hoxa2* et *Hoxb5* sont hautement exprimés au niveau des CSH et progéniteurs très primitifs, ces gènes font donc partie de la signature transcriptionnelle des cellules hématopoïétiques primitives (Chambers, Boles, et al. 2007; Forsberg et al. 2005; Ivanova et al. 2002; Lebert-Ghali et al. 2010; Toren et al. 2005).

Ces observations appuient donc la possibilité que plusieurs gènes *Hox*, notamment ceux du cluster *Hoxa*, puissent jouer un rôle important dans l'hématopoïèse, surtout aux niveaux des CSH et des progéniteurs.

## 1.9) La régulation des gènes et protéines HOX

Étant donné la capacité des gènes *Hox* à influencer le destin d'une cellule lors de l'embryogenèse ou durant l'hématopoïèse, une régulation stricte de leur expression s'effectue à plusieurs niveaux par plusieurs mécanismes (Figure 8) (McGonigle, Lappin, and Thompson 2008).

### 1.9.1) Les voies de signalisation affectant les gènes *Hox*

Plusieurs voies de signalisation sont capables d'activer l'expression des gènes *Hox*. Lorsque les CSH/progéniteurs humains sont cultivés en présence des cytokines SCF, FLT3-L et TPO, ces dernières sont capables de moduler l'expression de plusieurs gènes *HOX* (*HOXB3*, *B4* et *A9*, *B8* et *A10*) (McGuckin et al. 2004). De plus, il a été démontré que TPO pouvait activer le promoteur de *Hoxb4* via la voie *p38 MAPK* (Kirito, Fox, and Kaushansky 2003). La voie *Wnt* peut aussi activer l'expression de *Hoxb4* dans les CSH, un gène impliqué dans l'autorenouvellement des CSH (Reya et al. 2003).

### 1.9.2) La régulation des gènes *Hox* par des régulateurs de la chromatine : les groupes Polycomb et Trithorax

Les gènes *Hox* sont bien connus pour être ciblés par les complexes des Polycomb et Trithorax durant le développement embryonnaire (Yu et al. 1995; Lewis 1978; Sparmann and van Lohuizen 2006).

L'action des Polycomb sur les gènes *Hox* dans l'hématopoïèse reste encore énigmatique (Konuma, Oguro, and Iwama 2010; Lessard and Sauvageau 2003; Lessard et al. 1999). Lors de la mutation de *Bmi1* ou de *Rae28*, l'expression des gènes *Hox* reste inchangée à l'exception de celle de *Hoxa9* qui est légèrement augmentée dans les CSH *Bmi1*<sup>-/-</sup> (Ohta et al. 2002; Park et al. 2003). *A contrario*, PCGF1, une autre protéine Polycomb régule négativement l'expression des gènes *Hoxa* puisque l'ablation de son expression induit une augmentation de l'expression des gènes *Hoxa10*, *a7*, *a4*, *a9* et *a5* (Ross et al. 2012).

Chez les mammifères, MLL est l'orthologue de la protéine Trithorax de la drosophile. MLL est essentiel pour maintenir l'expression des gènes *Hox* durant l'embryogenèse. Par contre, dans les souris mutantes pour *Mll*, l'expression des gènes *Hox* est initiée, mais pas

maintenue ce qui indique que MLL n'est pas important pour l'activation de l'expression des gènes *Hox* mais bien pour maintenir leur expression (Yu et al. 1998; Yu et al. 1995). En utilisant un système de différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules hématopoïétiques, il a été démontré que l'absence de MLL provoquait une diminution de l'expression des gènes *Hox* des clusters a, b et c dans les progéniteurs hématopoïétiques (Ernst, Mabon, et al. 2004). De plus, dans un modèle de souris mutantes pour *Mll*, l'expression de *Hoxa7*, *a9* et *a10* dans des cellules de moelle osseuse est fortement réduite suite à l'élimination de MLL (Jude et al. 2007).

Dans le système hématopoïétique, l'expression des gènes *Hox* est donc dépendante de plusieurs protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine.

### **1.9.3) Les facteurs de transcription régulant directement l'expression des gènes *Hox***

D'autres protéines se lient directement sur le promoteur des gènes *Hox* et activent leur expression. Les protéines CDX (CDX1, CDX2 et CDX4) sont connues pour se lier à des séquences consensus sur le promoteur gènes *Hox* et réguler leur expression durant l'embryogenèse (Charite et al. 1998). En effet, la mutation de plusieurs protéines CDX, chez le poisson zébré et dans des cellules souches embryonnaires murines, affecte la génération de CSH/progéniteurs et perturbe le niveau d'expression de certains gènes *Hox* (Davidson et al. 2003; Davidson and Zon 2006; Wang et al. 2008). De plus, CDX4 et MENIN sont connus pour réguler l'expression de *Hoxa9* dans une lignée cellulaire hématopoïétique (Yan et al. 2006). La surexpression de *Cdx2* ou *Cdx4* dérégule l'expression des gènes *Hox* et génère des leucémies (Bansal et al. 2006; Rawat et al. 2008; Scholl et al. 2007).

D'autres facteurs de transcription comme GATA-1 ou NF-Y peuvent aussi, respectivement, réguler l'expression de *HOXB2* humain et *Hoxb4* murin (Vieille-Grosjean and Huber 1995; Zhu et al. 2003).

### **1.9.4) La régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle**

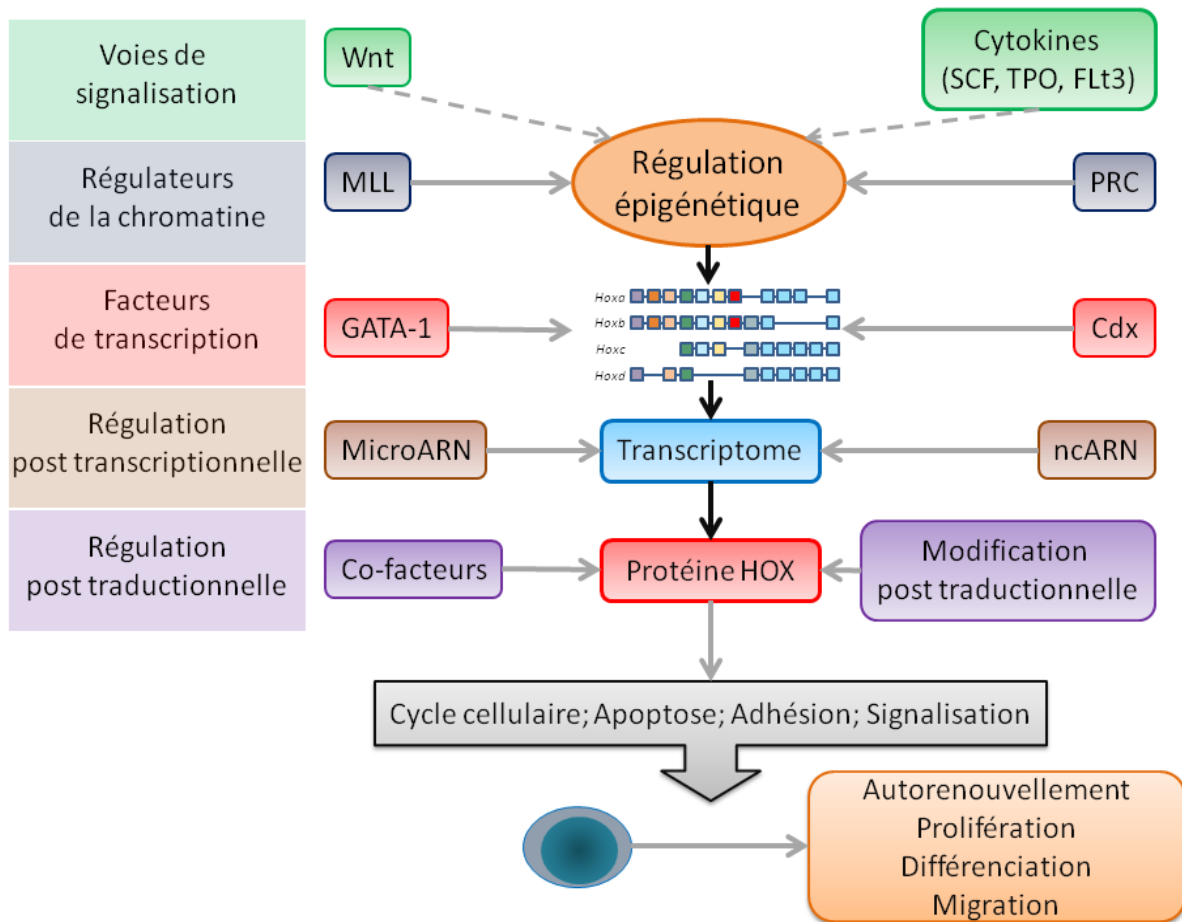
Comme plusieurs gènes chez le mammifère, la régulation des clusters *Hox* inclut l'épissage alternatif et l'utilisation de promoteurs alternatifs (McGonigle, Lappin, and Thompson 2008; Popovic, Erfurth, and Zeleznik-Le 2008). Plusieurs isoformes de *Hoxa9*

existent, notamment une protéine tronquée dépourvue de l'homéodomaine et donc incapable de lier l'ADN (Fujimoto et al. 1998). Cette isoforme de HOXA9 peut aussi interagir efficacement avec CBP et donc compétitionner et réguler la protéine HOXA9 complète (Dintilhac et al. 2004).

Les clusters comprennent aussi plusieurs microARN (Mainguy et al. 2007). Les microRNA sont des ARN non codants régulant négativement l'expression d'un ARN messenger, en se liant à ce dernier et en ciblant sa dégradation ce qui a pour conséquence de contrôler le niveau de protéines. *mir-196b*, un microRNA situé entre *Hoxa9* et *Hoxa10*, est capable de réguler négativement la traduction de *Hoxb8*, *c8*, *d8*, *a7*, *a9* et du cofacteur *Meis* (Li et al. 2012; Yekta, Shih, and Bartel 2004). D'autres microARN participent à la régulation des gènes *Hox* au niveau des CSH et lors de la différenciation hématopoïétique (Chung, Hu, and Park 2011; Shen et al. 2008; Shivdasani 2006). Aussi, une dérégulation de certains microRNA est associée à une dérégulation de l'expression des gènes *Hox* dans plusieurs cas de leucémie (Marcucci et al. 2011).

Des modifications post-traductionnelles directement sur les protéines HOX peuvent aussi réguler leur activité. Dans des progéniteurs myéloïdes, les protéines SHP1 et PKC peuvent respectivement moduler l'état de phosphorylation de l'homéodomaine des protéines HOXA10 et HOXA9. Ces phosphorylations ont pour effet d'affecter la capacité de liaison de ces protéines HOX à l'ADN et de réduire la différenciation myéloïde (Eklund et al. 2002). Finalement, au niveau des progéniteurs hématopoïétiques surexprimant le gène *Hoxa9*, ce dernier forme un complexe avec Smad4 dans le cytoplasme. L'interaction de SMAD4 et HOXA9 est un mécanisme de protection pour empêcher la transformation des progéniteurs normaux par HOXA9. La séquestration de HOXA9 par SMAD4 dans le cytoplasme est donc un moyen de réguler négativement l'action de HOXA9 au noyau (Quere et al. 2011).

Les gènes *Hox* ont la capacité d'influer le destin d'une cellule lors de l'embryogenèse ou durant l'hématopoïèse. Dans des cellules saines, plusieurs mécanismes sont donc nécessaires pour réguler adéquatement l'expression des gènes *Hox* ou l'activité des protéines HOX. Un défaut au niveau d'un des mécanismes de régulation (e.g translocation ou duplication de MLL) est suffisant pour induire une expression aberrante des gènes *Hox* ou une activité déficiente des protéines HOX ce qui mène au développement de pathologies comme la leucémie.



**Figure 8: La régulation des gènes et protéines HOX.**

Étant donné la capacité des gènes *Hox* à influencer sur le destin d'une cellule lors de l'embryogenèse ou durant l'hématopoïèse, une régulation stricte de leur expression s'effectue à plusieurs niveaux par plusieurs mécanismes.

### 1.10) L'implication des gènes *Hox* dans les leucémies

La leucémie est un cancer des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques. Les cellules leucémiques apparaissent après l'accumulation de mutations au niveau de l'ADN, ce qui induit la transformation des cellules. Les cellules vont alors être bloquées à un stade de différenciation et proliférer de manière anormale, ce qui va provoquer une accumulation des cellules leucémiques. Ces cellules vont graduellement envahir la moelle osseuse, les organes hématopoïétiques et le sang puis pourront même se propager à d'autres parties du corps. Les

fonctions du système hématopoïétique vont progressivement se détériorer jusqu'à causer la mort du patient si la leucémie n'est pas traitée. On distingue quatre grandes classes de leucémies selon leur temps de latence (aiguë ou chronique) et selon le type de lignée d'où émergent les cellules leucémiques (lymphoïde ou myéloïde) (Chen 2013).

Il est avéré que les gènes *Hox* et leur cofacteur Meis jouent aussi un rôle central dans plusieurs types de cancers hématologiques humains et murins (Alharbi et al. 2013; Argiropoulos and Humphries 2007; Argiropoulos, Yung, and Humphries 2007).

### **1.10.1) Les translocations impliquant les gènes *Hox***

Les gènes *Hox* sont directement liés à la génération de leucémies myéloïdes aiguës (LMA) et chroniques (LMC) puisque des séquences de gènes *Hox* peuvent subir des translocations avec le gène *Nup98* qui code pour une nucléoporine (Figure 9). La nouvelle protéine fusion dotée d'un potentiel oncogénique est composée des domaines N-Terminal de NUP98, ce qui lui confère son activité transcriptionnelle via le recrutement d'autres protéines, et le domaine C-terminal des protéines HOX qui contient l'homéodomaine (Alharbi et al. 2013; Bai et al. 2006; Kasper et al. 1999). Jusqu'à maintenant, *Hoxa9*, *a11*, *a13*, *b9*, *c11*, *c13*, *d11* et *d13* ont été identifiés comme partenaire de fusion avec *Nup98* dans les LMA et LMC humaines (Borrow et al. 1996; Fujino et al. 2002; Nakamura et al. 1996; Panagopoulos et al. 2003; Raza-Egilmez et al. 1998; Suzuki et al. 2002; Taketani, Taki, Shibuya, Ito, et al. 2002; Taketani, Taki, Shibuya, Kikuchi, et al. 2002). De plus, les protéines NUP98-HOXB3 et NUP98-HOXA10 ont été créées chez la souris et ont aussi un potentiel oncogénique (Pineault et al. 2004). Le potentiel de transformation de NUP98-HOXA9 et de NUP98-HOXA13 est dépendant de la capacité de l'homéodomaine à lier l'ADN. En effet, l'inhibition de la liaison à l'ADN par la mutation de l'homéodomaine affecte la capacité de transformation de NUP98-HOXA9 et de NUP98-HOXD13 (Kasper et al. 1999; Pineault et al. 2003). Par contre, le motif d'interaction avec PBX (PIM) n'est pas nécessaire pour toutes les protéines fusion NUP98-HOX. En effet, le potentiel de transformation de NUP98-HOXA9 nécessite le PIM tandis que NUP98-HOXD13 ne contient pas ce domaine (les paralogues 11 à 13 n'ont pas le PIM) et ne nécessite donc pas d'interagir avec PBX pour avoir un potentiel oncogénique. Ces résultats indiquent que l'homéodomaine provenant de la protéine HOX fusionnée contribue au potentiel oncogénique des protéines NUP98-HOX (Pineault et al. 2003; Kasper et al. 1999).

Plusieurs leucémies de type NUP98-HOX peuvent aussi être récapitulées et analysées dans des modèles murins surexprimant *Nup98-Hox* dans la moelle osseuse ou via l'utilisation de souris transgéniques *Nup98-Hox* (Iwasaki, Kuwata, et al. 2005; Kroon et al. 2001; Lin et al. 2005; Pineault et al. 2003). L'analyse de ces modèles a révélé que le potentiel leucémique des protéines fusion NUP98-HOX varie en fonction de protéines HOX fusionné à NUP98. De plus, une co-surexpression de NUP98-HOX avec MEIS ou FLT3 accélère le développement de la maladie (Calvo et al. 2002; Kroon et al. 2001; Palmqvist et al. 2006; Panagopoulos et al. 2003; Pineault, Abramovich, and Humphries 2005; Tosic et al. 2009).

Les protéines HOXA ont aussi la possibilité de fusionner avec le récepteur des cellules T (HOXA-TCR) dans des cas de leucémies lymphoïdes aiguës (LLA). Cette fusion mène à une surexpression globale des gènes *Hoxa* (Soulier et al. 2005; Speleman et al. 2005).

### **1.10.2) La dérégulation de l'expression des gènes *Hox* dans plusieurs cas de leucémies**

Les gènes *Hox* sont aussi impliqués indirectement dans plusieurs cas de LMA et LLA. En effet, une expression aberrante des gènes *Hox* est souvent observée suite à la mutation ou aux réarrangements chromosomiques de leurs régulateurs, comme MLL (Figure 9) (Afonja et al. 2000; Alharbi et al. 2013; Drabkin et al. 2002; Golub et al. 1999; Kawagoe et al. 1999; Lawrence et al. 1999).

MLL peut fusionner avec plus de 73 partenaires et est impliquée dans un large pourcentage de LLA et LMA (Slany 2009). Plusieurs protéines de fusions de MLL ont tendance à activer plus efficacement les gènes *Hox* que la protéine MLL non mutée, surtout les gènes du cluster *Hoxa* et leur cofacteur *Meis1* (Krivtsov et al. 2006; Milne et al. 2002; Milne et al. 2005; Somervaille and Cleary 2006). Selon le type de protéine fusionnée à MLL, l'initiation d'une LMA peut être dépendante ou non des gènes *Hox*. Par exemple, *Hoxa7* et *Hoxa9* sont nécessaires pour l'immortalisation de progéniteurs myéloïdes avec *Mll-enl* (Ayton and Cleary 2003). Aussi, dans une lignée de cellules leucémiques humaines comprenant la protéine fusion MLL-AF4, l'ablation de l'expression de *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10* ou *MEIS* dans ces cellules affecte leur capacité de reconstitution (Orlovsky et al. 2011). Par contre, l'initiation de la LMA avec MLL-GAS7 ou MLL-AF9 est indépendante de l'expression des gènes *Hoxa7* ou *Hoxa9*. Dans ce contexte, l'expression des gènes *Hoxa7* ou *Hoxa9* va



néanmoins influencer le temps de latence, le phénotype et la survie des cellules leucémiques (Faber et al. 2009; So et al. 2004). Il semble donc que l'importance des gènes *Hoxa* dans l'initiation des leucémies varie selon le type de protéines fusions qui est à l'origine de la leucémie. Par contre, l'influence du temps de latence, du phénotype et de la survie des cellules leucémiques par les gènes *Hoxa* suggère que ces derniers jouent un rôle dans la progression et possiblement l'agressivité des leucémies lorsqu'elles sont déjà établies.

Une surexpression des gènes *HOX*, notamment des gènes *HOXA* et de *MEIS1*, est aussi rapportée dans plusieurs cas de LLA, surtout dans des translocations impliquant MLL bien que d'autres translocations comme CALM-AF10 puissent aussi affecter l'expression des gènes *HOX* (Dik et al. 2005; Ferrando et al. 2003; Krivtsov et al. 2008; Rozovskaia et al. 2001; Zangrando et al. 2009).

La famille des protéines CDX est aussi associée aux développements de LMA chez l'humain. La surexpression de *Cdx2* et *Cdx4* dans la moelle osseuse de souris mène aussi au développement de LMA, mais avec des temps de latence différents. Dans les deux cas, la surexpression de *Cdx2* et *Cdx4* induit une augmentation de l'expression de plusieurs gènes *Hox* dans les cellules leucémiques (Bansal et al. 2006; Rawat et al. 2008; Scholl et al. 2007).

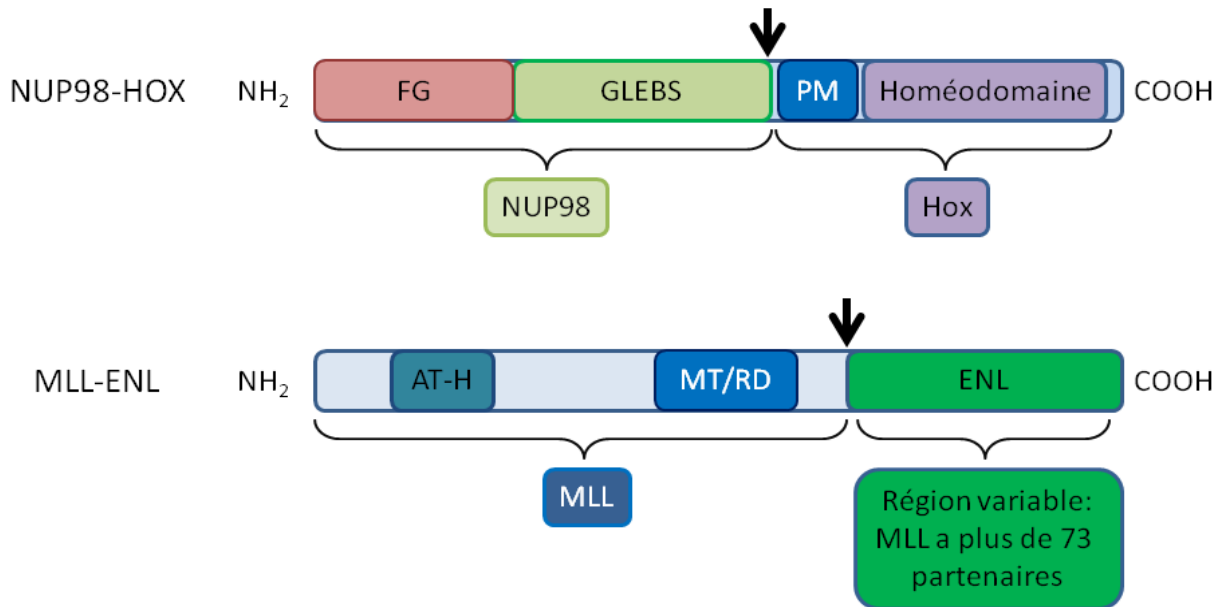
La mutation du gène *Npm1* (nucléophosmine 1) est aussi associée à la dérégulation des gènes *HOX* dans des cas de LMA (Rau and Brown 2009). La protéine NPM1 est préférentiellement localisée au niveau du noyau, mais est transférée au niveau du cytoplasme (NPMc+) dans des cas de LMA (Falini et al. 2009). Cette délocalisation peut causer une augmentation de l'expression de plusieurs gènes *Hox* et de *Meis1* (Mullighan et al. 2007; Vassiliou et al. 2011).

### **1.10.3) Les gènes *Hox* comme marqueur de pronostic**

L'accumulation de données d'expression sur les gènes *HOX* dans des LMA humaines a permis de déterminer que le niveau d'expression de ces gènes reflète le pronostic d'un patient. Une surexpression globale des gènes *HOX* est associée à un pronostic intermédiaire/défavorable. Une analyse sur des LMA humains a démontré que parmi une liste de 6817 gènes, *HOXA9* est le gène qui corrèle le plus avec un pronostic défavorable et un risque de rechute de la maladie (Golub et al. 1999). *A contrario*, une faible expression de

*HOXA9* ou de *HOXA4* et *MEIS1* est associée à un bon pronostic (Andreeff et al. 2008; Zangenberg et al. 2009).

Cibler les gènes *HOX*, notamment ceux du cluster *HOXA* semble une approche à envisager pour le traitement des LMA, spécialement les LMA dépendantes de l'expression des gènes *HOXA* (Orlovsky et al. 2011).



**Figure 9: L'implication des gènes *Hox* dans les leucémies.**

Les gènes *Hox* sont directement liés à la génération de leucémies via des translocations. D'autres réarrangements chromosomiques peuvent survenir et impliquer des régulateurs des gènes *Hox*, comme MLL. Cela pourra avoir comme conséquence de déréguler l'expression des gènes *Hox* dans plusieurs cas de leucémies. FG: Séquence de répétition de phénylalanine-glycine; GLEBS: Motif gle2p-binding-like; PM=Motif d'interaction avec PBX; AT-H=Crochet AT; MT/RD: Domaine DNA méthyltransférase/Domaine de répression

### 1.11) Le rôle des gènes *Hox* dans l'hématopoïèse

L'expression des gènes *Hox* dans les cellules hématopoïétiques primitives suggère que certains de ces gènes pourraient jouer un rôle clé au niveau des CSH et des progéniteurs lors de l'hématopoïèse normale. La dérégulation des gènes *Hox* dans des leucémies supporte aussi

l'idée que ces gènes puissent réguler certaines étapes de l'hématopoïèse. Plusieurs groupes ont donc tenté de définir la fonction de ces gènes dans l'hématopoïèse normale en effectuant des études de gain de fonction ou en utilisant des modèles de souris mutantes et transgéniques.

### **1.11.1) Les études sur la surexpression des gènes *Hox* dans les cellules hématopoïétiques**

La surexpression des gènes *Hox* dans des cellules murines de moelle osseuse et foie fœtal ainsi que dans des cellules humaines de moelle osseuse ou sang de cordon ombilical a démontré que les gènes *Hox* ont un effet sur la prolifération des CSH et des progéniteurs ainsi que sur leur différenciation cellulaire et leur survie.

Plusieurs gènes *Hox* ont un impact marqué sur l'autorenouvellement des CSH. La surexpression des gènes *Hox* du paralogue 4 est reconnue pour induire l'expansion des CSH et des progéniteurs (*in vivo* et *in vitro*) murins et humains, et ce, avec un potentiel oncogénique nul ou très faible (Antonchuk, Sauvageau, and Humphries 2001, 2002; Auvray et al. 2012; Beslu et al. 2004; Daga et al. 2000; Fournier et al. 2012; Iacovino et al. 2009; Kyba, Perlingeiro, and Daley 2002; Sauvageau et al. 1995; Thorsteinsdottir, Sauvageau, and Humphries 1999). Cette particularité des gènes *Hox* comme stimulateur de l'expansion des CSH pourrait avoir un impact majeur sur la thérapie par transplantation de moelle osseuse. De plus, malgré une demi-vie très courte et une expansion moindre, la protéine HOXB4 est directement capable d'induire l'expansion des CSH *in vitro* (Krosl et al. 2003; Amsellem et al. 2003). De plus, la diminution d'expression de *Pbx1* couplée à la surexpression de *Hoxb4* induit une expansion phénoménale ( $10^5$  fois en 2 semaines de culture) des CSH, démontrant que l'activité du cofacteur PBX1 régule négativement l'action de HOXB4 (Cellot et al. 2007; Krosl et al. 2003).

La surexpression de *Hoxa9* ou *Hoxb6* ou l'expression modérée de *Hoxa10*, provoque aussi l'expansion des CSH (Buske et al. 2001; Fischbach et al. 2005; Kroon et al. 1998; Magnusson, Brun, Miyake, et al. 2007; Thorsteinsdottir et al. 2002; Thorsteinsdottir et al. 1997). Qui plus est, la surexpression de *Hoxa9* et *Hoxb6* favorise la myélopoïèse. L'augmentation de l'expression de *Hoxb3* et *Hoxb6* bloque la différenciation des cellules B et T (Fischbach et al. 2005; Sauvageau et al. 1997). Quant à *Hoxa10*, sa surexpression affecte l'érythropoïèse. Dans ces cellules humaines, la surexpression de *HOXA10* favorise aussi la

myélopoïèse et affecte la lymphopoïèse (Taghon et al. 2002). Ces études indiquent donc que les gènes *Hox* sont aussi impliqués dans la différenciation d'une lignée.

Par contre, plusieurs gènes *Hox* (*a9*, *a10*, *b3*, *b6* et *b8*) sont aussi dotés d'un potentiel oncogénique étant donné que les souris transplantées avec des cellules surexprimant ces gènes finissent par développer des leucémies après une longue période de latence (Fischbach et al. 2005; Kroon et al. 1998; Perkins et al. 1990; Thorsteinsdottir et al. 2001; Thorsteinsdottir et al. 2002; Thorsteinsdottir et al. 1997). La co-surexpression de *Hoxa9* et *Meis1* accélère aussi le développement de leucémies indiquant que ces deux protéines collaborent (Kroon et al. 1998; Mamo et al. 2006). En effet, il a été démontré que la surexpression de *Hoxa9* prévient l'effet pro-apoptotique de *Meis1* sur les cellules leucémiques (Nakamura 2005; Wermuth and Buchberg 2005).

De façon moins intensive, les rôles des gènes *Hoxa5*, *Hoxa6* et *Hoxb8* ont été explorés via des études de surexpression. Globalement, ces gènes ont une action sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules (Crooks et al. 1999; Dickson et al. 2009; Salmanidis et al. 2013).

Une étude à plus large échelle a montré que la surexpression de presque tous les gènes du cluster *Hoxa* (à l'exception de *Hoxa2* et *Hoxa5*) avait le pouvoir de transformer des cellules hématopoïétiques primaires et de créer des lignées cellulaires stables. La transplantation de certaines de ces lignées induisait des leucémies chez les souris (Bach et al. 2010).

Si les études de surexpression des gènes *Hox* ont permis l'analyse de plusieurs phénotypes intéressants au niveau de l'hématopoïèse, le développement de leucémies dans plusieurs cas limite la possibilité de définir clairement le rôle des gènes *Hox* dans le contexte de l'hématopoïèse normale.

### **1.11.2) La mutation des gènes *Hox* et la redondance fonctionnelle**

Le gène *Hoxb4* est exprimé au niveau des cellules hématopoïétiques primitives et sa capacité à induire l'expansion des CSH lorsque surexprimé suggère que ce gène est possiblement un régulateur clé de l'hématopoïèse. Or, la mutation de *Hoxb4* dans des souris n'affecte pas l'hématopoïèse définitive. Seule une diminution mineure du nombre de CSH est observée au niveau du foie fœtal et de la moelle osseuse des souris mutantes (Bijl et al. 2006; Brun et al. 2004). De plus, la mutation combinée de *Hoxb3* et *Hoxb4* présente un phénotype

similaire, mais légèrement plus prononcé que celle de *Hoxb4* seulement (Bjornsson et al. 2003). Ces études indiquent que les gènes *Hoxb4* et *Hoxb3* ne sont pas essentiels à l'hématopoïèse définitive et que la perte de ces gènes peut être compensée par la fonction d'autres gènes *Hox*.

Étonnamment, malgré l'expression de plusieurs des gènes *Hoxb* dans les CSH et progéniteurs, l'ensemble des gènes *Hoxb1* à *b9* est aussi non essentiel à l'hématopoïèse définitive puisque, les CSH mutantes pour la quasi totalité du cluster B, en compétition avec des cellules de type sauvage, peuvent entièrement reconstituer le système hématopoïétique d'une souris irradiée (Bijl et al. 2006).

Chez ces mutants, l'absence d'un phénotype drastique dans l'hématopoïèse s'explique par le phénomène de redondance fonctionnelle qui est bien connu chez cette famille de gènes dans l'embryogenèse (Chen and Capecchi 1997; Horan, Kovacs, et al. 1995; Horan, Ramirez-Solis, et al. 1995; Suemori and Noguchi 2000; Zakany et al. 1997; Zakany et al. 1996). Ainsi, d'autres gènes *Hox* vont compenser la fonction du ou des gènes *Hox* supprimés, ce qui complique la compréhension précise de leur fonction dans l'hématopoïèse. L'étude d'expression des gènes *Hox* dans des cellules hématopoïétiques primaires de foie fœtal *Hoxb1-b9<sup>-/-</sup>* appuie ce concept : une plus haute expression de *Hoxc4*, *c9* et *c11* est observée dans ces cellules comparativement aux cellules contrôles (Bijl et al. 2006).

Comme *Hoxb4*, *Hoxa9* est exprimé de façon préférentielle au niveau des cellules hématopoïétiques primitives, cela supporte l'idée que *Hoxa9* dispose aussi d'une fonction au niveau des CSH. En effet, les souris *Hoxa9* mutantes détiennent le phénotype hématopoïétique le plus sévère comparé à tous les autres mutants des gènes *Hox* (Izon et al. 1998; Lawrence et al. 2005; Lawrence et al. 1997; Magnusson, Brun, Lawrence, et al. 2007). Les CSH de souris *Hoxa9<sup>-/-</sup>* ont un défaut au niveau de leur capacité d'autorenouvellement. En effet, des tests de transplantation en compétition ont démontré que les CSH *Hoxa9<sup>-/-</sup>* sont jusqu'à 8 fois moins compétentes que des cellules de type sauvage pour reconstituer une souris irradiée. Elles ont aussi une diminution des progéniteurs au niveau de la moelle osseuse et des défauts au niveau des cellules myéloïdes et lymphoïdes (Lawrence et al. 1997; So et al. 2004). Une explication plausible à la sévérité du phénotype pour *Hoxa9* comparé à celui des mutants *Hoxb4* ou *Hoxb3/b4* et *Hoxb1-9<sup>-/-</sup>* est que *Hoxa9* est un des gènes *Hox* les plus exprimés au niveau des CSH comparativement aux gènes du cluster B. Par conséquent, *Hoxa9* est possiblement le

gène qui a le rôle physiologique le plus important au niveau des CSH. De plus, le mutant combiné *Hoxb3/b4/a9* récapitule simplement la mutation de *Hoxa9*, supportant l'idée que les gènes *Hoxb3/b4* sont non essentiels à l'hématopoïèse (Magnusson, Brun, Lawrence, et al. 2007).

Contrairement à *Hoxa9*, la mutation de *Hoxa10* ne provoque pas d'effet notable sur le système hématopoïétique et les CSH mutantes pour *Hoxa10* conservent leur plein potentiel de reconstitution dans des tests de transplantation en compétition (Lawrence et al. 2005).

Qui plus est, la mutation ou la baisse d'expression (knockdown) de *Hoxa5*, *Hoxa7*, *Hoxb3*, *Hoxb6* et *Hoxc8* affecte légèrement l'hématopoïèse, mais sans provoquer de phénotype sévère. Ces mutations provoquent surtout des défauts mineurs au niveau de la myélopoïèse, de l'érythropoïèse ou du développement des cellules B indiquant que les gènes *Hox* n'ont pas seulement un rôle à jouer au niveau des CSH, mais aussi lors de la différenciation cellulaire. Malgré ces indices sur le rôle des gènes *Hox* dans l'hématopoïèse, les phénotypes de ces mutants sont subtils (Fuller et al. 1999; Kappen 2000; Ko et al. 2007; Shen et al. 1992; Shimamoto et al. 1999; So et al. 2004).

À ce jour, les phénotypes subtils retrouvés chez les souris mutantes pour les gènes *Hox* n'ont pas permis de définir clairement le rôle essentiel de ces gènes *Hox* au niveau des CSH ou de l'hématopoïèse en général, et ce, principalement à cause de la redondance fonctionnelle qui existe chez cette famille de gènes.

## **1.12) Raisonnement, hypothèse et modèles murins utilisés dans cette thèse:**

### **1.12.1) Raisonnement et hypothèse**

Les études de gain de fonction et des souris mutantes pour les gènes *Hox* ont fourni d'amples informations sur l'implication des gènes *Hox* dans la régulation de l'hématopoïèse, mais leur (s) rôle (s) précis et leur (s) mécanisme (s) d'action dans l'hématopoïèse adulte restent encore aujourd'hui largement mal compris.

Malgré l'expression de certains gènes *Hoxb* dans les cellules hématopoïétiques primitives murines, ces gènes sont non-essentiels à l'hématopoïèse définitive, ce qui nous

laisse penser que d'autres gènes *Hox*, notamment ceux du cluster *Hoxa* pourraient jouer un rôle dans l'hématopoïèse. Cette affirmation est supportée par l'analyse du profil d'expression des gènes *Hox* dans une population enrichie de CSH et de progéniteurs provenant de foie fœtal. On observe que les gènes du cluster *Hoxa* sont au moins 10 fois plus exprimés que les gènes *Hox* des autres clusters indiquant que les gènes *Hoxa* pourraient vraisemblablement avoir un rôle à jouer au niveau des cellules hématopoïétiques primitives (Bijl et al. 2006). Plusieurs études ont aussi démontré que l'expression de certains gènes *Hoxa* était enrichie dans les CSH adultes comparativement à des populations de cellules plus différenciées. Cette forte expression suggère donc que certains gènes *Hoxa* puissent cette fois-ci jouer un rôle au niveau des CSH adultes provenant de la moelle osseuse (Forsberg et al. 2005; Ivanova et al. 2002; Pineault et al. 2002; Sauvageau et al. 1994).

En se basant sur ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que **les gènes du cluster *Hoxa* jouent un rôle crucial dans la régulation de l'hématopoïèse adulte.**

Définir les populations hématopoïétiques qui sont régulées par les gènes *Hoxa* et décrire leurs mécanismes d'action est essentiel à notre compréhension générale de l'hématopoïèse. De plus, cette recherche contribue à mieux comprendre le développement et la progression des leucémies qui impliquent les gènes *Hoxa*. Avec le temps, cela pourra conduire à l'élaboration de nouveaux traitements ciblant les gènes *Hoxa* et favoriser un meilleur taux de suivi des patients atteints de cette maladie.

### **1.12.2) Modèles murins utilisés dans cette thèse :**

Les gènes *Hoxa* sont essentiels lors du développement embryonnaire (Kmita et al. 2005). En effet, il a été démontré que les souris ayant la mutation complète du cluster *Hoxa* (*Hoxa*<sup>-/-</sup>) meurent très tôt durant l'embryogenèse (E12.5), ce qui limite la possibilité d'étudier le rôle de ces gènes dans le système hématopoïétique adulte. Dans cette thèse, nous avons étudié l'effet de la délétion du cluster *Hoxa* sur l'hématopoïèse adulte et pour ce faire, nous avons utilisé deux modèles de souris viables, soit les souris *Hoxa*<sup>+/-</sup> et *Mx-Cre/Hoxa*<sup>flox/flox</sup> (mutation conditionnelle).

Dans le premier article, nous avons généré des souris *Hoxa*<sup>+/-</sup> sur fond génétique B6, en croisant des souris *Hoxa*<sup>+/*flox*</sup> avec des souris transgéniques *EIIa-Cre* (B6.FVB-Tg(*EIIa*-cre)

C5379Lmgd/J, Jackson) qui expriment la recombinaise Cre dans le zygote. Contrairement aux souris *Hoxa*<sup>-/-</sup>, ces souris ont l'avantage d'être viables, ce qui permet d'étudier l'hématopoïèse dans des souris adultes. Par contre, ces souris n'ont qu'un allèle *Hoxa* supprimé, il n'est donc pas possible d'analyser l'effet de la perte totale des gènes *Hoxa* sur l'hématopoïèse adulte. De plus, la délétion de l'allèle *Hoxa* floxée se fait dans tous les tissus des souris *Hoxa*<sup>+/-</sup>. Il se peut donc que la perte des gènes *Hoxa* dans les cellules stromales du microenvironnement hématopoïétique puisse influencer le phénotype observé au niveau des cellules hématopoïétiques.

Dans le second article, nous avons croisé des souris *Hoxa*<sup>flox/flox</sup> avec des souris transgéniques *Mx1-Cre* afin de générer des souris *Mx1-Cre/Hoxa*<sup>flox/flox</sup> sur fond génétique B6. Ces souris sont également viables puisqu'elles comportent deux allèles *Hoxa* fonctionnels. Dans ce modèle, l'induction de la recombinaise Cre est inductible, et se fait par injection de pIpC, un agent qui mime l'ARN viral, lequel induit la production d'interféron. Ce dernier va alors activer le promoteur *Mx1*, l'enzyme Cre sera alors produite et entrainera la délétion des deux allèles *Hoxa* dans les souris adultes. Dans ce modèle, la délétion des gènes *Hoxa* (*Hoxa*<sup>-/-</sup>) est restreinte en grande majorité au système hématopoïétique, ce qui permet d'étudier l'effet de la perte complète de ces gènes précisément dans les cellules hématopoïétiques. Par contre, un inconvénient de ce modèle est l'utilisation de pIpC pour induire la délétion. En effet, l'interféron est connu pour affecter les propriétés des CSH, il est donc primordial de traiter au pIpC les souris contrôles et les souris *Mx1-Cre/Hoxa*<sup>flox/flox</sup>.

Finalement, l'utilisation des souris *Hoxa*<sup>+/-</sup> et *Mx-Cre/Hoxa*<sup>flox/flox</sup> nous a aussi permis de vérifier si l'intensité des phénotypes observés pour les cellules hématopoïétiques dépend du niveau d'expression des gènes *Hoxa*.



## **Chapitre 2 : Article #1**

### **The HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells**

Le chapitre 2 est un article qui présente le profil d'expression des gènes *Hoxa* dans les CSH et les progéniteurs primitifs. Cet article décrit aussi les conséquences de l'ablation d'une des deux copies du cluster *Hoxa* sur les propriétés fonctionnelles des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques. J'ai contribué à toutes les étapes de la réalisation de cet article et j'ai notamment effectué la vaste majorité des expériences.

Publié en novembre 2010 dans « Experimental Hematology »

***The HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells***

Charles-Etienne Lebert-Ghali<sup>1</sup>, Marilaine Fournier<sup>1</sup>, Glenda J Dickson<sup>2</sup>, Alexander Thompson<sup>2</sup>, Guy Sauvageau<sup>3,4</sup> and Janet J Bijl<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche de Hôpital Maisonneuve-Rosemont (HMR), HMR, Montréal, H1T 2M4; <sup>2</sup>Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queen's University, Belfast, UK; <sup>3</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer, Montréal, H3T 1J4 ; <sup>4</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, H3C 3J7, Montréal

\*Correspondence:

Dr. Janet Bijl, PhD.

Centre de Recherche Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415 Boul. De l'Assomption

Montréal, QC, Canada H1T 2M4

E-mail:

Scientific section designation: Stem Cell Biology

Text: 3803 words

Figures: 6

Tables: 3

## ABSTRACT

### Objective

Functional compensation between homeodomain proteins has hindered the ability to unravel their role in hematopoiesis using single gene knock-outs. Since *HoxB* genes are dispensable for hematopoiesis, and most *HoxA* genes are expressed an order of magnitude higher than other cluster genes in hematopoietic stem cell (HSC) enriched populations, we hypothesize that maintenance of *HoxA* cluster expression is important for adult hematopoiesis and that global decrease of *HoxA* gene expression levels affects steady-state hematopoiesis.

### Methods

Expression levels of *HoxA* cluster genes have been determined in primitive hematopoietic populations derived from adult mice using quantitative reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR). Furthermore, the functional effect of single allelic deletion of the entire *HoxA* cluster on hematopoietic cells was analysed by competitive repopulation assays using *HoxA*<sup>+/-</sup> mice.

### Results

We show that the *HoxA* cluster is predominantly expressed in long-term (LT)-HSCs and that expression declines with progression to short-term (ST)-HSCs and early progenitors in a quantifiable manner. Monoallelic deletion of the *HoxA* cluster caused a general increase in primitive hematopoietic cell populations, but a decrease in side populations. In addition exhaustion of B-cell progenitors with age was observed, resulting in less mature B-cells. Moreover, bone marrow of *HoxA*<sup>+/-</sup> mice had a significant larger population of Mac1/Gr1 neutrophils, which might be caused by accelerated maturation of myeloid progenitors. Transplantation assays demonstrated that *HoxA*<sup>+/-</sup> HSCs were less competitive in long-term repopulation of myeloablated recipients, which appeared intrinsic to HSCs.

### Conclusions

These results show for the first time that maintenance of adult HSCs and progenitors is particularly sensitive to *HoxA* gene levels, suggesting a specific role for the *HoxA* cluster in primary regulation of definitive hematopoiesis.

Key words: *Hox genes*, expression profiling, mutant model, myeloid progenitors

## INTRODUCTION

The physiological need and definitive role for clustered *Homeobox (Hox)* genes in hematopoietic stem cell activity remains uncertain. In mammals the thirty nine *Hox* genes are arranged in four loci, named A, B, C and D, each on a different chromosome[1]. Primary hematopoietic cells and cell lines express *Hox* genes predominantly from the A, B and C clusters[2, 3]. Expression profiling of selected *Hox* genes in cell populations from various stages of maturation showed a general decrease of *Hox* gene expression with differentiation[4], suggesting that these genes might play a role in more primitive hematopoietic cells. A role in lineage commitment is supported by studies in bipotential hematopoietic cell lines that showed lineage directive properties for *Hoxa10* and *Hoxb8*[5]. Retroviral overexpression studies of several *Hox* genes in mouse bone marrow (BM) cells revealed altered hematopoiesis, with overexpression of *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxb8*, *Hoxb6* and *Hoxb3* ultimately resulting in myeloid leukemia[6-11]. In addition, recent assessment of oncogenic potential for all *HoxA* genes demonstrated that the majority of the cluster, except *Hoxa2* and *-a5*, could transform cells in culture[12]. Conversely, overexpression of *Hoxb4* increases hematopoietic stem cell self-renewal in the absence of leukemia development[13, 14].

Evaluation of the endogenous role for *Hox* in hematopoiesis using single gene knock-out was hindered, most likely, due to functional compensation between *HOX* proteins that only became evident from developmental studies using compound mutants[15, 16]. The observed hematopoietic phenotypes of single *Hox* genes knock-outs were extremely subtle[17-20]. *Hoxa9* homozygous null hematopoietic cells showed the most severe perturbations mostly limited to marginal diminution of leukocyte numbers accompanied by reduced precursor cell activity[20].

Better understanding of *Hox* gene function in hematopoiesis therefore requires a multiple gene knock-out approach. We previously showed that fetal liver derived HSCs lacking the *Hoxb1* to *Hoxb9* genomic region are highly competent in long-term repopulation even if five of the nine deleted *Hox* genes are expressed in HSCs[21]. Using quantitative RT-PCR, we previously

showed that several *HoxA* cluster genes are expressed at an average level of one log above their corresponding B and C paralogues. *Hoxa4-Hoxa7*, *Hoxa9* and *Hoxa11* were found to be particularly highly expressed in primitive fetal liver subsets[21]. Also other groups have found the association of some *HoxA* genes to HSC enriched populations, using either large scale array or southern blot in combination with global cDNA amplification[22-24], supporting the dominance of *HoxA* genes over the other clusters in HSC enriched populations.

A conditional knock-out model for the entire *HoxA* locus was recently generated[25]. Preliminary hematopoietic analysis of this model was limited to fetal-derived cells[26] which are known to differ functionally from their adult counterparts[27, 28]. Targeted deletion of the *HoxA* cluster results in early lethality in the homozygous state preventing analysis of adult hematopoiesis (Dr. Kmita, personal communication). Using heterozygous null *HoxA* cluster mice, we now provide direct evidence that adult bone marrow stem and progenitor cells are highly sensitive to *HoxA* gene dosage. Detailed immunophenotypic analysis of the hematopoietic compartment demonstrates a general increase of primitive hematopoietic cells due to some size changes of more specified progenitor population. In addition, HSC function in *HoxA*<sup>+/-</sup> heterozygote mice appears to be reduced, while maintenance of B-cell progenitors is dramatically affected with age. The findings underscore the importance of *HoxA* cluster gene expression levels in adult hematopoiesis.

## MATERIAL & METHODS

### Animals

All mice were bred and maintained in a specific pathogen free animal facility of the HMR Research Center. C57Bl/6 and B6SJL inbred strains were purchased from Jackson, (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Conditional mutant mice for the *HoxA* cluster genes were generously provided by Dr. Marie Kmita[25]. Heterozygous *HoxA*<sup>+/-</sup> mutant mice were obtained by crossing *HoxA*<sup>+/floxed</sup> mouse with mice transgenic for Cre recombinase expressing the transgene in the germline[29] (B6.FVB-Tg(EIIa-cre)C5379Lmgd/J, Jackson). *HoxA*<sup>+/-</sup> mice were backcrossed at least 9 times in the C57Bl/6J strain and analyzed for the presence of the mutation by polymerase chain reaction (PCR) and/or southern blotting on genomic tail DNA. Upon haploid deletion of a full *HoxA* cluster, we found no compensation from paralogous genes or aberrant expression of the neighbouring gene, *Evx*, in specific primitive hematopoietic populations (Supplemental Table 1). All mouse experiments were approved by the Animal Care Committee of the Hospital Maisonneuve-Rosemont Research Center.

### In vitro clonogenic progenitor assays

For clonogenic progenitor assays, cells were plated in 35-mm dishes in semi-solid medium, containing 1% methylcellulose in Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) supplemented with either 10% fetal bovine serum (FBS), 5.7% bovine serum albumin, 10<sup>-5</sup> β-mercaptoethanol (β-ME), 5 U/ml erythropoietin (Epo), 10ng/ml IL-3, 10ng/ml IL-6, 50ng/ml steel factor, 2mM glutamine, and 200mg/mL transferrin for myeloid progenitors or 30% FBS (selected for B cells), 10<sup>-4</sup> β-ME, 2mM glutamine and 10 ng/ml IL-7 for B-cell progenitors. BM and spleen cells isolated from *HoxA*<sup>+/-</sup> or control mice were plated at 3x10<sup>4</sup> (myeloid) or 3x10<sup>5</sup> (B-cell) and 10<sup>6</sup> cells/ml, respectively. Colonies were scored and identified according to standard criteria[30].

### Transplantation assay and Competitive Transplantation assay

Donor mutant BM cells (containing the locus CD45.2) were mixed with competitor wild-type (WT) BM cells derived from F1 progeny of C57Bl/6JxB6SJL (CD45.1<sup>+</sup>/CD45.2<sup>+</sup>) in three different ratios (1:0; 1:1; 4:1, respectively). A dose of 10<sup>6</sup> cells of each inoculate was

transplanted intravenously via the tail veins in three irradiated (800 cGy) congenic recipients (B6SJL, CD45.1<sup>+</sup>). Mutant and wild-type BM cells were distinguished by fluorescence-activated cell-sorting (FACS) analysis using antibodies specific to the leukocytic surface antigens CD45.1 and CD45.2 (BioLegend, San Diego, CA).

#### FACS analysis and sorting

Myeloid, lymphoid and erythroid populations in BM, spleen, and thymus of 4- to 15-month old healthy *HoxA*<sup>+/-</sup> mice were determined using the following conjugated antibodies: CD4-PE, CD8-APC, B220-PE, CD43-FITC, Mac1-PE, Gr1-FITC, IgM-bio and Ter119-bio (BioLegend). Biotinylated antibodies were detected with APC-conjugated streptavidin (BioLegend). Stem cell and progenitor populations (LT-HSC, ST-HSC, common myeloid progenitor (CMP), granulocyte/macrophage progenitor (GMP), megakaryocyte/erythroid progenitor (MEP), common lymphoid progenitor (CLP) and multiple myeloid progenitor (MMP)) were determined in or sorted from BM of 4- to 15-month old healthy *HoxA*<sup>+/-</sup> and control mice. The following antibodies were used: B220-bio, Gr-1-bio, Mac1-bio, CD3-bio, Ter119-bio, c-kit-APC, Sca1-PE/Cy5, Sca1-PE/Cy7, CD34-PE/Cy5, CD150-PE/Cy7, CD16/32-FITC all from BioLegend, CD34-FITC and IL7R-PE (eBioscience, San Diego, CA) CD34-PE (BD Bioscience Pharmingen San Jose, CA). Biotinylated antibodies were detected with APC/Cy7-conjugated (BD Bioscience Pharmingen) streptavidin.

For *HoxA* gene expression analysis fresh BM cells of 4- to 10-month old healthy wild type (C57Bl/6J or B6SJL) were isolated and lineage positive cells depleted on an Automated MACS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA) using the BM mouse biotin lineage depletion kit (Miltenyi Biotec). To purify LT- and ST-HSC populations collected lineage negative cells were incubated with CD34-FITC or CD34-PE, Sca1-PE/Cy5, CD150-PE/Cy7 and c-kit-APC. Both LT- and ST-HSCs are Sca1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> and further differentiated by CD150<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> (LT) and CD150<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup> (ST). The purity of the LT- and ST-HSC populations were at average 1:10 and 1:200, respectively, as determined by transplantation at limiting dilution together with helper cells in two independent experiments. For progenitor purification cells were incubated with following antibodies, CD16/32-FITC, IL7R-PE, CD34-PE/Cy5, Sca1-PE/Cy7 and c-kit-APC, and sorted according to the strategy described by Kondo et al.[31] and Akashi et al.[32] on a FACSVantage (BD Bioscience) using DIVA software. Purities for progenitor populations

were determined by CFC assays. The average frequencies of four to seven independent experiments were as follows: for CMP 1 in 2.5; for MEP1 in 15, and for GMP 1 in 2.5. In the CLP fraction no myeloid colony forming cells were detected.

Side populations were analyzed according to the protocol described by Goodell et al.[33]. Fluorescence was analyzed using the FACS LSR II (BD Bioscience, Mississauga, ON) and DIVA software. FACS data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc, Ashland, OR).

#### Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from  $2 \times 10^4$  to  $5 \times 10^5$  fresh sorted cells (LT-HSC, ST-HSC, CMP, GMP, MEP, CLP and MMP) with Trizol<sup>®</sup> and DNase I treated and cDNA generated using MMLV reverse transcriptase all as per manufacturer's instructions (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Quantitative PCR was performed in triplicate for each sample as described before[21, 34, 35], using either SYBR Green or TaqMan<sup>™</sup> specific primer probe sets (Applied Biosystems, Toronto, Canada) and thermal cycler ABI 7500 (Applied Biosystems). Primers for the detection of *HoxA* gene expression were based on those designed by Thompson et al.[36], and were validated for use with SYBR green. Triplicates were accepted in a 0.5 CT range. At least three independent experiments were done for each population.

#### Bone marrow cultures

Total BM cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS,  $10^{-5}$   $\beta$ -ME, 6ng/mL IL-3, 10ng/mL IL-6, 100 ng/mL steel factor, 50 $\mu$ g/ml Gentamycin (GIBCO), 100U/ml Penicillin, and 100 $\mu$ g/ml Streptomycin. For cell cycle analysis, BM cells were re-suspended at  $10^6$  cells/ml in DMEM containing 2% FBS and 10mM HEPES pH=7.4 pre-warmed to 37°C. BM cells were incubated with 10 $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Cambrex Bio Science, MD USA) at 37°C for 45 minutes and mixed regularly. In some experiments cells were additionally incubated with 1  $\mu$ g/ml Pyronin Y (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) at 37°C for 5 minutes to distinguish cells in G0 from those in G1. To prevent active expulsion of dye, cells were centrifuged at 4°C and re-suspended in ice cold Hanks balanced salt solution (HBSS)



supplemented with 2% FBS and 10mM HEPES pH=7.4, then incubated with antibodies to discriminate stem cell and progenitor populations.

*Statistical analysis*

Evaluation of significant difference between cell fractions of mutant mice versus wild type mice was obtained by performing a two-tailed Student's t-test. The difference in cell populations is considered significant when P-value <0.05.

## RESULTS

### Quantitative *HoxA* gene expression in stem and progenitor cells

To obtain better insights into which of the 11 *HoxA* genes are expressed in stem and progenitor cells, we performed quantitative RT-PCR analysis using RNA extracted from purified subsets of mouse bone marrow cells. With the exception of *Hoxa13*, the cell population enriched for LT-HSC expressed all *HoxA* genes (Fig.1a). Certain genes such as *Hoxa5* and *Hoxa9* are expressed at very high levels, exceeding 6000 copies per 12ng total RNA. ST-HSCs uniformly expressed much lower levels of all *HoxA* genes analyzed (Fig. 1a). This reduction in expression levels was significant (i.e., > 4 fold) for 8 of the 10 genes and most dramatic (> 13 fold) for *Hoxa10* (Fig. 1b). Of particular note, only *Hoxa7* (~ 3,000 copies) and *Hoxa9* (~4,000 copies) expression remained very high in ST-HSCs.

Commitment to myeloid versus lymphoid lineage takes place once cells leave the stem cell compartment. We analyzed whether certain *HoxA* genes are specifically expressed in myeloid (CMP) versus lymphoid (CLP) progenitors and found that *Hoxa2* to *Hoxa10* genes are equally expressed in both populations (Fig. 1c, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> column and Fig. 1d). Interestingly, multipotent myeloid progenitors (MMP) express higher levels of *HoxA* genes than do CMPs and CLPs (Fig.1d). Together, these results indicate measurable fluctuation in *HoxA* gene expression in 2 transitions: they are down-regulated at the LT-HSC to ST-HSC stage and up-regulated from ST-HSC to MMP.

### Evaluation of hematopoietic compartments isolated from *HoxA*<sup>+/-</sup> mice

*HoxA*<sup>+/-</sup> mice were identified and screened by Southern blotting (Fig. 2a) and quantitative RT-PCR analysis of BM derived from heterozygous and control mice showed a 50% reduction in expression levels of selected *HoxA* genes (Fig. 2b). Mature *HoxA*<sup>+/-</sup> mice were significantly smaller than control littermates (18.8g ± 4.4 vs. 27.4g ± 6.8, P=0.02; Table 1) and had smaller spleen size (0.06g ± 0.01 vs. 0.1g ± 0.03, P=0.04). As a result total cell numbers in the spleen were reduced in *HoxA*<sup>+/-</sup> mice compared to age-matched controls, contrary to cell numbers in the BM and thymus which were comparable (Table 1). The proportion of myeloid Mac1/Gr1 positive cells was significantly higher in both BM and spleen of young (<5 months) *HoxA*<sup>+/-</sup>

mice compared to controls (Fig. 2c and Table 2). Conversely, total numbers of B-cells were slightly lower in BM of heterozygous mice (Table 2). The spleen of *HoxA*<sup>+/-</sup> mice, however, had significantly higher percentage of B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> cells (Fig.2c), comprising the primitive B-cells (Table 2). Although due to an almost 2-fold reduced cellularity absolute numbers of B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> cells were comparable to those found in control mice, but the relative increase in population size might hint to some compensation for B-cell development in the spleen. No anomalies were observed in the T-cell subpopulations (Table 2). Heterozygous *HoxA*<sup>+/-</sup> mice were further analyzed by FACS for differences in early hematopoietic progenitor and stem cell populations including Lineage<sup>negative</sup>/c-kit<sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup> (LKS), CMP, CLP, GMP and MEP. The hematopoietic stem cell enriched LKS population and the myeloid progenitor containing fraction Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>/Sca1<sup>-</sup> gated on IL7R<sup>-</sup> were significantly larger in *HoxA*<sup>+/-</sup> mice (Fig.3a and b). Within the latter population the GMP fraction tends to be larger at the expense of the MEP fraction (Fig.3a, right panel). Indeed, a marginal reduction in absolute number of MEP cells was observed in *HoxA*<sup>+/-</sup> compared to control mice ( $61 \times 10^4 \pm 10.7$  vs.  $81 \times 10^4 \pm 3.8$  per femur + tibiae; P=0.03, respectively; Fig.3c and supplemental Table 2). Total numbers of GMPs in the bone marrow were slightly increased, but did not reach significance ( $64 \times 10^4 \pm 26.8$  vs.  $29 \times 10^4 \pm 6.6$ ; P=0.1; n=3). Immunophenotypical analysis showed no differences in LT- and ST-HSC, CMP and CLP populations (Fig.3c and data not shown). Distributions of cell cycle phases were comparable for all primitive populations, except for a marginal increase of *HoxA*<sup>+/-</sup> CLPs in G2 (Supplemental Fig.1). Interestingly, the size of the side population (that excluding Hoechst dye), typically associated with LT-HSC, was reduced ten-fold in BM of *HoxA*<sup>+/-</sup> compared to control mice (Fig. 3d and e; p = 0.006). Thus single allelic deletion of the *HoxA* locus results in a global increase of primitive hematopoietic cell populations, and an increase in mature Mac1/Gr1 myeloid cells in BM and spleen. Despite an increase in LKS cells the decrease in the SP population indicates that actual LT-HSCs numbers might be lower in *HoxA*<sup>+/-</sup> mice.

### Progenitor Assays

Myeloid and B lymphoid progenitor assays, performed with BM and spleen derived cells, showed a 2-fold higher frequency of B-cell progenitors in the BM of young (< 5 mo) adult *HoxA*<sup>+/-</sup> mice (Fig. 4a; p = 0.03). Interestingly, B-cell progenitor frequencies were decreased

ten-fold in BM of old (> 15 mo) *HoxA*<sup>+/-</sup> mice (p = 0.01) compared to young *HoxA*<sup>+/-</sup> mice, and were four-fold less than age matched control mice (p = 0.01). This decrease in B-cell progenitors resulted in clearly smaller populations of B220<sup>+</sup>/CD43<sup>-</sup> cells in the BM in three out of four mice. Interestingly, while in one mouse the phenotype was less pronounced, another old mouse (15 months old) had significantly reduced numbers of B lymphocytes and erythroid cells (Supplemental Fig.2). In spleen, immature B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> populations were significantly increased (p = 0.03), while mature B220<sup>+</sup>/CD43<sup>-</sup> populations were decreased (Supplemental Table 3; p = 0.03). Comparable frequencies were observed for myeloid progenitors in BM and spleen of young and old mice between *HoxA*<sup>+/-</sup> and control mice (Fig. 4a). However, as spleens are smaller in *HoxA*<sup>+/-</sup> mice the absolute number of progenitors were significantly lower (Fig 4a, right panel). *HoxA*<sup>+/-</sup> *in vitro*, BM cultures showed a delayed 2-fold retardation in growth (by 21 days) compared to control BM cells (Fig. 4b). This reduction in total cell numbers was supported by a decreased expansion of myeloid progenitors in cultures initiated with *HoxA*<sup>+/-</sup> cells, evident at ten days just before the exponential growth phase (Fig. 4c). FACS analysis showed that the vast majority of both control and *HoxA*<sup>+/-</sup> cultured cells were in cell cycle after ten days and no difference was observed in the distribution of cells in G0, G1 and S/G2 phase (Supplemental Fig.3).

#### *In vivo evaluation of hematopoietic compartments isolated from HoxA*<sup>+/-</sup> mice

To directly test if the functional activity of *HoxA*<sup>+/-</sup>-derived HSCs was impaired, BM cells of age matched heterozygous *HoxA* mice (CD45.2) and wild type mice (CD45.1/CD45.2) were transplanted into myeloablated congenic recipients (CD45.1) as detailed in Figure 5. The ability of *HoxA*<sup>+/-</sup> HSCs to repopulate myeloablated recipients in a context of minimal competition (i.e., few residual endogenous CD45.1 HSCs) was examined at different time points (5, 9, 12 and 24 weeks). In this setting *HoxA*<sup>+/-</sup> BM cells contributed at 67 ± 8% to total peripheral blood (PB) repopulation at early time points and at an average of 78 ± 8% and 81 ± 8% at 12 and 24 wks, respectively, after transplantation (Fig. 5a and Supplemental Table 4). In comparison, wild type cells repopulated irradiated recipients significantly better in the periphery at both medium and long-term (12 and 18 weeks; 91 ± 3% and 92 ± 2%, respectively) , and at short-term (5 and 9 weeks; 86 ± 14% and 84 ± 6, respectively;

Supplemental Table 4). Thus *HoxA*<sup>+/-</sup> HSCs appeared less competitive than control cells in recipients which few residual HSCs which survived myeloablation.

Competitive *in vivo* repopulation assays, using defined ratios of donor cells (*HoxA*<sup>+/-</sup> vs. wild type) showed that the contribution of *HoxA*<sup>+/-</sup> BM cells (CD45.2) in short-term and long-term repopulation assays was on average 10-20% less than expected for each donor mouse based on the initial transplant mixtures (Fig. 5a, Table 3). The difference between initial (t<sub>0</sub>) and end (t<sub>24</sub>) ratio of wild type vs. *HoxA*<sup>+/-</sup> cells, for all recipients analysed, showed that wild type HSCs are two to three-fold more potent in long-term repopulation than *HoxA*<sup>+/-</sup> HSCs (Fig. 5b). Despite their poorer competitive repopulation, FACS analysis for lymphoid and myeloid lineage markers showed that *HoxA*<sup>+/-</sup> HSCs differentiated into all lineages (data not shown).

In contrast to what has been shown for W/W mice[37], non-myeloablated *HoxA*<sup>+/-</sup> recipients are not engrafted by high doses of wild type cells (0% at 10<sup>6</sup> and 0.8% at a 10<sup>7</sup> cell dose, Fig. 6 upper panels). In addition, wild type cells remained more competitive over *HoxA*<sup>+/-</sup> cells when transplanted into irradiated *HoxA*<sup>+/-</sup> recipients (Fig.6 lower panels) suggesting no obvious microenvironment defects in this model.

## DISCUSSION

Ectopic expression of individual *HoxA* and *B* genes has revealed both, their potential to expand HSCs and progenitor populations[9, 13, 14, 38, 39] and their ability to modulate lineage commitment[5, 40, 41]. Conversely, single gene mutants for *Hox* genes show negligible to mild hematopoietic phenotypes raising the likelihood of functional redundancy within this family. Our previous data showed that the expressed *HoxB* cluster is dispensable for normal hematopoiesis[21], and thus elevated *HoxA* genes as potential key regulators of blood cell development. In this study we confirm that high expression levels of *HoxA* genes are associated with defined hematopoietic populations, in particular the long-term repopulating HSCs. Of the *HoxA* genes, *Hoxa10* and *Hoxa5* were identified as most specific to the LT-HSCs and thus might be particularly involved in functions related to this cell type. Interestingly, in a large expression profiling study using arrays these *Hox* genes were also found specific to the long-term stem cell population[23]. Similar expression levels for *HoxA* genes in common lymphoid and common myeloid progenitors were unexpected, since earlier data suggested that expression of *HoxA* genes were limited to myelopoiesis[3, 42], and genes from the *HoxC* cluster with lymphopoiesis[43-45]. The detection of high *HoxA* gene levels in more primitive multi-potent myeloid prone progenitors ( $sca^+/kit^+/CD16/32^+$ ), indicates that *HoxA* genes may play a role in early myeloid lineage commitment, likely in cells preceding the CMP stage. In accordance with their suggested role in myeloid lineages[40, 46], *Hoxa9* and *Hoxa10* show the largest difference in expression levels between CLPs and the multi-potent myeloid progenitors.

Hematopoietic anomalies for nullizygous single *Hox* genes are very subtle[17-20]. In this study we demonstrate that heterozygous knock-out mice for the entire *HoxA* locus show clear alterations in adult homeostatic hematopoiesis, with lack of compensation from paralogous genes. In particular primitive hematopoietic cell populations (LKS and LKS<sup>neg</sup> populations) and myeloid populations (Mac1/Gr1<sup>+</sup> cells) are increased. This appears to correspond with the two transitions in *HoxA* gene expression observed. Since *Hox* gene levels generally decline with hematopoietic differentiation[4, 47], further specific reduced *HoxA* gene expression levels might be insufficient to maintain LT-HSC and MMP populations favouring a

progression to differentiation and consequently an increase in descendent populations. Such an increase in LKS population has also been reported for newborn mice lacking both *HoxA* alleles, but in contrast to the *HoxA*<sup>+/-</sup> mice, the LT-HSC, ST-HSC and MMP populations were also large[26] suggesting a different regulation mechanism between adult and fetal hematopoiesis. The reduced number of myeloid progenitors in cycling cultures might also suggest that growth factor driven self-renewal division of *HoxA*<sup>+/-</sup> progenitors was decreased in favour of differentiation division although we cannot exclude increased apoptosis or slower division kinetics of progenitors. Progressive loss of B-cell progenitors with age indicates that *HoxA* genes are indispensable to maintain B-cell progenitors and precursors in sufficient numbers throughout the lifespan of a mouse. Why myeloid progenitors are more robust under *HoxA* insufficiency *in vivo* is not clear. The recent discovery of myeloid-biased and lymphoid-biased HSCs[48-50] might explain the difference in myeloid and lymphoid progenitor maintenance as myeloid-biased HSCs have a higher potential to long-term repopulation and are the predominant population in aged mice. Another possibility is that low *HoxA* gene levels direct lineage commitment to myeloid lineage at the expense of lymphoid lineage. However, initial increased numbers of B-cell progenitors favours the former.

Competitive transplantation experiments and reduced side populations clearly show that adult *HoxA*<sup>+/-</sup> repopulating cells are sensitive to *HoxA* gene dosage. Both these assays are based on functional competence of HSCs and thus it cannot be excluded that *HoxA*<sup>+/-</sup> mice have reduced numbers of HSCs, or that inefficient homing, and active efflux of Hoechst account for the lower repopulation contribution and small side population, respectively. However, failure of transplanted wild type HSCs to contribute to repopulation of and non-irradiated *HoxA*<sup>+/-</sup> recipient mice suggest that the niche is completely occupied by *HoxA*<sup>+/-</sup> HSCs and thus might favour a more qualitative than quantitative effect of single allelic *HoxA* gene deletion on HSCs. Similarly, it has been proposed that deletion of *Hoxa9* has a more qualitative impact on HSCs as competitive repopulation unit (CRU) frequencies were reduced in *Hoxa9*<sup>-/-</sup> mice, while no difference was found between *Hoxa9*<sup>-/-</sup> and control HSC compartments based on immunophenotypic analysis[20]. However, the potential of several *Hox* genes to expand HSC numbers, including *HoxA* genes *Hoxa9*[39] and *Hoxa4* (unpublished data, 2010) suggests that deletion or epigenetic silencing of this particular cluster might have both an impact on the

function and pool size of HSCs. In summary our results show that *HoxA* gene expression levels regulate optimal HSC activity under expanding conditions and in the presence of growth factors in a cell autonomous manner.

A recent study performed by the group of Duboule[26] also demonstrates a cell autonomous defect in primitive hematopoiesis in the absence of the *HoxA* locus. The authors reported decreased repopulation ability of *HoxA*<sup>-/-</sup> fetal liver cells due in part to impaired progression of HSCs to multipotent progenitors. The erythroid compartment was particularly affected, however all myeloid and lymphoid lineages were generated albeit in reduced numbers. Importantly, this defect was not observed in newborn mice, but only when fetal *HoxA*<sup>-/-</sup> HSCs were transplanted into the adult BM environment. This suggests a pivotal role for *HoxA* cluster genes in adult hematopoiesis, which is supported by the adult heterozygote phenotype. Tissue-specific conditional knockout models will help elucidate the role of the *HoxA* cluster in hematopoiesis.

In conclusion our data support a specific role for *HoxA* cluster genes in hematopoiesis. In particular, the function and maintenance of adult HSCs and progenitors are particularly sensitive to *HoxA* gene dose.



## **SUPPORT AND FINANCIAL DISCLOSURE DECLARATION**

This work was supported by grants from The Leukemia & Lymphoma Society of Canada and the Canadian Cancer Society and the NIH. C.E.L.G is a recipient of a Graduate School Faculty of University of Montréal Scholarship Doctoral award. M.F. holds Scholarship Master Award of the Cole Foundation. The authors declare no competing financial interests.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We want to thank in particular Dr. Marie Kmita from IRCM who has kindly shared the conditional *HoxA* mutant mice. The authors are also grateful to Dr. Gorazd Krosl for the scientific discussions and critical reading of the manuscript. We thank the staff of the animal care facility for taking care of the animals and the staff from the HMR flow cytometry platform for cell sorting and assistance in FACS analysis.

## **AUTHORSHIP**

Contribution: C.E.L.G performed experiments; analyzed results, generated figures and wrote the paper. M.F helped with transplantation experiments and analysis of the mice. A.T. and G.D performed and validated quantitative RT-PCR system for all *Hox* genes and helped writing the paper. G.S. designed experiments and wrote the paper. J.B. designed and performed experiments; analyzed results, generated figures and wrote the paper.

## REFERENCE LIST

- [1] Scott MP. A rational nomenclature for vertebrate homeobox (HOX) genes. *Nucleic Acids Res* 1993 Apr 25;21(8):1687-8.
- [2] Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Dec 6;91(25):12223-7.
- [3] Magli MC, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C, Boncinelli E. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jul 15;88(14):6348-52.
- [4] Magli MC, Largman C, Lawrence HJ. Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J Cell Physiol* 1997 Nov;173(2):168-77.
- [5] Shen WF, Detmer K, Mathews CH, Hack FM, Morgan DA, Largman C, et al. Modulation of homeobox gene expression alters the phenotype of human hematopoietic cell lines. *EMBO J* 1992 Mar;11(3):983-9.
- [6] Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J* 1998 Jul 1;17(13):3714-25.
- [7] Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Hough MR, Hugo P, Lawrence HJ, Largman C, et al. Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* 1997 Jan;6(1):13-22.
- [8] Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, Dragowska W, Lansdorp PM, Lawrence HJ, et al. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 1997 Jan;17(1):495-505.
- [9] Fischbach NA, Rozenfeld S, Shen W, Fong S, Chrobak D, Ginzinger D, et al. HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 2005 Feb 15;105(4):1456-66.

- [10] Perkins AC, Cory S. Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *EMBO J* 1993 Oct;12(10):3835-46.
- [11] Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F, Sauvageau G. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 2001 Jan;21(1):224-34.
- [12] Bach C, Buhl S, Mueller D, Garcia-Cuellar MP, Maethner E, Slany RK. Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood* 2010 Apr 8;115(14):2910-8.
- [13] Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM, et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 1995 Jul 15;9(14):1753-65.
- [14] Kros J, Beslu N, Mayotte N, Humphries RK, Sauvageau G. The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity* 2003 Apr;18(4):561-71.
- [15] Chen F, Capecchi MR. Targeted mutations in *hoxa-9* and *hoxb-9* reveal synergistic interactions. *Dev Biol* 1997 Jan 15;181(2):186-96.
- [16] Horan GS, Ramirez-Solis R, Featherstone MS, Wolgemuth DJ, Bradley A, Behringer RR. Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev* 1995 Jul 1;9(13):1667-77.
- [17] Kappen C. Disruption of the homeobox gene *Hoxb-6* in mice results in increased numbers of early erythrocyte progenitors. *Am J Hematol* 2000 Oct;65(2):111-8.
- [18] Shimamoto T, Tang Y, Naot Y, Nardi M, Brulet P, Bieberich CJ, et al. Hematopoietic progenitor cell abnormalities in *Hoxc-8* null mutant mice. *J Exp Zool* 1999 Feb 1;283(2):186-93.
- [19] Brun AC, Bjornsson JM, Magnusson M, Larsson N, Leveen P, Ehinger M, et al. *Hoxb4*-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood* 2004 Jun 1;103(11):4126-33.
- [20] Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G, Fong S, Izon DJ, Humphries RK, et al. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene *HOXA9* have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* 1997 Mar 15;89(6):1922-30.

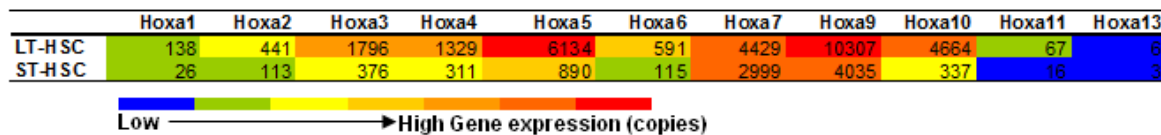
- [21] Bijl J, Thompson A, Ramirez-Solis R, Kros J, Grier DG, Lawrence HJ, et al. Analysis of HSC activity and compensatory Hox gene expression profile in Hoxb cluster mutant fetal liver cells. *Blood* 2006 Jul 1;108(1):116-22.
- [22] Akashi K, He X, Chen J, Iwasaki H, Niu C, Steenhard B, et al. Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* 2003 Jan 15;101(2):383-9.
- [23] Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science* 2002 Oct 18;298(5593):601-4.
- [24] Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ, Humphries RK. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol* 2002 Jan;30(1):49-57.
- [25] Kmita M, Tarchini B, Zakany J, Logan M, Tabin CJ, Duboule D. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 2005 Jun 23;435(7045):1113-6.
- [26] Di-Poi N, Koch U, Radtke F, Duboule D. Additive and global functions of HoxA cluster genes in mesoderm derivatives. *Dev Biol* 2010 May 15;341(2):488-98.
- [27] Rebel VI, Miller CL, Thornbury GR, Dragowska WH, Eaves CJ, Lansdorp PM. A comparison of long-term repopulating hematopoietic stem cells in fetal liver and adult bone marrow from the mouse. *Exp Hematol* 1996 Apr;24(5):638-48.
- [28] Bowie MB, Kent DG, Dykstra B, McKnight KD, McCaffrey L, Hoodless PA, et al. Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Apr 3;104(14):5878-82.
- [29] Lakso M, Pichel JG, Gorman JR, Sauer B, Okamoto Y, Lee E, et al. Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jun 11;93(12):5860-5.
- [30] Humphries RK, Eaves AC, Eaves CJ. Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Jun;78(6):3629-33.
- [31] Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997 Nov 28;91(5):661-72.

- [32] Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000 Mar 9;404(6774):193-7.
- [33] Goodell MA, McKinney-Freeman S, Camargo FD. Isolation and characterization of side population cells. *Methods Mol Biol* 2005;290:343-52.
- [34] Mamo A, Kros J, Kroon E, Bijl J, Thompson A, Mayotte N, et al. Molecular dissection of Meis1 reveals two domains required for leukemia induction and a key role for Hoxa gene activation. *Blood* 2006 Feb 9.
- [35] Dickson GJ, Lappin TR, Thompson A. Complete array of HOX gene expression by RQ-PCR. *Methods Mol Biol* 2009;538:369-93.
- [36] Thompson A, Quinn MF, Grimwade D, O'Neill CM, Ahmed MR, Grimes S, et al. Global down-regulation of HOX gene expression in PML-RARalpha + acute promyelocytic leukemia identified by small-array real-time PCR. *Blood* 2003 Feb 15;101(4):1558-65.
- [37] Miller CL, Rebel VI, Helgason CD, Lansdorp PM, Eaves CJ. Impaired steel factor responsiveness differentially affects the detection and long-term maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* 1997 Feb 15;89(4):1214-23.
- [38] Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, Izac B, Charneau P, Romeo PH, et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med* 2003 Nov;9(11):1423-7.
- [39] Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 2002 Jan 1;99(1):121-9.
- [40] Taghon T, Stolz F, De Smedt M, Cnockaert M, Verhasselt B, Plum J, et al. HOX-A10 regulates hematopoietic lineage commitment: evidence for a monocyte-specific transcription factor. *Blood* 2002 Feb 15;99(4):1197-204.
- [41] Magnusson M, Brun AC, Miyake N, Larsson J, Ehinger M, Bjornsson JM, et al. HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood* 2007 May 1;109(9):3687-96.
- [42] Lawrence HJ, Sauvageau G, Ahmadi N, Lopez AR, LeBeau MM, Link M, et al. Stage- and lineage-specific expression of the HOXA10 homeobox gene in normal and leukemic hematopoietic cells. *Exp Hematol* 1995 Oct;23(11):1160-6.

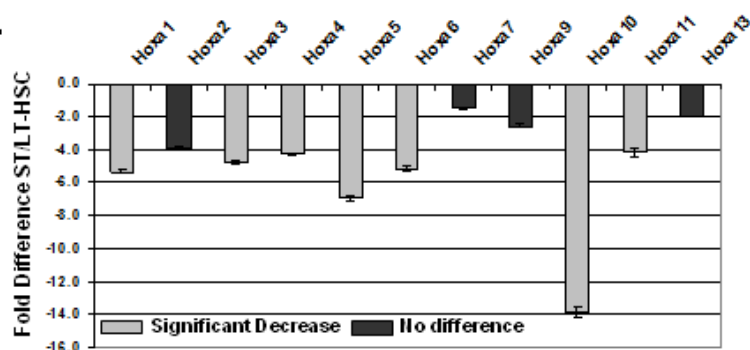
- [43] van Oostveen J, Bijl J, Raaphorst F, Walboomers J, Meijer C. The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* 1999 Nov;13(11):1675-90.
- [44] Bijl J, van Oostveen JW, Kreike M, Rieger E, van der Raaij-Helmer LM, Walboomers JM, et al. Expression of HOXC4, HOXC5, and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue. *Blood* 1996 Mar 1;87(5):1737-45.
- [45] Lawrence HJ, Stage KM, Mathews CH, Detmer K, Scibienski R, MacKenzie M, et al. Expression of HOX C homeobox genes in lymphoid cells. *Cell Growth Differ* 1993 Aug;4(8):665-9.
- [46] Payne KJ, Crooks GM. Human hematopoietic lineage commitment. *Immunol Rev* 2002 Sep;187:48-64.
- [47] Vieille-Grosjean I, Roullot V, Courtois G. Lineage and stage specific expression of HOX 1 genes in the human hematopoietic system. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Mar 31;183(3):1124-30.
- [48] Sieburg HB, Cho RH, Dykstra B, Uchida N, Eaves CJ, Muller-Sieburg CE. The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood* 2006 Mar 15;107(6):2311-6.
- [49] Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell* 2010 Mar 5;6(3):265-78.
- [50] Muller-Sieburg CE, Cho RH, Karlsson L, Huang JF, Sieburg HB. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood* 2004 Jun 1;103(11):4111-8.

# LEGENDS AND FIGURES

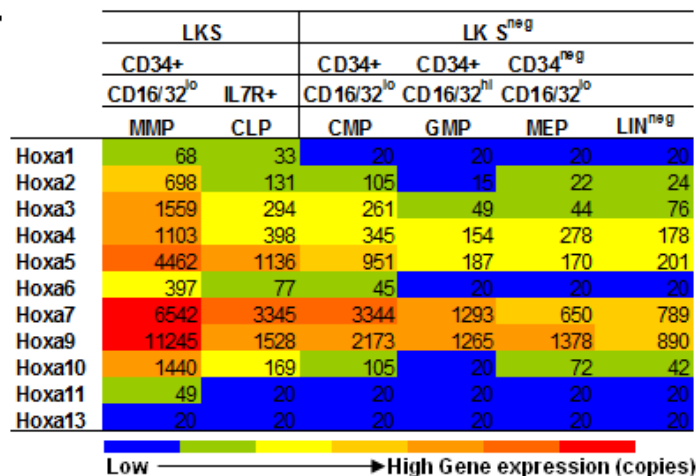
a.



b.



c.



d.

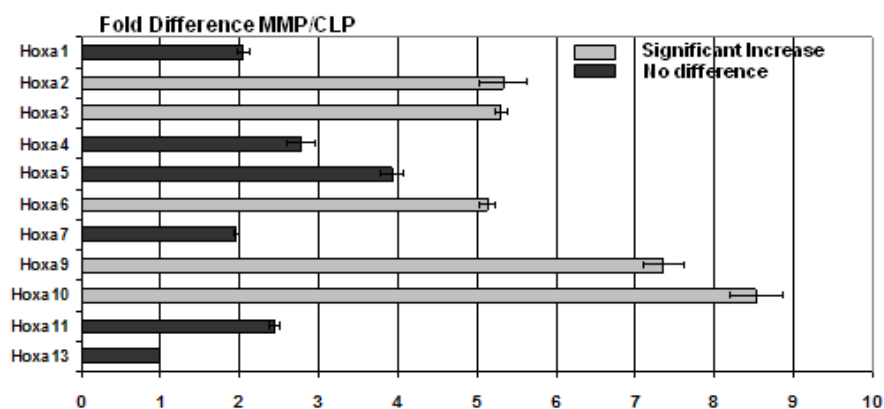
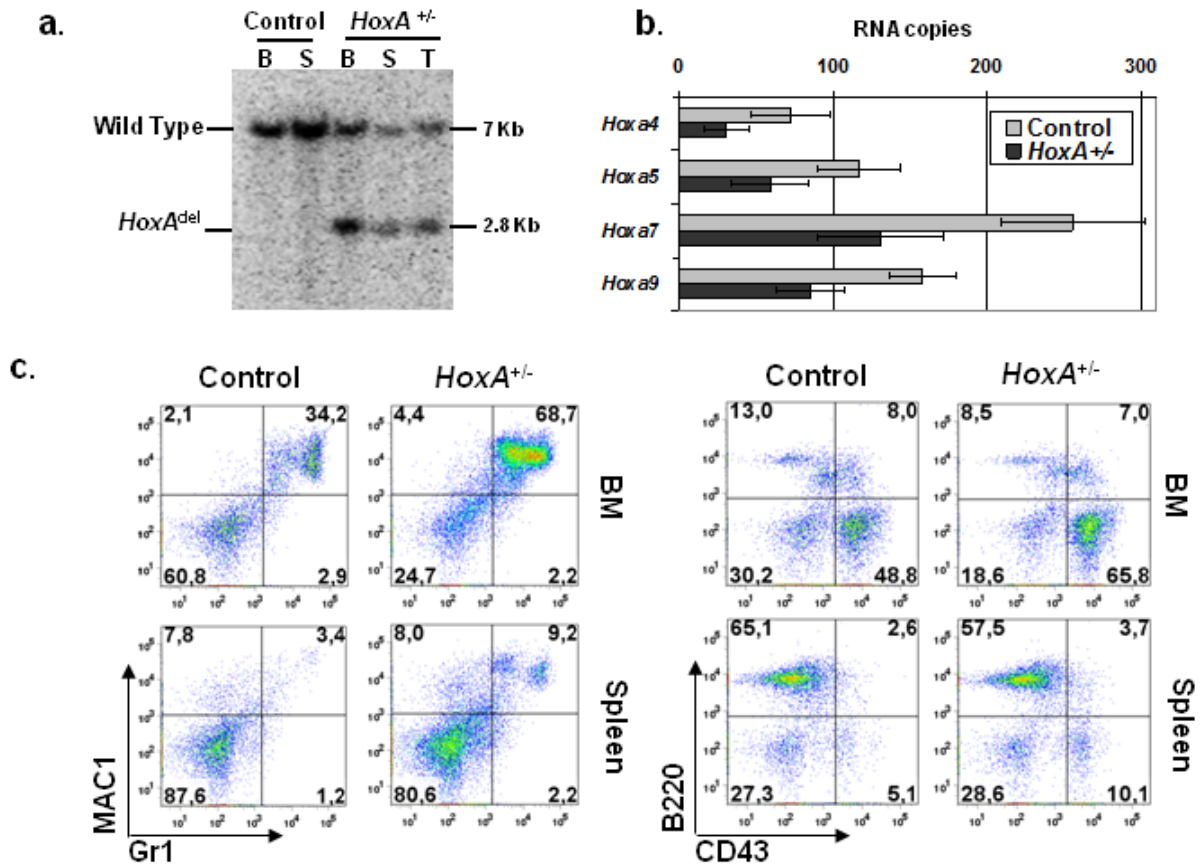


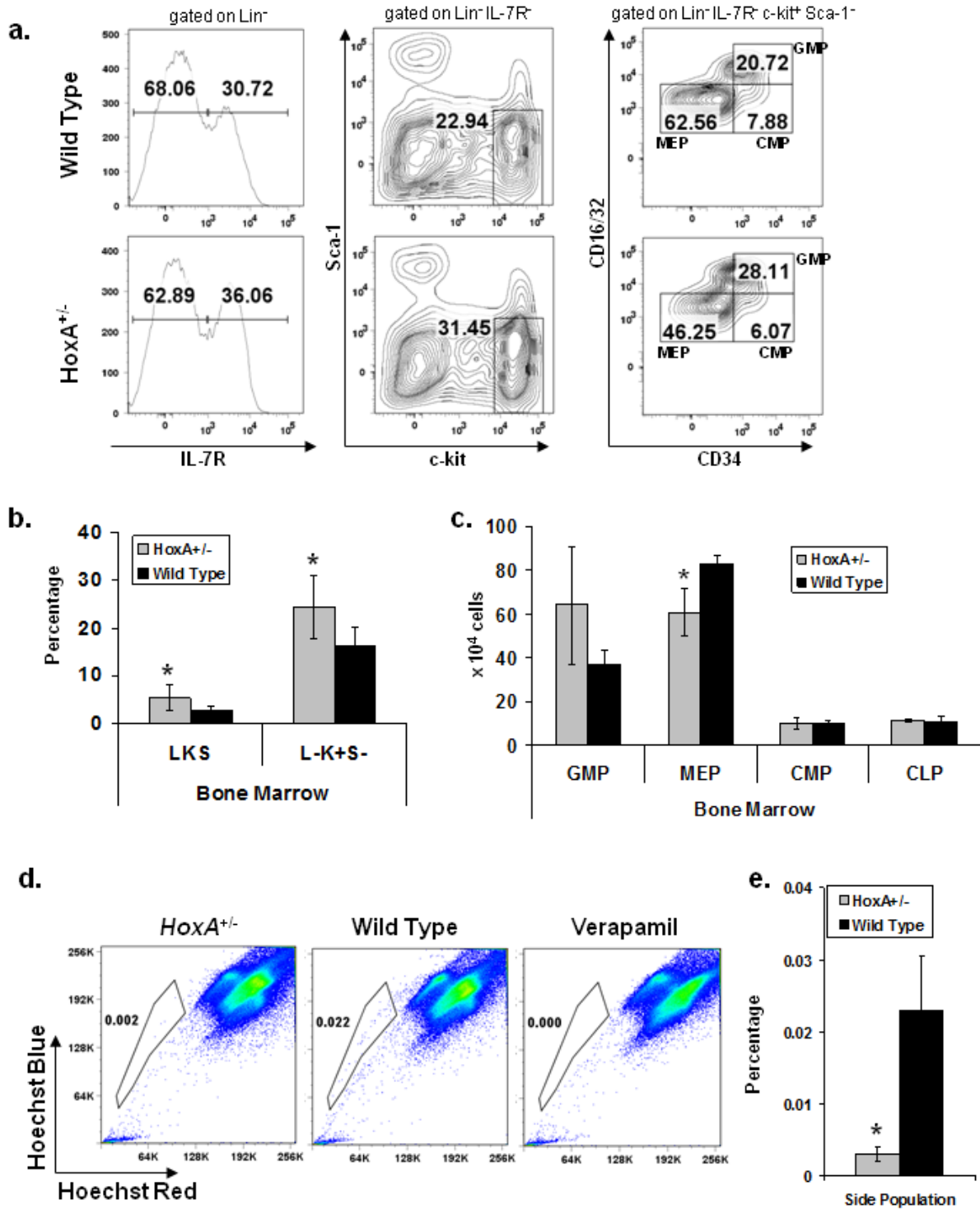
Figure 1 *HoxA* gene expression in purified subsets of adult bone marrow cells

**(a)** Calculated copy numbers of average *HoxA* expression in LT and ST HSCs (n=3). **(b)** Fold-difference in expression between ST and LT HSC (see material and method for purity and surface markers). **(c)** Average expression of *HoxA* genes in myeloid and lymphoid progenitors purified from wild type C57Bl/6 mice (n≥3). **(d)** Fold difference in expression for each *HoxA* gene between MMP and CLP populations. The copy numbers represent the mean of triplicates from at least three independent experiments. Fold changes are plotted as mean values from three independent experiments ± S.E. Only replicate cycle threshold ( $C_T$ )-values within 0.5  $C_T$  are accepted for *Hox* genes and 0.2  $C_T$  for the endogenous control *GAPDH*. The expression of *Hox* genes is given for 12ng total RNA, normalized for *GAPDH* ( $C_T = 20$ ). Standard curve-generated copy numbers for each group are calculated from the average  $C_T$  values in each group according to the following formula  $2^{(38 - C_T)}$ . Values less than 20 are considered not expressed. A 4-fold difference which corresponds to a  $\Delta\Delta C_T$  value of 2 is considered significant **(b, d)**. LKS = lineage negative/c-kit<sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup>; MMP = multi-potent myeloid progenitor; CLP = Common Lymphoid Progenitor; CMP = Common Myeloid Progenitor; GMP = Granulocyte/Macrophage Progenitor; MEP = Megakaryocyte/ Erythroid Progenitor.



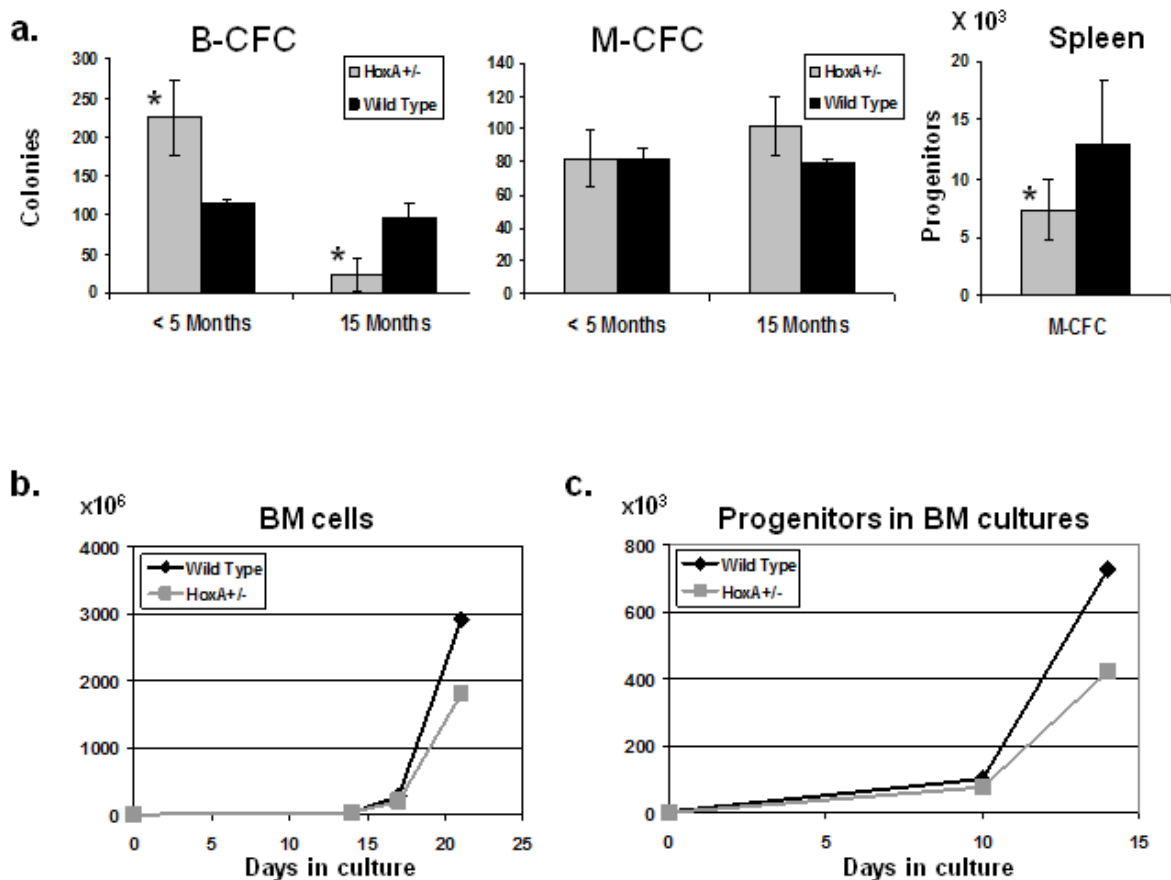


**Figure 2 (a)** Southern blot of genomic DNA isolated from bone marrow (B), spleen (S) and thymus (T) of heterozygous *HoxA* and control mice digested with HindIII. A Kpn/NdeI fragment located 5' to the *Hoxa13* coding region and the LoxP-pgk-*Hygro* cassette was used as probe. Expected band size is indicated for each of the two genotypes: *HoxA*<sup>del</sup> and wild type. **(b)** Expression of selected *HoxA* genes in bone marrow (BM) cells derived from *HoxA*<sup>+/-</sup> and control mice (n=3 for both). Copy numbers are calculated as indicated under figure 1. **(c)** FACS profiles for myeloid (left panels) and lymphoid (right panels) cell populations in BM and spleen of *HoxA*<sup>+/-</sup> and control young mice (<5 months).



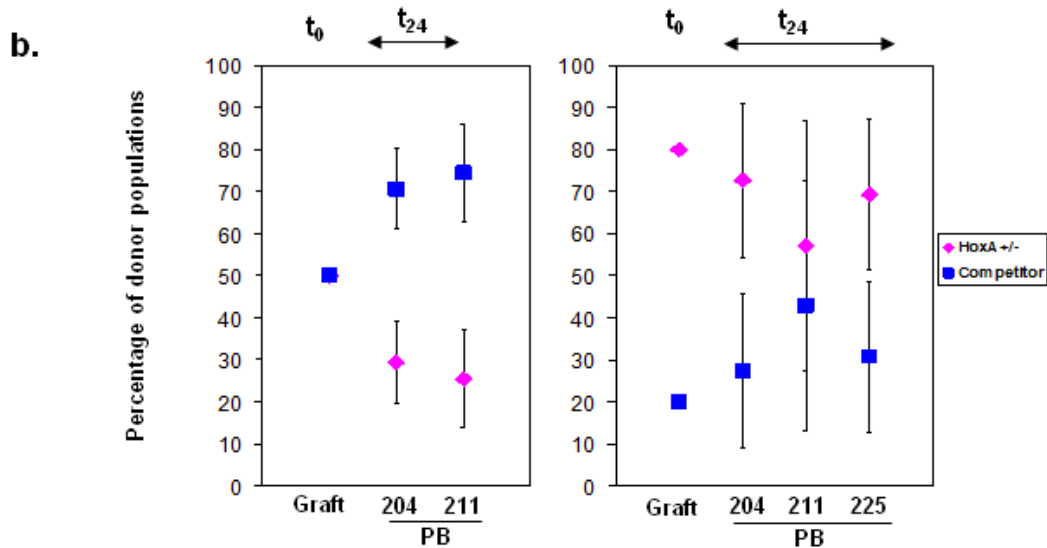
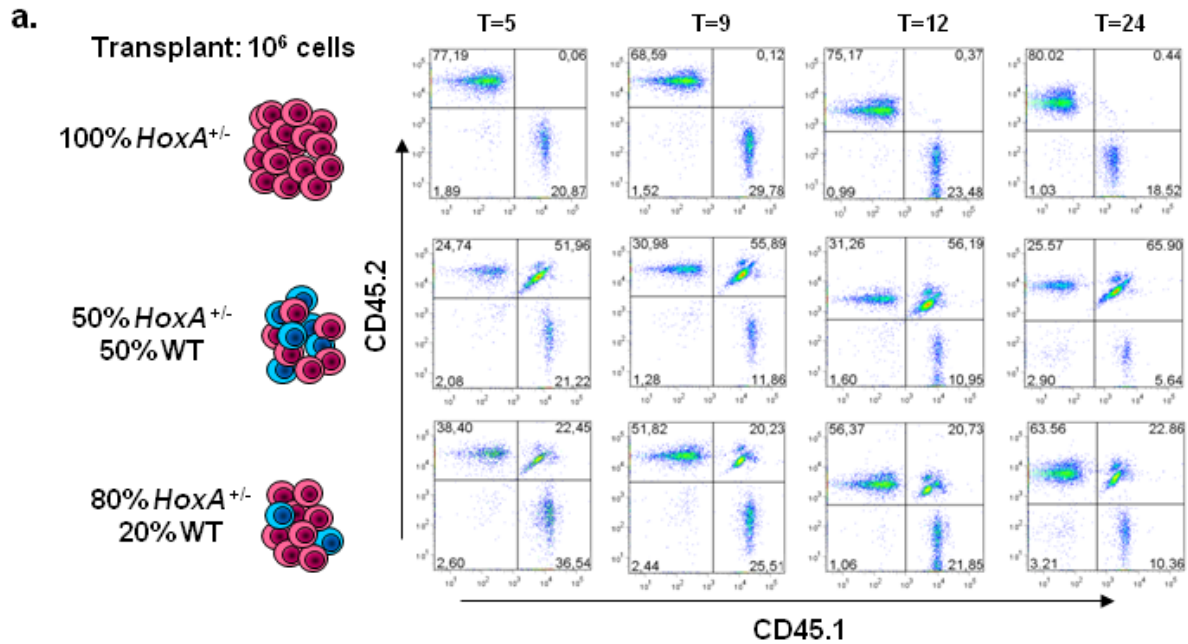
**Figure 3 (a)** FACS profiles for primitive myeloid progenitor populations in wild type and *HoxA*<sup>+/-</sup> mice. Three populations and their gating strategy are indicated, which are common myeloid progenitors (CMP), Granulocytic/Monocytic Progenitors (GMP) and

Megakaryocytic/ Erythroid Progenitors (MEP), which are defined as  $CD34^+/CD16/32^{lo}$ ,  $CD34^+/CD16/32^{hi}$  and  $CD34^+/CD16/32^{lo}$ , respectively, on the  $Lin^-/IL-7R^-/c-kit^+/Sca1^-$  population (right panels). **(b)** Average population size (%) of the  $Lin^-/c-kit^+/Sca1^+$  and  $Lin^-/c-kit^+/Sca1^-$  populations gated on  $IL7R^-$  cells in both  $HoxA^{+/-}$  and wild type (wt) mice (n=4). **(c)** Average cell numbers per two femurs and tibiae of myeloid and lymphoid progenitor populations GMP, MEP, CMP and CLP in both  $HoxA^{+/-}$  and wild type (wt) mice (n=3) **(d)** FACS profiles for Side Populations in age matched  $HoxA^{+/-}$  and wild type mice. The gate for the Side Population is set based on comparison with profiles for Hoechst efflux by using the drug Verapamil, as described by the group from Goodell[33]. **(e)** Average size (%) of Side Population in the BM of  $HoxA^{+/-}$  and wild type mice (n=3; \* significant; p = 0.006).



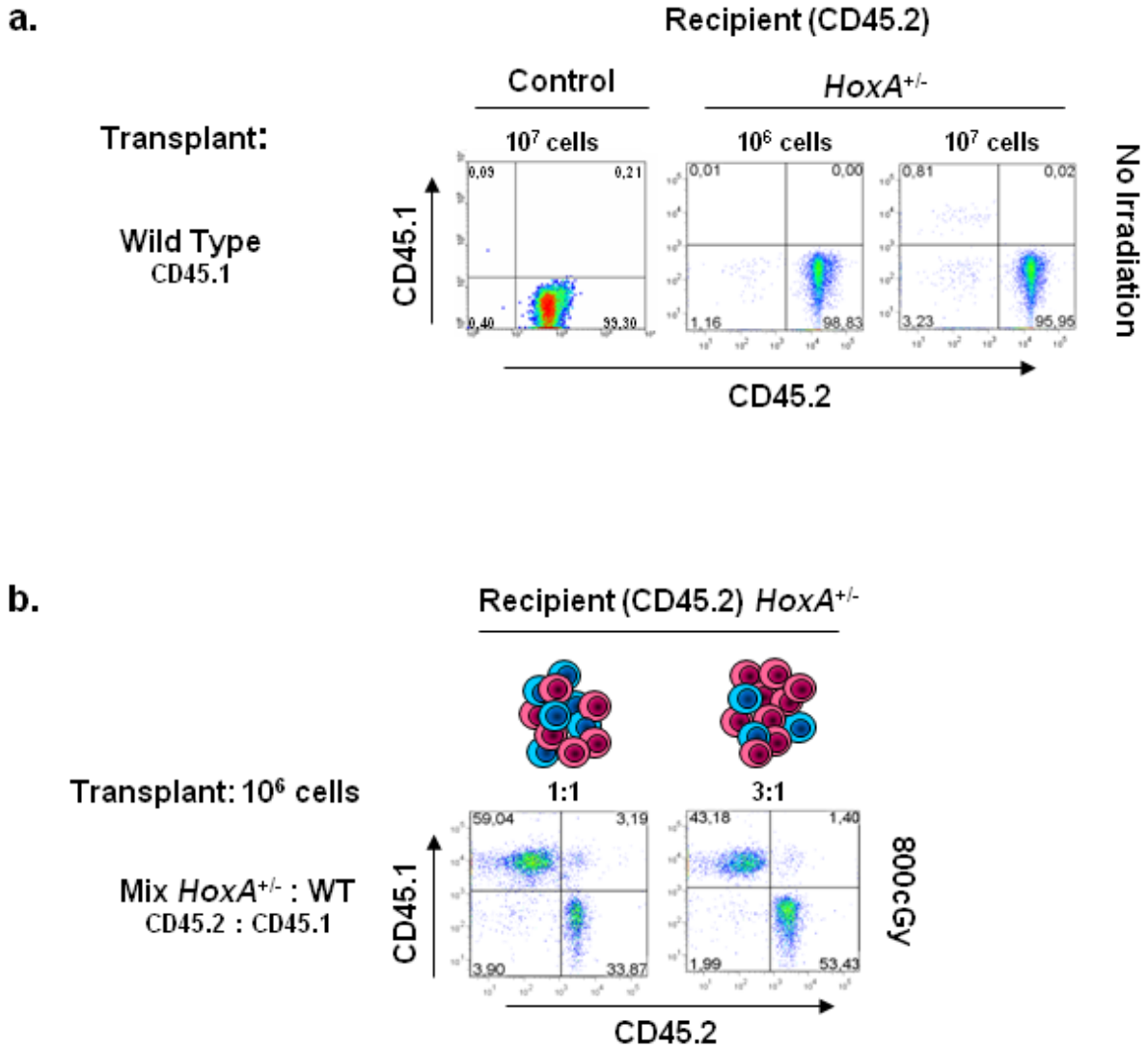
**Figure 4 (a)** Number of B-cell and myeloid colonies per  $3 \times 10^5$  and  $3 \times 10^4$  total bone marrow (BM) cells, respectively, from young (< 5 Months,  $n=3$ ) and old (15 Months,  $n=3$ ) *HoxA*<sup>+/-</sup> and age and sex matched control mice (left and middle panels). *HoxA*<sup>+/-</sup> mice have significantly more B-cell progenitors in their BM at young age ( $P = 0.03$ ) and less at old age ( $P = 0.01$ ) than control mice. In the right panel the absolute number of myeloid progenitors per spleen is given for *HoxA*<sup>+/-</sup> and control mice. CFCs = colony forming cells.

**(b)** Representative plot of growth curves from BM cultures and **(c)** of total number of myeloid progenitors in BM cultures from *HoxA*<sup>+/-</sup> and wild type mice against the time. Colony forming cell assays were scored at  $t=10$  and  $t=14$  with 5000 and 10000 cells for wild type and *HoxA*<sup>+/-</sup>, respectively ( $n=3$ ).



**Figure 5 (a)** Competitive repopulation assay with transplants composed of different ratios of BM cells isolated from *HoxA*<sup>+/-</sup> (CD45.2) and wild type (WT) mice (CD45.1/CD45.2). FACS profiles for peripheral blood show the repopulation of representative congenic recipient mice (CD45.1) by *HoxA*<sup>+/-</sup> and WT donor cells (as a % of total cells) over time using antibodies against CD45.1 and CD45.2. **(b)** Compilation of repopulation results for transplantation mixtures with a ratio 1:1 (left panel) and a ratio 4:1 right panel for *HoxA*<sup>+/-</sup> and WT cells.

Experiments were done using three independent *HoxA*<sup>+/-</sup> donor mice (204, 211 and 225) and each cell mixture was transplanted in three recipients. Only long-term repopulation is shown, 24 weeks post-transplantation ( $t_{24}$ ) and the ratio of mixture at transplantation ( $t_0$ ).



**Figure.6** Competitive repopulation assay using recipients with different genotype and irradiation doses. **(a)** Donor wild type (CD45.1) HSCs were transplanted into either control or *HoxA*<sup>+/-</sup> non-irradiated mice host (CD45.2; upper panel). **(b)** Mixtures of wild type (CD45.1) and *HoxA*<sup>+/-</sup> (CD45.2) donor cells were transplanted in *HoxA*<sup>+/-</sup> recipient mice that received an irradiation dose of 800cGy (lower panel). Representative FACS profiles for repopulation by CD45.1 and CD45.2 donor cells on recipient peripheral blood twelve weeks post-transplantation to distinguish wild type and *HoxA*<sup>+/-</sup> populations. Three mice were transplanted for each condition.

## TABLES

**Table 1 Measurements of Hematopoietic organs from heterozygous *HoxA*<sup>+/-</sup> and control mice.**

	N	Cellularity (x10 <sup>6</sup> cells)			Weight (g)		
		BM	Spleen	Thymus	Body	Spleen	Thymus
<b>Control</b>	7	70 ± 7	234* ± 68	119 ± 48	27 ± 7*	0.10 ± 0.03*	0.07 ± 0.02
<b><i>HoxA</i><sup>+/-</sup></b>	8	74 ± 16	133* ± 33	112 ± 45	19 ± 4*	0.06 ± 0.01*	0.05 ± 0.02

Cell numbers for total spleen and thymus are given, and for BM for both femurs and tibiae. Comparison between mutant and control cell populations was evaluated using a 2-tailed Student t test; \* = P < 0.05; BM = bone marrow.

**Table 2 Hematopoietic populations from heterozygous *HoxA*<sup>+/-</sup> and control mice.**

	Control, % (n = 7)			<i>HoxA</i> <sup>+/-</sup> , % (n = 8)		
	BM	Spleen	Thymus	BM	Spleen	Thymus
<b>B cells</b>						
B220+/CD43-	13.1 ± 4.2	62.3 ± 6.6	ND	8.8 ± 3.5	58.4 ± 2.6	ND
B220+/CD43+	6.0 ± 0.9	1.9 ± 0.6	ND	5.4 ± 1.2	2.8 ± 0.7	ND
B220+/IgM-	10.8 ± 2.7	12.3 ± 1.1	ND	8.0 ± 3.4	12.5 ± 3.0	ND
B220+/IgM+	7.1 ± 1.7	48.5 ± 6.2	ND	5.4 ± 1.8	45.6 ± 1.9	ND
<b>T cells</b>						
CD4	ND	16.1 ± 2.7	7.7 ± 2.1	ND	16.5 ± 2.5	8.6 ± 1.5
CD8	ND	10.4 ± 3.4	3.1 ± 1.1	ND	10.3 ± 1.9	5.8 ± 2.4
CD4/CD8	ND	0.4 ± 0.1	84.4 ± 5.3	ND	0.5 ± 0.3	73.8 ± 13.4
<b>Myeloid cells</b>						
Mac1	2.3 ± 0.4	4.5 ± 2.1	ND	2.4 ± 1.2	4.1 ± 1.9	ND
Mac1/Gr1	35.2 ± 4.2	2.4 ± 1.2	ND	50.2 ± 9.7	4.4 ± 2.2	ND
<b>Erythroid cells</b>						
Ter119	29.2 ± 3.1	4.7 ± 2.1	0.9 ± 0.8	25.4 ± 6.8	5.7 ± 3.5	1.1 ± 0.9

Percentage of lymphoid and myeloid populations in BM, spleen and thymus of heterozygous and control animals using FACS analysis. Comparison between mutant and control cell populations was evaluated using a 2-tailed Student t test; \* = P < 0.05; ND indicates not done. BM = bone marrow

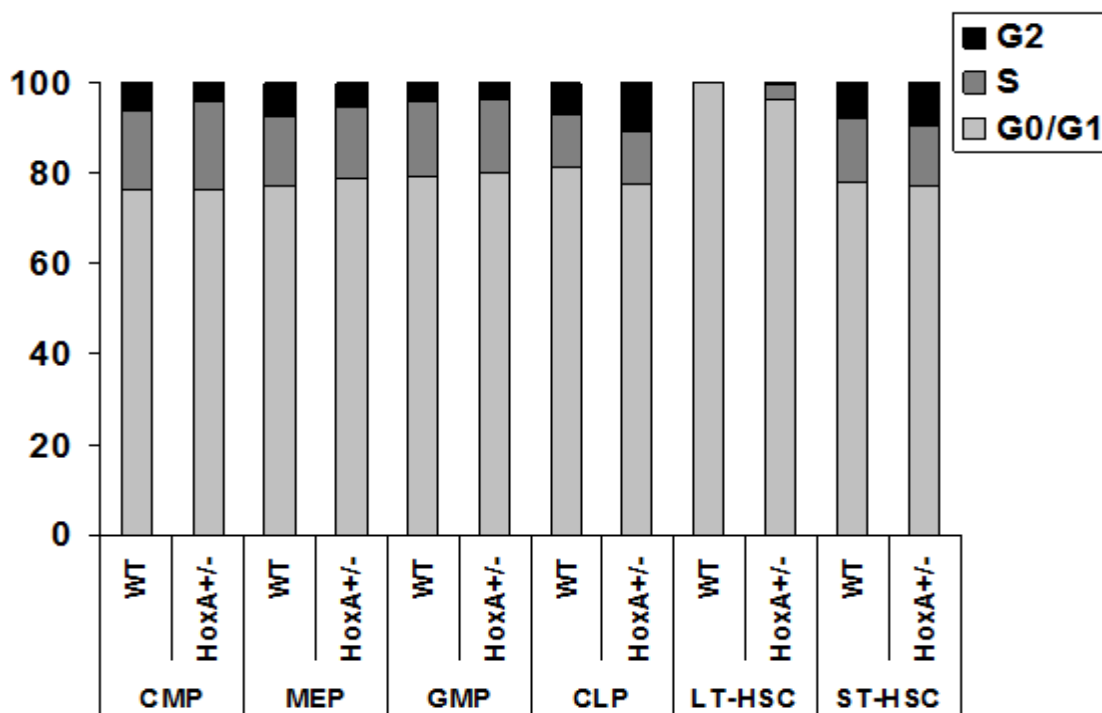


**Table 3 Contribution of *HoxA*<sup>+/-</sup> and control HSCs to repopulation in peripheral blood in competitive transplantation assays 24 weeks post-transplantation.**

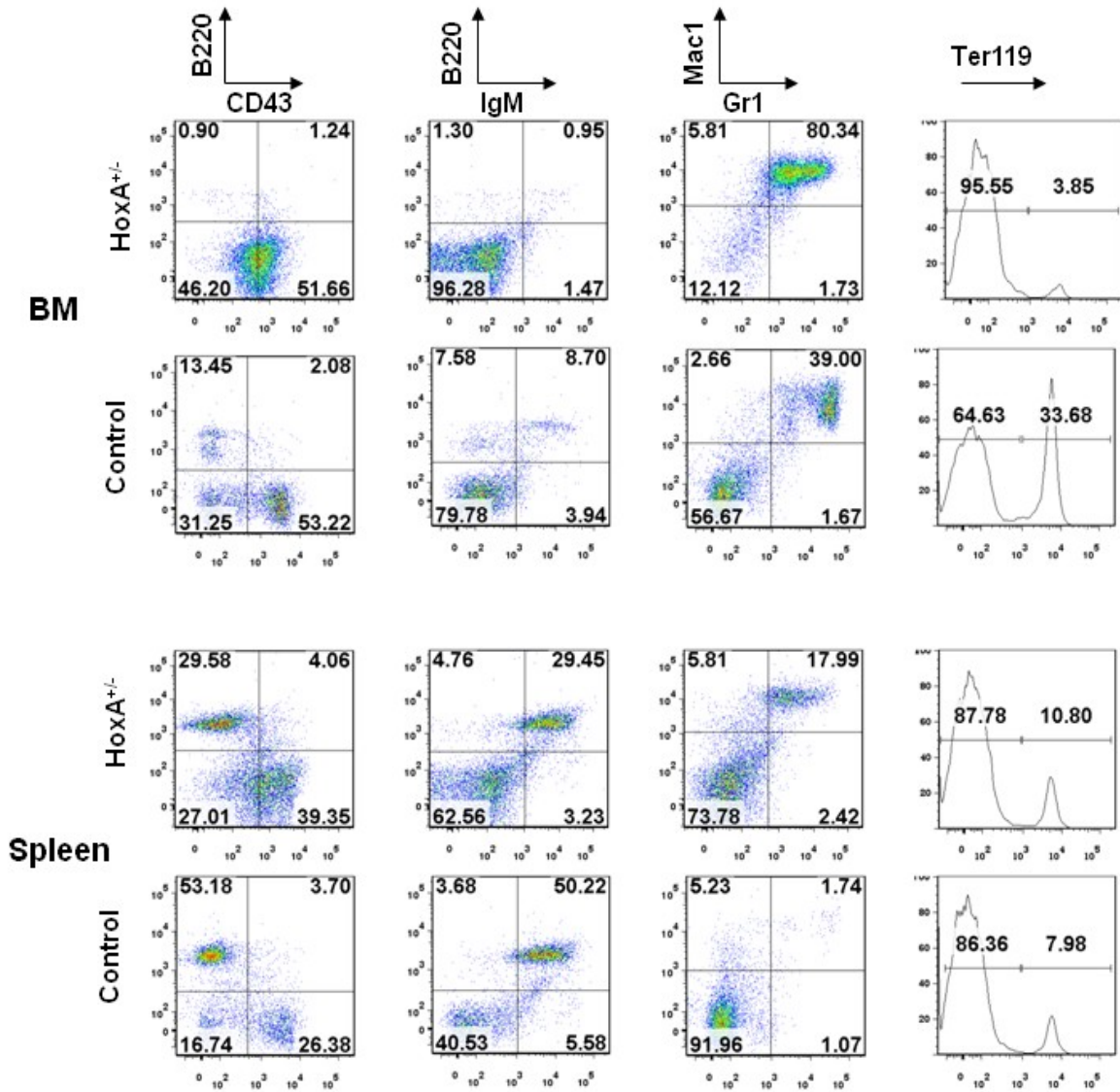
<i>Mouse</i>	<i>Genotype Test cells</i>	<i>n</i>	<i>Percentage of test cells in PB</i>			<i>Competition Factor*</i>
			<i>100%</i>	<i>50-50%</i>	<i>80-20%</i>	
<b>204</b>	<b><i>HoxA</i><sup>+/-</sup></b>	<b>3</b>	82 ± 8	29 ± 9	72 ± 17	2.3 ± 1.2
<b>211</b>	<b><i>HoxA</i><sup>+/-</sup></b>	<b>3</b>	90 ± 5	36 ± 21	57 ± 30	3.2 ± 2.8
<b>225</b>	<b><i>HoxA</i><sup>+/-</sup></b>	<b>3</b>	81 ± 5	NA	69 ± 18	2.1 ± 1.8
<b>1</b>	<b>Wild type</b>	<b>3</b>	92 ± 2	49 ± 2	NA	

Percentage of heterozygous and wild type cells in the periphery of recipient animals measured by FACS Analysis for the presence of Ly5.1 and Ly5.2 molecules. The test cells have been transplanted with and without wild type competitor cells as indicated. \*The competition factor is calculated as the ratio tester/competitor cells at t=0 divided by the ratio at t=24. PB = Peripheral Blood.

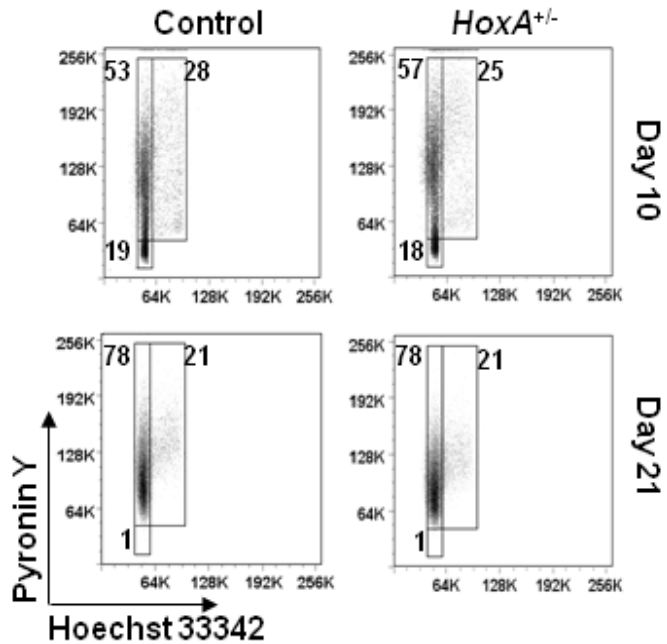
## SUPPLEMENTAL FIGURES



**Figure S1** Percentage distribution of cell cycle status within primitive progenitor and stem cell population determined by Hoechst staining for both *HoxA*<sup>+/-</sup> and wild type mice. CMP = common myeloid progenitor; MEP = megakaryocytic/erythroid progenitor; GMP = granulocytic macrophage progenitor; CLP = common lymphoid progenitor; LT (long-term) and ST (short-term) HSCs.



**Figure S2** FACS profiles for B-cells (B220/CD43/IgM), myeloid cells (Mac1/Gr1) and erythroid cells (Ter119) of bone marrow (BM) and spleen isolated from an old *HoxA*<sup>+/-</sup> and control mouse (15 months old). Note the almost complete absence of B-cells and erythroid cells in the BM of this particular *HoxA*<sup>+/-</sup> mouse.



**Figure S3** Cell cycle status of *HoxA*<sup>+/-</sup> and control BM cultures at day 10 and 21 determined by Hoechst 33342/pyronin Y labeling followed by flow cytometry analysis. Cells expressing low pyronin Y and Hoechst (lower left gate) are in G0; cells expressing low Hoechst and pyronin Y high (upper left gate) are in G1 of the cell cycle and cells expressing both high pyronin Y and Hoechst (right gate) are in S/G2 phase of the cell cycle.

## SUPPLEMENTAL TABLES

**Supplemental Table 1** Real Time Quantitative PCR analysis of a selection of *HOX* and *TALE* genes and the A cluster neighbouring gene *Evx*.

<i>Hox Gene</i>	Average C <sub>T</sub> Value			Standard Deviation		
	WT	A +/- MEP A	A +/- MEP B	WT2	A +/- MEP A	A +/- MEP B
<i>b1</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>b2</i>	34.63	33.81	33.01	0.05	0.26	0.09
<i>b3</i>	30.37	30.70	30.32	0.00	0.04	0.16
<i>b4</i>	29.10	29.31	28.68	0.16	0.24	0.19
<i>b5</i>	34.29	33.54	33.07	0.06	0.15	0.03
<i>b6</i>	>35	>35	>35	0.40	0.28	0.48
<i>b7</i>	>35	>35	>35	0.00	0.14	0.00
<i>b8</i>	>35	>35	>35	1.23	0.00	0.00
<i>b9</i>	>35	>35	>35	0.00	0.00	0.00
<i>b13</i>	>35	>35	>35	0.23	0.00	0.35
<i>c4</i>	>35	>35	34.78	0.00	0.25	0.10
<i>c5</i>	>35	>35	>35	0.00	0.31	0.00
<i>c6</i>	33.60	32.51	31.79	0.35	0.06	0.05
<i>c8</i>	>35	>35	>35	0.00	0.27	0.73
<i>c9</i>	>35	34.25	34.07	0.10	0.20	0.02
<i>c10</i>	>35	34.28	33.64	0.15	0.02	0.24
<i>c11</i>	>35	>35	>35	0.00	0.00	0.00
<i>c12</i>	>35	>35	>35	0.00	0.00	0.00
<i>c13</i>	>35	>35	>35	0.00	0.00	0.00
<i>d1</i>	>35	>35	>35	0.00	0.00	0.00
<i>d4</i>	>35	>35	>35	0.00	0.00	0.00
<i>d8</i>	>35	>35	>35	0.05	0.20	0.07
<i>d11</i>	>35	>35	>35	0.00	0.00	0.00
<i>d13</i>	>35	>35	>35	0.00	0.00	0.00
<i>Pbx1</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Meis1</i>	28.29	26.07	26.70	0.14	0.10	0.06
<i>Evx1</i>	>35	>35	>35	0.00	0.00	0.00

Corrected Cycle Threshold (CT) values are based on 50 ng RNA equivalents (18S = 8). Validated TaqMan specific primer and probe sets were used for all *HOX* and *TALE* reactions and a validated SYBR-specific primer reaction used to measure *Evx* expression. WT= Wild Type; A +/- MEP = HoxA cluster heterozygote Megakaryocyte/Erythroid Progenitor cells. Only *Meis-1* showed significant (>2 CT) change in measurable expression (CT <35) with

higher expression (lower CT) being associated with the heterozygote cells. ND= Not detected (CT >40)

**Supplemental Table 2** Absolute number of cells ( $\times 10^4$ ) per two femurs and tibiae of early myeloid and lymphoid progenitors in 2-4 months old *HoxA*<sup>+/-</sup> and control mice.

<b>Mouse ID</b>	<b>Genotype</b>	<b>GMP</b>	<b>MEP</b>	<b>CMP</b>	<b>CLP</b>
<b>1</b>	<b>wild type</b>	29.4	80.7	11.6	13.7
<b>2</b>	<b>wild type</b>	38.7	80.7	9.1	10.5
<b>3</b>	<b>wild type</b>	42.1	87.2	9.2	8.5
<b>204</b>	<b>HoxA+/-</b>	49.0	64.2	12.8	11.4
<b>211</b>	<b>HoxA+/-</b>	95.0	48.8	7.5	10.5
<b>225</b>	<b>HoxA+/-</b>	48.2	69.5	9.5	12.1

GMP = granulocytic/macrophage progenitor; MEP = megakaryocytic/erythroid progenitor;  
CMP = common myeloid progenitor; CLP = common lymphoid progenitor;

**Supplemental Table 3** Hematopoietic populations (%) in bone marrow, spleen and thymus of old (15 months) *HoxA*<sup>+/-</sup> and control mice.

	Control, % (n=4)			<i>HoxA</i> <sup>+/-</sup> , % (n=4)		
	BM	Spleen	Thymus	BM	Spleen	Thymus
<b>B cells</b>						
B220+/CD43-	11.9 ± 2.3	55.2 ± 6.7*	—	4.7 ± 5.4	35.4 ± 6.9*	—
B220+/CD43+	1.6 ± 0.3	2.8 ± 0.7*	—	1.6 ± 0.3	4.8 ± 0.4*	—
B220-/CD43+	47.0 ± 8.7	27.0 ± 6.0*	—	57.3 ± 7.0	39.7 ± 6.0*	—
B220+/IgM+	6.8 ± 3.3	55.5 ± 6.0*	—	4.3 ± 3.7	37.8 ± 7.7*	—
<b>T cells</b>						
CD4-/CD8+	—	9.8 ± 4.2	2.4 ± 0.5	—	12.4 ± 3.0	2.0 ± 0.5
CD4+/CD8-	—	19.5 ± 3.9	6.6 ± 0.9	—	22.1 ± 4.3	5.2 ± 2.1
CD4+/CD8+	—	0.7 ± 0.3*	85.6 ± 1.2	—	1.2 ± 0.2*	88.4 ± 4.1
<b>Myeloid cells</b>						
Mac1+/Gr1-	3.7 ± 1.5	6.2 ± 3.1	—	3.3 ± 1.1	9.8 ± 5.8	—
Mac1+/Gr1+	41.3 ± 5.2*	3.2 ± 0.9	—	61.8 ± 12.6*	9.5 ± 5.9	—
Mac1-/Gr1+	1.8 ± 0.8	2.8 ± 2.7	—	2.4 ± 2.3	2.5 ± 2.6	—
<b>Erythroid cells</b>						
Ter119+	32.5 ± 5.5	6.8 ± 3.8	2.4 ± 2.4	21 ± 11.4	8.8 ± 6.6	1.6 ± 1.1
<b>Primitive hematopoietic cells</b>						
c-kit-/Sca1+	9.4 ± 1.2*	58.7 ± 4.9	—	6.5 ± 1.0*	52.5 ± 7.8	—
c-kit+/Sca1+	1.3 ± 0.6	1.6 ± 0.7*	—	1.6 ± 0.4	4.1 ± 1.5*	—
c-kit+/Sca1-	10.3 ± 0.3	1.3 ± 0.1	—	10.2 ± 2.6	2.6 ± 1.4	—

\* = significant  $P \leq 0.05$ , 2-tailed Student t test. — indicates not done. BM = bone marrow.

**Supplemental Table 4** Repopulation kinetics of  $10^6$  donor BM cells of *HoxA*<sup>+/-</sup> or control mice in myeloablated recipients. Donor cell contribution to periphery was measured by FACS for the presence of CD45.2 positive cells.

Genotype	n	Percentage of test cells in PB			
		5 wks	9 wks	12 wks	>18 wks
<i>HoxA</i> <sup>+/-</sup>	9	67 ± 8	76 ± 8	78 ± 8	81 ± 8
wild type	3	86 ± 14	84 ± 6	91 ± 3	92 ± 2
P-value		0.07	0.06	0.002	

P-value is calculated using a student T test with 1-tail; PB= peripheral blood

## **Chapitre 3 : Article #2**

### ***Hoxa* genes are critical for maintenance of adult hematopoietic stem cells and regulate their interaction with the niche**

Le chapitre 3 présente l'effet de la mutation complète des gènes *Hoxa* dans le système hématopoïétique d'une souris adulte et les conséquences qui en résultent sur la fonction des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques. De plus, nous exposons un mécanisme d'action par lequel les gènes *Hoxa* influencent la fonction des CSH. J'ai contribué à toutes les étapes de la réalisation de cet article et j'ai notamment effectué la vaste majorité des expériences.

En préparation. Soumission prévue en 2014



***Hoxa genes are critical for maintenance of adult hematopoietic stem cells and regulate their interaction with the niche***

Charles-Étienne Lebert-Ghali<sup>1</sup>, Marilaine Fournier<sup>1</sup>, Alexander Thompson<sup>2</sup>, Guy Sauvageau<sup>3</sup> and Janet J. Bijl<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Hospital Maisonneuve-Rosemont Research Center, Montreal, QC, H1T 2M4; <sup>2</sup>Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queen's University, Belfast, UK, BT9 7AB, Department of Medicine<sup>3</sup>, University of Montreal, Montreal, QC, H3C 3J7

Running Title: *Hoxa* genes are required for HSC self-renewal

Correspondence: Dr. Janet Bijl, PhD.

Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415 Boul. De l'Assomption, Montréal, QC, Canada H1T 2M4

E-mail:

Keywords: *Hox* genes, hematopoietic stem cells, conditional knockout mouse model, transcription factors

Grant Sponsor: Leukemia & Lymphoma Society of Canada and Canadian Cancer Society Research Institute, number 20399

## ABSTRACT

Aberrant expression of homeobox (*Hox*) genes is frequently observed in leukemias. Moreover, enforced overexpression of individual *Hox* genes revealed enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells (HSCs) and/or interference with the differentiation of one or multiple lineages, indicating a pivotal role for these genes in HSC regulation. However, loss-of-function approaches targeting individual *Hox* genes did not provide conclusive evidence to support *Hox* dependency of hematopoiesis. This is likely due to a certain degree of functional redundancy within the *Hox* network. To fully understand the importance of *Hox* genes in hematopoiesis, we deleted the complete *Hoxa* locus in adult hematopoietic cells, using a conditional knockout mouse. This resulted in a strong reduction of HSCs and its immediate progenitors, but no acute bone marrow failure, although the production of mature blood cells was diminished. *Hoxa* ablated HSCs were severely impaired in their function to repopulate myeloablated hosts and showed a lineage bias resulting in severe B cell insufficiency. Increased apoptosis and differentiation were identified as culprits for loss of HSC. Differential expression profiling by RNASeq revealed changes in expression of several genes implicated in focal adhesion, interaction with the extra cellular matrix or cytokine-cytokine receptor interactions. *Hoxa* modulated genes such as *Colla1*, *Colla2*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Csf2rb2*, *Itga2* and *Itgb3* are critical for mobilization, focal adhesion, extracellular matrix interactions and engraftment of HSCs, suggesting a function for *Hoxa* genes in the communication of HSCs with its niche. Thus *Hoxa* genes are required for maintenance of long-term HSCs potentially through their actions on multiple biological processes, principally apoptosis, interaction with the niche and cell cycle status.

## INTRODUCTION

Hematopoiesis is the highly dynamic process of blood cell generation from multipotent hematopoietic stem cells (HSCs) that requires the establishment of several developmental programs as cells pass through the progenitor stages. HSCs have the choice to self-propagate or to differentiate, lose their multipotency and become lineage restricted [1]. It has been well recognized that transcription factors are playing key roles in the molecular orchestration of hematopoiesis and many of them have been identified as fusion partners produced by chromosomal translocations in leukemia [2]. The class I homeobox (*Hox*) genes present a conserved group of transcription factors, which are considered master control genes in fundamental developmental organization of the embryo [3, 4]. Mouse and human have 39 *Hox* genes that are arranged in four clusters, A-D, located on different chromosomes [5]. Evidence has accumulated pointing to a role for *Hox* genes in the regulation of hematopoiesis [6, 7]. In accordance with such a function in cell fate determination and establishment of a developmental program *Hox* genes are highly expressed in hematopoietic stem cells and their expression levels decrease in consecutive stages of development [8, 9]. Moreover, mouse models using retroviral mediated overexpression have shown that several *Hox* genes have the capacity to enhance self-renewal divisions of HSCs, but with exception of *Hoxb4* and *Hoxa4* constitutive overexpression of *Hox* genes in HSCs ultimately results in the development of leukemia [6, 10-12]. The capacity of *Hox* genes to switch cell fate in hematopoiesis became clear from a transgenic mouse in which the expression levels of *Hoxa10* could be modulated, resulting in either self-renewal of HSC or an accumulation of megakaryocytic erythroid progenitors [13]. In addition, retroviral overexpression of *Hoxa10* in HSCs led to perturbations in myeloid and lymphoid differentiation and myeloid leukemia in mice [14, 15]. Similarly *Hoxa5* appeared a determinant in erythroid versus myeloid lineage commitment as overexpression or antisense treatment of bone marrow (BM) cells shifted the balance from increased myelopoiesis to the increase in erythropoiesis, respectively [16].

The importance of a tight regulation of *Hox* genes in hematopoiesis became also evident from expression studies showing a strong association of aberrant *Hox* gene expression with leukemia [17-20]. Notably *HOXA9* was identified as most prominent prognostic factor in

myeloid leukemia [21]. In particular, leukemias with translocation in the trithorax gene mixed-myeloid-leukemia (MLL), an epigenetically regulator of *Hox* genes, have high *Hoxa* gene expression [17, 22]. The expression of *Meis1*, a co-factor of *Hox* genes, is frequently associated with those of *HOXA9* in human leukemias [23] and co-overexpression of *Meis1* accelerates *Hoxa9* induced myeloid leukemia in mice [24]. *Meis1* belongs to the three-amino-acid loop- extension (TALE) family, also including *PBX* genes. Hox proteins can actually form dimeric or trimeric complexes with PBX and Meis resulting in an enhancement of DNA-binding affinity and specificity [25]. Moreover, the presence of these co-factors influence the outcome of *Hox* genes as repressor or activator of transcription [26-28].

The expression of *Hox* genes in hematopoietic cells is mostly limited to genes of the A and B cluster, but superior levels in both fetal liver (FL) and BM primitive hematopoietic cells have been observed for *Hoxa* genes [29]. Determination of *Hox* function by overexpression in BM cells has revealed perturbations in hematopoiesis, but is hindered by the development of leukemia caused by a block of differentiation (Lebert Chapter). In addition, the evaluation of single gene loss of function mutants for *Hox* genes provided only limited insights in the function of *Hox* genes in hematopoiesis, which has been attributed to the functional redundancy by the remaining *Hox* genes [30]. Mutants for *Hoxa9* have the most striking hematopoietic phenotype among the *Hox* mutants. These mice exhibit a mild leucopenia in the BM and the periphery, mainly due to a reduction in absolute numbers of myeloid and B cell progenitors [31]. The size of the HSC pool, however, was intact, but the long-term repopulation ability of HSCs lacking *Hoxa9* was affected [32]. The impact of *Hoxa9* deletion alone on hematopoiesis was stronger than the deletion of almost the entire *Hoxb* cluster (*Hoxb1-b9*), as FL HSCs lacking *Hoxb1-b9* could competitively repopulated myeloablated hosts [29]. Mutants for *Hoxa7* had affected platelet productions as consequence of lower MEPs, while other lineages or HSCs were normal [33]. All these studies indicate a clear role for *Hox* genes in hematopoiesis, but they do not reveal a necessity for *Hox* genes in the generation or maintenance of HSCs and their function.

We previously showed that HSCs from mice heterozygous for *Hoxa* genes were less competent in long-term repopulation and could not support B cell generation in aging mice,

which was due to a premature exhaustion of progenitors [8]. These data indicated that HSCs are very sensitive for *Hoxa* gene levels and imply that hematopoiesis might be dependent on *Hoxa* genes. Support for a critical role for *Hox* genes in HSC came from studies with mutant mice for *Meis1* (and thus affecting the function of multiple *Hox* genes), which showed that *Meis1* is indispensable for the generation of definitive HSCs [34]. Furthermore, conditional mutants for *Pbx1* showed its importance in CLPs [35]. Surprisingly, the deletion of *Hoxa* genes in mesodermal tissues, the origin of hematopoiesis, revealed a cell autonomous defect in primitive hematopoiesis [36]. Moreover, *Hoxa*<sup>-/-</sup> fetal liver cells had decreased repopulation ability due in part to impaired progression of HSCs to multipotent progenitors. The erythroid compartment was particularly affected, however all myeloid and lymphoid lineages were generated albeit in reduced numbers. Importantly, this defect was not observed in newborn mice, but only when fetal *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs were transplanted into the adult BM environment, suggesting that a more important role for *Hoxa* genes could be expected in adult hematopoiesis.

Here we studied the function of *Hoxa* genes in definitive hematopoiesis, using a conditional knock-out. Excision of *Hoxa* genes resulted in overall reductions in mature, progenitor and stem cells in mice in hematopoietic homeostasis. *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs were largely deficient in engrafting irradiated hosts, which was not due to inferior homing capacity. Analysis for apoptosis and cell cycle showed higher proportions of apoptotic HSCs deficient for *Hoxa*, and higher proportions of HSCs entering cell cycle, suggesting that *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs underwent differentiation and failed to undergo self-renewal. Differential genes expression analysis confirmed the modulation of genes mapping to apoptosis and cell proliferation/differentiation. Additionally, an important set of differentially expressed genes were involved in focal adhesion, interaction with the extracellular matrix and cytokine-cytokine receptor, indicating a role for *Hoxa* genes in the establishment of genetic programs that determine vital interactions of HSCs with their niche.

## RESULTS

### Loss of *Hoxa* genes results in reduced production of hematopoietic cells.

For reasons of embryonic lethality a previously described conditional knockout mice for the entire *Hoxa* locus, *Hoxa<sup>ff</sup>*, (Kmita, 2005) were used to study the importance of *Hoxa* genes in definitive hematopoiesis. *Hoxa<sup>ff</sup>* mice were crossed with MxCre transgenic mice, in which Cre recombinase expression is induced by interferon following injections with pIpC. This model has been reported to be efficient and rather specific for deletion in hematopoietic cells [37, 38]. The complete *Hoxa* locus is stretched over a large region (~100kb) and therefore we first tested the efficiency of *Hoxa* excision in our model. We established that 7 injections of pIpC with a 2-day interval resulted in a near 100% deletion of both *Hoxa* alleles in colony inducing hematopoietic progenitors (Supplemental Figure 1B). Moreover, we confirmed by PCR analysis that primitive hematopoietic cells defined by Lineage<sup>-</sup>, c-kit<sup>+</sup> and Sca-1<sup>-</sup> (LKS) harboured the deletion one and five months after the last injections, while no floxed allele was detected (Supplemental Figure 1A). Expression of *Hoxa* mRNA in control compared to *Hoxa<sup>f/-</sup>* purified LKS shows a significant reduction in gene expression following pIpC treatment (Supplemental Figure 1C). This regime of 7 injections was used for all further described experiments.

To investigate the impact of *Hoxa* deletion on definitive hematopoiesis in homeostasis, a cohort of 10 MxCre/*Hoxa<sup>ff</sup>* and 10 control MxCre adult mice were injected with pIpC and monitored for hematopoietic anomalies in the periphery over a period of 20 weeks (Figure 1A). White blood cell, red blood cell and platelets counts were all significantly reduced with ~50, 10 and 30%, respectively, throughout the observation period (Figure 1B). We validated by PCR that no escapers (*Hoxa<sup>ff</sup>* or *Hoxa<sup>f/-</sup>* cells) were present at these extended times post-injections (Supplemental Figure 1). This indicates that the hematopoietic cell production of mature blood cells from progenitors (<12 weeks post-injection) and hematopoietic stem cells (>12 weeks post-injection) was affected by loss of *Hoxa* genes. FACS analysis showed that among the white blood cells in particular the B cells were significantly reduced (Supplemental Figure 1D). To evaluate whether the diminution of peripheral blood cells was reflecting those of primary hematopoietic organs, we analysed the cellularity of BM, spleen and thymus. Both

at short term (4 weeks ) and long term (20 weeks) the cell counts in all organs were significantly reduced between 20 and 45% in the absence of *Hoxa* (Figure 1C), indicating that the observed diminution in the peripheral blood (PB) is indeed due to an impairment in blood cell generation and not through mitigate cellular mobilization. Next we analysed whether the myeloid and lymphoid cell populations were modulated upon loss of *Hoxa* genes. FACS analysis showed that B cells were reduced to 54% and 83% of the population size in control BM and spleen, respectively. In the BM the diminution of B cells led to a relative higher proportion of erythroid cells (Ter119<sup>+</sup>), but not of myeloid cells. In the spleen proportions of Mac1<sup>+</sup> and CD4 and CD8 T cells were slightly, but significantly increased (Figure 1D). Thus the deletion of *Hoxa* genes in adult mice in hematopoietic homeostasis diminishes both short-term and long-term production of mature hematopoietic cells, in particular of B cells.

#### Primitive hematopoietic cells are reduced in absence of *Hoxa* genes

*Hox* genes are typically high expressed in hematopoietic stem cells and primitive progenitors. Their expression levels rapidly decrease with the progression to differentiated stages of hematopoiesis [8]. Therefore, deletion of *Hoxa* genes might have a more prominent effect on primitive hematopoietic cells. To evaluate the effect of *Hoxa* gene deletion on HSCs and multipotent progenitors (MPP) FACS analysis was performed on the BM of MxCre*Hoxa*<sup>fl/fl</sup> and MxCre mice one month following pIpC injections. Two different commonly used immunophenotyping strategies were applied to measure the size of the long-term (LT) HSCs and MPPs. The first strategy is based on antibodies directed against the SLAM markers CD150, CD48 and CD244 in combination with Sca1 and c-kit as determined by the group of Sean Morrison (Figure 2A) [39, 40]. Furthermore, we used a second antibody panel, in which LT-HSCs are defined by the absence of CD34 and Flt3 receptor (CD135) on LKS/IL-7R<sup>neg</sup> cells (Figure 2B) [41, 42]. Their immediate descendants express CD34 and are referred to as short-term (ST) HSCs, while cells that express also *Flt3* are considered MPPs. Additionally, early descendants of HSCs and MPPs, the common myeloid progenitors (CMP) [43], granulocytic/macrophage progenitors (GMP) and megakaryocytic/ erythrocyte progenitors were determined (Figure 2C). The numbers of LT-HSCs as defined by the expression of SLAM markers (Figure 2A) were almost 3-fold reduced upon excision of the *Hoxa* locus and the MPPs 4-fold reduced (Figure 2D). However, using the second strategy the population of

LT-HSC in absence of *Hoxa* was comparable to those of control mice (Figure 2E). Actually, the LT-HSC population determined by the second strategy was almost 2-fold larger than using the SLAM markers ( $0.014 \pm 0.004$  vs.  $0.0057 \pm 0.0012$ ), indicating that CD135 and CD34 markers might be less precise in LT-HSC determination. The percentage of LT-HSCs obtained by using the SLAM markers was comparable to those observed by Morrison *et al.* [40] and are considered the most pure population of LT-HSCs. Interestingly, the population of *Hoxa*<sup>-/-</sup> ST-HSCs was actually increased compared to control, however, a reduction in MPPs was observed, suggesting a partial block in the progression of ST-HSCs to MPP (Figure 2E). Consequently, more differentiated progenitors were significantly reduced, in particular CMPs and GMPs (Figure 2F), populations that are known to be sensitive to *Hoxa9* [31]. Thus the excision of *Hoxa* genes perturbs very early hematopoietic progenitor populations, including the HSCs.

To test whether the *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs were able to respond normally to growth factors, LT-HSCs were sorted according to the SLAM markers from pIpC injected MxCre/*Hoxa*<sup>fl/fl</sup> and MxCre mice and individually plated into 96-well plates (Figure 2G). Growth was monitored for 3 weeks. Almost 80% of the control HSCs proliferated in culture and frequently expanded to cover 50 to 80 of the culture surface (Figure 2H). In contrast, only 50% of the *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs responded with growth, and their expansion was in general inferior to those of control HSCs (data not shown), although a few exceptions were observed. Measurement of myeloid progenitors by CFC assays showed that in general the numbers of *Hoxa*<sup>-/-</sup> progenitors in the BM were significantly reduced compared to control. The absence of *Hoxa* genes affected in particular the macrophage (M), granulocytic/monocytic (GM) and the most primitive progenitors that have still the potential to differentiate into granulocyte/erythrocyte/megakaryocyte and macrophage (GEMM) (Figure 2I). These functional data correspond to the immunophenotypical analysis. Taken together, these data show that deletion of *Hoxa* genes result in a strong reduction in numbers of hematopoietic stem cells and their immediate derivatives, which is in accordance with the reported expression levels for *Hoxa* genes in these populations [8]. Moreover, *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs were less responsive to growth factors.



Capacity of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs to reconstitute hematopoiesis is severely reduced.

Although the loss of *Hoxa* genes results in reduced numbers of HSCs and progenitors this did not lead to BM failure for over 6 months. These mice were in hematopoietic homeostasis and it has been well recognized that under these conditions the need of HSCs to differentiate or self-renew is very low. Actually it has been reported that HSCs divide at average only five times in a mouse lifetime [44]. The function of HSCs is classically tested by transplantation into myeloablated recipient mice, in which the stromal cells in the BM provide the signalling cues for HSCs to settle and proliferate and differentiate re-establishing blood cell production. To test the ability of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs to fully restore hematopoiesis in myeloablated mice, 1 or 0.2 million total BM cells deleted for *Hoxa* locus or control (CD45.2) were transplanted in cohorts of congenic mice (CD45.1). Engraftment of HSCs was monitored by FACS analysis for CD45.1 or CD45.2 on peripheral blood (PB) over a period of 20 weeks (Figure 3A). All recipients that received 1 million of control BM cells showed high levels of donor cell contribution reaching 90% (Figure 3B). On the contrary, in 5 out of 14 mice that received *Hoxa*<sup>-/-</sup> BM cells the presence of donor cells in the periphery decreased rapidly below the 5% engraftment threshold level (Figure 3C and Table 1). Nine mice were considered engrafted by *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs, surprisingly, 2 mice displayed high engraftment levels. Of the remaining mice, 5 (36%) showed very low and 2 mice showed medium levels of engraftment. PCR analysis on BM cells of medium and highly reconstituted mice confirmed the presence of the *Hoxa* deletion, excluding the engraftment by escapers with no deletion or only one allele (data not shown). By definition offspring from HSCs include mature cells from all lineages. FACS analysis for lineage markers on donor cells in reconstituted mice showed the presence of lymphoid (B and T), myeloid and erythroid cells in the periphery. Again the proportion of B220<sup>+</sup> B cells was significantly reduced along a relative higher proportion of Mac1<sup>+</sup> myeloid and CD3<sup>+</sup> T cells (Figure 3D). At 24 weeks mice were sacrificed and evaluated for their engraftment level as well as proportions of myeloid and lymphoid cells in hematopoietic organs. Mice that received *Hoxa*<sup>-/-</sup> BM cells showed at average ~4-fold lower contribution of donor cells in BM, spleen and thymus than recipients of control cells (Figure 3E). Notable the 4 mice with medium and high engraftment levels of *Hoxa*<sup>-/-</sup> cells in the PB were also well reconstituted in BM, spleen and thymus (Table 1). FACS analysis demonstrated an overall

decrease in B220 B cells in BM (2.3X) and spleen (1.9x) (Figure 3F), specifically in the more mature subpopulations as defined by Hardy [45] (B220+/CD43- (D-F), B220+/IgM- (D) and B220+/IgM+ (E/F) (Table 2). Interestingly, B cells were more severely affected in mice with lowest repopulation of *Hoxa*<sup>-/-</sup> BM (Figure 3G), suggesting a close relation between B cell development and HSC function. Significant changes in myeloid and T cell populations included a decrease in immature populations, while proportions of mature cells (Mac1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) were increased in the absence of *Hoxa* genes (Figures 3H-J and Table 2).

The normal frequency of HSCs is around 1:10000 in unmanipulated wt mice. We showed a 3-fold reduction in immunophenotypically defined LT-HSCs following *Hoxa* gene excision, which argues that a dose of 1 million *Hoxa* deleted BM cells should contain a sufficient number of HSCs to repopulate myeloablated mice. The low engraftment rate of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs demonstrates that excision of the *Hoxa* locus is detrimental for the capacity of HSCs to efficiently regenerate hematopoiesis in myeloablated mice, but is not entirely defective. The presence of all hematopoietic populations long-term post-excision suggest that the differentiation programs of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs are more or less intact in at least a fraction of the HSCs, but the B cell fate is negatively modulated. Thus these data suggest a potential loss of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs with time. To test this possibility we sorted *Hoxa*<sup>-/-</sup> and control donor derived cells from the BM of the medium and low engrafted mice and transplanted a dose of 0.2 million cells in three mice for each condition. The large majority (6 in 8 mice) of secondary hosts of control BM cells were long-term repopulated (Figure 3K), indicating the presence of LT-HSCs in the BM transplant of the primary host. None of the mice that received *Hoxa*<sup>-/-</sup> primary BM cells showed any short-term or long-term repopulation, indicating that any or very few (frequency < 1:600000) HSCs were present in primary recipients of *Hoxa*<sup>-/-</sup> BM 20 weeks post-transplantation (Figure 3L and M). To exclude that a deficiency in homing and settling into the BM niche is underlying the capacity of HSCs to engraft, we measured the ability of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs to home to the BM in 21 hours. HSC enriched populations (LKS) were sorted from MxCre/*Hoxa*<sup>fl/fl</sup> and MxCre mice 1 month post-injections, labelled with CFSE or CTV, respectively, and transplanted in competition into irradiated mice (Figure S2A). FACS analysis showed that the presence of *Hoxa*<sup>-/-</sup> LKS cells in the BM after 21 hours was comparable to that of control cells in all 4 mice (Figure S2B), indicating no homing defects of

*Hoxa*<sup>-/-</sup> cells. Together these data suggest that *Hoxa* genes are required for the maintenance of HSCs.

*Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs are more quiescent and have increased apoptotic rates.

At steady-state hematopoiesis most HSCs are quiescent and based on pulse chase experiments with BrdU it has been calculated that HSCs divide at average 5 times in a life time of a mouse [44]. pIpC treatment is mimicking a viral infection and induces interferon production, which provokes HSCs to enter the cell cycle. They will re-enter their quiescent state after the inflammation ceases. Our experimental strategy thus applies a proliferative stress to HSCs. The decrease in immunophenotypical and functional HSCs 4 week's post-injections might be associated with the stress the HSCs underwent in response to the pIpC. For that reason the cycling status of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs was determined. FACS analysis for proliferation marker Ki67 in combination with Dapi showed that 60% of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs were in G0, which was 2-fold more than control HSCs (Figure 4A and B). In addition, excision of *Hoxa* also resulted in a small but significant decrease in cycling MPP cells (Figure 4A and C). Thus the smaller population of *Hoxa*<sup>-/-</sup> LT-HSCs were less in cycle, which could explain their poor engraftment potential and fewer numbers. The question then rose whether *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs had reduced capacity to enter cell cycle. To test this MxCre/*Hoxa*<sup>fl/fl</sup> and MxCre mice were given a single dose of BrdU one month post pIpC treatment and were sacrificed 24 hours later (Figure 4D). Surprisingly, more *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs were in S phase ( $27.33 \pm 3.71\%$  *Hoxa*<sup>-/-</sup> vs  $19.73 \pm 2.53$  control,  $P = 0.018$ ), suggesting that *Hoxa* deletion does not affect the ability to go through cell cycle (Figure 4E). Incorporation of BrdU was similar for *Hoxa*<sup>-/-</sup> and control MPPs (Figure 4F), indicating similar cell cycle kinetics. These results suggest that *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs have a higher cycling rate, which seem contradictory to the higher percentage of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs in quiescence. One possibility is that HSCs fail or have reduced capacity to undergo self-renewal divisions in the absence of *Hoxa* gene expression, but instead undergo a differentiation division losing the LT-HSC phenotype.

Another possibility is that *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs might undergo more apoptosis. FACS analysis for Annexin V and 7-AAD showed indeed a significant larger proportion of apoptotic or dead *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs (Figure 4G and H), indicating that apoptosis might account partly for the loss of

LT-HSCs lacking *Hoxa* expression. Not only HSCs, but also MPPs comprised more apoptotic cells (Figure 4I), suggesting the involvement of *Hoxa* genes in anti-apoptotic pathways.

*Evaluation of differentially expressed genes in LT-HSCs by RNASeq analysis.*

To get insight in the molecular basis underlying the regulation of long-term maintenance of LT-HSCs by *Hoxa* genes RNA-Seq analysis was performed on *Hoxa*<sup>-/-</sup> and control LT-HSCs 4 weeks post-injections (Supplemental Table S1). The FKPM values for *Hoxa* genes in the *Hoxa*<sup>-/-</sup> LT-HSCs were close to zero, and thus not expressed, confirming the deletion of *Hoxa* genes (Supplemental Table S2). On the contrary, the majority of *Hoxa* genes, from *Hoxa2* to *Hoxa10*, were expressed in MxCre control HSCs. Among these *Hoxa5*, *Hoxa9* and *Hoxa10* had the highest RPKM values, which correspond with our previously reported QRT-PCR data, showing highest mRNA levels for these *Hoxa* genes in LT-HSCs [8]. Comparison of the gene expression profiles resulted in the identification of 448 significantly differentially expressed genes in *Hoxa*<sup>-/-</sup> LT-HSCs (Figure 5A; P<0.05). The expression of the majority of the genes was decreased in HSCs deleted for the *Hoxa* locus (299 downregulated and 149 upregulated genes), indicating that *Hoxa* genes are predominantly activators of transcription in LT-HSCs. At a 2-fold cut-off compared to control the expression of 69 and 35 genes was decreased or increased, respectively. *Hox* genes are known for cross regulation both in cis or in trans and we have reported modulation of *Hox* gene expression in primitive hematopoietic cells lacking *Hoxb1-b9* [29]. Therefore, we first analysed whether *Hoxa* deletion affected the expression of *Hox* genes from other clusters. Five genes of the *Hoxb* cluster were de-repressed >2-fold (Supplemental Table S3), while genes of the C and D locus were unaffectedly silent (data not shown). Only few genes showed more than a 5-fold decrease in gene expression, notably *Hnf4a*, *Colla1* and two non-coding imprinted genes *Meg3* and *Rian*, while besides *Hoxb8* and *-b9* the transcription factor *Arx* showed a 5-fold or higher increase of expression in *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs (Table 3). Functional annotation clustering using Gene Ontology terms revealed that differentially expressed genes are associated with cell proliferation and differentiation, phosphate metabolic processes, intracellular signalling, lymphocyte activation, migration and apoptosis (Supplemental Table S4). A high number of genes those genes encode for proteins with kinase activity, lipid binding or GTPase regulatory activity. Moreover, association of differentially expressed genes with several KEGG pathways, most significantly for focal

adhesion, hematopoietic cell lineage, Extracellular Matrix-receptor interaction and cytokine-cytokine receptor interaction (Table 4 and Figure 5B). Genes involved in hematopoietic lineage include *CD34*, *Flt3* and *c-kit*, which are associated with a HSC and MPP phenotype were all downregulated, suggesting that *Hoxa* genes are important to preserve a stem cell phenotype. Interestingly, these genes were also identified as direct downstream targets of *Hoxa9* in transduced BM cells [46, 47] or B cells [48].

*Hoxa* modulated genes involved in focal adhesion and interactions with the extracellular matrix.

Genes associated to extracellular matrix interactions and are downregulated in *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs include *Colla1*, *Colla2*, *Col4a1* and *Col4a2* (Figure 5B). These genes are encoding for several collagen types that form structural components of the extracellular matrix. Increased expression levels for the collagen 4 types in LT-HSC compared to ST-HSCs and MPPs has been reported, suggesting that LT-HSCs actively contributes to the construction of their immediate environment [49]. *Colla1* expression is most affected by *Hoxa* deletion. Although not directly associated with LT-HSCs, *Colla1* is critical for skeletal formation and mutations lead to osteogenesis imperfecta [50]. Contact points of the cell with the extracellular matrix occurs at focal adhesion structures where bundles of actin filaments are connected to transmembrane receptors of the integrin family through junctional plaque proteins. *Hoxa* genes modulate expressions of two integrins in HSCs. Interestingly, *Itga2* has been proposed as a novel LT-HSC marker [51] and is found downregulated in *Hoxa*<sup>-/-</sup> LT-HSCs. In contrast, *Itgb3* and *Itga2b*, encoding respectively CD61 and CD41, are both upregulated. These integrins join together to form the integrin GPIIb/IIIa, which plays a major role in platelet function, acting as receptor for several adhesion molecules, including fibrinogen [52]. In addition, *Itgb3* is also a receptor for matrix metalloproteinases (Mmp) that are enhancing conditions for cell motility and are important for HSC differentiation [53]. Thus, the decrease in *Coll1* and *4* genes and integrin a2 together with an increase of integrin a2b suggest a destabilization of HSCs with their niche and might promote their exit and differentiation.

*Cytokine-cytokine receptor interactions affected in Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs

Loss of *Hoxa* genes in LT-HSCs resulted in the downregulation of genes encoding receptors involved in critical signalling pathways for growth, proliferation, differentiation and inflammation, including *Pdgfrb*, *Tgfbr2*, *Csfrb2* (or IL3 receptor), *Flt3*, *c-kit* and *Bmpr1a*. In general impaired signalling through these receptors is expected to negatively impact on proliferation and differentiation of LT-HSCs, although a decrease in *Bmpr1a* might release quiescence as shown for neural stem cells [54]. Of these *Flt3*, *c-kit* and *Pdgfrb* have been shown to be downstream targets of *Hoxa9* [46, 47, 55, 56]. Thus multiple signalling pathways in *Hoxa*<sup>-/-</sup> LT-HSCs appear to be disturbed.

## DISCUSSION

In this study we have investigated the requirement of *Hoxa* genes in definitive hematopoiesis through conditional deletion of the entire *Hoxa* locus. This multigene knock-out approach prevented issues regarding functional redundancy between *Hoxa* genes, of which several are expressed at one log higher levels than those of the *Hoxb* cluster [29]. We found that loss of *Hoxa* has profound effects on HSCs and B cell differentiation. Although this led to a modest leukopenia of all lineages, myeloid and erythroid differentiation were rather resistant to the absence of *Hoxa* expression. Despite increased CD4 and CD8 cells in the spleen, reduced percentage of double positive CD4/CD8 cells in favour of the single positive cells indicates a disturbance in T cell development as well. We found that deletion of the *Hoxa*<sup>-/-</sup> genes led to a decrease in LT-HSCs and MPPs, phenotypically defined by the SLAM markers [40]. The decrease in MPP was confirmed with a different antibody panel, including CD34 and Flt3, but not for LT-HSCs. The fraction of LT-HSCs and MPPs according to the SLAM markers is much smaller than based on CD34 and CD135 (Flt3) expression. Morrison determined by transplantation assays that 1 out of 2 CD150<sup>+</sup>/CD48<sup>-</sup>/CD244<sup>-</sup>/LKS cells were able to long-term repopulate, indicating that this cell populations has highest enrichment of LT-HSCs [40]. It is thus likely that this population represents most accurate the LT-HSCs, which is affected by *Hoxa* genes. However, RNASeq data showed that mRNA expression coding for CD34, c-kit and Flt3 markers in *Hoxa*<sup>-/-</sup> LT-HSCs were downregulated and might have influenced determination of the HSC and progenitor populations, although these changes were rather modest (data not shown).

### Functions for *Hoxa* genes in HSCs

*In vitro* assays showed that a high percentage of HSCs lacking *Hoxa* genes failed to proliferate (Figure 2H). These data correspond to the lower fraction of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs that is in cell cycle as determined by Ki-67 compared to control (Figure 4B). Moreover, decreased expression of the common chain of the IL3 receptor (*Csfr2b*) and c-kit gene (receptor for Steel factor) is likely to be responsible for the lower growth of single *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs that responded to IL3, Steel factor and IL6 administered in the medium. Transplantation assays demonstrated deficiencies of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs in regeneration of the hematopoiesis. Interestingly, the

regeneration potential of *Hoxa* deficient HSCs was not completely abrogated, because *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs repopulated a fraction of mice in both myeloid and lymphoid lineages. This data suggests that *Hoxa* genes are not essential for hematopoiesis. However, the absence of *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs in the BM of primary hosts at 24 weeks post-transplantation strongly indicates some level of compensatory proliferation at progenitor stages that are not sensitive to *Hoxa* depletion. Thus our data indicate that *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs detected at 4 weeks post-injection could contribute to hematopoietic regeneration, but fail to maintain themselves, indicating that *Hoxa*<sup>-/-</sup> have completely lost their potential to self-renew and instead undergo differentiation divisions. This loss of self-renewal is much more severe than observed for the *Hoxa9*<sup>-/-</sup> HSCs [32] indicating that indeed multiple *Hoxa* genes orchestrate the self-renewal program of HSCs, which cannot be preserved by the expression of remaining *Hoxb* genes even when elevated. Our data does not identify which members of the *Hoxa* cluster are required for the maintenance of adult HSCs, but previously reported expansion of HSCs overexpressing *Hoxa4* or *Hoxa10* suggest that these *Hoxa* genes contribute to establish self-renewal in addition to *Hoxa9* [11, 13], but mutants for these genes have no phenotype (*Hoxa10* [32]) or have not been evaluated for hematopoietic anomalies. Furthermore, a strong association of *Hoxa10* and *Hoxa5* to LT-HSCs emerged from comparative expression studies between LT-HSCs and their immediate descendants [57], suggesting that *Hoxa5* might also have a function in self-renewal properties as these characterize HSCs. Overexpression studies of *Hoxa* genes together with *Meis1* showed strongest transformation capacity for *Hoxa1*, *Hoxa4*, *Hoxa6*, *Hoxa9* and *Hoxa10* [58]. As cells with enhanced self-renewal might be more prone to transformation suggests that these *Hoxa* genes can drive self-renewal expansion divisions. As *Hoxa5* lacks clear transformation potential it would rather promote asymmetrical self-renewal divisions resulting in one HSC and a differentiated cell. Re-introduction of individual *Hoxa* genes in the *Hoxa*<sup>-/-</sup> background will address the question which of the *Hoxa* genes contributes to HSC self-renewal.

#### Downstream targets and the HSC niche

Comparison of global gene expression profiles in *Hoxa*<sup>-/-</sup> and control HSCs revealed that *Hoxa* genes regulate sets of genes that play an important role in the formation and interactions with their environment. The signals provided by the niche and the interactions of HSCs with the



niche are thought to be critical for their quiescence state and self-renewal divisions. In principle these two processes imply different choice of cell fate, because quiescent cells are not dividing. Thus self-renewal demands HSCs to be responsive to proliferating stimuli, but not to differentiation signals (at least very restricted to produce at least one HSC daughter cell). The prevention of differentiation might be more critical for self-renewal than the actual promotion of self-renewal as other cell types are able to undergo few self-renewal divisions, but eventually end up differentiating. Therefore, the location of HSCs in the BM to protect them from mitogenic and proliferation signals and the unresponsiveness to these signals could be critical to maintain HSCs. Homing and engraftment of HSCs to such locations are likely to be mediated through adhesion molecules expressed by HSCs themselves. Our data show that loss of *Hoxa* genes in HSCs affects the expression of adhesion molecules. In particular, the decreased expression of *Itga2* is of interest, because its expression has been reported to be associated with the long-term engraftment of human CD34+ cord blood cells in a xenograft model and proposed as a new stem cell marker [51]. Of note, for a cell to divide perfectly symmetrical polarity should be avoided. Integrins on focal adhesion points are connected to bundles of actin and thus could influence polarity through adhesion. The fact that integrin b1 can orient epithelial polarity [59] support a potential role for *Itga2* in the symmetrical self-renewal division of HSCs. Direct regulation of integrins by *Hoxa* genes was demonstrated by the group from Eklund, who reported that Hoxa10 in complex with Pbx2 activates transcription of *Itgb3* during myeloid differentiation resulting in the increased adhesion to fibronectin [60]. Also other integrins have been shown to be under the control of *Hox* genes, such as *Itga5b1* by *Hoxd3* that promotes angiogenesis [61] and co-localization of human *Itga7* and *Hoxc* genes on chromosome 12 indicates an evolutionary conserved functional relation between these gene sets [62].

The HSC homing involves a wide variety of adhesion molecule, such as selectin, integrin and chemokine receptors. We demonstrated that the deletion of the *Hoxa* genes affects expression of only a few genes coding for those adhesion molecules, mostly integrins. Thus, the expression of the vast majority of adhesion molecules remained intact in *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSC. Therefore, that could explained why *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSC conserve their potential of homing to the bone marrow.

We found that four genes encoding for collagen types were downregulated in the absence of *Hoxa* genes. The expression of collagen types 4a1 and 4a2 were linked to LT-HSCs [49] and it has been proposed that by the production of collagen, HSCs contribute to the construction of their proper environment and create gradients that protect them from exposure to stress signals. Increase of *Col4a2* expression has also been observed in primary myeloid cell transduced with Nup98-*Hoxa9* [63]. It is likely that *Hoxa* genes directly regulate *Col* genes, because *Hoxb1* has been shown to bind the promoter of *Col5a2* in complex with *Prep* and *Pbx1* and activates its expression [64]. Additionally, microarray data showed that fat loss resulted in the upregulation of *Hox* genes and collagen genes in adipose tissue, including *Hoxa5*, *Hoxa9*, *Colla1* and *Colla2* [65], which were downregulated in our screen. Moreover, promoter analysis using the genomatrix gene2 promoter software revealed potential binding sites for *Hoxa5* in the *Colla2* promoter. Thus the disruption of *Hoxa* gene expression in HSCs might lead to dramatic changes in the direct environment either by inadequate interaction with the BM niche and/or by the impaired ability to create their own protective environment. As a result *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs might be more expose to differentiation and apoptotic signals leading to a progressive loss of HSCs.

Also genes implicated in self-renewal or adhesion, *CD34*, *c-kit*, *Egr*, *Pu.1* and *Sox4* genes were downregulated in absence of *Hoxa* genes. These genes have been shown to be modulated by *Hoxa9* overexpression [46], indicating that *Hoxa9* is one of the critical *Hoxa* genes in self-renewal maintenance.

In conclusion, we show that *Hoxa* genes are critical for the long-term maintenance of LT-HSCs by acting on multiple biological processes. We report here that regulating the interactions with the HSC niche through modulating expression of receptors, adhesion molecules and secreted structural proteins might play a dominant role in the potential of *Hoxa* genes to stimulate HSC self-renewal.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Mice

*Hoxa* conditional knockout mice [66] were bred with MxCre transgenic mice and backcrossed for at least ten generations onto a C57BL/6 background. The presence of the floxed *Hoxa* alleles and Cre transgene was determined by PCR on genomic tail DNA. C57BL/6 (CD45.2), B6.SJL-Ptprca Pep3b/BoyJ (CD45.1) and Mx-1Cre (B6.Cg-Tg(Mx1-cre)1Cgn/J) strains were originally purchased from The Jackson Laboratories (ME, USA). All mice were housed in the specific pathogen-free animal facility of the Hospital Maisonneuve-Rosemont (HMR) Research Center. Experiments were approved by the Animal Care Committee of the HMR Research Center that is under legislation of the Canadian Council on Animal Care.

### pIpC Administration

Polyribinosinic:polyribocytidylic acid (pIpC; GE healthcare life sciences, Qc, Canada) was resuspended in Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS; Gibco, NY, USA) at 2 mg/ml. To induce excision of *Hoxa* genes, 8 to 16 week old *MxCre/Hoxa<sup>flox/flox</sup>* mice and *MxCre* controls received 7 injections of 10µg pIpC per gram of body weight for a maximum of 250µg per mice intraperitoneally every other day.

### Single-cell in vitro clonogenic progenitor assays

Methylcellulose culture media was prepared as previously described [8]. Briefly, single-cell HSC were directly sorted in individual wells of 96-well plates (Sarstedt, Qc, Canada) containing 100µl of Methylcellulose media per well. Colonies were maintained at 37°C in humidified incubators at 5% CO<sub>2</sub>. Colony formation was scored after 10-14 days of culture and identified according to standard criteria [67].

### Blood counts

To measure cell counts, blood was collected from the mandibular veins of *MxCre/Hoxa<sup>flox/flox</sup>* mice and *Mx1Cre* controls in microtubes containing PBS + 2mM EDTA. Total and differential counts were obtained using an automated COULTER Ac T diff2 (Beckman Coulter) and were adjusted for their volume.

### Bone marrow transplantation assays.

For transplantation assays, total BM cells from 8- to 16-week-old MxCre/*Hoxa*<sup>flox/flox</sup> and MxCre (both CD45.2) mice were collected 3 days after pIpC treatment and injected into the tail veins of irradiated (800cGy) B6SJL mice (CD45.1) at a dose of  $10^6$  cells or  $0.2 \times 10^6$  cells. For secondary transplantations CD45.2 BM cells were sorted from primary recipients and  $0.2 \times 10^6$  cells were injected with either *Hoxa* deficient cells or controls and re-injected into secondary recipients (CD45.1).

Beginning 3-4 weeks after transplantation PB chimerism was monitored monthly and continually for at least 16 weeks. Blood was obtained from mandibular veins of recipient mice, subjected to red cell lysis (NH<sub>4</sub>Cl solution), and stained with CD45.1 (A20), CD45.2 (104), B220 (RA3-6B2), Mac-1 (M1/70), CD3 (145-2C11) antibodies (BioLegend, San Diego, CA).

### Short-term homing experiments.

Experimental details concerning this technique can be found in supplemental Methods.

BM cells from 8- to 16-week-old MxCre/*Hoxa*<sup>flox/flox</sup> mice and Mx1Cre controls 4 weeks post-pIpC treatment were flushed from pelvis, femurs and tibiae with D-PBS supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, NY, USA). Total BM from MxCre controls were resuspended at a concentration of  $20 \times 10^6$ /ml and stained with CellTrace™ Violet (CTV, Life technologies, NY, US) according to the manufacturer protocol. Total BM from MxCre/*Hoxa*<sup>flox/flox</sup> mice were resuspend at a concentration of  $10 \times 10^6$ /ml and incubated with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, 0.5 mM) (Life technologies, NY, US) at 37°C for 10 min. BM cells were then washed to remove excess dye and resuspended in DPBS+2% FBS. MxCre/*Hoxa*<sup>flox/flox</sup> and control BM cells were stained with conjugated antibodies c-kit-APC, Sca1-PerCP/Cy5.5, B220-Bio, Gr-1-bio, Mac1-Bio, CD3-bio, Ter119-bio and then wash with D-PBS+2% prior Streptavidin-APC/Cy7 staining. Fifteen thousand LKS CTV<sup>hi</sup> and LKS CFSE<sup>hi</sup> from respectively MxCre and MxCre/*Hoxa*<sup>flox/flox</sup> individual mice were sort with an ARIAIII. The sorted cells ( $15\,000$  LKS CTV<sup>hi</sup> MxCre +  $15\,000$  LKS CFSE<sup>hi</sup> MxCre/*Hoxa*<sup>flox/flox</sup>) were combined at a 1:1 ratios and injected into a single 8-12 weeks old C57Bl/6 recipient irradiated 24 h previously with 800 cGy. 21 h later, the recipient

mouse was sacrificed, and bone marrow from pelvis, femurs and tibias was harvested, subjected to red cell lysis (NH<sub>4</sub>Cl solution), and analysed by LSRII. The ratio of homed CTV+ and CFSE+ cells was measured and compared with the ratio of the injected cells to determine the relative homing efficiency.

#### Flow cytometry

BM cells were flushed from the long bones (tibias and femurs) with D-PBS supplemented with 2% FBS. Cells were homogenized and filtered through 70µm nylon cell strainer (BD Falcon, NJ, USA) to obtain a single-cell suspension. Spleen and thymus were crushed between a mesh nylon to obtain a single-cell suspension. Cells were stained with antibodies in D-PBS+2% FBS and analysed by FACS on a LSRII cytometer (BD Biosciences) or sorted on a FACSAriaIII cell sorter (BD Biosciences). Data was analyzed using the FlowJo software (TreeStar). HSCs, progenitors population and mature cells were analysed and gated according to markers described in Table S5.

#### Cell cycle and apoptosis.

Experimental details concerning this technique can be found in supplemental Methods.

Bone marrow cells from Mx1Cre controls and MxCre/*Hoxa*<sup>flox/flox</sup> mice 4 weeks post-pIpC treatment were flushed from pelvis, femurs and tibias with D-PBS-2% FBS.

Depletion of the lineage positive cells (CD5, CD11b, CD19, CD45R, 7-4, Ly-6G/C (Gr-1), TER119, CD48) was achieved using Easysep magnetic cell separator system kit (Stem cell technologies, VA, Canada). Lin<sup>-</sup> fraction was labelled with c-kit-APC, Sca1-PerCP/Cy5.5, CD150-PECy7, CD244-FITC surface markers then fixed and permeabilized using the BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD biosciences, ON, Canada). To distinguish between G1 and G0 phases of the cell cycle, labelling using either anti-Ki67-PE or an isotype control PE conjugate (BioLegend) was added with the 0,5-1µg DAPI (Life technologies, NY, US) and the incubation prolonged to 25 min.

For *in vivo* 5-Bromodeoxy-uridine (BrdU, Sigma, Canada) incorporation assays, 4 weeks pIpC treated mice were injected intraperitoneally with 1 mg of BrdU (Sigma-Aldrich) and given drinking water containing 0.8 mg/ml BrdU and 5% glucose for 24 hrs. BM cells were extracted and undergo lineage depletion as describe above. Lin<sup>-</sup> fraction was labelled with c-

kit-APC, Sca1-Pacific Blue, CD150-PECy7, CD244-FITC surface markers, fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD biosciences, ON, Canada), treated with DNase (Sigma-Aldrich), and then stained with anti-BrdU-PE antibody (BioLegend). 7-AAD (BD biosciences, ON, Canada) was added 10 min prior acquisition. Cell cycle profiles were evaluated by flow cytometry using a LSRII cytometer (BD Biosciences) and analyse using a FlowJo (Tree Star).

For assessment of apoptosis, BM cells were extracted and undergo lineage depletion as described above. Lin- fraction was labelled with c-kit-APC, Sca1-Pacific Blue, CD150-PECy7, CD244-FITC surface markers. Cells were stained according to manufacturer's recommendations using with Annexin-V-PE (BioLegend). 7-AAD (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) was added 10 min prior acquisition. Data were acquired immediately after Annexin-V staining.

#### Quantitative RT-PCR and RNA amplification

Expression study on purified LT-HSC (CD150+ CD48- LKS) was performed on amplified RNA. Briefly, total RNA was extracted from 5000-15000 sorted LT-HSC using Trizol (Life technologies, NY, US), with 10µg glycogen (Life technologies, NY, US). The extracted RNA (8µl volume) was treated for 20min at room temperature with 1µl of RNase-free DNaseI (1U/µl; Life technologies, NY, US) in the presence of 1µl of RNase inhibitor (40U/µl) (Life technologies, NY, US). The RNA was then purified with RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA was amplified through one rounds of amplification using MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit (ambion) according to the manufacturer's instructions. For expression study on LKS population, quantitative RT-PCR on was performed on non amplified RNA. In both cases cDNA was generated using MMLV reverse transcriptase following manufacturer's instructions (Life technologies, NY, US). cDNA input was standardized and qPCR reactions were done on the ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using the following cycling conditions: 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 sec at 60°C. Samples were normalized to HPRT RNA levels and fold change determined by the  $\Delta\Delta CT$  method. All reactions were run in triplicate, and at least three independent experiments were done for each population. SYBR

Green and TaqMan (Applied Biosystems, Toronto, Canada) technology was used. Primers for the detection of *Hoxa* gene expression were the same as describe in [8].

#### RNA preparation and RNA-Seq library preparation

Total RNA from 60 000-100 000 Mx-Cre/*Hoxa*<sup>flox/flox</sup> and control LT-HSC (CD150+/CD48-/LKS; n=2 for each genotype) was extracted using Trizol (Life technologies, NY, US) and purified on RNeasy columns (Qiagen). Sample quality was first test on Bioanalyzer RNA Nano chips (Agilent) and transcriptome libraries generated. Libraries quality was asses using a Miseq QC. Paired end (2 x 100bp) sequencing was performed using an Illumina HiSeq2000 running TruSeq v3 chemistry. Sequencing of control and *Hoxa*-deficient transcriptomes generated over 95 million reads for each individual sample, of which >86% could be unambiguously mapped to the mouse genome, respectively (details in Supplemental Table S1). RPKM values were used to evaluate gene expression levels. To evaluate differentially expressed genes RNASeq data were analysed with the DeSeq package in the R program.

#### Statistical analysis

The significant difference between cell fractions of mutant mice versus control mice was obtained by performing a two-tailed Student's t-test. The difference in cell populations is considered significant when P value <0.05. To determine genes that are differentially expressed in *Hoxa*<sup>-/-</sup> LT-HSCs. For RNASeq analysis, gene expression was considered significantly different when adjusted P value <0.05.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors want to thank Mona Hassawi, Gratianne Vaisson and Gloria Giono Chiangi for the technical help. We gratefully acknowledge Martine Dupuis for sorting and help in FACS analysis. We want to thank Dr. Marie Kmita from IRCM who has kindly shared the conditional *HoxA* mutant mice. The staff of the animal facility is thanked for taking care of the animals. This work was supported by a grant of the Canadian Cancer Society #2099. CELG and MF are recipients of a department scholarship.

## REFERENCE LIST

- [1] Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003;21: 759-806.
- [2] Cantor AB, Orkin SH. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11: 513-9.
- [3] McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992;68: 283-302.
- [4] Krumlauf R. Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes. *Bioessays* 1992;14: 245-52.
- [5] Scott MP. A rational nomenclature for vertebrate homeobox (HOX) genes. *Nucleic Acids Res* 1993;21: 1687-8.
- [6] Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 2007;26: 6766-76.
- [7] van Oostveen J, Bijl J, Raaphorst F, Walboomers J, Meijer C. The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* 1999;13: 1675-90.
- [8] Lebert-Ghali CE, Fournier M, Dickson GJ, Thompson A, Sauvageau G, Bijl JJ. HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* 2010;38: 1074-86.
- [9] Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91: 12223-7.



- [10] Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM, et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 1995;9: 1753-65.
- [11] Fournier M, Lebert-Ghali CE, Kros G, Bijl JJ. HOXA4 induces expansion of hematopoietic stem cells in vitro and confers enhancement of pro-B-cells in vivo. *Stem Cells Dev* 2012;21: 133-42.
- [12] Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 2002;99: 121-9.
- [13] Magnusson M, Brun AC, Miyake N, Larsson J, Ehinger M, Bjornsson JM, et al. HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood* 2007;109: 3687-96.
- [14] Buske C, Feuring-Buske M, Antonchuk J, Rosten P, Hogge DE, Eaves CJ, et al. Overexpression of HOXA10 perturbs human lymphomyelopoiesis in vitro and in vivo. *Blood* 2001;97: 2286-92.
- [15] Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, Dragowska W, Lansdorp PM, Lawrence HJ, et al. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 1997;17: 495-505.
- [16] Crooks GM, Fuller J, Petersen D, Izadi P, Malik P, Pattengale PK, et al. Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* 1999;94: 519-28.
- [17] Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002;30: 41-7.

- [18] Andreeff M, Ruvolo V, Gadgil S, Zeng C, Coombes K, Chen W, et al. HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML. *Leukemia* 2008;22: 2041-7.
- [19] Drabkin HA, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L, et al. Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2002;16: 186-95.
- [20] Roche J, Zeng C, Baron A, Gadgil S, Gemmill RM, Tigaud I, et al. Hox expression in AML identifies a distinct subset of patients with intermediate cytogenetics. *Leukemia* 2004;18: 1059-63.
- [21] Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286: 531-7.
- [22] Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberg DS, Sallan SE, Silverman LB, Korsmeyer SJ, et al. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 2003;102: 262-8.
- [23] Lawrence HJ, Rozenfeld S, Cruz C, Matsukuma K, Kwong A, Komuves L, et al. Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia* 1999;13: 1993-9.
- [24] Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J* 1998;17: 3714-25.
- [25] Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, Moskow JJ, Lawrence HJ, Buchberg AM, et al. AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 1997;17: 6448-58.

- [26] Saleh M, Rambaldi I, Yang XJ, Featherstone MS. Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Mol Cell Biol* 2000;20: 8623-33.
- [27] Sagerstrom CG. PbX marks the spot. *Dev Cell* 2004;6: 737-8.
- [28] Choe SK, Lu P, Nakamura M, Lee J, Sagerstrom CG. Meis cofactors control HDAC and CBP accessibility at Hox-regulated promoters during zebrafish embryogenesis. *Dev Cell* 2009;17: 561-7.
- [29] Bijl J, Thompson A, Ramirez-Solis R, Kros J, Grier DG, Lawrence HJ, et al. Analysis of HSC activity and compensatory Hox gene expression profile in Hoxb cluster mutant fetal liver cells. *Blood* 2006;108: 116-22.
- [30] Horan GS, Ramirez-Solis R, Featherstone MS, Wolgemuth DJ, Bradley A, Behringer RR. Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev* 1995;9: 1667-77.
- [31] Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G, Fong S, Izon DJ, Humphries RK, et al. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene *HOXA9* have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* 1997;89: 1922-30.
- [32] Lawrence HJ, Christensen J, Fong S, Hu YL, Weissman I, Sauvageau G, et al. Loss of expression of the *Hoxa-9* homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood* 2005;106: 3988-94.
- [33] So CW, Karsunky H, Wong P, Weissman IL, Cleary ML. Leukemic transformation of hematopoietic progenitors by *MLL-GAS7* in the absence of *Hoxa7* or *Hoxa9*. *Blood* 2004;103: 3192-9.
- [34] Azcoitia V, Aracil M, Martinez A, Torres M. The homeodomain protein *Meis1* is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Dev Biol* 2005;280: 307-20.

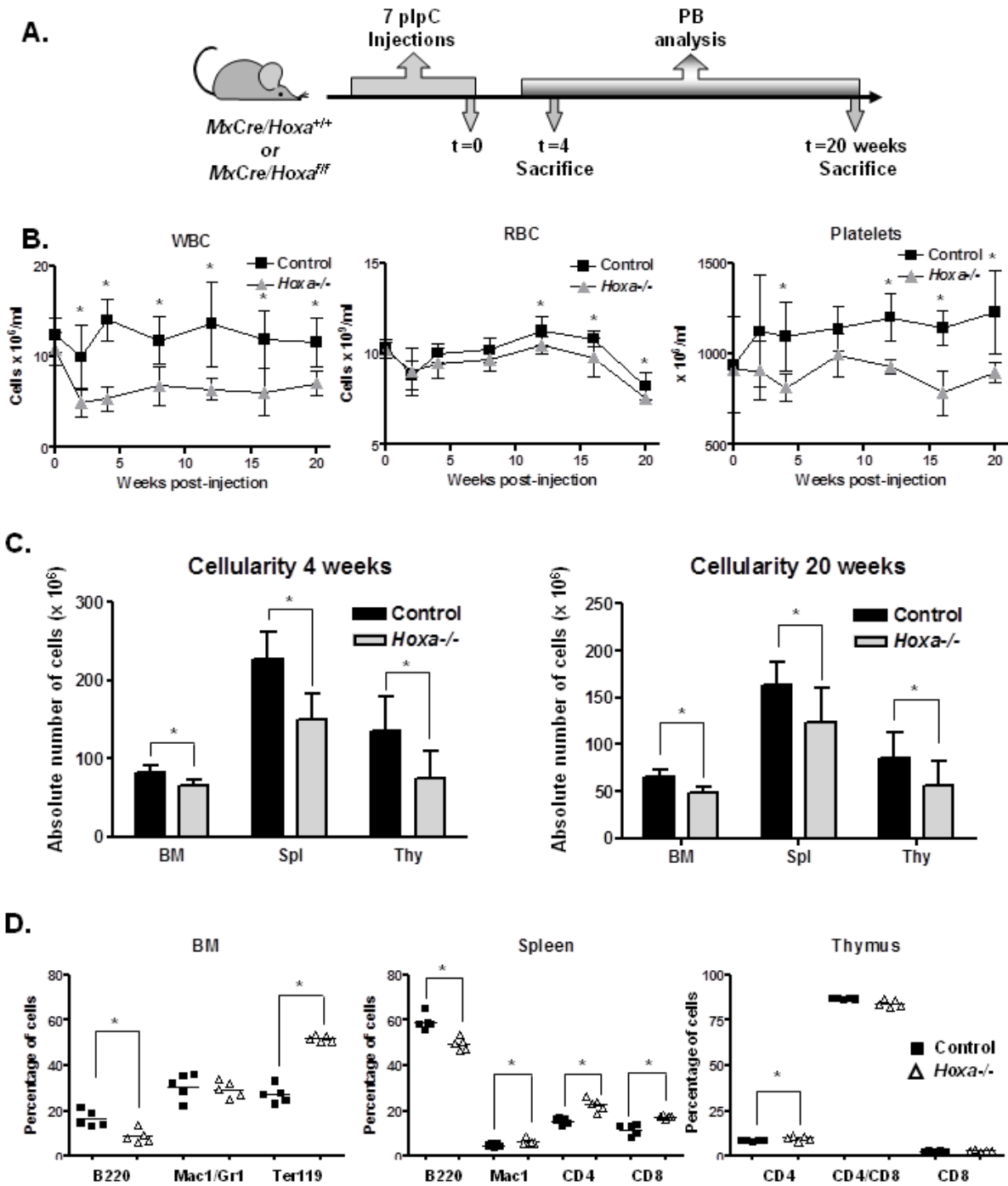
- [35] Sanyal M, Tung JW, Karsunky H, Zeng H, Selleri L, Weissman IL, et al. B-cell development fails in the absence of the Pbx1 proto-oncogene. *Blood* 2007;109: 4191-9.
- [36] Di-Poi N, Koch U, Radtke F, Duboule D. Additive and global functions of HoxA cluster genes in mesoderm derivatives. *Dev Biol* 2010;341: 488-98.
- [37] Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* 1995;269: 1427-9.
- [38] Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, et al. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96: 7088-92.
- [39] Yilmaz OH, Kiel MJ, Morrison SJ. SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity. *Blood* 2006;107: 924-30.
- [40] Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005;121: 1109-21.
- [41] Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273: 242-5.
- [42] Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98: 14541-6.
- [43] Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000;404: 193-7.

- [44] Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96: 3120-5.
- [45] Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 1991;173: 1213-25.
- [46] Huang Y, Sitwala K, Bronstein J, Sanders D, Dandekar M, Collins C, et al. Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. *Blood* 2012;119: 388-98.
- [47] Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. Meis1 programs transcription of FLT3 and cancer stem cell character, using a mechanism that requires interaction with Pbx and a novel function of the Meis1 C-terminus. *Blood* 2005;106: 254-64.
- [48] Gwin K, Frank E, Bossou A, Medina KL. Hoxa9 regulates Flt3 in lymphohematopoietic progenitors. *J Immunol* 2010;185: 6572-83.
- [49] Forsberg EC, Prohaska SS, Katzman S, Heffner GC, Stuart JM, Weissman IL. Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet* 2005;1: e28.
- [50] Wang Q, Forlino A, Marini JC. Alternative splicing in COL1A1 mRNA leads to a partial null allele and two In-frame forms with structural defects in non-lethal osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem* 1996;271: 28617-23.
- [51] Wong WM, Sigvardsson M, Astrand-Grundstrom I, Hogge D, Larsson J, Qian H, et al. Expression of integrin alpha2 receptor in human cord blood CD34+CD38-CD90+ stem cells engrafting long-term in NOD/SCID-IL2Rgamma(c) null mice. *Stem Cells* 2013;31: 360-71.
- [52] Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988;71: 831-43.

- [53] Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109: 625-37.
- [54] Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, et al. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 2010;7: 78-89.
- [55] Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. Persistent transactivation by meis1 replaces hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of meis1-pbx and hox-pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Mol Cell Biol* 2006;26: 3902-16.
- [56] Hassawi M, Shestakova EA, Fournier M, Lebert-Ghali CE, Vaisson G, Frison H, et al. Hoxa9 collaborates with E2A-PBX1 in mouse B cell leukemia in association with Flt3 activation and decrease of B cell gene expression. *Dev Dyn* 2013.
- [57] Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science* 2002;298: 601-4.
- [58] Bach C, Buhl S, Mueller D, Garcia-Cuellar MP, Maethner E, Slany RK. Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood* 2010;115: 2910-8.
- [59] Yu W, Datta A, Leroy P, O'Brien LE, Mak G, Jou TS, et al. Beta1-integrin orients epithelial polarity via Rac1 and laminin. *Mol Biol Cell* 2005;16: 433-45.
- [60] Bei L, Lu Y, Bellis SL, Zhou W, Horvath E, Eklund EA. Identification of a HoxA10 activation domain necessary for transcription of the gene encoding beta3 integrin during myeloid differentiation. *J Biol Chem* 2007;282: 16846-59.
- [61] Boudreau NJ, Varner JA. The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis. *J Biol Chem* 2004;279: 4862-8.

- [62] Wang W, Wu W, Desai T, Ward DC, Kaufman SJ. Localization of the alpha 7 integrin gene (ITGA7) on human chromosome 12q13: clustering of integrin and Hox genes implies parallel evolution of these gene families. *Genomics* 1995;26: 568-70.
- [63] Ghannam G, Takeda A, Camarata T, Moore MA, Viale A, Yaseen NR. The oncogene Nup98-HOXA9 induces gene transcription in myeloid cells. *J Biol Chem* 2004;279: 866-75.
- [64] Penkov D, Tanaka S, Di RG, Berthelsen J, Blasi F, Ramirez F. Cooperative interactions between PBX, PREP, and HOX proteins modulate the activity of the alpha 2(V) collagen (COL5A2) promoter. *J Biol Chem* 2000;275: 16681-9.
- [65] Dankel SN, Fadnes DJ, Stavrum AK, Stansberg C, Holdhus R, Hoang T, et al. Switch from stress response to homeobox transcription factors in adipose tissue after profound fat loss. *PLoS One* 2010;5: e11033.
- [66] Kmita M, Tarchini B, Zakany J, Logan M, Tabin CJ, Duboule D. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 2005;435: 1113-6.
- [67] Humphries RK, Eaves AC, Eaves CJ. Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78: 3629-33.

## LEGENDS AND FIGURES

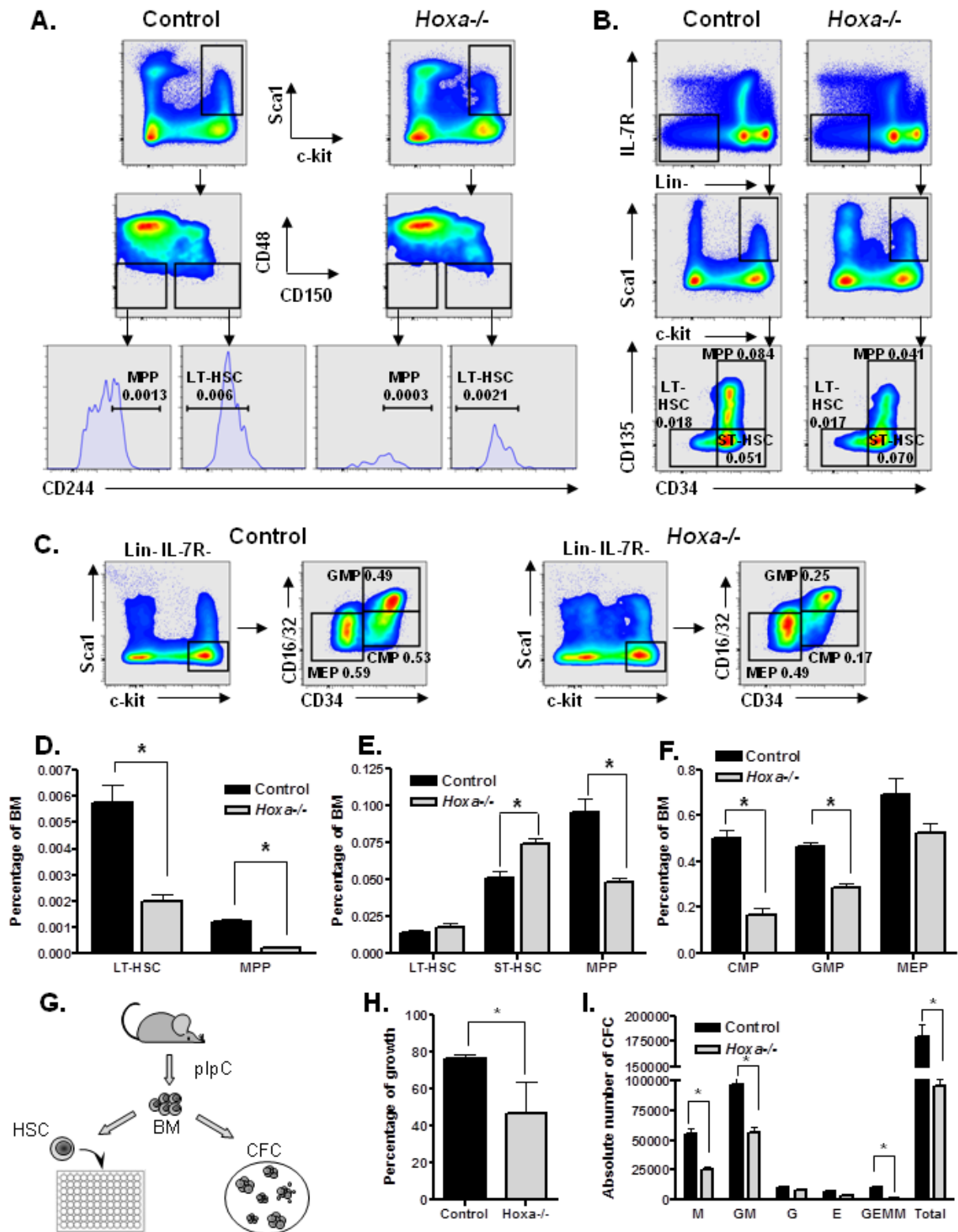


**Figure 1** Deletion of *Hoxa* genes in hematopoietic cells of adult mice. (A) Schematic of plpC injection regime and peripheral blood analysis in time. (B) Absolute number of WBC

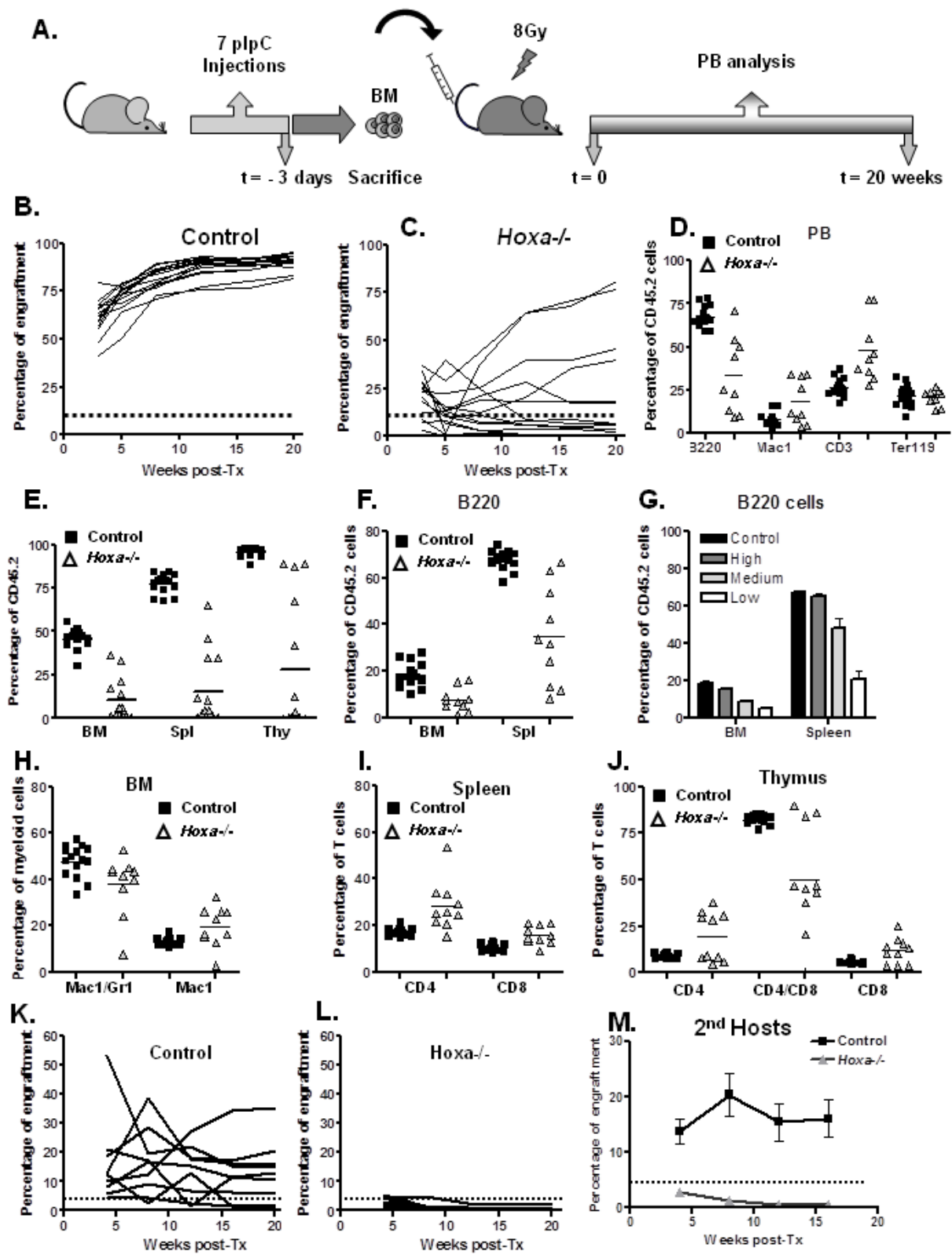


(left panel), RBC (middle panel) and platelets (right panel) in peripheral blood of MxCre/*Hoxa*<sup>flax/flax</sup> (*Hoxa*<sup>-/-</sup>; n=10) and MxCre (Control, n=10) mice over a 20 weeks period following pIpC injections. **(C)** Absolute numbers of cells in BM (two femurs and tibiae), spleen and thymus of MxCre/*Hoxa*<sup>flax/flax</sup> and MxCre mice 4 weeks (left) or 20 weeks (right) after pIpC induced *Hoxa* excision. **(D)** Percentage of B (B220), myeloid (Mac1; Gr1), erythroid (Ter119) and T cells (CD4; CD8) in hematopoietic organs of mice deleted for *Hoxa* genes or control at sacrifice 20 weeks post-pIpC injections.

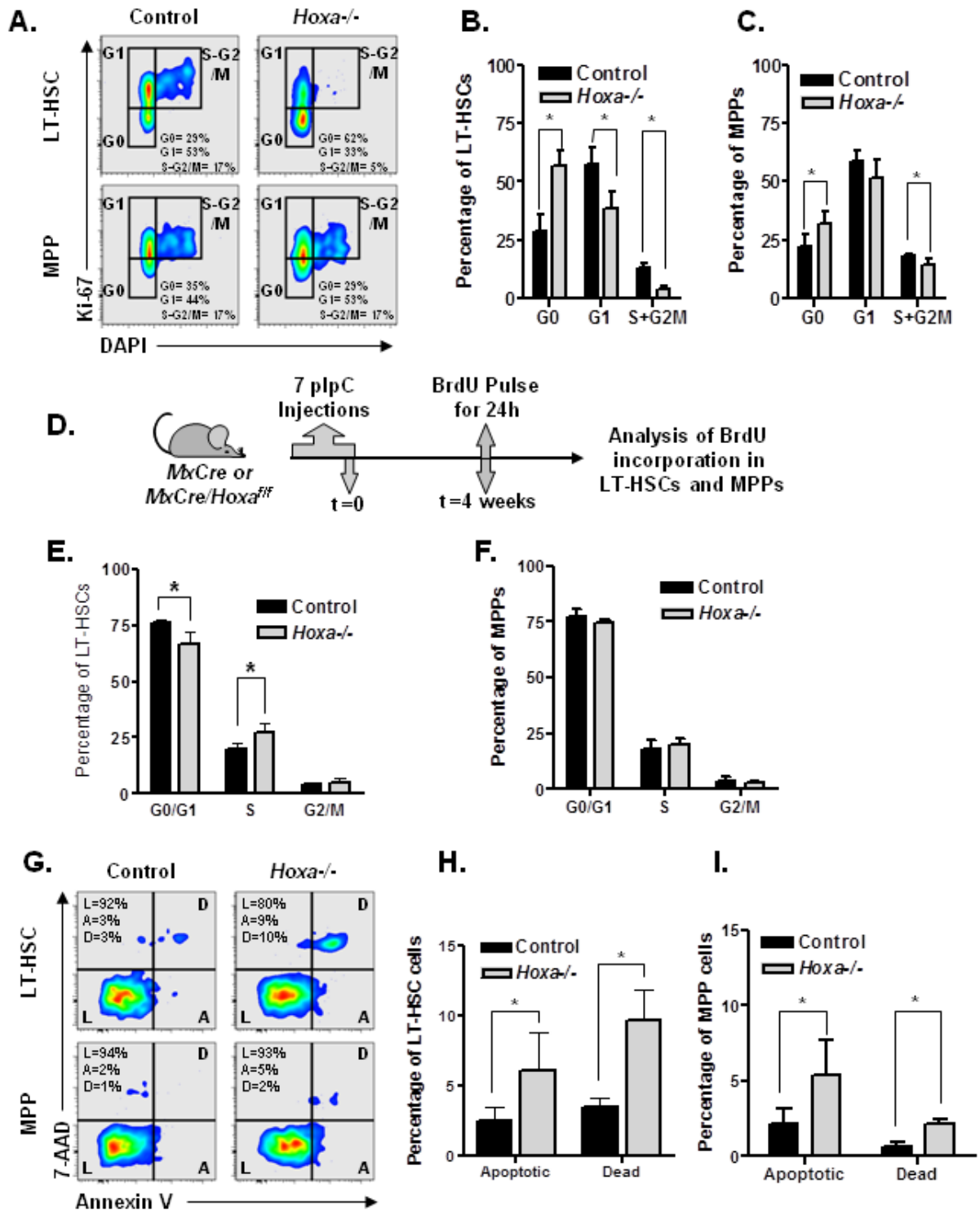
PB=peripheral blood, WBC=white blood cells, RBC=red blood cells, BM=bone marrow, Spl=spleen, Thy=thymus.



**Figure 2 Analysis of hematopoietic stem and progenitor cell 4 weeks after *Hoxa* excision.** (A-C) FACS profiles and gating strategy to identify (A-B) HSC and MPP populations according to strategy #1 using antibodies against SLAM molecules (A), according to strategy #2 (B) and to identify early myeloid progenitors (C). (D-F) Bar graphs depicting average percentage of HSC, MPP and myeloid progenitors in BM as identified with antibody panels used in (A), (B) and (C), respectively. (G) Workflow to evaluate proliferation capacity of HSCs *in vitro* and the frequency of CFC in *Hoxa*<sup>-/-</sup> and control BM cells. (H) Average percentage of HSCs that grow *in vitro* of 3 independent experiments. (I) Differential counts in absolute numbers for CFC types in *Hoxa*<sup>-/-</sup> and control BM (2 femurs and tibiae). \*P<0.05, LT-HSC=long-term HSC, ST-HSC=short-term HSC, MPP=multipotent progenitor, CMP=common myeloid progenitor, GMP=granulocyte monocyte progenitor, MEP=megakaryocyte erythroid progenitor, M=macrophage, GM=granulocyte monocyte, G=granulocyte, E=erythroid, GEMM=granulocyte erythroid megakaryocyte macrophage.



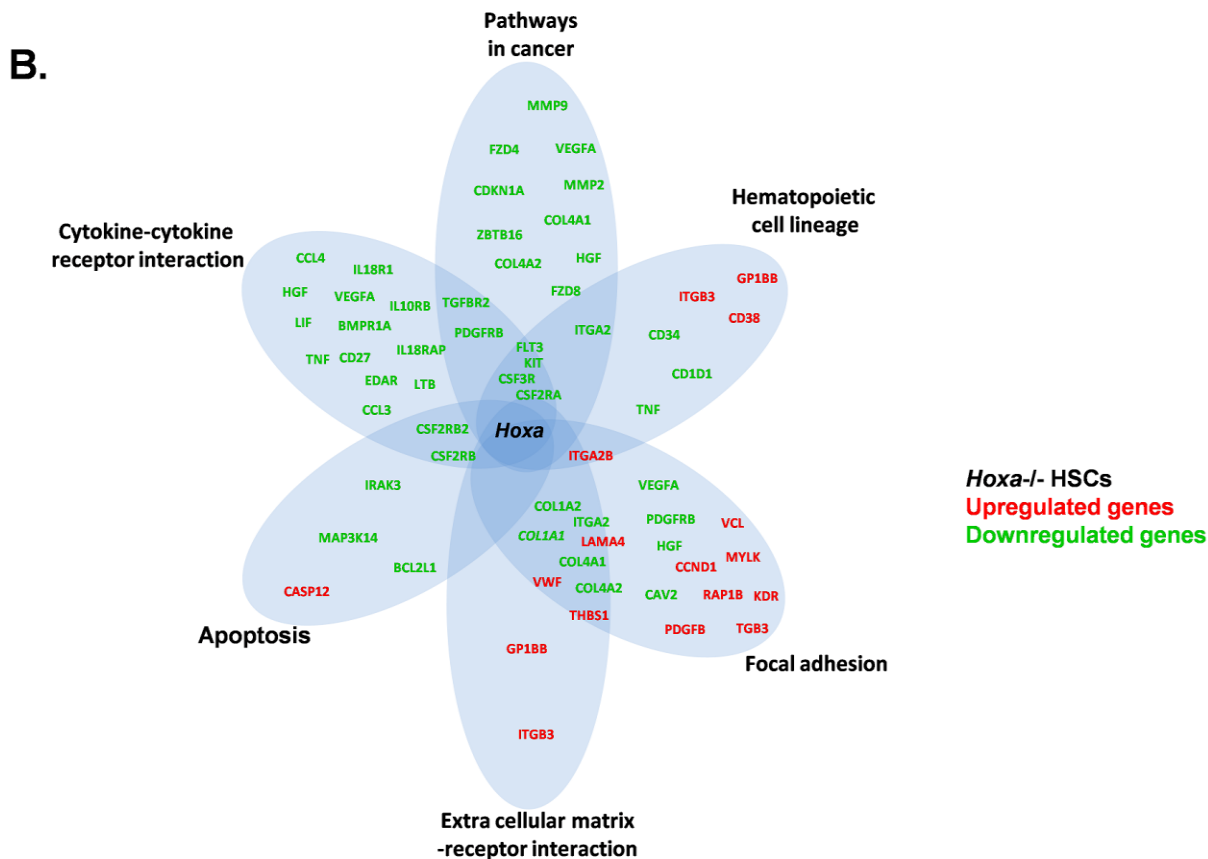
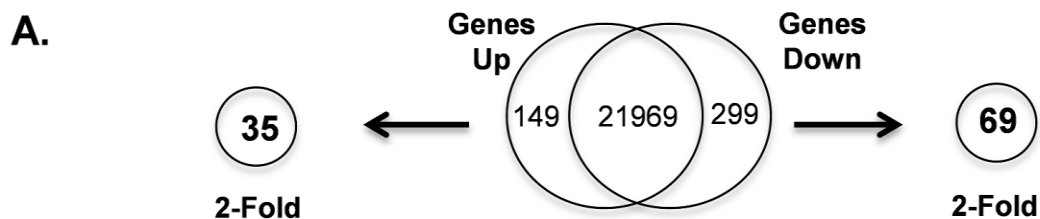
**Figure 3 Engraftment of *Hoxa*<sup>-/-</sup> and control HSCs.** (A) Experimental design of excision and evaluation of engraftment. (B, C) Kinetics of engraftment for control (n=15) and *Hoxa*<sup>-/-</sup> (n=14) HSCs evaluated by the percentage of CD45.2 cells in the peripheral blood. (D) Contribution of *Hoxa*<sup>-/-</sup> (n=9) and control (n=15) HSCs (CD45.2) to the B cell (B220+), myeloid (Mac1+), T cell (CD3+) and erythroid (Ter119+) lineages in the peripheral blood of BM chimeras 20 weeks post-transplantation. (E) Levels of engraftment for *Hoxa*<sup>-/-</sup> (n=10) and control (n=15) HSCs in the BM, spleen and thymus of recipient mice at sacrifice (~24 weeks). (F) Percentage of donor derived B cells (B220+) in the BM and spleen plotted for individual mice. (G) Average percentage of donor derived B cells (B220+) in control (n=15) and high (>50%; n=2), medium (25-50%; n=2) and low (5-25%; n=6) engrafted *Hoxa*<sup>-/-</sup> cells. Note that decrease of engraftment is associated with reduced percentage of B cells. (H-J) The percentage of myeloid cells and T cell subpopulations of *Hoxa*<sup>-/-</sup> derived cells that are modulated compared to control donor cells in the indicated organs. (K-M) Percentage of engraftment of *Hoxa*<sup>-/-</sup> (n=12) and control (n=8) BM cells sorted from primary recipient mice 24 weeks post-transplantation. \* P<0.05, PB = peripheral blood, Spl = spleen, Thy = thymus.



**Figure 4** Cell cycle and apoptosis analysis for *Hoxa<sup>-/-</sup>* and control HSCs and multipotent progenitors. (A) FACS plots showing the percentage of proliferating (Ki-67+) cells and the fraction of cells in the G0, G1 and S-G2/M phase of the cell cycle. Average percentage of (B)

LT-HSCs and **(C)** MPPs in different phases of the cell cycle based on Ki-67 and Dapi staining (n=5 for each genotype). **(D)** Experimental design of BrdU pulse (24h) in control and *Hoxa*<sup>-/-</sup> mice. Average percentage of **(E)** LT-HSCs and **(F)** MPPs that are in different phases of the cell cycle based on BrdU and 7-AAD staining (n=4 for each genotype). **(G)** FACS plots of annexin V/7-AAD staining showed the percentage of apoptotic and dead cells for LT-HSCs and MPPs. Average percentage of **(H)** LT-HSCs and **(I)** MPPs that are in different phases of apoptosis based on annexin V and 7-AAD (n=5 for each genotype).

\*P<0.05, LT-HSC = long-term hematopoietic stem cell, MPP = multipotent progenitor.



**Figure 5 Differentially expressed genes in *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs. (A)** Venn diagram showing the total number of genes and genes that are >2-fold downregulated or upregulated in *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs. **(B)** Picture of differentially expressed genes that are involved in biological processes as determined by functional annotation cluster analysis for KEGG pathways, using the DAVID platform.



## TABLES

Table 1 Engraftment of *Hoxa*<sup>-/-</sup> and control BM cells

	mouse #	PB	BM	Spleen	Thymus	Engraftment
<b><i>Hoxa</i><sup>-/-</sup></b>	2	3.47	1.66	3.17	0.31	No
	3	6.22	4.18	4.68	0.70	Low
	4	39.85	21.05	34.49	67.68	Medium
	5	18.33	14.23	10.55	12.76	Low
	6	6.38	6.27	3.22	0.33	Low
	7	0.44	0.66	0.32	0.02	No
	8*	2.66	6.06	1.48	42.10	No
	9	6.43	2.46	4.33	0.05	Low
	10	76.50	36.34	64.74	87.21	High
	11	17.74	5.06	11.44	0.61	Low
	12	45.54	33.27	35.07	89.07	Medium
	13	1.28	1.26	0.78	3.77	No
	14	0.12	0.94	0.01	0.00	No
	15	80.79	17.58	45.97	88.73	High
	<b>Control</b>	16	82.87	42.24	67.58	94.16
17		89.65	50.70	83.99	98.20	High
18		90.67	46.43	75.61	93.23	High
19		90.41	39.13	68.58	96.04	High
20		81.49	30.11	68.38	88.04	High
21		87.20	49.20	74.08	97.86	High
22		90.21	47.82	75.84	92.90	High
23		93.47	44.28	82.75	98.01	High
24		95.58	47.26	79.44	98.09	High
25		94.72	51.56	82.83	96.84	High
26		93.39	45.41	79.24	98.13	High
27		91.01	55.85	77.50	97.65	High
28		91.89	50.17	80.09	97.36	High
29		93.10	45.75	84.32	97.73	High
30		93.39	42.84	78.34	97.02	High

Engraftment is considered >5% donor cell contribution in the PB and presence of myeloid and lymphoid cells. Low: 5-25%; medium: 25-50%; high: >50% donor cells in PB. \*Data from mouse 8 have been used for lineage analysis in the primary hematopoietic organs. PB = peripheral blood, BM = bone marrow.

**Table 2 Percentage of hematopoietic cell populations in reconstituted recipient mice of *Hoxa*<sup>-/-</sup> and control BM 24 weeks post-transplantation.**

	Control (n=15)			<i>Hoxa</i> <sup>-/-</sup> (n=10)		
	BM	Spleen	Thymus	BM	Spleen	Thymus
<b><i>B cells</i></b>						
B220 <sup>+</sup> /CD43 <sup>-</sup>	18.37 ± 5.24	67.40 ± 4.04		7.82 ± 4.91*	34.85 ± 21.24*	
B220 <sup>+</sup> /CD43 <sup>+</sup>	1.96 ± 0.38	1.63 ± 0.44		1.54 ± 0.58	1.61 ± 0.67	
B220 <sup>+</sup> /IgM <sup>+</sup>	11.42 ± 2.82	29.04 ± 4.02		6.16 ± 2.62*	17.54 ± 7.16*	
B220 <sup>+</sup> /IgM <sup>+</sup>	10.04 ± 2.78	40.68 ± 2.84		4.52 ± 3.18*	20.34 ± 14.93*	
<b><i>T cells</i></b>						
CD4 <sup>+</sup>		17.40 ± 1.70	9.05 ± 1.29		28.40 ± 10.53*	19.53 ± 13.31*
CD8 <sup>+</sup>		10.63 ± 1.62	5.50 ± 0.94		16.09 ± 3.92*	11.81 ± 6.88*
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		0.34 ± 0.16	82.34 ± 2.37		0.99 ± 1.01	50.06 ± 29.17*
<b><i>Myeloid cells</i></b>						
Mac1 <sup>+</sup>	13.40 ± 1.67	2.52 ± 0.57		19.81 ± 8.60*	6.53 ± 7.19	
Mac1 <sup>+</sup> /Gr1 <sup>+</sup>	47.80 ± 6.87	0.42 ± 0.18		37.94 ± 12.87*	0.95 ± 1.26	
<b><i>Erythroid cells</i></b>						
Ter119	8.93 ± 3.16	4.04 ± 1.74		19.07 ± 12.50*	6.47 ± 5.25	

\*P<0.05

**Table 3 Twenty most down- and upregulated genes in *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs**

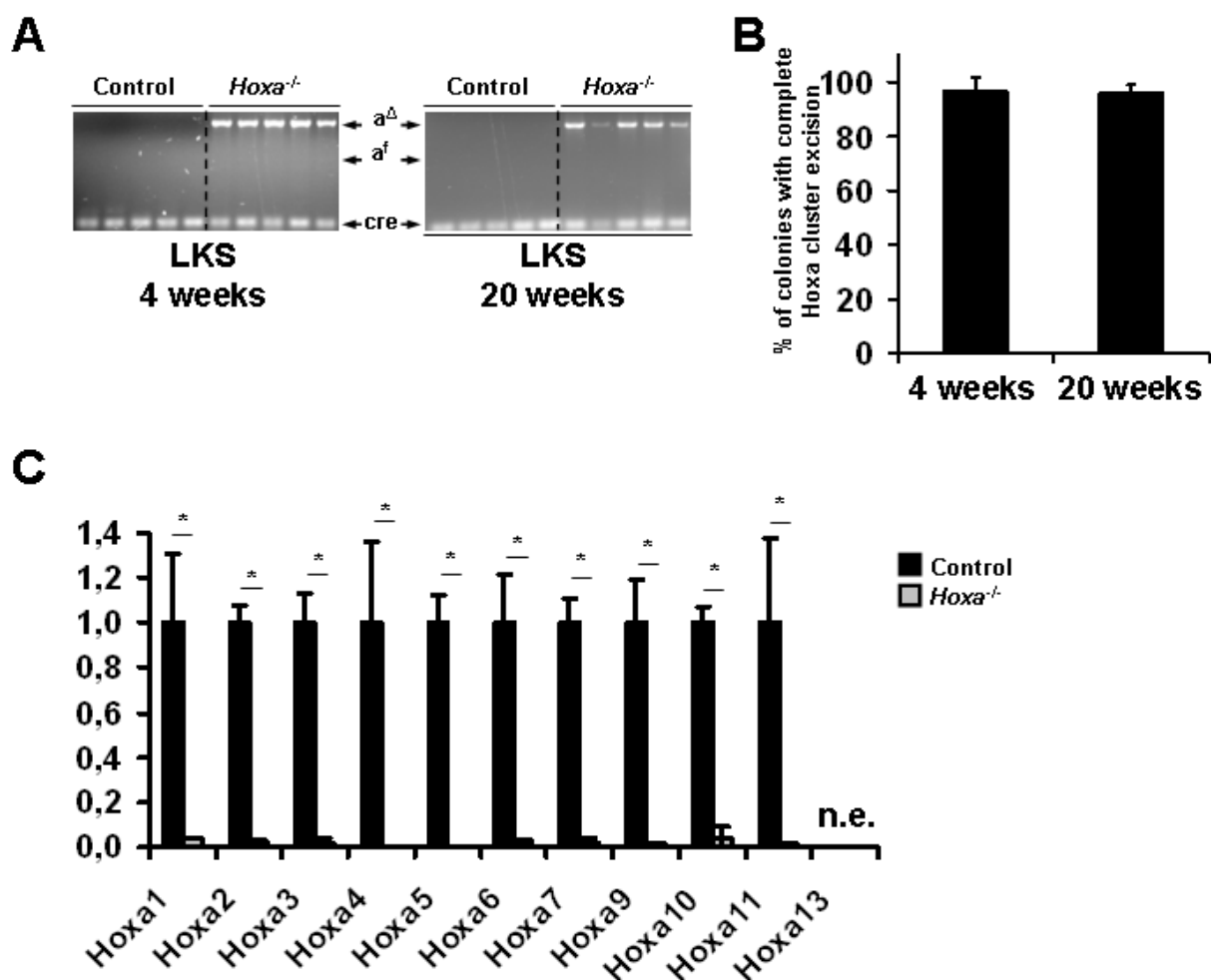
id	Gene name	foldChange	padj
<b>Downregulated genes</b>			
Hnf4a	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha	61.03	7.61E-51
Col1a1	Collagen Type I, alpha 1	20.95	2.20E-16
Meg3	maternally expressed 3	15.14	7.06E-24
Rian	maternally expressed 8	8.62	7.69E-07
Sparc	Osteonectin	7.31	9.62E-06
Smtnl1	Smoothelin-like 1	6.86	3.78E-05
Vldlr	Very low density lipid receptor	5.85	4.40E-32
Emcn	Endomucin	5.09	2.72E-14
Paqr5	Progesterin and adipoQ receptor V	4.94	6.15E-12
Kcnd3	Potassium voltage-gated channel D3	4.56	1.95E-02
Cd69	CD69, calcium dependent lectin II	4.41	4.40E-27
P2ry10	Purinergic receptor P2Y	4.17	4.37E-03
Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	4.04	8.40E-03
Dpp4	Dipeptidyl-peptidase 4	3.88	3.72E-18
Fscn1	Fascin homolog 1	3.61	1.82E-05
Pdgfrb	Platelet derived growth factor receptor b	3.58	2.45E-08
Itga2	Integrin alpha 2	3.31	5.64E-04
Rgnef	Rho guanine nucleotide exchange factor	3.30	1.20E-13
Fosl2	Fos-like antigen 2, Fra2	3.19	3.04E-03
Flt3	Fms-related tyrosine kinase 3	3.16	4.37E-04
<b>Upregulated genes</b>			
Arx	Aristales related homeobox	15.13	4.63E-02
Hoxb8	Homeobox gene b8	10.91	2.74E-09
Gm53		7.75	2.01E-02
Hoxb9	Homeobox gene b9	5.98	1.56E-06
Matn4	Matrilin 4	4.14	3.26E-04
1200009I06Rik		3.83	2.82E-05
Clu	Clusterin	3.79	4.99E-03
F10	Coagulation factor X	3.76	2.15E-05
Pde3a	Phosphodiesterase 3a	3.56	3.63E-02
Hoxb6	Homeobox gene b6	3.39	1.91E-02
Slpi	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	3.36	1.79E-04
Mv1	Murine retrovirus integration site 1	3.24	2.12E-11
Gpx8	Glutathione peroxidase 8	3.16	8.37E-03
Darc	Duffy blood group atypical chemokine receptor	3.11	7.04E-03
Prg2	Proteoglycan 2	3.01	8.83E-03
Alox5	Arachidonate 5 lipoxygenase	3.00	7.00E-03
Cxcr1	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1	2.93	6.69E-04
Alox12	Arachidonate 12 lipoxygenase	2.87	8.24E-04
Serpinb10-ps	Serpin peptidase inhibitor clade B, 10	2.86	2.47E-04
Cd38	CD38, ADP-Ribosyl Cyclase	2.75	1.22E-02

**Table 4 Differentially expressed genes in *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSC that map to KEGG pathways.**

<b>KEGG Pathway</b>	<b>Count</b>	<b>%</b>	<b>P-Value</b>	<b>Fold enrichment</b>	<b>FDR</b>
Focal Adhesion	16	3.66	0.0002	3.11	0.19
Hematopoietic cell lineage	10	2.29	0.0003	4.58	0.33
ECM-receptor interaction	9	2.06	0.0012	4.18	1.45
Cytokine-cytokine receptor interaction	16	3.66	0.0014	2.53	1.69
Vascular smooth muscle contraction	9	1.60	0.0119	2.89	13.15
MAPK signalling pathway	14	3.20	0.0187	2.03	19.89
Pathways in cancer	16	3.66	0.0188	1.91	19.96
Small cell lung cancer	7	1.60	0.0219	3.17	22.89
Cell adhesion molecules	9	2.06	0.0449	2.25	41.65
Acute myeloid leukemia	5	1.14	0.0586	3.38	50.77
Gap junction	6	1.37	0.0704	2.69	57.58
Apoptosis	6	1.37	0.0733	2.69	59.06
Alzheimer's disease	9	2.06	0.0973	2.66	69.93

FDR = False discovery rate

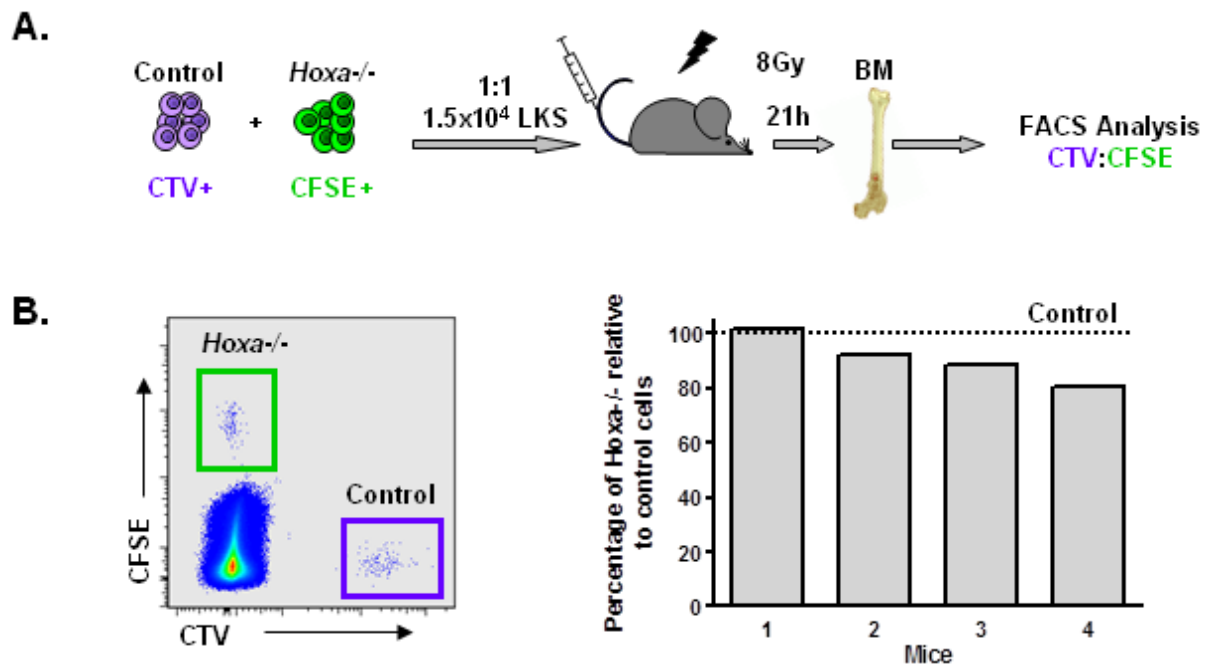
## SUPPLEMENTAL FIGURES



**Figure S1: *Hoxa* genes are Efficiently Deleted after pIpC Treatment**

**HSCs.** (A) PCR analysis show that LKS cells harboured the deletion of *Hoxa* clusters at one and five months after the last pIpC injections (n=5 for each genotype). (B) Seven injections of pIpC with a 2-day interval resulted in a near 100% deletion of both *Hoxa* alleles in methylcellulose colonies (n=50 colonies per 5 mice). (C) Expression of *Hoxa* mRNA in control (Mx1-Cre) compared to *Hoxa*<sup>-/-</sup> (Mx1-Cre/*Hox*<sup>flx/flx</sup>) in purified LKS shows a significant reduction in gene expression following conditional deletion. Values are shown of three biological replicates. N.e = no expression detected in control and *Hoxa*<sup>-/-</sup> LKS cells. (n=5 for each genotype)

\* P<0.05



**Figure S2: LKS *Hoxa*<sup>-/-</sup> cells efficiently homed to bone marrow after transplantation.**

(A) Setup for short-term homing experiment. (B) Representative FACS profiles of homed LKS *Hoxa*<sup>-/-</sup> CFSE and LKS control CTV cells 21 hours post transplantation in the same recipient. Short-term BM-homing efficiency of *Hoxa*<sup>-/-</sup> relative to control LSK cells. n=4 recipients.

## SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1 Percentage of mapped reads and their exome coverage of *Hoxa*<sup>-/-</sup> and MxCre HSCs

Library	Total Reads	Reads PF (%)	% $\geq$ Q30 bases (PF)	Mapped Reads	% mapped Reads (PF)	Exome coverage (%)
<i>Hoxa</i> <sup>-/-</sup> #1	109.47.988	88.1	84.74	65.323.627	67.71	22.80
<i>Hoxa</i> <sup>-/-</sup> #2	95.497.366	90.4	88.54	67.313.743	78.01	24.05
MxCre #1	122.666.986	86.8	76.45	44.768.036	42.04	15.52
MxCre #2	149.036.828	90.4	88.52	60.357.900	44.80	22.46

PF = Passed Filter

Table S2 Loss of *Hoxa* gene expression in HSCs following deletion of *Hoxa* cluster.

<b>Gene</b>	<b>RPKM value</b>	
	<b>Control</b>	<b><i>Hoxa</i><sup>-/-</sup></b>
<i>Hoxa1</i>	0,24	0,01
<i>Hoxa2</i>	1,75	0,00
<i>Hoxa3</i>	5,71	0,03
<i>Hoxa4</i>	1,62	0,00
<i>Hoxa5</i>	2,85	0,04
<i>Hoxa6</i>	6,47	0,00
<i>Hoxa7</i>	5,17	0,01
<i>Hoxa9</i>	12,90	0,13
<i>Hoxa10</i>	11,93	0,05
<i>Hoxa11</i>	0,05	0,00
<i>Hoxa13</i>	0,00	0,00

Note that genes with a RPKM<1 are not considered being expressed

Table S3 *Hoxb* gene expression is modulated in *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs.

<b>Gene</b>	<b>RPKM value</b>		<b>Fold</b>	<b>P-value</b>	<b>Significant</b>
	<b>Control</b>	<b><i>Hoxa</i><sup>-/-</sup></b>			
<i>Hoxb1</i>	0,03	0,03	NA	NA	no
<i>Hoxb2</i>	8,94	19,27	2,16	5,00E-05	yes
<i>Hoxb3</i>	8,04	8,21	1,02	8,64E-01	no
<i>Hoxb4</i>	3,18	4,22	1,33	6,68E-02	no
<i>Hoxb5</i>	4,40	8,66	1,97	1,00E-04	yes
<i>Hoxb6</i>	1,28	4,23	3,29	5,00E-05	yes
<i>Hoxb7</i>	0,35	1,23	3,48	1,04E-02	no
<i>Hoxb8</i>	0,34	3,54	10,49	5,00E-05	yes
<i>Hoxb9</i>	0,53	3,17	5,94	5,00E-05	yes
<i>Hoxb13</i>	0,00	0,00	NA	NA	no



Table S4. Functional categorization of differentially expressed genes in *Hoxa*<sup>-/-</sup> HSCs according to GO Term platform.

<b>Term</b>	<b>Count</b>	<b>%</b>	<b>PValue</b>	<b>Fold Enrichment</b>	<b>FDR</b>
Regulation of cell proliferation	32	7.323	1.18E-06	2.667	0.002
Phosphate metabolic process	42	9.611	3.45E-06	2.175	0.006
Intracellular signalling cascade	40	9.153	6.57E-05	1.960	0.112
Positive regulation of cell proliferation	19	4.348	6.67E-05	3.000	0.114
Negative regulation of cell differentiation	14	3.204	2.16E-04	3.450	0.368
Cell migration	16	3.661	3.12E-04	2.990	0.531
Regulation of lymphocyte activation	12	2.746	3.70E-04	3.737	0.630
Regulation of biosynthetic process	8	1.831	5.25E-04	5.606	0.891
Negative regulation of cell projection organization	5	1.144	8.75E-04	11.211	1.481
Positive regulation of apoptosis	15	3.432	0.001327	2.712	2.238
Cytokine-mediated signalling pathway	7	1.602	0.001464	5.606	2.466
Leukocyte migration	6	1.373	0.002529	6.257	4.224
TGFbeta receptor signaling pathway	6	1.373	0.004111	5.606	6.781
Cell adhesion	23	5.263	0.007199	1.839	11.587

FDR= False discovery rate

Table S5. Details of antibodies used for flow cytometry.

<b>Extra cellular staining</b>			
<b>Epitope</b>	<b>Clone</b>	<b>Conjugate</b>	<b>Company</b>
CD117 (c-kit)	2B8	APC	BioLegend
CD11b (Mac-1)	M1/70	Biotin	BioLegend
CD11b (Mac-1)	M1/70	PE	BioLegend
CD11b (Mac-1)	M1/70	Pacific Blue	BioLegend
CD127 (IL-7Ra)	A7R34	PE	eBioscience
CD135	A2F10	PE/Cy5	BioLegend
CD150 (SLAM)	TC15-12F12.2	PE/Cy7	BioLegend
CD16/32	93	PE/Cy7	BioLegend
CD19	1D3	PE/Cy7	BD BioScience
CD24	M1/69	PerCP/Cy5.5	BioLegend
CD244.2 (2B4B6 Alloantigen m2B4 (B6)458.1		FITC	BioLegend
CD34	RAM34	FITC	eBioscience
CD3e	145-2C11	Biotin	BioLegend
CD4	GK1.5	PE	BioLegend
CD4	GK1.5	APC/Cy7	BD BioScience
CD43	S7	FITC	BD BioScience
CD44	IM7	PE/Cy7	BioLegend
CD45.1 (Ly5.1)	A20	PE	BioLegend
CD45.2 (Ly 5.2)	104	Biotin	BioLegend
CD45.2 (Ly 5.2)	104	FITC	BioLegend
CD45.2 (Ly 5.2)	104	Pacific Blue	BioLegend
CD45R (B220)	RA3-6B2	APC/Cy7	BioLegend
CD48	HM48-1	Biotin	BioLegend
CD48	HM48-1	PE	BioLegend
CD8a	53-6.7	APC	BioLegend
CD8a	53-6.7	Biotin	BD BioScience
CD93 (AA 4.1)	AA4.1	PE	BD BioScience
IgD	11-26c.2a	Pacific Blue	BioLegend
Ly-51 (BP-1)	6C3	PE	BioLegend
Ly-6A/E (Sca-1)	E13-161.7	PE/Cy7	BioLegend
Ly-6A/E (Sca-1)	E13-161.7	Pacific Blue	BioLegend
Ly-6A/E (Sca-1)	E13-161.7	PerCP/Cy5.5	BioLegend
Ly-6G/Ly6C (Gr-1)	RB6-8C5	Biotin	BioLegend
Ly-6G/Ly6C (Gr-1)	R B6-8C5	FITC	BioLegend
NK-1.1	PK136	Biotin	BioLegend
CD71	RI7217	PE	BioLegend
TER-119	TER-119	APC	BioLegend
CD45R (B220)	RA3-6B2	Biotin	BioLegend
CD11b (Mac-1)	M1/70	Biotin	BioLegend
CD3e	145-2C11	Biotin	BioLegend
TER-119	TER-119	Biotin	BioLegend
Ly-6G/Ly6C (Gr-1)	RB6-8C5	Biotin	BioLegend
Annexin V		PE	BioLegend
<b>Intracellular staining</b>			
<b>Epitope</b>	<b>Clone</b>	<b>Conjugate</b>	<b>Company</b>
BrdU	Bu20a	PE	BioLegend
Ki-67	16A8	PE	BioLegend
<b>Streptavidin</b>			
<b>Epitope</b>		<b>Conjugate</b>	
Streptavidin		APC	BioLegend
Streptavidin		PE	BioLegend
Streptavidin		APC/Cy7	BioLegend
Streptavidin		PerCP/Cy5.5	BD BioScience
<b>Dye</b>			<b>Company</b>
7AAD			BD BioScience
DAPI			Life technologies
CFSE			Life technologies
CTV			Life technologies

## Chapitre 4 :

### Discussion, conclusion et perspectives

Plusieurs études ont déjà démontré l'implication des gènes *Hox* dans la régulation de l'hématopoïèse et ainsi que leur rôle dans de nombreux cas de leucémies. Par contre, leurs fonctions précises et leurs mécanismes d'action dans l'hématopoïèse adulte restent encore largement mal compris à ce jour. Nous avons choisi d'utiliser un modèle de souris comportant une délétion pour l'ensemble des gènes *Hoxa* afin d'explorer leur rôle dans l'hématopoïèse adulte et définir leurs mécanismes d'action au niveau des CSH. Le chapitre 4 est une discussion des résultats présentés dans les deux articles ci-dessus. Cette partie expose nos données et les compare avec celles retrouvées dans la littérature. Également, ce chapitre présente une interprétation des résultats et les perspectives à envisager pour la suite de l'étude.

#### 4.1) Profil d'expression des gènes *Hoxa* dans les populations de CSH et de progéniteurs primitifs (Article 1)

Plusieurs études ont déjà dressé le profil d'expression des gènes *Hox* au niveau des populations de cellules hématopoïétiques primitives (Bijl et al. 2006; Giampaolo et al. 1995; Giampaolo et al. 1994; Kawagoe et al. 1999; Moretti et al. 1994; Pineault et al. 2002; Sauvageau et al. 1994; Taghon et al. 2003).

Cependant, ces études ont analysé des populations cellulaires très hétérogènes puisqu'elles comprenaient à la fois des progéniteurs et des CSH. En effet, à l'époque, les marqueurs définissant les CSH étaient beaucoup moins précis qu'aujourd'hui et les techniques d'analyse d'expression de l'époque exigeaient l'utilisation de beaucoup plus de cellules. Cela ne permet pas de définir avec exactitude dans quelles populations les gènes *Hox* sont les plus exprimés (CSH ou progéniteurs) et donc à quelle étape ils seraient les plus importants. Aussi, dans ces analyses, la plupart des données d'expression sont présentées sous forme semi-quantitative (southern blot de ADNc ou RT-PCR), ce qui ne définit pas précisément l'expression des gènes *Hox* (Pineault et al. 2002; Sauvageau et al. 1994).

Nous avons utilisé une des techniques quantitatives les plus sensibles, soit la qRT-PCR pour dresser quantitativement le profil d'expressions des gènes *Hoxa* dans des populations hautement enrichies en CSH (CSH-LT et CSH-ST/MPP) et dans les progéniteurs primitifs tels que les CLP, CMP, GMP et MEP (Akashi et al. 2000; Kiel et al. 2005; Kondo, Weissman, and Akashi 1997; Osawa et al. 1996).

Dans un premier temps, nous avons montré que globalement, l'expression des gènes *Hoxa* diminue avec la différenciation des CSH en progéniteurs ce qui confirme donc les études précédentes (Argiropoulos and Humphries 2007). L'expression des gènes *Hoxa* est maximale au niveau des CSH-LT et diminue fortement chez les CSH-ST/MPP et progéniteurs subséquents. Une haute expression des gènes *Hoxa* dans les CSH-LT suggère donc que ces gènes sont associés aux fonctions des CSH-LT. De plus, les gènes *Hoxa* au centre du cluster sont fortement exprimés alors que les gènes *Hoxa* aux extrémités du cluster ne sont presque pas ou pas du tout exprimés. Cela indique que le principe de colinéarité n'est pas respecté durant la différenciation des cellules hématopoïétiques. De façon similaire aux gènes *Hoxa*, le principe de colinéarité ne semble pas être respecté pour l'expression des gènes *Hoxb* dans une population de cellules enrichies en CSH fœtales (Bijl et al. 2006). Durant le développement embryonnaire, le principe de colinéarité contrôle l'expression des gènes *Hox* dans l'espace et le temps et est essentiel pour définir de façon adéquate le positionnement des membres du corps le long de l'axe antéropostérieur. Tous les gènes *Hox* (*Hox1-Hox13*) ont donc un rôle qualitatif à jouer dans le positionnement spatial des segments du corps. Or, contrairement aux cellules embryonnaires, un positionnement spatial spécifique n'est pas nécessaire pour les cellules hématopoïétiques (le sang circule dans tout le corps). L'expression de gènes *Hox* de façon colinéaire ne semble donc pas devoir être respectée pour ce type de cellules. De ce fait, il est possible que l'expression des gènes *Hoxa* aux extrémités du cluster a possiblement perdue son importance avec l'évolution du système hématopoïétique.

Dans les CSH-LT, le gène *Hoxa9* affiche l'expression la plus élevée comparée à tous les autres gènes *Hoxa*. Cela indique que parmi tous les gènes *Hoxa*, *Hoxa9* est possiblement le gène le plus important pour les CSH-LT. Par conséquent, cette expression élevée du gène *Hoxa9* dans les CSH semble expliquer l'intensité du phénotype au niveau de l'hématopoïèse observée chez les souris mutantes (Izon et al. 1998; Lawrence et al. 2005; Lawrence et al. 1997).

La comparaison de l'expression des gènes *Hoxa* entre les CSH-LT et des CSH-ST/MPP, indique que l'expression de *Hoxa5* et *Hoxa10* est plus spécifiquement associée au CSH-LT. Nos données sont soutenues par d'autres études qui ont effectué l'analyse globale du profil d'expression des gènes dans les CSH et les progéniteurs. Elles ont aussi révélé que *Hoxa5* et *Hoxa10* font spécifiquement partie de la signature transcriptionnelle des CSH-LT. Ces recherches ont aussi démontré que *Hoxa9* était exprimé dans les CSH-LT et les CSH-ST, une observation que nous avons aussi confirmée (Chambers, Boles, et al. 2007; Forsberg et al. 2005; Ivanova et al. 2002).

Étonnamment, le niveau d'expression des gènes *Hoxa* est très similaire entre les CLP et les CMP. Cela suggère qu'à cette étape de l'hématopoïèse, l'expression des gènes *Hoxa* ne semble pas être impliquée dans l'engagement des progéniteurs vers la lignée myéloïde ou lymphoïde. Il est possible que l'engagement d'un progéniteur vers l'une ou l'autre des lignées puisse s'effectuer avant le stade des CMP ou CLP, par exemple, directement au niveau des CSH (CSH à dominance myéloïde versus CSH à dominance lymphoïde).

Dans le deuxième article, nous avons effectué une analyse globale du profil transcriptionnel des CSH-LT. Malgré quelques différences, les données d'expression issues du séquençage d'ARN (Article 2) corroborent avec le profil d'expression des gènes *Hoxa* réalisé par q-RT-PCR au niveau des CSH-LT (Article 1).

Il est bon de noter que l'expression d'un gène peut refléter l'importance de sa fonction au niveau d'une population cellulaire étudiée. Par contre, malgré une forte expression de certains gènes *Hoxa* dans les CSH, la fonction des protéines HOXA n'a pas été évaluée dans cette étude. Nous ne pouvons donc pas exclure que d'autres mécanismes de régulation post traductionnelle puissent aussi modifier la fonction des protéines HOXA.

## **4.2) Conséquences de l'ablation des gènes *Hoxa* sur les cellules hématopoïétiques : un effet dose dépendant (Article 1 et 2)**

Les souris mutantes pour un gène *Hox* présentent des phénotypes subtils au niveau des CSH ou de l'hématopoïèse en général, et ce, principalement à cause de la redondance fonctionnelle qui existe chez cette famille de gènes (Argiropoulos and Humphries 2007). Pour pallier à cet obstacle, nous avons muté la totalité du cluster *Hoxa*.

Les études des souris mutantes pour les gènes *Hox* durant l'embryogenèse ont démontré que les transformations homéotiques étaient dépendantes de la dose en protéines HOX (Chen and Capecchi 1997; Horan, Ramirez-Solis, et al. 1995; Zakany et al. 1997). L'utilisation des souris *Hoxa*<sup>+/-</sup> et *Mx-Cre/Hoxa*<sup>fllox/fox</sup> nous a permis d'étudier le rôle des gènes *Hoxa* dans l'hématopoïèse et de vérifier si l'intensité des phénotypes est proportionnelle à la diminution d'expression des gènes *Hoxa*. Pour valider nos modèles murins, nous avons confirmé dans un premier temps que les souris *Hoxa*<sup>+/-</sup> sont bien haploinsuffisantes étant donné que l'expression des gènes *Hoxa* est bien diminuée de moitié. Deuxièmement, suite à l'injection de pIpC dans le modèle *Mx-Cre/Hoxa*<sup>fllox/fox</sup>, nos données d'expression (q-RT-PCR et RNAseq) et de PCR (sur l'ADN génomique) démontrent que l'ablation des gènes *Hoxa* est quasi complète au niveau de la population de LKS et CSH-LT.

#### **4.2.1) L'effet de la perte des gènes *Hoxa* sur les cellules différenciées**

Une variation du nombre de cellules au niveau des organes hématopoïétiques est une des premières indications qui peut révéler un problème au niveau de l'hématopoïèse. Chez les souris *Hoxa*<sup>+/-</sup>, seule la rate présente une diminution du nombre de cellules comparativement à des souris contrôles. Le phénotype au niveau des souris *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup> est plus drastique puisque la circulation sanguine, la moelle osseuse, la rate et le thymus présentent tous une réduction du nombre de cellules. D'un point de vue quantitatif, la réduction du nombre de cellules dans les différents organes hématopoïétiques est donc proportionnelle au taux d'expression des gènes *Hoxa*.

Qui plus est, certaines lignées hématopoïétiques sont plus sensibles que d'autres face à une variation du taux d'expression des *Hoxa*. Cela est notamment le cas pour les cellules B (B220<sup>+</sup>) où leur nombre est légèrement réduit dans la rate des souris *Hoxa*<sup>+/-</sup>. Or, au niveau des souris *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup> une réduction plus drastique des cellules B est observée dans la circulation, la rate et la moelle osseuse. Le rôle des gènes *Hoxa* dans le développement normal des cellules B est aussi mis en évidence dans les tests de transplantation avec les cellules de moelle osseuse *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup>. Les souris reconstituées avec les cellules de moelle osseuse *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup> n'arrivent pas à régénérer correctement le bassin de cellules B dans la rate et la moelle osseuse.

Quelques défauts mineurs sont aussi observés au niveau des cellules myéloïdes chez les souris *Mx-Cre/Hoxa<sup>-/-</sup>*, ce qui indique que les gènes *Hoxa* ne semblent pas jouer un rôle primordial pour la différenciation de ces cellules.

Nous avons observé que l'érythroïèse adulte chez les souris *Mx-Cre/Hoxa<sup>-/-</sup>* était aussi peu affectée par la perte des gènes *Hoxa*. Or, l'étude de Di-Poi et al. a démontré que l'érythroïèse est affectée chez les souris nouveau-nées *Hoxa<sup>-/-</sup>*. Cette différence peut s'expliquer par le type de modèle de souris utilisé pour induire la délétion des gènes *Hoxa*. Dans l'étude de Di-Poi et al. les auteurs utilisent des souris Brachyury-Cre ce qui induit la délétion des gènes *Hoxa* très tôt dans le développement embryonnaire. Il est possible qu'un défaut rencontré au niveau des CSH embryonnaires ou dans l'érythroïèse fœtale ait des conséquences sur l'érythroïèse des souris néonatales *Hoxa<sup>-/-</sup>*. De plus, dans ce modèle de recombinaison Cre, la délétion se fait au niveau des cellules dérivées du mésoderme ce qui comprend les cellules des vaisseaux sanguins et des cellules stromales. *A contrario*, le modèle *Mx-Cre* induit la délétion des gènes *Hoxa* principalement dans les cellules hématopoïétiques, donc l'effet de la perte des gènes *Hoxa* est spécifique aux cellules hématopoïétiques. Il est donc possible que le phénotype observé dans l'érythroïèse chez les souris néonatales *Hoxa<sup>-/-</sup>* soit influencé par un défaut au niveau du microenvironnement embryonnaire ou de la moelle osseuse, suite à la perte des gènes *Hoxa* dans ces tissus. Finalement, il se peut que l'érythroïèse néonatale et adulte ait des programmes transcriptionnels distincts qui ne sont pas influencés de la même manière par la perte des gènes *Hoxa*.

Malgré quelques divergences au niveau des phénotypes entre les deux études, nos données et celles de Di-Poi et al. (Di-Poi et al. 2010) confirment aussi l'importance des gènes *Hoxa* dans la différenciation des cellules hématopoïétiques (Tableau 3).

Globalement, la différenciation de la lignée de cellules B est la plus sensible face aux variations du niveau d'expression des gènes *Hoxa*.

#### **4.2.2) Les progéniteurs de cellules B et les progéniteurs myéloïdes sont sensibles au niveau d'expression des gènes *Hoxa***

Une diminution du niveau d'expression des gènes *Hoxa* n'affecte pas seulement la différenciation terminale des cellules matures, mais aussi leurs progéniteurs.

Chez les souris *Hoxa*<sup>+/-</sup>, on observe une perte des progéniteurs de cellules B avec l'âge. Malgré une plus haute fréquence en progéniteur de cellules B chez ces jeunes souris *Hoxa*<sup>+/-</sup> (<5 mois) le pourcentage de cellules B (B220+) dans la moelle osseuse et la rate a légèrement diminué comparé aux souris contrôles de même âge (voir Figure 2c et 4a de l'article 1). Quant aux vieilles souris *Hoxa*<sup>+/-</sup> (15 mois), la perte en progéniteur de cellules B s'accompagne d'une forte réduction du nombre de cellules B220+ dans la moelle osseuse comparée aux souris contrôles de même âge (voir Figure S2 de l'article 1). Il semble donc que la plus haute fréquence en progéniteur B chez les jeunes *Hoxa*<sup>+/-</sup> ne permettent pas la production d'un plus grand nombre de cellules B dans la moelle osseuse et la rate. Les mécanismes par lesquels les cellules B matures sont affectées n'ont pas été identifiés, mais il pourrait s'agir d'un problème de différenciation des progéniteurs de cellules B en cellules B matures, d'une augmentation de l'apoptose ou d'un défaut de prolifération des progéniteurs.

Il est connu que *flt3* est essentiel pour les CLP et la génération des progéniteurs de cellules B (Holmes et al. 2006; Mackarehtschian et al. 1995; McKenna et al. 2000). Chez les souris *Hoxa9*<sup>-/-</sup>, le nombre de CLP est diminué et la génération des cellules B est aussi affectée, surtout à partir de la fraction pro-B (So et al. 2004). De plus, une étude de Gwin et al a démontré que *Hoxa9* régulait directement l'expression de *flt3* en se liant à son promoteur dans une lignée cellulaire lymphoïde et que chez les souris *Hoxa9*<sup>-/-</sup>, l'expression *flt3* était diminuée au niveau des CLP et des cellules B (Gwin et al. 2010). Il est donc très probable que chez les souris *Hoxa*<sup>+/-</sup> et *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup> un défaut au niveau de la régulation de *flt3* par *Hoxa9* soit un des mécanismes qui expliquent la perte des progéniteurs de cellules B et un défaut subséquent dans la génération de cellules B matures. Par contre, la mutation de tout le cluster *Hoxa* ne permet pas d'exclure que d'autres gènes *Hoxa* puissent accentuer le phénotype observé au niveau de la lignée B, via la dérégulation d'autres processus cellulaires, comme l'apoptose.

Les gènes *Hoxa* sont donc indispensables pour maintenir le nombre de progéniteurs B tout au long de la vie d'une souris et semblent spécialement importants dans les premières étapes de la lymphopoïèse B (progéniteur pré - pro B).

La réduction du nombre de progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse est aussi dépendante de la dose en gènes *Hoxa*. Chez les souris *Hoxa*<sup>+/-</sup>, les CMP, GMP et MEP ne sont presque pas affectés alors que chez les souris et *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup>, ces populations sont



sévèrement diminuées. Ces données corrélient aussi avec la réduction de la capacité de croissance des progéniteurs myéloïdes *Mx-Cre/Hoxa<sup>-/-</sup>* en méthylcellulose. La diminution du nombre de progéniteurs myéloïdes retrouvés en culture liquide (Article 1) suggère que leur capacité de prolifération est diminuée au profit de leur différenciation. Par contre, nous ne pouvons pas exclure qu'une augmentation de l'apoptose soit à l'origine de la réduction du nombre de progéniteurs myéloïdes *Hoxa<sup>+/-</sup>* dans la culture.

La raison pour laquelle les progéniteurs de cellules B semblent plus affectés que les progéniteurs myéloïdes n'a pas été encore élucidée. Il se pourrait que les gènes *Hoxa* affectent l'équilibre entre les CSH à dominance lymphoïde versus les CSH à dominance myéloïde et favorisent le maintien des CSH à dominance myéloïde (Challen et al. 2010; Dykstra et al. 2007; Muller-Sieburg et al. 2004).

### **4.2.3) En situation d'homéostasie, les CSH et les progéniteurs primitifs sont aussi affectés par la perte des gènes *Hoxa***

Nous avons démontré que le bassin de progéniteurs primitifs et de CSH est perturbé au niveau des souris adultes *Hoxa<sup>+/-</sup>* et *Mx-Cre/Hoxa<sup>-/-</sup>*.

Étrangement, nous avons observé une augmentation des populations primitives LKS et LKS- chez le mutant *Hoxa<sup>+/-</sup>*. Or, nous avons démontré que la différenciation des CSH en progéniteurs s'accompagne d'une diminution de l'expression des gènes *Hoxa* (Figure 1, Article 1). La baisse d'expression des gènes *Hoxa* dans les souris *Hoxa<sup>+/-</sup>* pourrait donc être responsable de la différenciation prématurée des CSH au détriment de leur maintien dans la moelle osseuse, ce qui aurait pour conséquence l'augmentation générale des populations LKS et LKS-. Le groupe de Denis Duboule (Di-Poi et al. 2010) a aussi décrit une augmentation similaire de la population LKS au niveau de la moelle osseuse de souris nouveau-nées *Hoxa<sup>-/-</sup>* ainsi qu'une augmentation des populations de CSH et MPP. *A contrario*, chez les souris *Hoxa<sup>+/-</sup>* nous observons une réduction drastique de la « side population », ce qui indique une diminution du nombre de CSH et de progéniteurs primitifs. Cette divergence entre les deux études peut provenir d'une différence au niveau des mécanismes de régulation des CSH dans l'hématopoïèse néonatale versus l'hématopoïèse adulte. De plus, la technique de la population SP se base sur la capacité des CSH à excréter le Hoechst 33342 via les transporteurs ABC. Donc, nous ne pouvons pas exclure que cette diminution de la population SP puisse aussi

provenir d'une quelconque influence des gènes *Hoxa* sur l'activité des transporteurs transmembranaires ABC et non d'une diminution réelle du nombre de CSH. Aussi, la fréquence des CSH-LT *Hoxa*<sup>+/-</sup> et des CSH- LT contrôle est la même lorsque définie par immunophénotype avec les marqueurs SLAM (données non indiquées dans l'article 1).

Le bassin de CSH et de MPP est plus sérieusement affecté par la perte des deux allèles *Hoxa*. L'analyse de la population CSH-LT et MPP avec les marqueurs SLAM aussi révèle que ces populations sont significativement diminuées chez les souris *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup>. La réduction de la population MPP a été confirmée par l'utilisation des marqueurs CD34 et FLT3, mais pas celle de la fraction CSH-LT. Toutefois, la divergence observée lors de l'analyse des CSH-LT avec ces deux cocktails de marqueurs pourrait provenir d'une influence directe des gènes *Hoxa* sur l'expression de ces marqueurs. En effet, il a été déterminé que *Hoxa9* était capable de réguler directement l'expression de *cd34* et *flt3* en se liant directement à leurs promoteurs (Gwin et al. 2010; Huang et al. 2012). De plus, nos données de séquençage d'ARN démontrent une baisse d'expression des gènes *cd34* (~2 fois) et *flt3* (~3 fois) dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> confirmant l'influence des gènes *Hoxa* sur ces deux marqueurs. Étant donné l'influence des gènes *Hoxa* sur les gènes codant pour *cd34* et *flt3*, l'analyse du bassin de CSH et de progéniteurs avec ces marqueurs pourrait biaiser les résultats obtenus. De plus, les CSH-LT définis qu'avec cette combinaison de marqueurs CD150<sup>+</sup>/CD48<sup>-</sup>/CD244<sup>-</sup>/LKS représentaient la fraction la plus enrichie en CSH à ce jour (avec une fréquence de 1: 2.1 CSH) (Kiel et al. 2005). Les marqueurs SLAM représentent donc la meilleure option disponible pour définir précisément le phénotype des CSH. Il est bon de souligner que dans notre RNAseq, l'expression de *slamf1* (qui code pour CD150) est légèrement augmentée (~1.5 fois) dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>.

Étonnamment, contrairement aux souris mutantes *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup>, les souris *Hoxa9*<sup>-/-</sup> présentent plutôt une augmentation phénotypique du pourcentage de CSH CD150<sup>+</sup>LKS au niveau de la moelle osseuse (Magnusson, Brun, Lawrence, et al. 2007). Il est possible que l'augmentation de la population de CSH CD150<sup>+</sup>LKS dans les souris *Hoxa9*<sup>-/-</sup> soit le résultat de mécanismes de compensation pour pallier à la réduction des fonctions des CSH *Hoxa9*<sup>-/-</sup> (Lawrence et al. 2005; Magnusson, Brun, Lawrence, et al. 2007). Il est possible d'envisager que cette compensation soit impossible chez les CSH *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup> du fait que leurs

fonctions soient trop sérieusement affectées, une idée qui est supportée par les résultats des tests de transplantation.

Les gènes *Hoxa* sont donc importants pour le maintien des CSH et des progéniteurs au niveau de la moelle osseuse lorsque le système hématopoïétique est en homéostasie.

#### 4.2.4) Les rôles des gènes *Hoxa* dans les CSH

Les analyses de transplantations avec des cellules de moelle osseuse *Hoxa*<sup>+/-</sup> et *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup> démontrent aussi que les fonctions des CSH adultes sont réduites proportionnellement au niveau d'expression des gènes *Hoxa*.

La cinétique et la capacité de reconstitution des CSH *Hoxa*<sup>+/-</sup> sont légèrement affectées lorsque qu'elles sont transplantées seules. Toutefois, les tests de transplantation en compétition révèlent clairement que la fonction des CSH *Hoxa*<sup>+/-</sup> est diminuée par rapport à celle des CSH de type sauvage. Ces tests ne permettent pas de déterminer si le nombre ou la capacité de homing de CSH *Hoxa*<sup>+/-</sup> est également réduit chez ces souris *Hoxa*<sup>+/-</sup>. Par contre, l'incapacité des cellules de type sauvages à reconstituer une souris *Hoxa*<sup>+/-</sup> non irradiée suggère que la niche de ces souris est entièrement occupée par des CSH *Hoxa*<sup>+/-</sup> et donc que leur nombre semble intacte. Ainsi, la perte d'un allèle *Hoxa* semble plutôt provoquer un défaut qualitatif plutôt que quantitatif sur les CSH. De plus, des cellules de type sauvage reconstituent parfaitement le système hématopoïétique d'une souris *Hoxa*<sup>+/-</sup> irradiée suggérant que la niche de ces souris est intacte et que le défaut des CSH *Hoxa*<sup>+/-</sup> est intrinsèque aux cellules. Aussi, les défauts affectant la fonction des CSH *Hoxa*<sup>+/-</sup> récapitulent sensiblement celui des CSH *Hoxa9*<sup>-/-</sup> puisque dans les deux cas, les CSH sont moins compétitives face à des CSH de type sauvage (Lawrence et al. 2005; Magnusson, Brun, Lawrence, et al. 2007). Cela indique donc que les défauts des CSH *Hoxa*<sup>+/-</sup> sont en partie dus à la diminution d'expression de *Hoxa9*.

Dans le cas de l'ablation complète des allèles *Hoxa*, la capacité de reconstitution des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> est sévèrement altérée puisque moins de la moitié des souris transplantées présente une reconstitution au niveau de la circulation sanguine. De plus, dans ces souris reconstituées, le pourcentage et la cinétique de reconstitution sont respectivement plus faibles et plus lents. Plusieurs souris présentent aussi une reconstitution passagère, ce qui suggère que

les CSH ne parviennent pas à se maintenir à long terme et présentent donc un défaut sévère au niveau de leur potentiel d'autorenouvellement. Cette affirmation est appuyée par le fait que, les cellules *Hoxa*<sup>-/-</sup> provenant d'un hôte primaire sont incapables de reconstituer un hôte secondaire ce qui indique que plus aucune CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> n'est fonctionnelle ou présente dans la moelle osseuse de l'hôte primaire. Les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> présentent donc un défaut majeur dans leur capacité d'autorenouvellement ce qui compromet leur maintien dans la moelle osseuse. Nous avons aussi démontré que le phénotype des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> ne provient pas d'un problème de homing. En effet, le homing des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> n'est pas affecté par la perte des gènes *Hoxa* puisque, 21 heures post transplantations, un pourcentage similaire de cellules *Hoxa*<sup>-/-</sup> et de cellules contrôles a migré jusqu'à la moelle osseuse d'une souris transplantée. Aussi, bien que la reconstitution s'effectue au niveau des lignées myéloïdes et lymphoïdes, la régénération de la lignée de cellules B est encore affectée dans les souris transplantées avec des cellules *Hoxa*<sup>-/-</sup>, ce qui suggère que le problème est intrinsèque aux cellules *Hoxa*<sup>-/-</sup>.

Dans l'étude de Di-Poi N et al, les auteurs ont aussi testé la capacité de reconstitution des cellules de foies fœtaux *Hoxa*<sup>-/-</sup>, mais dans une situation de compétition. Ils ont observé qu'environ 60% des souris étaient reconstituées avec les cellules mutantes et arrivaient donc à compétitionner avec les cellules de types sauvages. De plus, le pourcentage de reconstitution des cellules *Hoxa*<sup>-/-</sup> était relativement élevé (~60%) (Di-Poi et al. 2010). Cela suggère que les cellules de foies fœtaux sont moins sensibles que les cellules de moelle osseuse adultes à la perte des gènes *Hoxa*. La délétion des gènes *Hoxa* a donc un impact sur la fonction et la taille du bassin de CSH dans la moelle osseuse ce qui démontre le rôle central des gènes *Hoxa* dans l'hématopoïèse adulte, et surtout dans le maintien des CSH lors de stress hématopoïétique (transplantation).

Le défaut de l'autorenouvellement touchant les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> est bien plus sévère que celui observé avec les CSH *Hoxa*<sup>9</sup><sup>-/-</sup> ou tous autres mutants pour un gène *Hox* (Argiropoulos and Humphries 2007; Lawrence et al. 2005; Magnusson, Brun, Lawrence, et al. 2007). Cela indique que plusieurs gènes *Hoxa* orchestrent le programme d'autorenouvellement des CSH et que le cluster *Hoxb* n'est pas capable de pallier pour la perte des gènes *Hoxa*. Par contre, à ce stade, nos données ne nous permettent pas d'identifier spécifiquement quels sont les gènes *Hoxa* essentiels aux CSH. Les gènes *Hoxa* ont des séquences très similaires et des rôles redondants. Il est donc possible de penser que les gènes *Hoxa* n'agissent pas de façon

individuelle, mais plutôt en tant que groupe de gènes pour réguler les fonctions des CSH. De plus, identifier les gènes *Hoxa* qui joueraient en particulier une fonction essentielle dans le maintien des CSH adultes semble difficile à cause de la redondance fonctionnelle. Par contre, en se basant sur les études d'expression des gènes *Hoxa* dans les CSH et les études fonctionnelles, il est possible de spéculer sur le rôle central de certains gènes *Hoxa*. En effet, les études de gain de fonction ont révélé que les gènes *Hoxa4*, *a9* et *a10* sont capables d'induire l'autorenouvellement des CSH, ce qui laisse supposer qu'ils peuvent réguler ce processus au niveau physiologique. De plus, nos données d'expression sur les gènes *Hoxa* ainsi que d'autres études (Chambers, Boles, et al. 2007; Forsberg et al. 2005; Ivanova et al. 2002; Toren et al. 2005) ont démontré que certains gènes *Hoxa* (*Hoxa10*, *Hoxa9*, *Hoxa7*, *Hoxa5*, *Hoxa2*) sont hautement ou préférentiellement exprimés dans les CSH, ce qui suggère qu'ils pourraient jouer un rôle dans ces cellules. Il semble donc que les gènes *Hoxa* proximaux (*Hoxa10*, *Hoxa9*, *Hoxa7*, *Hoxa5*, *Hoxa2*) soient les plus importants pour réguler la fonction des CSH contrairement aux gènes distaux (*Hoxa13*, *Hoxa11*, *Hoxa1*).

Finalement, les CSH de foie fœtal ont pour but l'expansion du bassin de CSH alors que les CSH de moelle osseuse doivent maintenir leur nombre dans la moelle osseuse. De plus, les CSH provenant de foie fœtal et les CSH de moelle osseuse n'ont pas le même programme transcriptionnel (Bowie, Kent, Dykstra, et al. 2007). Il est donc possible que deux combinaisons différentes de gènes *Hoxa* soient respectivement impliquées dans la régulation des CSH de foie fœtal et des CSH de la moelle osseuse.

### **4.3) Mécanismes d'action des gènes *Hoxa* (Article 2):**

La comparaison du profil transcriptionnel des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> et des CSH contrôles par séquençage d'ARN a révélé que les protéines *Hoxa* sont capables de réguler directement ou indirectement un vaste groupe de gènes. Nous avons remarqué que les gènes *Hoxa* sont capables d'influencer diverses voies de signalisation. Plus particulièrement, les gènes *Hoxa* affectent les voies des cytokines ce qui peut influencer la prolifération, la différenciation et la survie des CSH et des progéniteurs. De plus, les gènes *Hoxa* semblent pouvoir moduler plusieurs protéines impliquées dans l'interaction des CSH avec leur niche hématopoïétique.

### 4.3.1) Les gènes *Hoxa* affectent les voies des cytokines

Nous avons démontré qu'*in vitro*, un plus faible pourcentage de CSH était capable de croître en réponse à des facteurs de croissance et des cytokines (SCF, IL-3 et IL-6). Ces données corrélaient aussi avec la diminution du nombre de CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> qui sont dans le cycle cellulaire (marquages au Ki-67). Il est donc possible que les CSH et progéniteurs *Hoxa*<sup>-/-</sup> répondent moins bien à des cytokines présentes dans leur environnement, ce qui peut avoir des conséquences sur la prolifération, la différenciation et la survie de ces cellules.

En effet, nos données d'expression supportent cette idée. Les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> présentent une réduction de l'expression des gènes *Csf2rb* (qui code pour une des chaînes du récepteur de l'IL-3), *c-kit* (récepteur pour SCF), et *flt3* (récepteur pour le ligand FLT3). Bien que les CSH n'expriment pas le récepteur FLT3 à leur surface, les CSH-ST et de nombreux progéniteurs l'expriment. Par contre, il est bon de noter qu'une diminution d'expression de l'ARN des gènes *Csf2rb*, *c-kit* et *flt3* ne reflète pas nécessairement une diminution d'expression de ces récepteurs à la surface des CSH et/ou progéniteurs. C'est notamment le cas de *c-kit* qui expose une diminution d'ARN d'environ 1,6 fois dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> comparées aux CSH contrôles, mais l'expression du récepteur C-KIT à la surface des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> semble intacte. Il a été démontré que l'IL-3 est capable de promouvoir la survie de diverses lignées cellulaires (Baffy et al. 1993; Rodriguez-Tarduchy, Collins, and Lopez-Rivas 1990). De plus, nos données ont démontré qu'un plus haut pourcentage de CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> était en apoptose. Il est donc possible qu'une diminution de l'expression de *Csf2rb* dans les *Hoxa*<sup>-/-</sup> induit une diminution d'expression du récepteur de l'IL-3 à leur surface. Ainsi, l'incapacité à répondre convenablement à l'IL-3 pourrait donc être un mécanisme qui déclenche l'apoptose chez les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>. Une diminution d'expression de plusieurs gènes codant pour des récepteurs de cytokine peut donc être à l'origine des effets observés sur la prolifération et la survie des CSH et des progéniteurs *Hoxa*<sup>-/-</sup>.

Nous avons aussi observé que les cellules B et leurs progéniteurs étaient particulièrement affectés par la perte des gènes *Hoxa*. Il est connu que les CLP et les progéniteurs de cellules B sont sensibles à l'expression de *flt3* et *c-kit* (Mackaretschian et al. 1995; McKenna et al. 2000; Parcels et al. 2006; Ray et al. 1996; Waskow et al. 2002). Bien que nous n'ayons pas formellement vérifié l'expression de *flt3* et *c-kit* dans les CLP et les

progéniteurs de cellules B, il est possible de penser que l'expression de ces récepteurs soit aussi diminuée dans ces cellules. Il semble donc probable qu'une diminution d'expression de *flt3* et *c-kit* puisse être un des mécanismes par lequel les CLP et le développement des cellules B soient affectés suite à la perte des gènes *Hoxa*. Qui plus est, il est connu que ces cytokines peuvent agir de façon synergique pour promouvoir la prolifération des progéniteurs primitifs de la lignée lymphoïde (Parcells et al. 2006). Une diminution modérée de plusieurs récepteurs de cytokines peut ainsi se solder par une amplification du phénotype au niveau des progéniteurs.

L'expression de plusieurs autres récepteurs des cytokines et des facteurs de croissance (IL-10rb, IL-18r1, TNF, TGFbr2, Pdgfrb, etc) capable d'affecter la prolifération, la différenciation et la survie des cellules hématopoïétiques est aussi perturbée suite à la perte des gènes *Hoxa*. De plus, les gènes *Hoxa* n'affectent pas seulement l'expression des récepteurs de cytokine mais directement l'expression de chimiokines (*ccl3* et *ccl4*) et de facteurs de croissance (*Vegfa*) ayant des rôles dans l'hématopoïèse (Cook 1996; Hattori et al. 2001; Rehn et al. 2011). Cela démontre donc que les gènes *Hoxa* sont capables de réguler un vaste réseau de gènes impliqués dans les voies de signalisation des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance.

#### **4.3.2) Les gènes *Hoxa* sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose**

En plus des récepteurs des cytokines, les gènes *Hoxa* peuvent réguler l'expression de gènes directement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose.

En effet, un des acteurs importants dans la régulation du cycle cellulaire est le gène *Cdkn1a* qui code pour la protéine p21. La délétion des gènes *Hoxa* induit une réduction de l'expression de *Cdkn1a*, un gène régulant le passage de la phase G1 à S. En période d'homéostasie, p21 n'est pas essentiel au maintien des CSH. Par contre, il a été démontré que *Cdkn1a* était important pour la récupération des CSH suite à un stress au niveau de leur ADN (dommage à l'ADN) (Cheng et al. 2000; Foudi et al. 2009; van Os et al. 2007). De plus, dans une lignée cellulaire myéloïde, *Hoxa10* contrôle directement l'expression du gène *Cdkn1a* en se liant à son promoteur, induit un arrêt du cycle cellulaire et promeut la différenciation en macrophage (Bromleigh and Freedman 2000). Il se peut donc que la diminution d'expression

de *Cdkn1a* dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> puisse affecter l'autorenouvellement des CSH lorsqu'elles sont dans des situations de stress.

*Vldlr* est un des gènes dont l'expression est fortement diminuée dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> comparées aux CSH contrôles. De plus, lors d'analyses du profil global d'expression des gènes dans les CSH, plusieurs groupes ont associé l'expression de *Vldlr* au CSH-LT, ce qui suggère que ce gène joue une fonction au niveau des CSH (Chambers, Boles, et al. 2007; Forsberg et al. 2005). Or, le rôle de *Vldlr* dans l'hématopoïèse n'a pas encore été analysé. Par contre, le récepteur *Vldlr* joue un rôle dans la maintenance des cellules endothéliales microvasculaires via l'inhibition de leur cycle cellulaire (Oganesian et al. 2008). Il est donc possible de penser que *Vldlr* puisse participer au maintien des CSH en contrôlant leur état de quiescence dans la moelle osseuse.

L'analyse du cycle cellulaire avec le BrdU suggère que les CSH-LT *Hoxa*<sup>-/-</sup> ont un taux de prolifération légèrement plus élevé que les CSH-LT contrôles. Ce résultat semble diverger du marquage au Ki-67 qui suggère une quiescence accrue des CSH-LT *Hoxa*<sup>-/-</sup> comparée aux CSH contrôles. Un marquage au BrdU et au Ki-67 permet d'étudier le cycle cellulaire, mais ces deux techniques n'analysent pas le cycle cellulaire de la même façon. Le marquage au Ki-67 analyse le cycle cellulaire à un temps précis afin d'obtenir le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle. Quant au BrdU, il permet de mesurer le pourcentage de cellules qui ont incorporé le BrdU durant une période d'exposition définie (24h dans notre cas) suite à leur entrée en phase S. Le BrdU mesure donc la cinétique des cellules alors que le Ki67 mesure le statut du cycle cellulaire à un temps précis. Il est possible que la perte des gènes *Hoxa* affecte l'entrée en cycle des CSH-LT *Hoxa*<sup>-/-</sup> ce qui serait en accord avec le plus grand pourcentage de CSH-LT *Hoxa*<sup>-/-</sup> quiescente dans le profil de Ki-67. Par contre, le pourcentage de CSH-LT *Hoxa*<sup>-/-</sup> qui est capable d'entrer en cycle pourrait possiblement proliférer plus rapidement que les CSH-LT contrôles, ce qui expliquerait le plus haut pourcentage de CSH-LT *Hoxa*<sup>-/-</sup> en phase S dans le marquage au BrdU. De plus, il a déjà été démontré que dans la moelle osseuse adulte, environ 70% CSH-LT étaient en en G0 (Wilson et al. 2008). Dans le profil avec le marquage au Ki-67, le pourcentage de CSH-LT contrôle en G0 semble bas (27%) par rapport aux CSH-LT retournées dans la moelle osseuse d'une souris de type sauvage. Or, il est connu qu'un traitement au pIpC induisait l'entrée en cycle des CSH-LT (Essers et al. 2009). Il est donc possible que les CSH-LT *Hoxa*<sup>-/-</sup> et CSH-LT contrôles



réagissent différemment à une induction du cycle cellulaire par le pIpC. Un Marquage au Hoechst 33342 et à la Pyronin Y des CSH-LT *Hoxa*<sup>-/-</sup> et CSH-LT contrôles donnerait l'occasion de distinguer la phase G0 et G1 comme avec le Ki-67 ce qui permettrait d'affirmer ou d'infirmer la validité des résultats avec le Ki-67.

Nous avons démontré qu'un plus haut pourcentage de CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> était en apoptose comparé aux CSH contrôles. Or, la perte des gènes *Hoxa* cause une augmentation de l'expression de la *Caspase 12*, une protéine qui peut jouer un rôle proapoptotique (Lamkanfi, Kalai, and Vandenabeele 2004). De plus, la délétion des gènes *Hoxa* influence négativement l'expression d'autres gènes (*Irak3*, *Map3k14* et *Bcl2l1*) impliqués dans la cascade de signalisation de l'apoptose ou de la survie. Par contre, nous ne sommes pas en mesure de définir si les gènes *Hoxa* ont directement un effet antiapoptotique sur les CSH ou si la perturbation d'autres processus cellulaires (comme l'autorenouvellement) est à l'origine du déclenchement de la mort cellulaire.

### **4.3.3) Plusieurs facteurs de transcription ayant une fonction connue dans l'hématopoïèse sont régulés par les gènes *Hoxa***

L'expression de plusieurs facteurs de transcription jouant un rôle dans les CSH ou dans la différenciation des lignées hématopoïétiques est perturbée dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>.

Les facteurs de transcription *Egr1* et *Hes* sont capables d'influencer la prolifération des CSH/progénéiteurs hématopoïétiques (Guiu et al. 2013; Min et al. 2008; Yu et al. 2006). Or, l'expression de *Egr1*, *Egr2*, et *Egr3* et de *Hes1* est réduite dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> ce qui pourrait contribuer au défaut de prolifération observé chez les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>. On constate aussi une diminution de l'expression de *Sox4* et *Nfkbid* dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>. Il a été démontré que *Sox4* est important pour la survie des cellules Pro-B et que *Nfkbid* est nécessaire pour le développement des cellules B1 B (Arnold et al. 2012; Schilham et al. 1996; Smith and Sigvardsson 2004; Sun et al. 2013). Nous pouvons donc penser que si la diminution d'expression de *Sox4* et *Nfkbid* s'effectuent aussi durant le développement des cellules B, il est possible que ce changement d'expression ait des répercussions sur le phénotype observé au niveau des cellules B.

De plus, il a déjà été démontré que l'expression des gènes *Egr* et *Sox4* pouvait être modulée par *Hoxa9*, ce qui pourrait expliquer la diminution d'expression de ces facteurs de transcription suite à la perte des gènes *Hoxa* (Huang et al. 2012).

#### **4.3.4) Les gènes *Hoxa* influencent la relation des CSH avec leur niche**

La comparaison du profil transcriptionnel des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> et des CSH contrôles a révélé que les gènes *Hoxa* régulent aussi l'expression de plusieurs gènes ayant une association avec la niche hématopoïétique. Le microenvironnement de la moelle osseuse supporte le maintien des CSH adultes tout au long de la vie d'un individu. En effet, la niche procure un support physique ainsi que des signaux extrinsèques qui vont permettre de réguler l'état de quiescence des CSH et leur différenciation lorsque nécessaire. Un équilibre de ces signaux va être important pour convenablement contrôler l'autorenouvellement des CSH dans le but de promouvoir des divisions de types asymétriques et conserver au moins une cellule avec les propriétés des CSH. Dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la modulation et l'interaction de la niche est affectée, ce qui indique que la relation des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> avec leurs environnements est altérée.

##### **4.3.4.1) Les gènes *Hoxa* régulent des gènes participant à la formation ou au remodelage de la MEC**

Le collagène est un des constituants de la MEC. Dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>, l'expression de *Col4a1* (RPKM contrôle= 14.2 Vs RPKM *Hoxa*<sup>-/-</sup>=10.0), *Col4a2* (RPKM contrôle = 14.7 Vs RPKM *Hoxa*<sup>-/-</sup>=9.9), *Colla1* (RPKM contrôle= 2,1 Vs RPKM *Hoxa*<sup>-/-</sup>= 0,1) et *Colla2* (RPKM contrôle= 4,6 Vs RPKM *Hoxa*<sup>-/-</sup>= 2,0) est diminuée comparativement aux CSH contrôles. Dans notre étude de RNAseq, nous avons considéré qu'un gène n'était pas exprimé lorsqu'il a une expression en RPKM<1. Bien que l'expression de gènes *Col* soit considérée moyenne, elle n'est pas marginale, ce qui suggère que cette diminution d'expression des gènes *Col* dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> pourrait affecter leurs fonctions. Deux études sur le profil transcriptionnel des CSH et de leurs progéniteurs ont défini que l'expression de *Col4a1*, *Col4a2* et *Colla2* était spécifiquement associée au CSH-LT (Chambers, Boles, et al. 2007; Forsberg et al. 2005). De plus, il a été proposé que les CSH-LT sont en mesure de modifier leur propre environnement immédiat en sécrétant des protéines de la matrice extracellulaire et en exprimant des ligands

ou récepteurs de surface (Forsberg et al. 2005). Les gènes *Hoxa* semblent donc être des acteurs importants dans la production de collagène dans l'environnement. En effet, dans des cellules myéloïdes, la surexpression de *Nup98-Hoxa9* induit une augmentation de l'expression de *Col4a2* (Ghannam et al. 2004). Une autre étude a également démontré que dans des lignées cellulaires, HOXB1 en association avec PBX1 ou PREP est capable de lier directement le promoteur de *Col5a2*, ce qui laisse penser que les gènes *Hoxa* peuvent, eux aussi, réguler directement l'expression des gènes *Col* (Penkov et al. 2000). Cette idée est corroborée par une analyse bio-informatique du promoteur de *Colla2* qui révèle que le promoteur de ce gène détient un site potentiel de liaison pour *Hoxa5*.

Contrairement aux collagènes qui contribuent à l'architecture de la MEC, les métalloprotéases matricielles (MMP) sont essentielles à la dégradation de la MEC. De plus, les MMP jouent un rôle important dans la régulation de plusieurs processus cellulaires comme la prolifération ou la migration des CSH (Rodriguez, Morrison, and Overall 2010; Shirvaikar, Marquez-Curtis, and Janowska-Wieczorek 2012). L'expression de *Mmp2* et *Mmp9* est réduite dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>. Il a été démontré que la mutation de *Mmp9* affectait la capacité de prolifération et de différenciation des CSH (Heissig et al. 2002). De plus, *Mmp2* est nécessaire pour les cellules stromales de la moelle osseuse afin qu'elles conservent leur effet chimiotactique sur les progéniteurs pro-B (Clutter, Fortney, and Gibson 2005). Il est donc possible que la diminution d'expression de *Mmp2* et *Mmp9*, suite à la perte des gènes *Hoxa*, altère des fonctions comme la prolifération ou la migration des CSH et des progéniteurs de cellules B.

Les gènes *Hoxa* régulent plusieurs gènes impliqués dans la construction ou la dégradation de la MEC. Les gènes *Hoxa* sont donc essentiels pour les CSH puisqu'ils vont moduler leur microenvironnement immédiat.

#### **4.3.4.2) Des molécules d'adhésion sont affectées par la perte des gènes *Hoxa***

Via des molécules d'adhésion, les CSH et progéniteurs effectuent des interactions de type cellules-cellules et de type cellules-MEC. La fonction principale de ces interactions est de maintenir les CSH à proximité des cellules de la niche et de contrôler le nombre de divisions des CSH. De plus, ces molécules d'adhésion jouent un rôle dans le homing des cellules. La majorité de ces molécules d'adhésion sont capables de relayer des signaux intracellulaires via

l'activation de cascades de signalisation. Ces récepteurs participent donc activement à la rétention, à la division et au homing des CSH. Nous avons observé que la perte des gènes *Hoxa* dans les CSH affecte l'expression de plusieurs gènes codant pour des molécules d'adhésion.

Notamment, l'expression de l'intégrine *Itga2* (CD49b) est diminuée tandis que celle de *Itga2b* (CD41), *Itgb2* (CD18) et *Itgb3* (CD61) est augmentée dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>. Or, plusieurs études supportent les rôles de ces intégrines dans les CSH. En effet, la différence d'expression de ITGA2 (CD49b) permet de discriminer les CSH (CD49b<sup>-</sup>) ayant un potentiel de reconstitution à long terme (CSH-LT) et les CSH (CD49b<sup>+</sup>) dotées d'une capacité de reconstitution passagère (CSH-IT/CSH-ST) (Benveniste et al. 2010; Wagers and Weissman 2006). Par contre, ce profil d'expression de ITGA2 n'est pas maintenu d'une espèce à l'autre, puisque chez l'humain, les CSH CD49b<sup>+</sup> issues du sang de cordon sont les cellules dotées d'un potentiel de reconstitution à long terme (Wong et al. 2013). De plus, ITGB3 est associé à la fonction des CSH puisque son expression corrèle avec l'état de quiescence des CSH et leur potentiel de reconstitution à long terme (Umemoto et al. 2006, 2008). Une augmentation d'expression de *Itgb3* dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> pourrait donc être à l'origine de l'augmentation du pourcentage de CSH en G0 observée dans les souris *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup> (marquage au Ki-67). Également, la signalisation via l'intégrine CD11b (composée de la sous-unité *Itgb2*) peut influencer la polarité des neutrophiles (Szczer, Zheng, and Filippi 2009). Or, la polarité est capable d'agir sur le type de division qu'une cellule souche va effectuer (symétrique versus asymétrique) (Florian and Geiger 2010). Il est donc possible que le changement d'expression des intégrines puisse influencer la polarité des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> et ainsi influencer leur potentiel d'autorenouvellement. Qui plus est, durant l'embryogenèse, ITGA2B marque le début de l'hématopoïèse définitive et contribue à la fonction des CSH (Dumon et al. 2012). Les gènes *Hoxa* sont aussi capables de réguler directement l'expression de certaines intégrines. En effet, en collaboration avec PBX2, HAXA10 active la transcription des *Itgb3* pendant la différenciation d'une lignée de cellules myéloïdes humaines (Bei et al. 2007).

D'autres protéines, comme la Vinculine (VCL), l'endomucine (EMCN), et CD34, jouent aussi un rôle dans l'adhésion ou la migration des CSH et des progéniteurs (Doyonnas et al. 2005; Drew et al. 2005; Matsubara et al. 2005; Nielsen and McNagny 2007, 2008; Ohmori

et al. 2010). Les gènes *Hoxa* régulent aussi l'expression de ces gènes, ce qui pourrait affecter la reconstitution des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>.

Suite à la perte des gènes *Hoxa*, il se produit une dérégulation de l'expression de plusieurs molécules d'adhésion, ce qui peut affecter la relation des CSH avec leur niche, ainsi que leurs transports. Cette dérégulation peut donc possiblement affecter l'état de quiescence, la capacité d'autorenouvellement ou de migration des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>.

En somme, il semble que le phénotype rencontré au niveau des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> émerge d'une accumulation de défauts engendrés par la perturbation de plusieurs voies de signalisation.

#### **4.4) Quels gènes du cluster *Hoxa* sont les plus importants pour la fonction des CSH adultes**

Nous avons déterminé le rôle des gènes *Hoxa* en tant que groupe de gènes, mais nous n'avons pas identifié quel gène *Hoxa* était le plus important pour la fonction des CSH. Pour tester l'importance d'un gène *Hoxa*, nous pourrions vérifier si l'expression ectopique d'un seul de ces gènes dans des cellules *Hoxa*<sup>-/-</sup> peut compenser la perte du cluster *Hoxa* et restaurer les fonctions des CSH *Hoxa*.

*Hoxa9* et *Hoxa4* sont connus pour induire l'expansion des CSH lorsque surexprimées (Fournier et al. 2012; Thorsteinsdottir et al. 2002). Nous avons donc testé si *Hoxa9* ou *Hoxa4*, pouvaient restaurer les fonctions des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>. Pour se faire, nous avons surexprimé *Hoxa9* ou *Hoxa4* à l'aide de vecteurs viraux *MSCV-Hoxa9-pgk-EGFP* et *MSCV-Hoxa4-pgk-EGFP* dans des cellules de Lin<sup>-</sup> *Hoxa*<sup>-/-</sup>. Les cellules GFP<sup>+</sup> ont alors été transplantées dans des souris irradiées et nous avons suivi la reconstitution au niveau du sang périphérique sur une période de 16 semaines. Des cellules *Hoxa*<sup>+/+</sup> surexprimant le vecteur vide *MSCV-pgk-EGFP* ont été utilisées comme contrôles positifs. Nos données préliminaires nous indiquent que certains gènes *Hoxa* ont une fonction plus importante que d'autres pour les CSH. En effet, les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>/*Hoxa4*-GFP<sup>+</sup> sont incapables de reconstituer une souris irradiée alors que les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>/*Hoxa9*-GFP<sup>+</sup> peuvent le faire de façon partielle. Cela indique que certains gènes *Hoxa* (notamment *Hoxa9*) sont indispensables à l'autorenouvellement des CSH. De plus, une

reconstitution partielle des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>/*Hoxa9*-GFP<sup>+</sup> indique que pour avoir une fonction totalement normale, l'expression d'une combinaison particulière de gènes *Hoxa* est nécessaire. En plus de *Hoxa9*, les gènes *Hoxa5*, *a7* et *a10* font aussi partie des gènes *Hoxa* les plus exprimés au niveau des CSH-LT (Article 1). Cela indique qu'ils font probablement partie des gènes *Hoxa* les plus importants pour les CSH-LT. Une expression ectopique de *Hoxa9* en combinaison avec *Hoxa5* ou *a7* ou *a10* pourrait possiblement permettre de restaurer complètement la fonction des CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup>.

#### **4.5) Influence des séquences non codantes présentes dans le cluster *Hoxa***

Le cluster *Hoxa* contient aussi plusieurs ARN non codant (ARNnc) comme *Mir-196b* et *HOTAIRMI* (Li et al. 2012; Zhang et al. 2009). Il est connu que les MicroARN sont capables de réguler plusieurs processus dans les cellules hématopoïétiques et dans les CSH (Garzon and Croce 2008). La délétion du cluster *Hoxa* élimine non seulement les gènes *Hoxa*, mais aussi les séquences des ARN non codant *HOTAIRMI* et *mir-196b*. *HOTAIRMI* est un long ARN non codant qui se situe entre *HOXA1* et *HOXA2*. Il a été démontré que ce ARNnc joue un rôle dans la myélopoïèse (Zhang et al. 2009). Quant à *mir-196b*, son rôle n'a pas été formellement exploré dans l'hématopoïèse normale ou au sein des CSH. Par contre, il a été démontré que *mir-196b* peut réguler l'expression des gènes *Hoxa9*, *Meis1* et *Fas* dans les cellules leucémiques (Li et al. 2012; Velu, Baktula, and Grimes 2009). De plus, dans une lignée cellulaire, il a été démontré que *mir-196b* pouvait induire la répression de *Hoxb8* ce qui pourrait expliquer l'augmentation d'expression de *Hoxb8* dans les CSH *Hoxa*<sup>-/-</sup> (Yekta, Shih, and Bartel 2004). Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que la délétion de *HOTAIRMI* et *mir-196b* puisse contribuer au phénotype observé dans les souris *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup>. Par contre, des résultats préliminaires (résultats non décrits dans la thèse) ont démontré que la moelle osseuse *Hoxa*<sup>-/-</sup> surexprimant *Mir-196b* est incapable de reconstituer un hôte irradié. Ces résultats suggèrent que *Mir-196b* est incapable de restaurer le phénotype au niveau des CSH, et donc ce microARN ne semble pas avoir un rôle essentiel dans la régulation des CSH.

## 4.6) Compensation fonctionnelle du cluster *Hoxb*

Le phénomène de compensation fonctionnelle a précédemment été mis en évidence dans l'étude des souris mutantes pour ces gènes dans l'embryogenèse et l'hématopoïèse.

Au niveau de la moelle osseuse des souris *Hoxa*<sup>+/-</sup>, l'expression des gènes *Hoxa4*, *a5*, *a7* et *a9* est diminuée de moitié, ce qui signifie que la copie fonctionnelle restante des gènes *Hoxa* n'est pas en mesure de compenser cette diminution d'expression. De plus, suite à la perte d'un allèle *Hoxa*, l'expression des gènes *Hox* des clusters B, C et D reste la même dans les progéniteurs MEP. Il semble donc que même au niveau des populations hématopoïétiques primitives, aucun phénomène de compensation directe n'existe pour pallier à la perte d'un allèle *Hoxa*. Seule, l'expression du cofacteur *Meis1* est significativement plus élevée dans les MEP *Hoxa*<sup>+/-</sup>.

Par contre, les données du séquençage d'ARN révèlent une augmentation significative de l'expression des gènes *Hoxb2*, *b5*, *b6*, *b8* et *b9* au niveau des CSH *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup> comparativement aux CSH contrôles. Ces données indiquent que des mécanismes de compensation sont initiés par les gènes du cluster *Hoxb* pour tenter de contrebalancer l'effet de la perte des gènes *Hoxa* sur la fonction des CSH. Or, l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes *Hoxb* n'est pas en mesure de corriger le phénotype des CSH *Mx-Cre/Hoxa*<sup>-/-</sup>, ce qui confirme l'importance des gènes *Hoxa* dans le maintien des fonctions des CSH.

**Tableau 3** : Résumé des phénotypes des diverses populations cellulaires chez les souris *Hoxa*<sup>+/-</sup>, *Hoxa*<sup>-/-</sup> et *Hoxa9*<sup>-/-</sup>

		Souris mutantes			
		<i>Hoxa</i> <sup>+/-</sup> adulte	<i>Hoxa</i> <sup>-/-</sup> de BM adulte	<i>Hoxa9</i> <sup>-/-</sup>	<i>Hoxa</i> <sup>-/-</sup> de FL
Population de cellules affectées	HSC	+	+++	+	++
	Progéniteurs primitifs	ND	+++	+	++
	Progéniteurs de cellules B	++	+++	+	++
	Cellules B	+	+++	+	++
	Progéniteurs myéloïdes	-	+++	+	++
	Cellules myéloïdes	+	+	+	++
Références		Lebert-Ghali et al. 2010	Lebert-Ghali et al. non publié	Izon et al. 1998; Lawrence et al. 2005; Lawrence et al. 1997	Di-Poi et al. 2010

+++ : Fortement affecté

++ : Moyennement affecté

+ : Légèrement affecté

- : Inchangé

ND= Non déterminé



## Conclusion et perspectives

La survie d'un individu repose sur le bon fonctionnement de son système hématopoïétique puisque ce dernier assure des fonctions vitales comme la défense immunitaire ou le transport de l'oxygène. Les facteurs essentiels à l'hématopoïèse et les mécanismes qui régulent ce système sont encore mal définis. Comme nous l'avons mentionné précédemment, le but de cette thèse est de caractériser le rôle des gènes *Hoxa* dans l'hématopoïèse adulte et de mettre en lumière leurs mécanismes de régulation.

En résumé, nous avons démontré que les gènes *Hoxa* sont importants pour le maintien des CSH, des progéniteurs primitifs et des progéniteurs de cellules B. Tout particulièrement, la perte des gènes *Hoxa* affecte l'autorenouvellement des CSH ainsi que leur survie dans la moelle osseuse. À l'aide de techniques modernes de biologie moléculaire, nous avons réussi à illustrer les mécanismes moléculaires, jusqu'ici non caractérisés, par lesquels les gènes *Hoxa* régulent la fonction des CSH. Notre analyse a révélé que les gènes *Hoxa* modulent l'expression de plusieurs gènes qui sont associés aux récepteurs de cytokines, à l'adhérence et aux interactions avec l'MEC. Les gènes *Hoxa* sont donc nécessaires aux CSH pour leur permettre d'entretenir des interactions adéquates avec leur niche et maintenir leur nombre et leurs fonctions au cours du temps dans la moelle osseuse. L'ensemble de nos résultats démontre que les gènes *Hoxa* sont donc d'importants régulateurs multifonctionnels de l'hématopoïèse adulte.

Cette étude a permis d'élargir nos connaissances sur les rôles et les mécanismes d'action des gènes *Hoxa* dans les CSH et l'hématopoïèse. Cependant, plusieurs questions persistent : Dans l'hématopoïèse, y a-t-il des gènes *Hoxa* qui sont plus importants que d'autres ? Quels sont les gènes directement régulés par les protéines HOXA ? Les gènes *Hoxa* régulent-ils les mêmes voies de signalisation dans les progéniteurs de cellules B que dans les CSH ? Les mécanismes de régulations des gènes *Hoxa* sont-ils conservés d'une espèce à l'autre et notamment chez l'humain ?

De plus, cette étude a aussi fourni une nouvelle base de travail pour comprendre les rôles et les mécanismes d'action des gènes *Hoxa* dans les leucémies. De façon similaire aux CSH, les gènes *Hoxa* sont-ils essentiels pour le maintien des cellules souches leucémiques ? Si certaines leucémies se révèlent dépendantes des gènes *Hoxa*, cela pourrait conduire à

l'élaboration de nouveaux traitements ciblant spécifiquement la voie des gènes *Hoxa* et favoriser un meilleur taux de suivi des patients atteints de cette maladie. Une question persiste, comment cibler spécifiquement les gènes *Hoxa* dans les cellules souches leucémiques sans affecter le maintien des CSH? Dans le futur, d'autres études seront nécessaires pour répondre à ces questions.

## Bibliographie

- Adolfsson, J., O. J. Borge, D. Bryder, K. Theilgaard-Monch, I. Astrand-Grundstrom, E. Sitnicka, Y. Sasaki, and S. E. Jacobsen. 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):659-69.
- Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C. T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O. J. Borge, L. A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson, and S. E. Jacobsen. 2005. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121 (2):295-306.
- Affolter, M., M. Slattery, and R. S. Mann. 2008. A lexicon for homeodomain-DNA recognition. *Cell* 133 (7):1133-5.
- Afonja, O., J. E. Smith, Jr., D. M. Cheng, A. S. Goldenberg, E. Amorosi, T. Shimamoto, S. Nakamura, K. Ohyashiki, J. Ohyashiki, K. Toyama, and K. Takeshita. 2000. MEIS1 and HOXA7 genes in human acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 24 (10):849-55.
- Akashi, K., X. He, J. Chen, H. Iwasaki, C. Niu, B. Steenhard, J. Zhang, J. Haug, and L. Li. 2003. Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* 101 (2):383-9.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I. L. Weissman. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404 (6774):193-7.
- Akdis, M., S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares, C. Rhyner, N. Ouaked, A. Schaffartzik, W. Van De Veen, S. Zeller, M. Zimmermann, and C. A. Akdis. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 127 (3):701-21 e1-70.
- Alharbi, R. A., R. Pettengell, H. S. Pandha, and R. Morgan. 2013. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* 27 (5):1000-8.
- Allman, D., A. Sambandam, S. Kim, J. P. Miller, A. Pagan, D. Well, A. Meraz, and A. Bhandoola. 2003. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* 4 (2):168-74.
- Allsopp, R. C., G. B. Morin, R. DePinho, C. B. Harley, and I. L. Weissman. 2003. Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* 102 (2):517-20.
- Allsopp, R. C., G. B. Morin, J. W. Horner, R. DePinho, C. B. Harley, and I. L. Weissman. 2003. Effect of TERT over-expression on the long-term transplantation capacity of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 9 (4):369-71.
- Amsellem, S., F. Pflumio, D. Bardin, B. Izac, P. Charneau, P. H. Romeo, A. Dubart-Kupperschmitt, and S. Fichelson. 2003. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med* 9 (11):1423-7.
- Andreeff, M., V. Ruvolo, S. Gadgil, C. Zeng, K. Coombes, W. Chen, S. Kornblau, A. E. Baron, and H. A. Drabkin. 2008. HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML. *Leukemia* 22 (11):2041-7.

- Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R. K. Humphries. 2001. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp Hematol* 29 (9):1125-34.
- Repeated Author. 2002. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 109 (1):39-45.
- Arai, F., A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G. Y. Koh, and T. Suda. 2004. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118 (2):149-61.
- Argiropoulos, B., and R. K. Humphries. 2007. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 26 (47):6766-76.
- Argiropoulos, B., E. Yung, and R. K. Humphries. 2007. Unraveling the crucial roles of Meis1 in leukemogenesis and normal hematopoiesis. *Genes Dev* 21 (22):2845-9.
- Arnold, C. N., E. Pirie, P. Dosenovic, G. M. McInerney, Y. Xia, N. Wang, X. Li, O. M. Siggs, G. B. Karlsson Hedestam, and B. Beutler. 2012. A forward genetic screen reveals roles for Nfkbid, Zeb1, and Ruvbl2 in humoral immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (31):12286-93.
- Arranz, L., A. Herrera-Merchan, J. M. Ligos, A. de Molina, O. Dominguez, and S. Gonzalez. 2012. Bmi1 is critical to prevent Ikaros-mediated lymphoid priming in hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 11 (1):65-78.
- Auvray, C., A. Delahaye, F. Pflumio, R. Haddad, S. Amsellem, A. Miri-Nezhad, L. Broix, A. Yacia, F. Bulle, S. Fichelson, and I. Vigon. 2012. HOXC4 homeoprotein efficiently expands human hematopoietic stem cells and triggers similar molecular alterations as HOXB4. *Haematologica* 97 (2):168-78.
- Ayton, P. M., and M. L. Cleary. 2003. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev* 17 (18):2298-307.
- Bach, C., S. Buhl, D. Mueller, M. P. Garcia-Cuellar, E. Maethner, and R. K. Slany. 2010. Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood* 115 (14):2910-8.
- Baffy, G., T. Miyashita, J. R. Williamson, and J. C. Reed. 1993. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem* 268 (9):6511-9.
- Bai, X. T., B. W. Gu, T. Yin, C. Niu, X. D. Xi, J. Zhang, Z. Chen, and S. J. Chen. 2006. Trans-repressive effect of NUP98-PMX1 on PMX1-regulated c-FOS gene through recruitment of histone deacetylase 1 by FG repeats. *Cancer Res* 66 (9):4584-90.
- Balazs, A. B., A. J. Fabian, C. T. Esmen, and R. C. Mulligan. 2006. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. *Blood* 107 (6):2317-21.
- Bannister, A. J., and T. Kouzarides. 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384 (6610):641-3.
- Bansal, D., C. Scholl, S. Frohling, E. McDowell, B. H. Lee, K. Dohner, P. Ernst, A. J. Davidson, G. Q. Daley, L. I. Zon, D. G. Gilliland, and B. J. Huntly. 2006. Cdx4 dysregulates Hox gene expression and generates acute myeloid leukemia alone and in cooperation with Meis1a in a murine model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (45):16924-9.

- Becker, A. J., Culloch Ea Mc, and J. E. Till. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197:452-4.
- Bedford, D. C., L. H. Kasper, T. Fukuyama, and P. K. Brindle. 2010. Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases. *Epigenetics* 5 (1):9-15.
- Beerman, I., D. Bhattacharya, S. Zandi, M. Sigvardsson, I. L. Weissman, D. Bryder, and D. J. Rossi. 2010. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (12):5465-70.
- Beerman, I., C. Bock, B. S. Garrison, Z. D. Smith, H. Gu, A. Meissner, and D. J. Rossi. 2013. Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell* 12 (4):413-25.
- Bei, L., Y. Lu, S. L. Bellis, W. Zhou, E. Horvath, and E. A. Eklund. 2007. Identification of a HoxA10 activation domain necessary for transcription of the gene encoding beta3 integrin during myeloid differentiation. *J Biol Chem* 282 (23):16846-59.
- Bei, L., Y. Lu, and E. A. Eklund. 2005. HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91Phox during myeloid differentiation. *J Biol Chem* 280 (13):12359-70.
- Benveniste, P., C. Cantin, D. Hyam, and N. N. Iscove. 2003. Hematopoietic stem cells engraft in mice with absolute efficiency. *Nat Immunol* 4 (7):708-13.
- Benveniste, P., C. Frelin, S. Janmohamed, M. Barbara, R. Herrington, D. Hyam, and N. N. Iscove. 2010. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* 6 (1):48-58.
- Benz, C., M. R. Copley, D. G. Kent, S. Wohrer, A. Cortes, N. Aghaeepour, E. Ma, H. Mader, K. Rowe, C. Day, D. Treloar, R. R. Brinkman, and C. J. Eaves. 2012. Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell* 10 (3):273-83.
- Berger, M. F., G. Badis, A. R. Gehrke, S. Talukder, A. A. Philippakis, L. Pena-Castillo, T. M. Alleyne, S. Mnaimneh, O. B. Botvinnik, E. T. Chan, F. Khalid, W. Zhang, D. Newburger, S. A. Jaeger, Q. D. Morris, M. L. Bulyk, and T. R. Hughes. 2008. Variation in homeodomain DNA binding revealed by high-resolution analysis of sequence preferences. *Cell* 133 (7):1266-76.
- Bernstein, E., E. M. Duncan, O. Masui, J. Gil, E. Heard, and C. D. Allis. 2006. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol* 26 (7):2560-9.
- Bertoncello, I., G. S. Hodgson, and T. R. Bradley. 1985. Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells: I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on the basis of rhodamine-123 fluorescence. *Exp Hematol* 13 (10):999-1006.
- Beslu, N., J. Kros, M. Laurin, N. Mayotte, K. R. Humphries, and G. Sauvageau. 2004. Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood* 104 (8):2307-14.
- Bhandoola, A., H. von Boehmer, H. T. Petrie, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2007. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 26 (6):678-89.

- Bijl, J., A. Thompson, R. Ramirez-Solis, J. Kros, D. G. Grier, H. J. Lawrence, and G. Sauvageau. 2006. Analysis of HSC activity and compensatory Hox gene expression profile in Hoxb cluster mutant fetal liver cells. *Blood* 108 (1):116-22.
- Bjornsson, J. M., N. Larsson, A. C. Brun, M. Magnusson, E. Andersson, P. Lundstrom, J. Larsson, E. Repetowska, M. Ehinger, R. K. Humphries, and S. Karlsson. 2003. Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in Hoxb3 and Hoxb4. *Mol Cell Biol* 23 (11):3872-83.
- Blank, U., G. Karlsson, and S. Karlsson. 2008. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* 111 (2):492-503.
- Blank, U., G. Karlsson, J. L. Moody, T. Utsugisawa, M. Magnusson, S. Singbrant, J. Larsson, and S. Karlsson. 2006. Smad7 promotes self-renewal of hematopoietic stem cells. *Blood* 108 (13):4246-54.
- Blank, U., and S. Karlsson. 2011. The role of Smad signaling in hematopoiesis and translational hematology. *Leukemia* 25 (9):1379-88.
- Bock, T. A. 1997. Assay systems for hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 15 Suppl 1:185-95.
- Borge, O. J., V. Ramsfjell, O. P. Veiby, M. J. Murphy, Jr., S. Lok, and S. E. Jacobsen. 1996. Thrombopoietin, but not erythropoietin promotes viability and inhibits apoptosis of multipotent murine hematopoietic progenitor cells in vitro. *Blood* 88 (8):2859-70.
- Borrow, J., A. M. Shearman, V. P. Stanton, Jr., R. Becher, T. Collins, A. J. Williams, I. Dube, F. Katz, Y. L. Kwong, C. Morris, K. Ohyashiki, K. Toyama, J. Rowley, and D. E. Housman. 1996. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet* 12 (2):159-67.
- Bowie, M. B., D. G. Kent, M. R. Copley, and C. J. Eaves. 2007. Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells. *Blood* 109 (11):5043-8.
- Bowie, M. B., D. G. Kent, B. Dykstra, K. D. McKnight, L. McCaffrey, P. A. Hoodless, and C. J. Eaves. 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):5878-82.
- Bowie, M. B., K. D. McKnight, D. G. Kent, L. McCaffrey, P. A. Hoodless, and C. J. Eaves. 2006. Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J Clin Invest* 116 (10):2808-16.
- Bradley, T. R., and D. Metcalf. 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44 (3):287-99.
- Bridges, Calvin B. Morgan Thomas Hunt. 1923. *The third-chromosome group of mutant characters of Drosophila melanogaster*. Washington.
- Bromleigh, V. C., and L. P. Freedman. 2000. p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. *Genes Dev* 14 (20):2581-6.
- Brooke, N. M., J. Garcia-Fernandez, and P. W. Holland. 1998. The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* 392 (6679):920-2.
- Broske, A. M., L. Vockentanz, S. Kharazi, M. R. Huska, E. Mancini, M. Scheller, C. Kuhl, A. Enns, M. Prinz, R. Jaenisch, C. Nerlov, A. Leutz, M. A. Andrade-Navarro, S. E. Jacobsen, and F. Rosenbauer. 2009. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet* 41 (11):1207-15.

- Broudy, V. C. 1997. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90 (4):1345-64.
- Brown, K., S. Xie, X. Qiu, M. Mohrin, J. Shin, Y. Liu, D. Zhang, D. T. Scadden, and D. Chen. 2013. SIRT3 reverses aging-associated degeneration. *Cell Rep* 3 (2):319-27.
- Brun, A. C., J. M. Bjornsson, M. Magnusson, N. Larsson, P. Leveen, M. Ehinger, E. Nilsson, and S. Karlsson. 2004. Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood* 103 (11):4126-33.
- Buscarlet, M., V. Krasteva, L. Ho, C. Simon, J. Hebert, B. Wilhelm, G. R. Crabtree, G. Sauvageau, P. Thibault, and J. A. Lessard. 2014. Essential role of BRG, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in leukemia maintenance. *Blood* 123 (11):1720-8.
- Buske, C., M. Feuring-Buske, J. Antonchuk, P. Rosten, D. E. Hogge, C. J. Eaves, and R. K. Humphries. 2001. Overexpression of HOXA10 perturbs human lymphomyelopoiesis in vitro and in vivo. *Blood* 97 (8):2286-92.
- Cai, X., J. J. Gaudet, J. K. Mangan, M. J. Chen, M. E. De Obaldia, Z. Oo, P. Ernst, and N. A. Speck. 2011. Runx1 loss minimally impacts long-term hematopoietic stem cells. *PLoS One* 6 (12):e28430.
- Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, and D. T. Scadden. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425 (6960):841-6.
- Calvo, K. R., D. B. Sykes, M. P. Pasillas, and M. P. Kamps. 2002. Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene* 21 (27):4247-56.
- Cao, R., Y. Tsukada, and Y. Zhang. 2005. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 20 (6):845-54.
- Cao, R., L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. S. Jones, and Y. Zhang. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298 (5595):1039-43.
- Cellot, S., J. Krosch, J. Chagraoui, S. Meloche, R. K. Humphries, and G. Sauvageau. 2007. Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in Hoxb4hiPbx1(10) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 35 (5):802-16.
- Chabot, B., D. A. Stephenson, V. M. Chapman, P. Besmer, and A. Bernstein. 1988. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335 (6185):88-9.
- Challen, G. A., N. C. Boles, S. M. Chambers, and M. A. Goodell. 2010. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell* 6 (3):265-78.
- Challen, G. A., D. Sun, M. Jeong, M. Luo, J. Jelinek, J. S. Berg, C. Bock, A. Vasanthakumar, H. Gu, Y. Xi, S. Liang, Y. Lu, G. J. Darlington, A. Meissner, J. P. Issa, L. A. Godley, W. Li, and M. A. Goodell. 2012. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet* 44 (1):23-31.
- Chambers, S. M., N. C. Boles, K. Y. Lin, M. P. Tierney, T. V. Bowman, S. B. Bradfute, A. J. Chen, A. A. Merchant, O. Sirin, D. C. Weksberg, M. G. Merchant, C. J. Fisk, C. A.

- Shaw, and M. A. Goodell. 2007. Hematopoietic fingerprints: an expression database of stem cells and their progeny. *Cell Stem Cell* 1 (5):578-91.
- Chambers, S. M., C. A. Shaw, C. Gatz, C. J. Fisk, L. A. Donehower, and M. A. Goodell. 2007. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol* 5 (8):e201.
- Chan, W. I., R. L. Hannah, M. A. Dawson, C. Pridans, D. Foster, A. Joshi, B. Gottgens, J. M. Van Deursen, and B. J. Huntly. 2011. The transcriptional coactivator Cbp regulates self-renewal and differentiation in adult hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* 31 (24):5046-60.
- Chanda, B., A. Ditadi, N. N. Iscove, and G. Keller. 2013. Retinoic acid signaling is essential for embryonic hematopoietic stem cell development. *Cell* 155 (1):215-27.
- Charite, J., W. de Graaff, D. Consten, M. J. Reijnen, J. Korving, and J. Deschamps. 1998. Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of cdx gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* 125 (22):4349-58.
- Chen, C. Z., L. Li, M. Li, and H. F. Lodish. 2003. The endoglin(positive) sca-1(positive) rhodamine(low) phenotype defines a near-homogeneous population of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Immunity* 19 (4):525-33.
- Chen, C. Z., M. Li, D. de Graaf, S. Monti, B. Gottgens, M. J. Sanchez, E. S. Lander, T. R. Golub, A. R. Green, and H. F. Lodish. 2002. Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (24):15468-73.
- Chen, F., and M. R. Capecchi. 1997. Targeted mutations in *hoxa-9* and *hoxb-9* reveal synergistic interactions. *Dev Biol* 181 (2):186-96.
- Chen, Yi-Bin. 2013. Leukemia, [En ligne]. *Pubmed Health* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0002276/> (Page consultée en décembre 2013).
- Cheng, T., N. Rodrigues, H. Shen, Y. Yang, D. Dombkowski, M. Sykes, and D. T. Scadden. 2000. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287 (5459):1804-8.
- Cheshier, S. H., S. J. Morrison, X. Liao, and I. L. Weissman. 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):3120-5.
- Chiu, C. P., W. Dragowska, N. W. Kim, H. Vaziri, J. Yui, T. E. Thomas, C. B. Harley, and P. M. Lansdorf. 1996. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells* 14 (2):239-48.
- Cho, R. H., H. B. Sieburg, and C. E. Muller-Sieburg. 2008. A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood* 111 (12):5553-61.
- Choe, S. K., P. Lu, M. Nakamura, J. Lee, and C. G. Sagerstrom. 2009. Meis cofactors control HDAC and CBP accessibility at Hox-regulated promoters during zebrafish embryogenesis. *Dev Cell* 17 (4):561-7.
- Chow, A., D. Lucas, A. Hidalgo, S. Mendez-Ferrer, D. Hashimoto, C. Scheiermann, M. Battista, M. Leboeuf, C. Prophete, N. van Rooijen, M. Tanaka, M. Merad, and P. S. Frenette. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* 208 (2):261-71.



- Christensen, J. L., and I. L. Weissman. 2001. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (25):14541-6.
- Christensen, J. L., D. E. Wright, A. J. Wagers, and I. L. Weissman. 2004. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* 2 (3):E75.
- Chung, S. S., W. Hu, and C. Y. Park. 2011. The Role of MicroRNAs in Hematopoietic Stem Cell and Leukemic Stem Cell Function. *Ther Adv Hematol* 2 (5):317-34.
- Clapier, C. R., and B. R. Cairns. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78:273-304.
- Clark, B. R., and A. Keating. 1995. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci* 770:70-8.
- Clutter, S. D., J. Fortney, and L. F. Gibson. 2005. MMP-2 is required for bone marrow stromal cell support of pro-B-cell chemotaxis. *Exp Hematol* 33 (10):1192-200.
- Cobas, M., A. Wilson, B. Ernst, S. J. Mancini, H. R. MacDonald, R. Kemler, and F. Radtke. 2004. Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med* 199 (2):221-9.
- Collins, S. J. 2002. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia* 16 (10):1896-905.
- Cook, D. N. 1996. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 59 (1):61-6.
- Copley, M. R., S. Babovic, C. Benz, D. J. Knapp, P. A. Beer, D. G. Kent, S. Wohrer, D. Q. Treloar, C. Day, K. Rowe, H. Mader, F. Kuchenbauer, R. K. Humphries, and C. J. Eaves. 2013. The Lin28b-let-7-Hmga2 axis determines the higher self-renewal potential of fetal haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* 15 (8):916-25.
- Copley, M. R., P. A. Beer, and C. J. Eaves. 2012. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell* 10 (6):690-7.
- Coulombel, L. 2004. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 23 (43):7210-22.
- Crispino, J. D., M. B. Lodish, J. P. MacKay, and S. H. Orkin. 1999. Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol Cell* 3 (2):219-28.
- Crooks, G. M., J. Fuller, D. Petersen, P. Izadi, P. Malik, P. K. Pattengale, D. B. Kohn, and J. C. Gasson. 1999. Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* 94 (2):519-28.
- Cumano, A., F. Dieterlen-Lievre, and I. Godin. 1996. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86 (6):907-16.
- Czermin, B., R. Melfi, D. McCabe, V. Seitz, A. Imhof, and V. Pirrotta. 2002. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111 (2):185-96.
- Dadley-Moore, Davina. 2005. SLAM-dunk decider. *Nat Rev Immunol* 5 (8):589.
- Daga, A., M. Podesta, M. C. Capra, G. Piaggio, F. Frassoni, and G. Corte. 2000. The retroviral transduction of HOXC4 into human CD34(+) cells induces an in vitro expansion of clonogenic and early progenitors. *Exp Hematol* 28 (5):569-74.

- Dagher, R. N., K. Hiatt, C. Traycoff, E. F. Srouf, and M. C. Yoder. 1998. c-Kit and CD38 are expressed by long-term reconstituting hematopoietic cells present in the murine yolk sac. *Biol Blood Marrow Transplant* 4 (2):69-74.
- Dakic, A., D. Metcalf, L. Di Rago, S. Mifsud, L. Wu, and S. L. Nutt. 2005. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J Exp Med* 201 (9):1487-502.
- Davidson, A. J., P. Ernst, Y. Wang, M. P. Dekens, P. D. Kingsley, J. Palis, S. J. Korsmeyer, G. Q. Daley, and L. I. Zon. 2003. cdx4 mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple hox genes. *Nature* 425 (6955):300-6.
- Davidson, A. J., and L. I. Zon. 2006. The caudal-related homeobox genes cdx1a and cdx4 act redundantly to regulate hox gene expression and the formation of putative hematopoietic stem cells during zebrafish embryogenesis. *Dev Biol* 292 (2):506-18.
- De Bruyn, P. P., P. C. Breen, and T. B. Thomas. 1970. The microcirculation of the bone marrow. *Anat Rec* 168 (1):55-68.
- de Napoles, M., J. E. Mermoud, R. Wakao, Y. A. Tang, M. Endoh, R. Appanah, T. B. Nesterova, J. Silva, A. P. Otte, M. Vidal, H. Koseki, and N. Brockdorff. 2004. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* 7 (5):663-76.
- Di-Poi, N., U. Koch, F. Radtke, and D. Duboule. 2010. Additive and global functions of HoxA cluster genes in mesoderm derivatives. *Dev Biol* 341 (2):488-98.
- Dickson, G. J., A. Kwasniewska, K. I. Mills, T. R. Lappin, and A. Thompson. 2009. Hoxa6 potentiates short-term hemopoietic cell proliferation and extended self-renewal. *Exp Hematol* 37 (3):322-33 e3.
- Dik, W. A., W. Brahim, C. Braun, V. Asnafi, N. Dastugue, O. A. Bernard, J. J. van Dongen, A. W. Langerak, E. A. Macintyre, and E. Delabesse. 2005. CALM-AF10+ T-ALL expression profiles are characterized by overexpression of HOXA and BMI1 oncogenes. *Leukemia* 19 (11):1948-57.
- Ding, L., and S. J. Morrison. 2013. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495 (7440):231-5.
- Ding, L., T. L. Saunders, G. Enikolopov, and S. J. Morrison. 2012. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481 (7382):457-62.
- Dintilhac, A., R. Bihan, D. Guerrier, S. Deschamps, and I. Pellerin. 2004. A conserved non-homeodomain Hoxa9 isoform interacting with CBP is co-expressed with the 'typical' Hoxa9 protein during embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 4 (2):215-22.
- Doulatov, S., F. Notta, E. Laurenti, and J. E. Dick. 2012. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* 10 (2):120-36.
- Doyonnas, R., J. S. Nielsen, S. Chelliah, E. Drew, T. Hara, A. Miyajima, and K. M. McNagny. 2005. Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 105 (11):4170-8.
- Drabkin, H. A., C. Parsy, K. Ferguson, F. Guilhot, L. Lacotte, L. Roy, C. Zeng, A. Baron, S. P. Hunger, M. Varela-Garcia, R. Gemmill, F. Brizard, A. Brizard, and J. Roche. 2002. Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 16 (2):186-95.
- Drew, E., J. S. Merzaban, W. Seo, H. J. Ziltener, and K. M. McNagny. 2005. CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution. *Immunity* 22 (1):43-57.

- Duboule, D. 1992. The vertebrate limb: a model system to study the Hox/HOM gene network during development and evolution. *Bioessays* 14 (6):375-84.
- Repeated Author. 1998. Vertebrate hox gene regulation: clustering and/or colinearity? *Curr Opin Genet Dev* 8 (5):514-8.
- Dumon, S., D. S. Walton, G. Volpe, N. Wilson, E. Dasse, W. Del Pozzo, J. R. Landry, B. Turner, L. P. O'Neill, B. Gottgens, and J. Frampton. 2012. Itga2b regulation at the onset of definitive hematopoiesis and commitment to differentiation. *PLoS One* 7 (8):e43300.
- Duncan, A. W., F. M. Rattis, L. N. DiMascio, K. L. Congdon, G. Pazianos, C. Zhao, K. Yoon, J. M. Cook, K. Willert, N. Gaiano, and T. Reya. 2005. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 6 (3):314-22.
- Dykstra, B., D. Kent, M. Bowie, L. McCaffrey, M. Hamilton, K. Lyons, S. J. Lee, R. Brinkman, and C. Eaves. 2007. Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell* 1 (2):218-29.
- Dykstra, B., S. Olthof, J. Schreuder, M. Ritsema, and G. de Haan. 2011. Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 208 (13):2691-703.
- Eberharter, A., and P. B. Becker. 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3 (3):224-9.
- Eklund, E. A., I. Goldenberg, Y. Lu, J. Andrejic, and R. Kakar. 2002. SHP1 protein-tyrosine phosphatase regulates HoxA10 DNA binding and transcriptional repression activity in undifferentiated myeloid cells. *J Biol Chem* 277 (39):36878-88.
- Eliasson, P., and J. I. Jonsson. 2010. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol* 222 (1):17-22.
- Ernst, P., J. K. Fisher, W. Avery, S. Wade, D. Foy, and S. J. Korsmeyer. 2004. Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev Cell* 6 (3):437-43.
- Ernst, P., M. Mabon, A. J. Davidson, L. I. Zon, and S. J. Korsmeyer. 2004. An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr Biol* 14 (22):2063-9.
- Essers, M. A., S. Offner, W. E. Blanco-Bose, Z. Waibler, U. Kalinke, M. A. Duchosal, and A. Trumpp. 2009. IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458 (7240):904-8.
- Faber, J., A. V. Krivtsov, M. C. Stubbs, R. Wright, T. N. Davis, M. van den Heuvel-Eibrink, C. M. Zwaan, A. L. Kung, and S. A. Armstrong. 2009. HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* 113 (11):2375-85.
- Fair, K., M. Anderson, E. Bulanova, H. Mi, M. Tropschug, and M. O. Diaz. 2001. Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol* 21 (10):3589-97.
- Falini, B., N. Bolli, A. Liso, M. P. Martelli, R. Mannucci, S. Pileri, and I. Nicoletti. 2009. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 23 (10):1731-43.
- Ferrando, A. A., S. A. Armstrong, D. S. Neuberg, S. E. Sallan, L. B. Silverman, S. J. Korsmeyer, and A. T. Look. 2003. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 102 (1):262-8.

- Fischbach, N. A., S. Rozenfeld, W. Shen, S. Fong, D. Chrobak, D. Ginzinger, S. C. Kogan, A. Radhakrishnan, M. M. Le Beau, C. Largman, and H. J. Lawrence. 2005. HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 105 (4):1456-66.
- Fleming, W. H., E. J. Alpern, N. Uchida, K. Ikuta, G. J. Spangrude, and I. L. Weissman. 1993. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* 122 (4):897-902.
- Florian, M. C., K. Dorr, A. Niebel, D. Daria, H. Schrezenmeier, M. Rojewski, M. D. Filippi, A. Hasenberg, M. Gunzer, K. Scharffetter-Kochanek, Y. Zheng, and H. Geiger. 2012. Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell* 10 (5):520-30.
- Florian, M. C., and H. Geiger. 2010. Concise review: polarity in stem cells, disease, and aging. *Stem Cells* 28 (9):1623-9.
- Forsberg, E. C., S. S. Prohaska, S. Katzman, G. C. Heffner, J. M. Stuart, and I. L. Weissman. 2005. Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet* 1 (3):e28.
- Forzati, F., A. Federico, P. Pallante, A. Abbate, F. Esposito, U. Malapelle, R. Sepe, G. Palma, G. Troncone, M. Scarfo, C. Arra, M. Fedele, and A. Fusco. 2012. CBX7 is a tumor suppressor in mice and humans. *J Clin Invest* 122 (2):612-23.
- Foudi, A., K. Hochedlinger, D. Van Buren, J. W. Schindler, R. Jaenisch, V. Carey, and H. Hock. 2009. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 27 (1):84-90.
- Fournier, M., C. E. Lebert-Ghali, G. Kroschl, and J. J. Bijl. 2012. HOXA4 induces expansion of hematopoietic stem cells in vitro and confers enhancement of pro-B-cells in vivo. *Stem Cells Dev* 21 (1):133-42.
- Frelin, C., R. Herrington, S. Janmohamed, M. Barbara, G. Tran, C. J. Paige, P. Benveniste, J. C. Zuniga-Pflucker, A. Souabni, M. Busslinger, and N. N. Iscove. 2013. GATA-3 regulates the self-renewal of long-term hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 14 (10):1037-44.
- French, R. A., S. R. Broussard, W. A. Meier, C. Minshall, S. Arkins, J. F. Zachary, R. Dantzer, and K. W. Kelley. 2002. Age-associated loss of bone marrow hematopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution. *Endocrinology* 143 (2):690-9.
- Friedman, J. S., V. I. Rebel, R. Derby, K. Bell, T. T. Huang, F. A. Kuypers, C. J. Epstein, and S. J. Burakoff. 2001. Absence of mitochondrial superoxide dismutase results in a murine hemolytic anemia responsive to therapy with a catalytic antioxidant. *J Exp Med* 193 (8):925-34.
- Fujimoto, S., K. Araki, O. Chisaka, M. Araki, K. Takagi, and K. Yamamura. 1998. Analysis of the murine Hoxa-9 cDNA: an alternatively spliced transcript encodes a truncated protein lacking the homeodomain. *Gene* 209 (1-2):77-85.
- Fujino, T., A. Suzuki, Y. Ito, K. Ohyashiki, Y. Hatano, I. Miura, and T. Nakamura. 2002. Single-translocation and double-chimeric transcripts: detection of NUP98-HOXA9 in myeloid leukemias with HOXA11 or HOXA13 breaks of the chromosomal translocation t(7;11)(p15;p15). *Blood* 99 (4):1428-33.

- Fuller, J. F., J. McAdara, Y. Yaron, M. Sakaguchi, J. K. Fraser, and J. C. Gasson. 1999. Characterization of HOX gene expression during myelopoiesis: role of HOX A5 in lineage commitment and maturation. *Blood* 93 (10):3391-400.
- Gao, J., S. Graves, U. Koch, S. Liu, V. Jankovic, S. Buonamici, A. El Andaloussi, S. D. Nimer, B. L. Kee, R. Taichman, F. Radtke, and I. Aifantis. 2009. Hedgehog signaling is dispensable for adult hematopoietic stem cell function. *Cell Stem Cell* 4 (6):548-58.
- Garcia-Bellido, A., and E. B. Lewis. 1976. Autonomous cellular differentiation of homoeotic bithorax mutants of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 48 (2):400-10.
- Garzon, R., and C. M. Croce. 2008. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 15 (4):352-8.
- Gehring, W. J., M. Affolter, and T. Burglin. 1994. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* 63:487-526.
- Geissler, E. N., M. A. Ryan, and D. E. Housman. 1988. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55 (1):185-92.
- Gekas, C., F. Dieterlen-Lievre, S. H. Orkin, and H. K. Mikkola. 2005. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 8 (3):365-75.
- Ghannam, G., A. Takeda, T. Camarata, M. A. Moore, A. Viale, and N. R. Yaseen. 2004. The oncogene Nup98-HOXA9 induces gene transcription in myeloid cells. *J Biol Chem* 279 (2):866-75.
- Giampaolo, A., E. Pelosi, M. Valtieri, E. Montesoro, P. Sterpetti, P. Samoggia, A. Camagna, G. Mastroberardino, M. Gabbianelli, U. Testa, and et al. 1995. HOXB gene expression and function in differentiating purified hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 13 Suppl 1:90-105.
- Giampaolo, A., P. Sterpetti, D. Bulgarini, P. Samoggia, E. Pelosi, M. Valtieri, and C. Peschle. 1994. Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood* 84 (11):3637-47.
- Godin, I., and A. Cumano. 2002. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat Rev Immunol* 2 (8):593-604.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J. P. Mesirov, H. Coller, M. L. Loh, J. R. Downing, M. A. Caligiuri, C. D. Bloomfield, and E. S. Lander. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286 (5439):531-7.
- Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner, and R. C. Mulligan. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183 (4):1797-806.
- Gould, A., A. Morrison, G. Sproat, R. A. White, and R. Krumlauf. 1997. Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes Dev* 11 (7):900-13.
- Greenbaum, A., Y. M. Hsu, R. B. Day, L. G. Schuettpelz, M. J. Christopher, J. N. Borgerding, T. Nagasawa, and D. C. Link. 2013. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495 (7440):227-30.
- Grier, D. G., A. Thompson, A. Kwasniewska, G. J. McGonigle, H. L. Halliday, and T. R. Lappin. 2005. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* 205 (2):154-71.
- Guiu, J., R. Shimizu, T. D'Altri, S. T. Fraser, J. Hatakeyama, E. H. Bresnick, R. Kageyama, E. Dzierzak, M. Yamamoto, L. Espinosa, and A. Bigas. 2013. Hes repressors are essential

- regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling. *J Exp Med* 210 (1):71-84.
- Gupta, R., S. Karpatkin, and R. S. Basch. 2006. Hematopoiesis and stem cell renewal in long-term bone marrow cultures containing catalase. *Blood* 107 (5):1837-46.
- Gurney, A. L., and F. J. de Sauvage. 1996. Dissection of c-Mpl and thrombopoietin function: studies of knockout mice and receptor signal transduction. *Stem Cells* 14 Suppl 1:116-23.
- Gwin, K., E. Frank, A. Bossou, and K. L. Medina. 2010. Hoxa9 regulates Flt3 in lymphohematopoietic progenitors. *J Immunol* 185 (11):6572-83.
- Hardy, R. R., and K. Hayakawa. 2001. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19:595-621.
- Harrison, D. E. 1980. Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity. *Blood* 55 (1):77-81.
- Harrison, D. E., C. M. Astle, and M. Stone. 1989. Numbers and functions of transplantable primitive immunohematopoietic stem cells. Effects of age. *J Immunol* 142 (11):3833-40.
- Harrison, D. E., C. T. Jordan, R. K. Zhong, and C. M. Astle. 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):206-19.
- Hattori, K., S. Dias, B. Heissig, N. R. Hackett, D. Lyden, M. Tateno, D. J. Hicklin, Z. Zhu, L. Witte, R. G. Crystal, M. A. Moore, and S. Rafii. 2001. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 193 (9):1005-14.
- Heath, V., H. C. Suh, M. Holman, K. Renn, J. M. Gooya, S. Parkin, K. D. Klarmann, M. Ortiz, P. Johnson, and J. Keller. 2004. C/EBPalpha deficiency results in hyperproliferation of hematopoietic progenitor cells and disrupts macrophage development in vitro and in vivo. *Blood* 104 (6):1639-47.
- Heissig, B., K. Hattori, S. Dias, M. Friedrich, B. Ferris, N. R. Hackett, R. G. Crystal, P. Besmer, D. Lyden, M. A. Moore, Z. Werb, and S. Rafii. 2002. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109 (5):625-37.
- Herrera-Merchan, A., L. Arranz, J. M. Ligos, A. de Molina, O. Dominguez, and S. Gonzalez. 2012. Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease. *Nat Commun* 3:623.
- Hess, J. L., B. D. Yu, B. Li, R. Hanson, and S. J. Korsmeyer. 1997. Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* 90 (5):1799-806.
- Higuchi, Y., H. Zeng, and M. Ogawa. 2003. CD38 expression by hematopoietic stem cells of newborn and juvenile mice. *Leukemia* 17 (1):171-4.
- Hock, H., M. J. Hamblen, H. M. Rooke, D. Traver, R. T. Bronson, S. Cameron, and S. H. Orkin. 2003. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 18 (1):109-20.
- Hock, H., E. Meade, S. Medeiros, J. W. Schindler, P. J. Valk, Y. Fujiwara, and S. H. Orkin. 2004. Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* 18 (19):2336-41.
- Hofmann, I., E. H. Stover, D. E. Cullen, J. Mao, K. J. Morgan, B. H. Lee, M. G. Kharas, P. G. Miller, M. G. Cornejo, R. Okabe, S. A. Armstrong, N. Ghilardi, S. Gould, F. J. de

- Sauvage, A. P. McMahon, and D. G. Gilliland. 2009. Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 4 (6):559-67.
- Holland, J. D., A. Klaus, A. N. Garratt, and W. Birchmeier. 2013. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 25 (2):254-64.
- Holmes, M. L., S. Carotta, L. M. Corcoran, and S. L. Nutt. 2006. Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes Dev* 20 (8):933-8.
- Horan, G. S., E. N. Kovacs, R. R. Behringer, and M. S. Featherstone. 1995. Mutations in paralogous Hox genes result in overlapping homeotic transformations of the axial skeleton: evidence for unique and redundant function. *Dev Biol* 169 (1):359-72.
- Horan, G. S., R. Ramirez-Solis, M. S. Featherstone, D. J. Wolgemuth, A. Bradley, and R. R. Behringer. 1995. Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev* 9 (13):1667-77.
- Hotta, T., N. Hirabayashi, M. Utsumi, T. Murate, and H. Yamada. 1980. Age-related changes in the function of hemopoietic stroma in mice. *Exp Hematol* 8 (7):933-6.
- Hu, Y. L., E. Passegue, S. Fong, C. Largman, and H. J. Lawrence. 2007. Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9. *Blood* 109 (11):4732-8.
- Huang, Y., K. Sitwala, J. Bronstein, D. Sanders, M. Dandekar, C. Collins, G. Robertson, J. MacDonald, T. Cezard, M. Bilenky, N. Thiessen, Y. Zhao, T. Zeng, M. Hirst, A. Hero, S. Jones, and J. L. Hess. 2012. Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. *Blood* 119 (2):388-98.
- Huber, T. L., V. Kouskoff, H. J. Fehling, J. Palis, and G. Keller. 2004. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 432 (7017):625-30.
- Iacovino, M., C. Hernandez, Z. Xu, G. Bajwa, M. Prather, and M. Kyba. 2009. A conserved role for Hox paralog group 4 in regulation of hematopoietic progenitors. *Stem Cells Dev* 18 (5):783-92.
- Ichikawa, M., T. Asai, T. Saito, S. Seo, I. Yamazaki, T. Yamagata, K. Mitani, S. Chiba, S. Ogawa, M. Kurokawa, and H. Hirai. 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.
- Ichikawa, M., S. Goyama, T. Asai, M. Kawazu, M. Nakagawa, M. Takeshita, S. Chiba, S. Ogawa, and M. Kurokawa. 2008. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol* 180 (7):4402-8.
- Ikuta, K., and I. L. Weissman. 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):1502-6.
- Ito, K., A. Hirao, F. Arai, S. Matsuoka, K. Takubo, I. Hamaguchi, K. Nomiyama, K. Hosokawa, K. Sakurada, N. Nakagata, Y. Ikeda, T. W. Mak, and T. Suda. 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431 (7011):997-1002.
- Ito, K., A. Hirao, F. Arai, K. Takubo, S. Matsuoka, K. Miyamoto, M. Ohmura, K. Naka, K. Hosokawa, Y. Ikeda, and T. Suda. 2006. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12 (4):446-51.

- Ito, T., F. Tajima, and M. Ogawa. 2000. Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 28 (11):1269-73.
- Ivanova, N. B., J. T. Dimos, C. Schaniel, J. A. Hackney, K. A. Moore, and I. R. Lemischka. 2002. A stem cell molecular signature. *Science* 298 (5593):601-4.
- Iwama, A., H. Oguro, M. Negishi, Y. Kato, Y. Morita, H. Tsukui, H. Ema, T. Kamijo, Y. Katoh-Fukui, H. Koseki, M. van Lohuizen, and H. Nakauchi. 2004. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* 21 (6):843-51.
- Iwasaki, H., and K. Akashi. 2007. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* 26 (6):726-40.
- Iwasaki, H., C. Somoza, H. Shigematsu, E. A. Duprez, J. Iwasaki-Arai, S. Mizuno, Y. Arinobu, K. Geary, P. Zhang, T. Dayaram, M. L. Fenyus, S. Elf, S. Chan, P. Kastner, C. S. Huettner, R. Murray, D. G. Tenen, and K. Akashi. 2005. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* 106 (5):1590-600.
- Iwasaki, M., T. Kuwata, Y. Yamazaki, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, M. Osato, Y. Ito, E. Kroon, G. Sauvageau, and T. Nakamura. 2005. Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model. *Blood* 105 (2):784-93.
- Izon, D. J., S. Rozenfeld, S. T. Fong, L. Komuves, C. Largman, and H. J. Lawrence. 1998. Loss of function of the homeobox gene Hoxa-9 perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood* 92 (2):383-93.
- Jacobs, J. J., K. Kieboom, S. Marino, R. A. DePinho, and M. van Lohuizen. 1999. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397 (6715):164-8.
- Jaffredo, T., W. Nottingham, K. Liddiard, K. Bollerot, C. Pouget, and M. de Bruijn. 2005. From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp Hematol* 33 (9):1029-40.
- Jin, G., Y. Yamazaki, M. Takuwa, T. Takahara, K. Kaneko, T. Kuwata, S. Miyata, and T. Nakamura. 2007. Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood* 109 (9):3998-4005.
- Johnson, G. R., and M. A. Moore. 1975. Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature* 258 (5537):726-8.
- Jones, R. J., J. E. Wagner, P. Celano, M. S. Zicha, and S. J. Sharkis. 1990. Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature* 347 (6289):188-9.
- Ju, Z., and K. Lenhard Rudolph. 2008. Telomere dysfunction and stem cell ageing. *Biochimie* 90 (1):24-32.
- Jude, C. D., L. Climer, D. Xu, E. Artinger, J. K. Fisher, and P. Ernst. 2007. Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell* 1 (3):324-37.
- Kacena, M. A., C. M. Gundberg, and M. C. Horowitz. 2006. A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells. *Bone* 39 (5):978-84.



- Kajiume, T., Y. Ninomiya, H. Ishihara, R. Kanno, and M. Kanno. 2004. Polycomb group gene *me1-18* modulates the self-renewal activity and cell cycle status of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 32 (6):571-8.
- Kamminga, L. M., L. V. Bystrykh, A. de Boer, S. Houwer, J. Douma, E. Weersing, B. Dontje, and G. de Haan. 2006. The Polycomb group gene *Ezh2* prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood* 107 (5):2170-9.
- Kappen, C. 2000. Disruption of the homeobox gene *Hoxb-6* in mice results in increased numbers of early erythrocyte progenitors. *Am J Hematol* 65 (2):111-8.
- Karlsson, G., E. Rorby, C. Pina, S. Soneji, K. Reckzeh, K. Miharada, C. Karlsson, Y. Guo, C. Fugazza, R. Gupta, J. H. Martens, H. G. Stunnenberg, S. Karlsson, and T. Enver. 2013. The tetraspanin CD9 affords high-purity capture of all murine hematopoietic stem cells. *Cell Rep* 4 (4):642-8.
- Kasper, L. H., P. K. Brindle, C. A. Schnabel, C. E. Pritchard, M. L. Cleary, and J. M. van Deursen. 1999. CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Mol Cell Biol* 19 (1):764-76.
- Katayama, Y., M. Battista, W. M. Kao, A. Hidalgo, A. J. Peired, S. A. Thomas, and P. S. Frenette. 2006. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124 (2):407-21.
- Katsura, Y. 2002. Redefinition of lymphoid progenitors. *Nat Rev Immunol* 2 (2):127-32.
- Kaufman, T. C., M. A. Seeger, and G. Olsen. 1990. Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet* 27:309-62.
- Kawagoe, H., R. K. Humphries, A. Blair, H. J. Sutherland, and D. E. Hogge. 1999. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 13 (5):687-98.
- Kerppola, T. K. 2009. Polycomb group complexes--many combinations, many functions. *Trends Cell Biol* 19 (12):692-704.
- Kiel, M. J., S. He, R. Ashkenazi, S. N. Gentry, M. Teta, J. A. Kushner, T. L. Jackson, and S. J. Morrison. 2007. Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* 449 (7159):238-42.
- Kiel, M. J., and S. J. Morrison. 2008. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 8 (4):290-301.
- Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst, and S. J. Morrison. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121 (7):1109-21.
- Kikuchi, K., and M. Kondo. 2006. Developmental switch of mouse hematopoietic stem cells from fetal to adult type occurs in bone marrow after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (47):17852-7.
- Kim, I., S. He, O. H. Yilmaz, M. J. Kiel, and S. J. Morrison. 2006. Enhanced purification of fetal liver hematopoietic stem cells using SLAM family receptors. *Blood* 108 (2):737-44.
- Kim, I., T. L. Saunders, and S. J. Morrison. 2007. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell* 130 (3):470-83.

- Kim, S. I., and E. H. Bresnick. 2007. Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles. *Oncogene* 26 (47):6777-94.
- Kimura, S., A. W. Roberts, D. Metcalf, and W. S. Alexander. 1998. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (3):1195-200.
- Kimura, Y., B. Ding, N. Imai, D. J. Nolan, J. M. Butler, and S. Rafii. 2011. c-Kit-mediated functional positioning of stem cells to their niches is essential for maintenance and regeneration of adult hematopoiesis. *PLoS One* 6 (10):e26918.
- Kirito, K., N. Fox, and K. Kaushansky. 2003. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood* 102 (9):3172-8.
- Klauke, K., V. Radulovic, M. Broekhuis, E. Weersing, E. Zwart, S. Olthof, M. Ritsema, S. Bruggeman, X. Wu, K. Helin, L. Bystrykh, and G. de Haan. 2013. Polycomb Cbx family members mediate the balance between haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Nat Cell Biol* 15 (4):353-62.
- Klein, G. 1995. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* 51 (9-10):914-26.
- Kmita, M., B. Tarchini, J. Zakany, M. Logan, C. J. Tabin, and D. Duboule. 2005. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 435 (7045):1113-6.
- Ko, K. H., Q. L. Lam, M. Zhang, C. K. Wong, C. K. Lo, M. Kahmeyer-Gabbe, W. H. Tsang, S. L. Tsang, L. C. Chan, M. H. Sham, and L. Lu. 2007. Hoxb3 deficiency impairs B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Exp Hematol* 35 (3):465-75.
- Kohler, A., V. Schmithorst, M. D. Filippi, M. A. Ryan, D. Daria, M. Gunzer, and H. Geiger. 2009. Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. *Blood* 114 (2):290-8.
- Kondo, M., I. L. Weissman, and K. Akashi. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91 (5):661-72.
- Kongsuwan, K., E. Webb, P. Housiaux, and J. M. Adams. 1988. Expression of multiple homeobox genes within diverse mammalian haemopoietic lineages. *EMBO J* 7 (7):2131-8.
- Konuma, T., H. Oguro, and A. Iwama. 2010. Role of the polycomb group proteins in hematopoietic stem cells. *Dev Growth Differ* 52 (6):505-16.
- Kranc, K. R., H. Schepers, N. P. Rodrigues, S. Bamforth, E. Villadsen, H. Ferry, T. Bouriez-Jones, M. Sigvardsson, S. Bhattacharya, S. E. Jacobsen, and T. Enver. 2009. Cited2 is an essential regulator of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 5 (6):659-65.
- Krasteva, V., M. Buscarlet, A. Diaz-Tellez, M. A. Bernard, G. R. Crabtree, and J. A. Lessard. 2012. The BAF53a subunit of SWI/SNF-like BAF complexes is essential for hemopoietic stem cell function. *Blood* 120 (24):4720-32.
- Krause, D. S., D. T. Scadden, and F. I. Preffer. 2013. The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe? *Cytometry B Clin Cytom* 84 (1):7-20.
- Krivtsov, A. V., and S. A. Armstrong. 2007. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 7 (11):823-33.
- Krivtsov, A. V., Z. Feng, M. E. Lemieux, J. Faber, S. Vempati, A. U. Sinha, X. Xia, J. Jesneck, A. P. Bracken, L. B. Silverman, J. L. Kutok, A. L. Kung, and S. A.

- Armstrong. 2008. H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 14 (5):355-68.
- Krivtsov, A. V., D. Twomey, Z. Feng, M. C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J. E. Levine, J. Wang, W. C. Hahn, D. G. Gilliland, T. R. Golub, and S. A. Armstrong. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442 (7104):818-22.
- Kroon, E., J. Kros, U. Thorsteinsdottir, S. Baban, A. M. Buchberg, and G. Sauvageau. 1998. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J* 17 (13):3714-25.
- Kroon, E., U. Thorsteinsdottir, N. Mayotte, T. Nakamura, and G. Sauvageau. 2001. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J* 20 (3):350-61.
- Kros, J., N. Beslu, N. Mayotte, R. K. Humphries, and G. Sauvageau. 2003. The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity* 18 (4):561-71.
- Kros, J., A. Mamo, J. Chagraoui, B. T. Wilhelm, S. Girard, I. Louis, J. Lessard, C. Perreault, and G. Sauvageau. 2010. A mutant allele of the Swi/Snf member BAF250a determines the pool size of fetal liver hemopoietic stem cell populations. *Blood* 116 (10):1678-84.
- Krumlauf, R. 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78 (2):191-201.
- Ku, C. J., T. Hosoya, I. Maillard, and J. D. Engel. 2012. GATA-3 regulates hematopoietic stem cell maintenance and cell-cycle entry. *Blood* 119 (10):2242-51.
- Kunisato, A., S. Chiba, E. Nakagami-Yamaguchi, K. Kumano, T. Saito, S. Masuda, T. Yamaguchi, M. Osawa, R. Kageyama, H. Nakauchi, M. Nishikawa, and H. Hirai. 2003. HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood* 101 (5):1777-83.
- Kuzmichev, A., T. Jenuwein, P. Tempst, and D. Reinberg. 2004. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* 14 (2):183-93.
- Kuzmichev, A., K. Nishioka, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. Reinberg. 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16 (22):2893-905.
- Kyba, M., R. C. Perlingeiro, and G. Q. Daley. 2002. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 109 (1):29-37.
- Lamkanfi, M., M. Kalai, and P. Vandenabeele. 2004. Caspase-12: an overview. *Cell Death Differ* 11 (4):365-8.
- Lantz, C. S., J. Boesiger, C. H. Song, N. Mach, T. Kobayashi, R. C. Mulligan, Y. Nawa, G. Dranoff, and S. J. Galli. 1998. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392 (6671):90-3.
- Latchman, D. S. 1997. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (12):1305-12.
- Lawrence, H. J., J. Christensen, S. Fong, Y. L. Hu, I. Weissman, G. Sauvageau, R. K. Humphries, and C. Largman. 2005. Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood* 106 (12):3988-94.

- Lawrence, H. J., C. D. Helgason, G. Sauvageau, S. Fong, D. J. Izon, R. K. Humphries, and C. Largman. 1997. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* 89 (6):1922-30.
- Lawrence, H. J., S. Rozenfeld, C. Cruz, K. Matsukuma, A. Kwong, L. Komuves, A. M. Buchberg, and C. Largman. 1999. Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia* 13 (12):1993-9.
- Lebert-Ghali, C. E., M. Fournier, G. J. Dickson, A. Thompson, G. Sauvageau, and J. J. Bijl. 2010. HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* 38 (11):1074-1086 e1-5.
- Lemieux, M. E., and C. J. Eaves. 1996. Identification of properties that can distinguish primitive populations of stromal-cell-responsive lympho-myeloid cells from cells that are stromal-cell-responsive but lymphoid-restricted and cells that have lympho-myeloid potential but are also capable of competitively repopulating myeloablated recipients. *Blood* 88 (5):1639-48.
- Lessard, J., S. Baban, and G. Sauvageau. 1998. Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells. *Blood* 91 (4):1216-24.
- Lessard, J., and G. Sauvageau. 2003. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423 (6937):255-60.
- Repeated Author. 2003. Polycomb group genes as epigenetic regulators of normal and leukemic hemopoiesis. *Exp Hematol* 31 (7):567-85.
- Lessard, J., A. Schumacher, U. Thorsteinsdottir, M. van Lohuizen, T. Magnuson, and G. Sauvageau. 1999. Functional antagonism of the Polycomb-Group genes *eed* and *Bmi1* in hemopoietic cell proliferation. *Genes Dev* 13 (20):2691-703.
- Levine, S. S., A. Weiss, H. Erdjument-Bromage, Z. Shao, P. Tempst, and R. E. Kingston. 2002. The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol Cell Biol* 22 (17):6070-8.
- Lewis, E. B. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276 (5688):565-70.
- Li, C. L., and G. R. Johnson. 1995. Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization. *Blood* 85 (6):1472-9.
- Li, J. J., Y. Q. Huang, R. Basch, and S. Karpatkin. 2001. Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets. *Thromb Haemost* 85 (2):204-6.
- Li, Z., H. Huang, P. Chen, M. He, Y. Li, S. Arnovitz, X. Jiang, C. He, E. Hyjek, J. Zhang, Z. Zhang, A. Elkahloun, D. Cao, C. Shen, M. Wunderlich, Y. Wang, M. B. Neilly, J. Jin, M. Wei, J. Lu, P. J. Valk, R. Delwel, B. Lowenberg, M. M. Le Beau, J. Vardiman, J. C. Mulloy, N. J. Zeleznik-Le, P. P. Liu, J. Zhang, and J. Chen. 2012. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. *Nat Commun* 3:688.
- Liang, Y., G. Van Zant, and S. J. Szilvassy. 2005. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 106 (4):1479-87.
- Lieu, Y. K., and E. P. Reddy. 2009. Conditional c-myb knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (51):21689-94.

- Lin, Y. W., C. Slape, Z. Zhang, and P. D. Aplan. 2005. NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia. *Blood* 106 (1):287-95.
- Linton, P. J., and K. Dorshkind. 2004. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5 (2):133-9.
- Liu, J., L. Cao, J. Chen, S. Song, I. H. Lee, C. Quijano, H. Liu, K. Keyvanfar, H. Chen, L. Y. Cao, B. H. Ahn, N. G. Kumar, Rovira, II, X. L. Xu, M. van Lohuizen, N. Motoyama, C. X. Deng, and T. Finkel. 2009. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* 459 (7245):387-92.
- Luis, T. C., M. Ichii, M. H. Brugman, P. Kincade, and F. J. Staal. 2012. Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia* 26 (3):414-21.
- Lyman, S. D., and S. E. Jacobsen. 1998. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91 (4):1101-34.
- Mackaretschian, K., J. D. Hardin, K. A. Moore, S. Boast, S. P. Goff, and I. R. Lemischka. 1995. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 3 (1):147-61.
- Maconochie, M. K., S. Nonchev, M. Studer, S. K. Chan, H. Popperl, M. H. Sham, R. S. Mann, and R. Krumlauf. 1997. Cross-regulation in the mouse HoxB complex: the expression of Hoxb2 in rhombomere 4 is regulated by Hoxb1. *Genes Dev* 11 (14):1885-95.
- Maeurer, M. J., and M. T. Lotze. 1998. Interleukin-7 (IL-7) knockout mice. Implications for lymphopoiesis and organ-specific immunity. *Int Rev Immunol* 16 (3-4):309-22.
- Magli, M. C., P. Barba, A. Celetti, G. De Vita, C. Cillo, and E. Boncinelli. 1991. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (14):6348-52.
- Magnusson, M., A. C. Brun, H. J. Lawrence, and S. Karlsson. 2007. Hoxa9/hoxb3/hoxb4 compound null mice display severe hematopoietic defects. *Exp Hematol* 35 (9):1421-8.
- Magnusson, M., A. C. Brun, N. Miyake, J. Larsson, M. Ehinger, J. M. Bjornsson, A. Wutz, M. Sigvardsson, and S. Karlsson. 2007. HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood* 109 (9):3687-96.
- Maillard, I., U. Koch, A. Dumortier, O. Shestova, L. Xu, H. Sai, S. E. Pross, J. C. Aster, A. Bhandoola, F. Radtke, and W. S. Pear. 2008. Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2 (4):356-66.
- Mainguy, G., J. Koster, J. Woltering, H. Jansen, and A. Durston. 2007. Extensive polycistronism and antisense transcription in the mammalian Hox clusters. *PLoS One* 2 (4):e356.
- Mak, K. S., A. P. Funnell, R. C. Pearson, and M. Crossley. 2011. PU.1 and Haematopoietic Cell Fate: Dosage Matters. *Int J Cell Biol* 2011:808524.
- Mamo, A., J. Kros, E. Kroon, J. Bijl, A. Thompson, N. Mayotte, S. Girard, R. Bisailon, N. Beslu, M. Featherstone, and G. Sauvageau. 2006. Molecular dissection of Meis1 reveals 2 domains required for leukemia induction and a key role for Hoxa gene activation. *Blood* 108 (2):622-9.
- Mancini, S. J., N. Mantei, A. Dumortier, U. Suter, H. R. MacDonald, and F. Radtke. 2005. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 105 (6):2340-2.

- Mann, R. S., and M. Affolter. 1998. Hox proteins meet more partners. *Curr Opin Genet Dev* 8 (4):423-9.
- Mann, R. S., and S. K. Chan. 1996. Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet* 12 (7):258-62.
- Mann, R. S., K. M. Lelli, and R. Joshi. 2009. Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Curr Top Dev Biol* 88:63-101.
- Mansson, R., A. Hultquist, S. Luc, L. Yang, K. Anderson, S. Kharazi, S. Al-Hashmi, K. Liuba, L. Thoren, J. Adolfsson, N. Buza-Vidas, H. Qian, S. Soneji, T. Enver, M. Sigvardsson, and S. E. Jacobsen. 2007. Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity* 26 (4):407-19.
- Manz, M. G., D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman, and K. Akashi. 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97 (11):3333-41.
- Mar, B. G., D. Amakye, I. Aifantis, and S. Buonamici. 2011. The controversial role of the Hedgehog pathway in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* 25 (11):1665-73.
- Marcucci, G., K. Mrozek, M. D. Radmacher, R. Garzon, and C. D. Bloomfield. 2011. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood* 117 (4):1121-9.
- Matsubara, A., A. Iwama, S. Yamazaki, C. Furuta, R. Hirasawa, Y. Morita, M. Osawa, T. Motohashi, K. Eto, H. Ema, T. Kitamura, D. Vestweber, and H. Nakauchi. 2005. Endomucin, a CD34-like sialomucin, marks hematopoietic stem cells throughout development. *J Exp Med* 202 (11):1483-92.
- Matsunaga, T., F. Hirayama, Y. Yonemura, R. Murray, and M. Ogawa. 1998. Negative regulation by interleukin-3 (IL-3) of mouse early B-cell progenitors and stem cells in culture: transduction of the negative signals by betac and betaIL-3 proteins of IL-3 receptor and absence of negative regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92 (3):901-7.
- Matsuoka, S., Y. Ebihara, M. Xu, T. Ishii, D. Sugiyama, H. Yoshino, T. Ueda, A. Manabe, R. Tanaka, Y. Ikeda, T. Nakahata, and K. Tsuji. 2001. CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. *Blood* 97 (2):419-25.
- Matsuzaki, Y., K. Kinjo, R. C. Mulligan, and H. Okano. 2004. Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity* 20 (1):87-93.
- Mauch, P., L. E. Botnick, E. C. Hannon, J. Obbagg, and S. Hellman. 1982. Decline in bone marrow proliferative capacity as a function of age. *Blood* 60 (1):245-52.
- McCulloch, E. A., and J. E. Till. 1960. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res* 13:115-25.
- McGonigle, G. J., T. R. Lappin, and A. Thompson. 2008. Grappling with the HOX network in hematopoiesis and leukemia. *Front Biosci* 13:4297-308.
- McGrath, K. E., and J. Palis. 2005. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematol* 33 (9):1021-8.
- McGuckin, C. P., N. Forraz, R. Pettengell, and A. Thompson. 2004. Thrombopoietin, flt3-ligand and c-kit-ligand modulate HOX gene expression in expanding cord blood CD133 cells. *Cell Prolif* 37 (4):295-306.

- McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, and J. J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95 (11):3489-97.
- McMahon, K. A., S. Y. Hiew, S. Hadjur, H. Veiga-Fernandes, U. Menzel, A. J. Price, D. Kioussis, O. Williams, and H. J. Brady. 2007. Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 1 (3):338-45.
- Mebius, R. E., and G. Kraal. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5 (8):606-16.
- Mendez-Ferrer, S., D. Lucas, M. Battista, and P. S. Frenette. 2008. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 452 (7186):442-7.
- Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov, and P. S. Frenette. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466 (7308):829-34.
- Miao, W., R. Xufeng, M. R. Park, H. Gu, L. Hu, J. W. Kang, S. Ma, P. H. Liang, Y. Li, H. Cheng, H. Yu, M. Epperly, J. Greenberger, and T. Cheng. 2013. Hematopoietic stem cell regeneration enhanced by ectopic expression of ROS-detoxifying enzymes in transplant mice. *Mol Ther* 21 (2):423-32.
- Mikkola, H. K., J. Klintman, H. Yang, H. Hock, T. M. Schlaeger, Y. Fujiwara, and S. H. Orkin. 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):547-51.
- Mikkola, H. K., and S. H. Orkin. 2006. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133 (19):3733-44.
- Milne, T. A., S. D. Briggs, H. W. Brock, M. E. Martin, D. Gibbs, C. D. Allis, and J. L. Hess. 2002. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 10 (5):1107-17.
- Milne, T. A., M. E. Martin, H. W. Brock, R. K. Slany, and J. L. Hess. 2005. Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the Hox a9 locus, promoting transcription and multiple histone modifications. *Cancer Res* 65 (24):11367-74.
- Min, I. M., G. Pietramaggiori, F. S. Kim, E. Passegue, K. E. Stevenson, and A. J. Wagers. 2008. The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2 (4):380-91.
- Mochizuki-Kashio, M., Y. Mishima, S. Miyagi, M. Negishi, A. Saraya, T. Konuma, J. Shinga, H. Koseki, and A. Iwama. 2011. Dependency on the polycomb gene Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood* 118 (25):6553-61.
- Moens, C. B., and L. Selleri. 2006. Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol* 291 (2):193-206.
- Mohrin, M., E. Bourke, D. Alexander, M. R. Warr, K. Barry-Holson, M. M. Le Beau, C. G. Morrison, and E. Passegue. 2010. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* 7 (2):174-85.
- Mohyeldin, A., T. Garzon-Muvdi, and A. Quinones-Hinojosa. 2010. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7 (2):150-61.

- Moretti, P., P. Simmons, P. Thomas, D. Haylock, P. Rathjen, M. Vadas, and R. D'Andrea. 1994. Identification of homeobox genes expressed in human haemopoietic progenitor cells. *Gene* 144 (2):213-9.
- Morrison, S. J., H. D. Hemmati, A. M. Wandycz, and I. L. Weissman. 1995. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (22):10302-6.
- Morrison, S. J., K. R. Prowse, P. Ho, and I. L. Weissman. 1996. Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* 5 (3):207-16.
- Morrison, S. J., A. M. Wandycz, K. Akashi, A. Globerson, and I. L. Weissman. 1996. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2 (9):1011-6.
- Morrison, S. J., A. M. Wandycz, H. D. Hemmati, D. E. Wright, and I. L. Weissman. 1997. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124 (10):1929-39.
- Morrison, S. J., and I. L. Weissman. 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1 (8):661-73.
- Morrison, S. J., D. E. Wright, and I. L. Weissman. 1997. Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (5):1908-13.
- Moskow, J. J., F. Bullrich, K. Huebner, I. O. Daar, and A. M. Buchberg. 1995. Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol Cell Biol* 15 (10):5434-43.
- Muller-Sieburg, C. E., R. H. Cho, L. Karlsson, J. F. Huang, and H. B. Sieburg. 2004. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood* 103 (11):4111-8.
- Muller-Sieburg, C. E., R. H. Cho, M. Thoman, B. Adkins, and H. B. Sieburg. 2002. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 100 (4):1302-9.
- Muller-Sieburg, C. E., H. B. Sieburg, J. M. Bernitz, and G. Cattarossi. 2012. Stem cell heterogeneity: implications for aging and regenerative medicine. *Blood* 119 (17):3900-7.
- Muller-Sieburg, C. E., C. A. Whitlock, and I. L. Weissman. 1986. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-lo hematopoietic stem cell. *Cell* 44 (4):653-62.
- Mullighan, C. G., A. Kennedy, X. Zhou, I. Radtke, L. A. Phillips, S. A. Shurtleff, and J. R. Downing. 2007. Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia* 21 (9):2000-9.
- Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, and T. Kishimoto. 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382 (6592):635-8.
- Nakahata, T., and M. Ogawa. 1982. Clonal origin of murine hemopoietic colonies with apparent restriction to granulocyte-macrophage-megakaryocyte (GMM) differentiation. *J Cell Physiol* 111 (3):239-46.



- Repeated Author. 1982. Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (12):3843-7.
- Nakahata, T., S. S. Spicer, J. R. Cantey, and M. Ogawa. 1982. Clonal assay of mouse mast cell colonies in methylcellulose culture. *Blood* 60 (2):352-61.
- Nakamura, T., D. A. Largaespada, M. P. Lee, L. A. Johnson, K. Ohyashiki, K. Toyama, S. J. Chen, C. L. Willman, I. M. Chen, A. P. Feinberg, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and J. D. Shaughnessy, Jr. 1996. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet* 12 (2):154-8.
- Nakamura, Takuro. 2005. Meis and Hox: a mighty pair defeats apoptosis. *Blood* 105 (3):909-910.
- Nandurkar, H. H., L. Robb, D. Tarlinton, L. Barnett, F. Kontgen, and C. G. Begley. 1997. Adult mice with targeted mutation of the interleukin-11 receptor (IL11Ra) display normal hematopoiesis. *Blood* 90 (6):2148-59.
- Naveiras, O., V. Nardi, P. L. Wenzel, P. V. Hauschka, F. Fahey, and G. Q. Daley. 2009. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460 (7252):259-63.
- Negishi, M., A. Saraya, S. Miyagi, K. Nagao, Y. Inagaki, M. Nishikawa, S. Tajima, H. Koseki, H. Tsuda, Y. Takasaki, H. Nakauchi, and A. Iwama. 2007. Bmi1 cooperates with Dnmt1-associated protein 1 in gene silencing. *Biochem Biophys Res Commun* 353 (4):992-8.
- Nekrasov, M., T. Klymenko, S. Fraterman, B. Papp, K. Oktaba, T. Kocher, A. Cohen, H. G. Stunnenberg, M. Wilm, and J. Muller. 2007. Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *EMBO J* 26 (18):4078-88.
- Nerlov, C., and T. Graf. 1998. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* 12 (15):2403-12.
- Nie, Y., Y. C. Han, and Y. R. Zou. 2008. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med* 205 (4):777-83.
- Nielsen, J. S., and K. M. McNagny. 2007. Influence of host irradiation on long-term engraftment by CD34-deficient hematopoietic stem cells. *Blood* 110 (3):1076-7.
- Repeated Author. 2008. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 121 (Pt 22):3683-92.
- Nilsson, S. K., H. M. Johnston, and J. A. Coverdale. 2001. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* 97 (8):2293-9.
- Nilsson, S. K., H. M. Johnston, G. A. Whitty, B. Williams, R. J. Webb, D. T. Denhardt, I. Bertocello, L. J. Bendall, P. J. Simmons, and D. N. Haylock. 2005. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 106 (4):1232-9.
- Nombela-Arrieta, C., G. Pivarnik, B. Winkel, K. J. Canty, B. Harley, J. E. Mahoney, S. Y. Park, J. Lu, A. Protopopov, and L. E. Silberstein. 2013. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* 15 (5):533-43.
- Nutt, S. L., and B. L. Kee. 2007. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26 (6):715-25.

- Oganesian, A., L. C. Armstrong, M. M. Migliorini, D. K. Strickland, and P. Bornstein. 2008. Thrombospondins use the VLDL receptor and a nonapoptotic pathway to inhibit cell division in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 19 (2):563-71.
- Oguro, H., L. Ding, and S. J. Morrison. 2013. SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell* 13 (1):102-16.
- Oguro, H., A. Iwama, Y. Morita, T. Kamijo, M. van Lohuizen, and H. Nakauchi. 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):2247-53.
- Oguro, H., J. Yuan, H. Ichikawa, T. Ikawa, S. Yamazaki, H. Kawamoto, H. Nakauchi, and A. Iwama. 2010. Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. *Cell Stem Cell* 6 (3):279-86.
- Ohmori, T., Y. Kashiwakura, A. Ishiwata, S. Madoiwa, J. Mimuro, Y. Furukawa, and Y. Sakata. 2010. Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells, independent of integrin function. *J Biol Chem* 285 (41):31763-73.
- Ohta, H., A. Sawada, J. Y. Kim, S. Tokimasa, S. Nishiguchi, R. K. Humphries, J. Hara, and Y. Takihara. 2002. Polycomb group gene rae28 is required for sustaining activity of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 195 (6):759-70.
- Ooi, A. G., H. Karsunky, R. Majeti, S. Butz, D. Vestweber, T. Ishida, T. Quertermous, I. L. Weissman, and E. C. Forsberg. 2009. The adhesion molecule esam1 is a novel hematopoietic stem cell marker. *Stem Cells* 27 (3):653-61.
- Orford, K. W., and D. T. Scadden. 2008. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet* 9 (2):115-28.
- Orkin, S. H. 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1 (1):57-64.
- Orlovsky, K., A. Kalinkovich, T. Rozovskaia, E. Shezen, T. Itkin, H. Alder, H. G. Ozer, L. Carramusa, A. Avigdor, S. Volinia, A. Buchberg, A. Mazo, O. Kollet, C. Largman, C. M. Croce, T. Nakamura, T. Lapidot, and E. Canaani. 2011. Down-regulation of homeobox genes MEIS1 and HOXA in MLL-rearranged acute leukemia impairs engraftment and reduces proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (19):7956-61.
- Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada, and H. Nakauchi. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273 (5272):242-5.
- Oshima, M., M. Endoh, T. A. Endo, T. Toyoda, Y. Nakajima-Takagi, F. Sugiyama, H. Koseki, M. Kyba, A. Iwama, and M. Osawa. 2011. Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood* 117 (15):e142-50.
- Paige, C. J., R. H. Gisler, J. P. McKearn, and N. N. Iscove. 1984. Differentiation of murine B cell precursors in agar culture. Frequency, surface marker analysis and requirements for growth of clonable pre-B cells. *Eur J Immunol* 14 (11):979-87.
- Pajcini, K. V., N. A. Speck, and W. S. Pear. 2011. Notch signaling in mammalian hematopoietic stem cells. *Leukemia* 25 (10):1525-32.
- Palis, J., S. Robertson, M. Kennedy, C. Wall, and G. Keller. 1999. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126 (22):5073-84.

- Palmqvist, L., B. Argiropoulos, N. Pineault, C. Abramovich, L. M. Sly, G. Krystal, A. Wan, and R. K. Humphries. 2006. The Flt3 receptor tyrosine kinase collaborates with NUP98-HOX fusions in acute myeloid leukemia. *Blood* 108 (3):1030-6.
- Panagopoulos, I., M. Isaksson, R. Billstrom, B. Strombeck, F. Mitelman, and B. Johansson. 2003. Fusion of the NUP98 gene and the homeobox gene HOXC13 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer* 36 (1):107-12.
- Parcells, B. W., A. K. Ikeda, T. Simms-Waldrup, T. B. Moore, and K. M. Sakamoto. 2006. FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem Cells* 24 (5):1174-84.
- Park, I. K., S. J. Morrison, and M. F. Clarke. 2004. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest* 113 (2):175-9.
- Park, I. K., D. Qian, M. Kiel, M. W. Becker, M. Pihalja, I. L. Weissman, S. J. Morrison, and M. F. Clarke. 2003. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423 (6937):302-5.
- Pearson, J. C., D. Lemons, and W. McGinnis. 2005. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet* 6 (12):893-904.
- Pellerin, I., C. Schnabel, K. M. Catron, and C. Abate. 1994. Hox proteins have different affinities for a consensus DNA site that correlate with the positions of their genes on the hox cluster. *Mol Cell Biol* 14 (7):4532-45.
- Penkov, D., S. Tanaka, G. Di Rocco, J. Berthelsen, F. Blasi, and F. Ramirez. 2000. Cooperative interactions between PBX, PREP, and HOX proteins modulate the activity of the alpha 2(V) collagen (COL5A2) promoter. *J Biol Chem* 275 (22):16681-9.
- Perkins, A., K. Kongsuwan, J. Visvader, J. M. Adams, and S. Cory. 1990. Homeobox gene expression plus autocrine growth factor production elicits myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (21):8398-402.
- Pestina, T. I., J. L. Cleveland, C. Yang, G. P. Zambetti, and C. W. Jackson. 2001. Mpl ligand prevents lethal myelosuppression by inhibiting p53-dependent apoptosis. *Blood* 98 (7):2084-90.
- Pevny, L., C. S. Lin, V. D'Agati, M. C. Simon, S. H. Orkin, and F. Costantini. 1995. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 121 (1):163-72.
- Pevny, L., M. C. Simon, E. Robertson, W. H. Klein, S. F. Tsai, V. D'Agati, S. H. Orkin, and F. Costantini. 1991. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349 (6306):257-60.
- Phelan, M. L., I. Rambaldi, and M. S. Featherstone. 1995. Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol Cell Biol* 15 (8):3989-97.
- Pineault, N., C. Abramovich, and R. K. Humphries. 2005. Transplantable cell lines generated with NUP98-Hox fusion genes undergo leukemic progression by Meis1 independent of its binding to DNA. *Leukemia* 19 (4):636-43.
- Pineault, N., C. Abramovich, H. Ohta, and R. K. Humphries. 2004. Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol* 24 (5):1907-17.
- Pineault, N., C. Buske, M. Feuring-Buske, C. Abramovich, P. Rosten, D. E. Hogge, P. D. Aplan, and R. K. Humphries. 2003. Induction of acute myeloid leukemia in mice by

- the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1. *Blood* 101 (11):4529-38.
- Pineault, N., C. D. Helgason, H. J. Lawrence, and R. K. Humphries. 2002. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol* 30 (1):49-57.
- Pires-daSilva, A., and R. J. Sommer. 2003. The evolution of signalling pathways in animal development. *Nat Rev Genet* 4 (1):39-49.
- Popovic, R., F. Erfurth, and N. Zeleznik-Le. 2008. Transcriptional complexity of the HOXA9 locus. *Blood Cells Mol Dis* 40 (2):156-9.
- Popovic, R., and N. J. Zeleznik-Le. 2005. MLL: how complex does it get? *J Cell Biochem* 95 (2):234-42.
- Popperl, H., M. Bienz, M. Studer, S. K. Chan, S. Aparicio, S. Brenner, R. S. Mann, and R. Krumlauf. 1995. Segmental expression of Hoxb-1 is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon exd/pbx. *Cell* 81 (7):1031-42.
- Purton, L. E., S. Dworkin, G. H. Olsen, C. R. Walkley, S. A. Fabb, S. J. Collins, and P. Chambon. 2006. RARGamma is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *J Exp Med* 203 (5):1283-93.
- Purton, L. E., and D. T. Scadden. 2007. Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell Stem Cell* 1 (3):263-70.
- Putz, G., A. Rosner, I. Nuesslein, N. Schmitz, and F. Buchholz. 2006. AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. *Oncogene* 25 (6):929-39.
- Quere, R., G. Karlsson, F. Hertwig, M. Rissler, B. Lindqvist, T. Fioretos, P. Vandenberghe, M. L. Slovak, J. Cammenga, and S. Karlsson. 2011. Smad4 binds Hoxa9 in the cytoplasm and protects primitive hematopoietic cells against nuclear activation by Hoxa9 and leukemia transformation. *Blood* 117 (22):5918-30.
- Raaijmakers, M. H., and D. T. Scadden. 2008. Divided within: heterogeneity within adult stem cell pools. *Cell* 135 (6):1006-8.
- Radulovic, V., G. de Haan, and K. Klauke. 2013. Polycomb-group proteins in hematopoietic stem cell regulation and hematopoietic neoplasms. *Leukemia* 27 (3):523-33.
- Randall, T. D., F. E. Lund, M. C. Howard, and I. L. Weissman. 1996. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood* 87 (10):4057-67.
- Rau, R., and P. Brown. 2009. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol* 27 (4):171-81.
- Rawat, V. P., S. Thoene, V. M. Naidu, N. Arseni, B. Heilmeyer, K. Metzeler, K. Petropoulos, A. Deshpande, L. Quintanilla-Martinez, S. K. Bohlander, K. Spiekermann, W. Hiddemann, M. Feuring-Buske, and C. Buske. 2008. Overexpression of CDX2 perturbs HOX gene expression in murine progenitors depending on its N-terminal domain and is closely correlated with deregulated HOX gene expression in human acute myeloid leukemia. *Blood* 111 (1):309-19.
- Ray, R. J., C. J. Paige, C. Furlonger, S. D. Lyman, and R. Rottapel. 1996. Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *Eur J Immunol* 26 (7):1504-10.

- Raza-Egilmez, S. Z., S. N. Jani-Sait, M. Grossi, M. J. Higgins, T. B. Shows, and P. D. Aplan. 1998. NUP98-HOXD13 gene fusion in therapy-related acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 58 (19):4269-73.
- Rebel, V. I., A. L. Kung, E. A. Tanner, H. Yang, R. T. Bronson, and D. M. Livingston. 2002. Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (23):14789-94.
- Rehn, M., A. Olsson, K. Reckzeh, E. Diffner, P. Carmeliet, G. Landberg, and J. Cammenga. 2011. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates murine hematopoietic stem cell function in the low-oxygenic niche. *Blood* 118 (6):1534-43.
- Reisman, D., S. Glaros, and E. A. Thompson. 2009. The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* 28 (14):1653-68.
- Reya, T., A. W. Duncan, L. Ailles, J. Domen, D. C. Scherer, K. Willert, L. Hintz, R. Nusse, and I. L. Weissman. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423 (6938):409-14.
- Roberts, C. W., M. M. Leroux, M. D. Fleming, and S. H. Orkin. 2002. Highly penetrant, rapid tumorigenesis through conditional inversion of the tumor suppressor gene *Snf5*. *Cancer Cell* 2 (5):415-25.
- Rodriguez-Tarduchy, G., M. Collins, and A. Lopez-Rivas. 1990. Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *EMBO J* 9 (9):2997-3002.
- Rodriguez, D., C. J. Morrison, and C. M. Overall. 2010. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* 1803 (1):39-54.
- Rosenbauer, F., and D. G. Tenen. 2007. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol* 7 (2):105-17.
- Ross, K., A. K. Sedello, G. P. Todd, M. Paszkowski-Rogacz, A. W. Bird, L. Ding, T. Grinenko, K. Behrens, N. Hubner, M. Mann, C. Waskow, C. Stocking, and F. Buchholz. 2012. Polycomb group ring finger 1 cooperates with Runx1 in regulating differentiation and self-renewal of hematopoietic cells. *Blood* 119 (18):4152-61.
- Rossi, D. J., D. Bryder, J. Seita, A. Nussenzweig, J. Hoeijmakers, and I. L. Weissman. 2007. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447 (7145):725-9.
- Rossi, D. J., D. Bryder, J. M. Zahn, H. Ahlenius, R. Sonu, A. J. Wagers, and I. L. Weissman. 2005. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (26):9194-9.
- Rossi, D. J., C. H. Jamieson, and I. L. Weissman. 2008. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 132 (4):681-96.
- Rossi, L., K. K. Lin, N. C. Boles, L. Yang, K. Y. King, M. Jeong, A. Mayle, and M. A. Goodell. 2012. Less is more: unveiling the functional core of hematopoietic stem cells through knockout mice. *Cell Stem Cell* 11 (3):302-17.
- Rothenberg, E. V. 2007. Negotiation of the T lineage fate decision by transcription-factor interplay and microenvironmental signals. *Immunity* 26 (6):690-702.
- Repeated Author. 2007. Regulatory factors for initial T lymphocyte lineage specification. *Curr Opin Hematol* 14 (4):322-9.

- Rozovskaia, T., E. Feinstein, O. Mor, R. Foa, J. Blechman, T. Nakamura, C. M. Croce, G. Cimino, and E. Canaani. 2001. Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4 : 11) abnormality. *Oncogene* 20 (7):874-8.
- Russell, E. S. 1979. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* 20:357-459.
- Sabin, Florence Rena. 1917. Origin and development of the primitive vessels of the chick and of the pig. *Contributions to embryology*. 6 (18).
- Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P. G. Robey, M. Riminucci, and P. Bianco. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131 (2):324-36.
- Salmanidis, M., G. Brumatti, N. Narayan, B. D. Green, J. A. van den Bergen, J. J. Sandow, A. G. Bert, N. Silke, R. Sladic, H. Puthalakath, L. Rohrbeck, T. Okamoto, P. Bouillet, M. J. Herold, G. J. Goodall, A. M. Jabbour, and P. G. Ekert. 2013. Hoxb8 regulates expression of microRNAs to control cell death and differentiation. *Cell Death Differ* 20 (10):1370-80.
- Sarma, K., R. Margueron, A. Ivanov, V. Pirrotta, and D. Reinberg. 2008. Ezh2 requires PHF1 to efficiently catalyze H3 lysine 27 trimethylation in vivo. *Mol Cell Biol* 28 (8):2718-31.
- Sashida, G., and A. Iwama. 2012. Epigenetic regulation of hematopoiesis. *Int J Hematol* 96 (4):405-12.
- Sato, T., J. H. Laver, and M. Ogawa. 1999. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 94 (8):2548-54.
- Sauvageau, G., N. N. Iscove, and R. K. Humphries. 2004. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* 23 (43):7223-32.
- Sauvageau, G., P. M. Lansdorp, C. J. Eaves, D. E. Hogge, W. H. Dragowska, D. S. Reid, C. Largman, H. J. Lawrence, and R. K. Humphries. 1994. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (25):12223-7.
- Sauvageau, G., U. Thorsteinsdottir, C. J. Eaves, H. J. Lawrence, C. Largman, P. M. Lansdorp, and R. K. Humphries. 1995. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 9 (14):1753-65.
- Sauvageau, G., U. Thorsteinsdottir, M. R. Hough, P. Hugo, H. J. Lawrence, C. Largman, and R. K. Humphries. 1997. Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* 6 (1):13-22.
- Sauvageau, M., and G. Sauvageau. 2010. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 7 (3):299-313.
- Schiedlmeier, B., A. C. Santos, A. Ribeiro, N. Moncaut, D. Lesinski, H. Auer, K. Kornacker, W. Ostertag, C. Baum, M. Mallo, and H. Klump. 2007. HOXB4's road map to stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (43):16952-7.
- Schilham, M. W., M. A. Oosterwegel, P. Moerer, J. Ya, P. A. de Boer, M. van de Wetering, S. Verbeek, W. H. Lamers, A. M. Kruisbeek, A. Cumano, and H. Clevers. 1996. Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 380 (6576):711-4.

- Schlenner, S. M., V. Madan, K. Busch, A. Tietz, C. Laufle, C. Costa, C. Blum, H. J. Fehling, and H. R. Rodewald. 2010. Fate mapping reveals separate origins of T cells and myeloid lineages in the thymus. *Immunity* 32 (3):426-36.
- Schneuwly, S., A. Kuroiwa, and W. J. Gehring. 1987. Molecular analysis of the dominant homeotic Antennapedia phenotype. *EMBO J* 6 (1):201-6.
- Schofield, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4 (1-2):7-25.
- Scholl, C., D. Bansal, K. Dohner, K. Eiwen, B. J. Huntly, B. H. Lee, F. G. Rucker, R. F. Schlenk, L. Bullinger, H. Dohner, D. G. Gilliland, and S. Frohling. 2007. The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. *J Clin Invest* 117 (4):1037-48.
- Schroeder, T. 2010. Hematopoietic stem cell heterogeneity: subtypes, not unpredictable behavior. *Cell Stem Cell* 6 (3):203-7.
- Schuettengruber, B., A. M. Martinez, N. Iovino, and G. Cavalli. 2011. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12 (12):799-814.
- Scott, C. L., J. Gil, E. Hernando, J. Teruya-Feldstein, M. Narita, D. Martinez, T. Visakorpi, D. Mu, C. Cordon-Cardo, G. Peters, D. Beach, and S. W. Lowe. 2007. Role of the chromobox protein CBX7 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (13):5389-94.
- Shahbazian, M. D., and M. Grunstein. 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76:75-100.
- Shao, L., H. Li, S. K. Pazhanisamy, A. Meng, Y. Wang, and D. Zhou. 2011. Reactive oxygen species and hematopoietic stem cell senescence. *Int J Hematol* 94 (1):24-32.
- Shen, W. F., K. Detmer, C. H. Mathews, F. M. Hack, D. A. Morgan, C. Largman, and H. J. Lawrence. 1992. Modulation of homeobox gene expression alters the phenotype of human hematopoietic cell lines. *EMBO J* 11 (3):983-9.
- Shen, W. F., Y. L. Hu, L. Uttarwar, E. Passegue, and C. Largman. 2008. MicroRNA-126 regulates HOXA9 by binding to the homeobox. *Mol Cell Biol* 28 (14):4609-19.
- Shen, W. F., C. Largman, P. Lowney, J. C. Corral, K. Detmer, C. A. Hauser, T. A. Simonitch, F. M. Hack, and H. J. Lawrence. 1989. Lineage-restricted expression of homeobox-containing genes in human hematopoietic cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (21):8536-40.
- Shen, W. F., J. C. Montgomery, S. Rozenfeld, J. J. Moskow, H. J. Lawrence, A. M. Buchberg, and C. Largman. 1997. AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 17 (11):6448-58.
- Shen, W. F., S. Rozenfeld, A. Kwong, L. G. Kom ves, H. J. Lawrence, and C. Largman. 1999. HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol Cell Biol* 19 (4):3051-61.
- Shen, X., W. Kim, Y. Fujiwara, M. D. Simon, Y. Liu, M. R. Mysliwiec, G. C. Yuan, Y. Lee, and S. H. Orkin. 2009. Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells. *Cell* 139 (7):1303-14.
- Shimamoto, T., Y. Tang, Y. Naot, M. Nardi, P. Brulet, C. J. Bieberich, and K. Takeshita. 1999. Hematopoietic progenitor cell abnormalities in Hoxc-8 null mutant mice. *J Exp Zool* 283 (2):186-93.

- Shirvaikar, N., L. A. Marquez-Curtis, and A. Janowska-Wieczorek. 2012. Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Homing after Transplantation: The Role of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. *Biochem Res Int* 2012:685267.
- Shivdasani, R. A. 2006. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 108 (12):3646-53.
- Shivdasani, R. A., Y. Fujiwara, M. A. McDevitt, and S. H. Orkin. 1997. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J* 16 (13):3965-73.
- Shivdasani, R. A., E. L. Mayer, and S. H. Orkin. 1995. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373 (6513):432-4.
- Shizuru, J. A., R. S. Negrin, and I. L. Weissman. 2005. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med* 56:509-38.
- Siminovitch, L., E. A. McCulloch, and J. E. Till. 1963. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol* 62:327-36.
- Sims, N. A., B. J. Jenkins, A. Nakamura, J. M. Quinn, R. Li, M. T. Gillespie, M. Ernst, L. Robb, and T. J. Martin. 2005. Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res* 20 (7):1093-102.
- Simsek, T., F. Kocabas, J. Zheng, R. J. Deberardinis, A. I. Mahmoud, E. N. Olson, J. W. Schneider, C. C. Zhang, and H. A. Sadek. 2010. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 7 (3):380-90.
- Singbrant, S., G. Karlsson, M. Ehinger, K. Olsson, P. Jaako, K. Miharada, M. Stadtfeld, T. Graf, and S. Karlsson. 2010. Canonical BMP signaling is dispensable for hematopoietic stem cell function in both adult and fetal liver hematopoiesis, but essential to preserve colon architecture. *Blood* 115 (23):4689-98.
- Singbrant, S., J. L. Moody, U. Blank, G. Karlsson, L. Umans, A. Zwijsen, and S. Karlsson. 2006. Smad5 is dispensable for adult murine hematopoiesis. *Blood* 108 (12):3707-12.
- Slany, R. K. 2009. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* 94 (7):984-93.
- Smith, E., and M. Sigvardsson. 2004. The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation. *J Leukoc Biol* 75 (6):973-81.
- Smith, L. G., I. L. Weissman, and S. Heimfeld. 1991. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (7):2788-92.
- Snoeck, H. W. 2013. Aging of the hematopoietic system. *Curr Opin Hematol* 20 (4):355-61.
- So, C. W., H. Karsunky, P. Wong, I. L. Weissman, and M. L. Cleary. 2004. Leukemic transformation of hematopoietic progenitors by MLL-GAS7 in the absence of Hoxa7 or Hoxa9. *Blood* 103 (8):3192-9.
- Somervaille, T. C., and M. L. Cleary. 2006. Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10 (4):257-68.
- Soulier, J., E. Clappier, J. M. Cayuela, A. Regnault, M. Garcia-Peydro, H. Dombret, A. Baruchel, M. L. Toribio, and F. Sigaux. 2005. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 106 (1):274-86.
- Spangrude, G. J., and D. M. Brooks. 1992. Phenotypic analysis of mouse hematopoietic stem cells shows a Thy-1-negative subset. *Blood* 80 (8):1957-64.



- Spangrude, G. J., S. Heimfeld, and I. L. Weissman. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241 (4861):58-62.
- Spangrude, G. J., and G. R. Johnson. 1990. Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (19):7433-7.
- Sparmann, A., and M. van Lohuizen. 2006. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 6 (11):846-56.
- Speleman, F., B. Cauwelier, N. Dastugue, J. Cools, B. Verhasselt, B. Poppe, N. Van Roy, J. Vandesompele, C. Graux, A. Uyttebroeck, M. Boogaerts, B. De Moerloose, Y. Benoit, D. Selleslag, J. Billiet, A. Robert, F. Huguet, P. Vandenberghe, A. De Paepe, P. Marynen, and A. Hagemeijer. 2005. A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 19 (3):358-66.
- Staal, F. J., F. Weerkamp, A. W. Langerak, R. W. Hendriks, and H. C. Clevers. 2001. Transcriptional control of T lymphocyte differentiation. *Stem Cells* 19 (3):165-79.
- Staber, P. B., P. Zhang, M. Ye, R. S. Welner, C. Nombela-Arrieta, C. Bach, M. Kerényi, B. A. Bartholdy, H. Zhang, M. Alberich-Jorda, S. Lee, H. Yang, F. Ng, J. Zhang, M. Leddin, L. E. Silberstein, G. Hoefler, S. H. Orkin, B. Gottgens, F. Rosenbauer, G. Huang, and D. G. Tenen. 2013. Sustained PU.1 levels balance cell-cycle regulators to prevent exhaustion of adult hematopoietic stem cells. *Mol Cell* 49 (5):934-46.
- Stamenkovic, I. 2003. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200 (4):448-64.
- Stier, S., T. Cheng, D. Dombkowski, N. Carlesso, and D. T. Scadden. 2002. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 99 (7):2369-78.
- Stier, S., Y. Ko, R. Forkert, C. Lutz, T. Neuhaus, E. Grunewald, T. Cheng, D. Dombkowski, L. M. Calvi, S. R. Rittling, and D. T. Scadden. 2005. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 201 (11):1781-91.
- Suarez-Alvarez, B., R. M. Rodriguez, M. F. Fraga, and C. Lopez-Larrea. 2012. DNA methylation: a promising landscape for immune system-related diseases. *Trends Genet* 28 (10):506-14.
- Suda, T., K. Takubo, and G. L. Semenza. 2011. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 9 (4):298-310.
- Sudo, K., H. Ema, Y. Morita, and H. Nakauchi. 2000. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192 (9):1273-80.
- Suemori, H., and S. Noguchi. 2000. Hox C cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development. *Dev Biol* 220 (2):333-42.
- Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda, and T. Nagasawa. 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25 (6):977-88.
- Sun, B., S. Mallampati, Y. Gong, D. Wang, V. Lefebvre, and X. Sun. 2013. Sox4 is required for the survival of pro-B cells. *J Immunol* 190 (5):2080-9.
- Suzuki, A., Y. Ito, G. Sashida, S. Honda, T. Katagiri, T. Fujino, T. Nakamura, and K. Ohyashiki. 2002. t(7;11)(p15;p15) Chronic myeloid leukaemia developed into blastic transformation showing a novel NUP98/HOXA11 fusion. *Br J Haematol* 116 (1):170-2.

- Szczur, K., Y. Zheng, and M. D. Filippi. 2009. The small Rho GTPase Cdc42 regulates neutrophil polarity via CD11b integrin signaling. *Blood* 114 (20):4527-37.
- Szilvassy, S. J., R. K. Humphries, P. M. Lansdorp, A. C. Eaves, and C. J. Eaves. 1990. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (22):8736-40.
- Tadokoro, Y., H. Ema, M. Okano, E. Li, and H. Nakauchi. 2007. De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 204 (4):715-22.
- Taghon, T., F. Stolz, M. De Smedt, M. Cnockaert, B. Verhasselt, J. Plum, and G. Leclercq. 2002. HOX-A10 regulates hematopoietic lineage commitment: evidence for a monocyte-specific transcription factor. *Blood* 99 (4):1197-204.
- Taghon, T., K. Thys, M. De Smedt, F. Weerkamp, F. J. Staal, J. Plum, and G. Leclercq. 2003. Homeobox gene expression profile in human hematopoietic multipotent stem cells and T-cell progenitors: implications for human T-cell development. *Leukemia* 17 (6):1157-63.
- Tajbakhsh, S., P. Rocheteau, and I. Le Roux. 2009. Asymmetric cell divisions and asymmetric cell fates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:671-99.
- Tajima, F., T. Deguchi, J. H. Laver, H. Zeng, and M. Ogawa. 2001. Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells. *Blood* 97 (9):2618-24.
- Taketani, T., T. Taki, N. Shibuya, E. Ito, J. Kitazawa, K. Terui, and Y. Hayashi. 2002. The HOXD11 gene is fused to the NUP98 gene in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q31;p15). *Cancer Res* 62 (1):33-7.
- Taketani, T., T. Taki, N. Shibuya, A. Kikuchi, R. Hanada, and Y. Hayashi. 2002. Novel NUP98-HOXC11 fusion gene resulted from a chromosomal break within exon 1 of HOXC11 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Cancer Res* 62 (16):4571-4.
- Takubo, K., N. Goda, W. Yamada, H. Iriuchishima, E. Ikeda, Y. Kubota, H. Shima, R. S. Johnson, A. Hirao, M. Suematsu, and T. Suda. 2010. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 7 (3):391-402.
- Taniguchi, Y., N. Komatsu, and T. Moriuchi. 1995. Overexpression of the HOXA4 (HOXD3) homeobox gene in human erythroleukemia HEL cells results in altered adhesive properties. *Blood* 85 (10):2786-94.
- Thorsteinsdottir, U., E. Kroon, L. Jerome, F. Blasi, and G. Sauvageau. 2001. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 21 (1):224-34.
- Thorsteinsdottir, U., A. Mamo, E. Kroon, L. Jerome, J. Bijl, H. J. Lawrence, K. Humphries, and G. Sauvageau. 2002. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 99 (1):121-9.
- Thorsteinsdottir, U., G. Sauvageau, M. R. Hough, W. Dragowska, P. M. Lansdorp, H. J. Lawrence, C. Largman, and R. K. Humphries. 1997. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 17 (1):495-505.
- Thorsteinsdottir, U., G. Sauvageau, and R. K. Humphries. 1999. Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood* 94 (8):2605-12.

- Toren, A., B. Bielora, J. Jacob-Hirsch, T. Fisher, D. Kreiser, O. Moran, S. Zeligson, D. Givol, A. Yitzhaky, J. Itskovitz-Eldor, I. Kventsel, E. Rosenthal, N. Amariglio, and G. Rechavi. 2005. CD133-positive hematopoietic stem cell "stemness" genes contain many genes mutated or abnormally expressed in leukemia. *Stem Cells* 23 (8):1142-53.
- Tosic, N., M. Stojiljkovic, N. Colovic, M. Colovic, and S. Pavlovic. 2009. Acute myeloid leukemia with NUP98-HOXC13 fusion and FLT3 internal tandem duplication mutation: case report and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 193 (2):98-103.
- Tothova, Z., R. Kollipara, B. J. Huntly, B. H. Lee, D. H. Castrillon, D. E. Cullen, E. P. McDowell, S. Lazo-Kallanian, I. R. Williams, C. Sears, S. A. Armstrong, E. Passegue, R. A. DePinho, and D. G. Gilliland. 2007. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 128 (2):325-39.
- Traver, D., K. Akashi, M. Manz, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman, and I. L. Weissman. 2000. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290 (5499):2152-4.
- Trowbridge, J. J., J. W. Snow, J. Kim, and S. H. Orkin. 2009. DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 5 (4):442-9.
- Uchida, N., and I. L. Weissman. 1992. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* 175 (1):175-84.
- Ugarte, F., and E. C. Forsberg. 2013. Haematopoietic stem cell niches: new insights inspire new questions. *EMBO J* 32 (19):2535-47.
- Umamoto, T., M. Yamato, Y. Shiratsuchi, M. Terasawa, J. Yang, K. Nishida, Y. Kobayashi, and T. Okano. 2006. Expression of Integrin beta3 is correlated to the properties of quiescent hemopoietic stem cells possessing the side population phenotype. *J Immunol* 177 (11):7733-9.
- Repeated Author. 2008. CD61 enriches long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 365 (1):176-82.
- van Bekkum, D. W., G. J. van den Engh, G. Wagemaker, S. J. Bol, and J. W. Visser. 1979. Structural identity of the pluripotential hemopoietic stem cell. *Blood Cells* 5 (2):143-59.
- van Os, R., L. M. Kamminga, A. Ausema, L. V. Bystrykh, D. P. Draijer, K. van Pelt, B. Dontje, and G. de Haan. 2007. A limited role for p21Cip1/Waf1 in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning. *Stem Cells* 25 (4):836-43.
- van Os, R., L. M. Kamminga, and G. de Haan. 2004. Stem cell assays: something old, something new, something borrowed. *Stem Cells* 22 (7):1181-90.
- Van Zant, Gary. 2006. Stem cell markers: less is more! *Blood* 107 (3):855-856.
- Varnum-Finney, B., L. E. Purton, M. Yu, C. Brashem-Stein, D. Flowers, S. Staats, K. A. Moore, I. Le Roux, R. Mann, G. Gray, S. Artavanis-Tsakonas, and I. D. Bernstein. 1998. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* 91 (11):4084-91.
- Varnum-Finney, B., L. Xu, C. Brashem-Stein, C. Nourigat, D. Flowers, S. Bakkour, W. S. Pear, and I. D. Bernstein. 2000. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* 6 (11):1278-81.
- Vassiliou, G. S., J. L. Cooper, R. Rad, J. Li, S. Rice, A. Uren, L. Rad, P. Ellis, R. Andrews, R. Banerjee, C. Grove, W. Wang, P. Liu, P. Wright, M. Arends, and A. Bradley. 2011.

- Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice. *Nat Genet* 43 (5):470-5.
- Velu, C. S., A. M. Baktula, and H. L. Grimes. 2009. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. *Blood* 113 (19):4720-8.
- Vieille-Grosjean, I., and P. Huber. 1995. Transcription factor GATA-1 regulates human HOXB2 gene expression in erythroid cells. *J Biol Chem* 270 (9):4544-50.
- Visnjic, D., Z. Kalajzic, D. W. Rowe, V. Katavic, J. Lorenzo, and H. L. Aguila. 2004. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 103 (9):3258-64.
- von Freeden-Jeffry, U., P. Vieira, L. A. Lucian, T. McNeil, S. E. Burdach, and R. Murray. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181 (4):1519-26.
- Wagers, A. J., and I. L. Weissman. 2006. Differential expression of alpha2 integrin separates long-term and short-term reconstituting Lin-/loThy1.1(lo)c-kit+ Sca-1+ hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 24 (4):1087-94.
- Wang, H., L. Wang, H. Erdjument-Bromage, M. Vidal, P. Tempst, R. S. Jones, and Y. Zhang. 2004. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431 (7010):873-8.
- Wang, L., R. Benedito, M. G. Bixel, D. Zeuschner, M. Stehling, L. Savendahl, J. J. Haigh, H. Snippert, H. Clevers, G. Breier, F. Kiefer, and R. H. Adams. 2013. Identification of a clonally expanding haematopoietic compartment in bone marrow. *EMBO J* 32 (2):219-30.
- Wang, L., J. L. Brown, R. Cao, Y. Zhang, J. A. Kassis, and R. S. Jones. 2004. Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* 14 (5):637-46.
- Wang, Q., T. Stacy, M. Binder, M. Marin-Padilla, A. H. Sharpe, and N. A. Speck. 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):3444-9.
- Wang, Y., A. Yabuuchi, S. McKinney-Freeman, D. M. Ducharme, M. K. Ray, K. Chawengsaksophak, T. K. Archer, and G. Q. Daley. 2008. Cdx gene deficiency compromises embryonic hematopoiesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (22):7756-61.
- Warr, M. R., M. Binnewies, J. Flach, D. Reynaud, T. Garg, R. Malhotra, J. Debnath, and E. Passegue. 2013. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* 494 (7437):323-7.
- Waskow, C., S. Paul, C. Haller, M. Gassmann, and H. R. Rodewald. 2002. Viable c-Kit(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity* 17 (3):277-88.
- Watson, J. V., A. Nakeff, S. H. Chambers, and P. J. Smith. 1985. Flow cytometric fluorescence emission spectrum analysis of Hoechst-33342-stained DNA in chicken thymocytes. *Cytometry* 6 (4):310-5.
- Weissman, I. L. 2002. The road ended up at stem cells. *Immunol Rev* 185:159-74.
- Weksberg, D. C., S. M. Chambers, N. C. Boles, and M. A. Goodell. 2008. CD150- side population cells represent a functionally distinct population of long-term hematopoietic stem cells. *Blood* 111 (4):2444-51.
- Welch, J. S., T. J. Ley, D. C. Link, C. A. Miller, D. E. Larson, D. C. Koboldt, L. D. Wartman, T. L. Lamprecht, F. Liu, J. Xia, C. Kandoth, R. S. Fulton, M. D. McLellan, D. J.

- Dooling, J. W. Wallis, K. Chen, C. C. Harris, H. K. Schmidt, J. M. Kalicki-Veizer, C. Lu, Q. Zhang, L. Lin, M. D. O'Laughlin, J. F. McMichael, K. D. Delehaunty, L. A. Fulton, V. J. Magrini, S. D. McGrath, R. T. Demeter, T. L. Vickery, J. Hundal, L. L. Cook, G. W. Swift, J. P. Reed, P. A. Alldredge, T. N. Wylie, J. R. Walker, M. A. Watson, S. E. Heath, W. D. Shannon, N. Varghese, R. Nagarajan, J. E. Payton, J. D. Baty, S. Kulkarni, J. M. Klco, M. H. Tomasson, P. Westervelt, M. J. Walter, T. A. Graubert, J. F. DiPersio, L. Ding, E. R. Mardis, and R. K. Wilson. 2012. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 150 (2):264-78.
- Welner, R. S., R. Pelayo, and P. W. Kincade. 2008. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat Rev Immunol* 8 (2):95-106.
- Wermuth, P. J., and A. M. Buchberg. 2005. Meis1-mediated apoptosis is caspase dependent and can be suppressed by coexpression of HoxA9 in murine and human cell lines. *Blood* 105 (3):1222-30.
- Wheadon, H., J. M. Ramsey, E. Dobbin, G. J. Dickson, P. M. Corrigan, R. W. Freeburn, and A. Thompson. 2011. Differential Hox expression in murine embryonic stem cell models of normal and malignant hematopoiesis. *Stem Cells Dev* 20 (8):1465-76.
- Whetton, A. D., and E. Spooncer. 1998. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 10 (6):721-6.
- Whitcomb, S. J., A. Basu, C. D. Allis, and E. Bernstein. 2007. Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends Genet* 23 (10):494-502.
- Whitlock, C. A., and O. N. Witte. 1982. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (11):3608-12.
- Williams, D. E., J. Eisenman, A. Baird, C. Rauch, K. Van Ness, C. J. March, L. S. Park, U. Martin, D. Y. Mochizuki, H. S. Boswell, and et al. 1990. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 63 (1):167-74.
- Wilson, A., E. Laurenti, G. Oser, R. C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C. F. Dunant, L. Eshkind, E. Bockamp, P. Lio, H. R. Macdonald, and A. Trumpp. 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135 (6):1118-29.
- Wilson, A., M. J. Murphy, T. Oskarsson, K. Kaloulis, M. D. Bettess, G. M. Oser, A. C. Pasche, C. Knabenhans, H. R. Macdonald, and A. Trumpp. 2004. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* 18 (22):2747-63.
- Wilson, A., G. M. Oser, M. Jaworski, W. E. Blanco-Bose, E. Laurenti, C. Adolphe, M. A. Essers, H. R. Macdonald, and A. Trumpp. 2007. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann N Y Acad Sci* 1106:64-75.
- Wilson, A., and A. Trumpp. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6 (2):93-106.
- Winkler, I. G., N. A. Sims, A. R. Pettit, V. Barbier, B. Nowlan, F. Helwani, I. J. Poulton, N. van Rooijen, K. A. Alexander, L. J. Raggatt, and J. P. Levesque. 2010. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 116 (23):4815-28.
- Wong, W. M., M. Sigvardsson, I. Astrand-Grundstrom, D. Hogge, J. Larsson, H. Qian, and M. Ekblom. 2013. Expression of integrin alpha2 receptor in human cord blood CD34+CD38-CD90+ stem cells engrafting long-term in NOD/SCID-IL2Rgamma(c) null mice. *Stem Cells* 31 (2):360-71.

- Woolthuis, C. M., G. de Haan, and G. Huls. 2011. Aging of hematopoietic stem cells: Intrinsic changes or micro-environmental effects? *Curr Opin Immunol* 23 (4):512-7.
- Worton, R. G., E. A. McCulloch, and J. E. Till. 1969. Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal. *J Exp Med* 130 (1):91-103.
- Repeated Author. 1969. Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. *J Cell Physiol* 74 (2):171-82.
- Wu, H., X. Liu, R. Jaenisch, and H. F. Lodish. 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, J. I., J. Lessard, and G. R. Crabtree. 2009. Understanding the words of chromatin regulation. *Cell* 136 (2):200-6.
- Xie, Y., T. Yin, W. Wiegraabe, X. C. He, D. Miller, D. Stark, K. Perko, R. Alexander, J. Schwartz, J. C. Grindley, J. Park, J. S. Haug, J. P. Wunderlich, H. Li, S. Zhang, T. Johnson, R. A. Feldman, and L. Li. 2009. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* 457 (7225):97-101.
- Xing, Z., M. A. Ryan, D. Daria, K. J. Nattamai, G. Van Zant, L. Wang, Y. Zheng, and H. Geiger. 2006. Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood* 108 (7):2190-7.
- Yan, J., Y. X. Chen, A. Desmond, A. Silva, Y. Yang, H. Wang, and X. Hua. 2006. Cdx4 and menin co-regulate Hoxa9 expression in hematopoietic cells. *PLoS One* 1:e47.
- Yang, L., D. Bryder, J. Adolfsson, J. Nygren, R. Mansson, M. Sigvardsson, and S. E. Jacobsen. 2005. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 105 (7):2717-23.
- Yekta, S., I. H. Shih, and D. P. Bartel. 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304 (5670):594-6.
- Yilmaz, O. H., M. J. Kiel, and S. J. Morrison. 2006. SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity. *Blood* 107 (3):924-30.
- Yu, B. D., R. D. Hanson, J. L. Hess, S. E. Horning, and S. J. Korsmeyer. 1998. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (18):10632-6.
- Yu, B. D., J. L. Hess, S. E. Horning, G. A. Brown, and S. J. Korsmeyer. 1995. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 378 (6556):505-8.
- Yu, X., J. K. Alder, J. H. Chun, A. D. Friedman, S. Heimfeld, L. Cheng, and C. I. Civin. 2006. HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding. *Stem Cells* 24 (4):876-88.
- Yuan, J., C. K. Nguyen, X. Liu, C. Kanellopoulou, and S. A. Muljo. 2012. Lin28b reprograms adult bone marrow hematopoietic progenitors to mediate fetal-like lymphopoiesis. *Science* 335 (6073):1195-200.
- Zakany, J., C. Fromental-Ramain, X. Warot, and D. Duboule. 1997. Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dose-dependent mechanism with potential evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (25):13695-700.
- Zakany, J., M. Gerard, B. Favier, S. S. Potter, and D. Duboule. 1996. Functional equivalence and rescue among group 11 Hox gene products in vertebral patterning. *Dev Biol* 176 (2):325-8.

- Zangenberg, M., L. Grubach, A. Aggerholm, T. Silkjaer, C. Juhl-Christensen, C. G. Nyvold, E. Kjeldsen, H. B. Ommen, and P. Hokland. 2009. The combined expression of HOXA4 and MEIS1 is an independent prognostic factor in patients with AML. *Eur J Haematol* 83 (5):439-48.
- Zangrado, A., M. C. Dell'orto, G. Te Kronnie, and G. Basso. 2009. MLL rearrangements in pediatric acute lymphoblastic and myeloblastic leukemias: MLL specific and lineage specific signatures. *BMC Med Genomics* 2:36.
- Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. Li. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425 (6960):836-41.
- Zhang, P., J. Iwasaki-Arai, H. Iwasaki, M. L. Fenyus, T. Dayaram, B. M. Owens, H. Shigematsu, E. Levantini, C. S. Huettner, J. A. Lekstrom-Himes, K. Akashi, and D. G. Tenen. 2004. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity* 21 (6):853-63.
- Zhang, X., Z. Lian, C. Padden, M. B. Gerstein, J. Rozowsky, M. Snyder, T. R. Gingeras, P. Kapranov, S. M. Weissman, and P. E. Newburger. 2009. A myelopoiesis-associated regulatory intergenic noncoding RNA transcript within the human HOXA cluster. *Blood* 113 (11):2526-34.
- Zhang, Y., Z. Yang, and J. Wu. 2007. Signaling pathways and preimplantation development of mammalian embryos. *FEBS J* 274 (17):4349-59.
- Zhao, Y., Y. Lin, Y. Zhan, G. Yang, J. Louie, D. E. Harrison, and W. F. Anderson. 2000. Murine hematopoietic stem cell characterization and its regulation in BM transplantation. *Blood* 96 (9):3016-22.
- Zhou, S., J. D. Schuetz, K. D. Bunting, A. M. Colapietro, J. Sampath, J. J. Morris, I. Lagutina, G. C. Grosveld, M. Osawa, H. Nakauchi, and B. P. Sorrentino. 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):1028-34.
- Zhu, J., and S. G. Emerson. 2002. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21 (21):3295-313.
- Zhu, J., D. M. Giannola, Y. Zhang, A. J. Rivera, and S. G. Emerson. 2003. NF-Y cooperates with USF1/2 to induce the hematopoietic expression of HOXB4. *Blood* 102 (7):2420-7.
- Zijlmans, J. M., J. W. Visser, K. Kleiverda, P. M. Kluin, R. Willemze, and W. E. Fibbe. 1995. Modification of rhodamine staining allows identification of hematopoietic stem cells with preferential short-term or long-term bone marrow-repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (19):8901-5.
- Zon, L. I. 2008. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature* 453 (7193):306-13.
- Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, and D. R. Littman. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393 (6685):595-9.

# Annexe 1

## Liste des publications

- **Publication par article**

**Lebert-Ghali CE**, Fournier M, Thompson A, Sauvageau G, Bijl JJ. Hoxa genes are critical for maintenance of hematopoietic stem cells and regulate their interaction with the niche. *En préparation*

Hassawi M\*, Shestakova\*, Fournier M, **Lebert-Ghali CE**, Frison H, Thompson A, Bijl JJ. Hoxa9 collaborates with E2A-PBX1 in mouse B cell leukemia in association with Flt3 activation and decrease of B cell gene expression. *Dev Dyn.* 2014 Jan;243(1):145-58.

\*these authors contributed equally to the manuscript

Fournier M, **Lebert-Ghali CE**, Kros1 G, Bijl JJ. HOXA4 Induces Expansion of Hematopoietic Stem Cells In Vitro and Confers Enhancement of Pro-B-Cells In Vivo. *Stem Cells Dev.* 2012 Jan 1;21(1):133-42.

**Lebert-Ghali CE**, Fournier M, Dickson GJ, Thompson A, Sauvageau G, Bijl JJ. HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol.* 2010 Nov;38(11):1074-1086.

Bijl J, Kros1 J, **Lebert-Ghali CE**, Vacher J, Mayotte N, Sauvageau G. Evidence for Hox and E2A-PBX1 collaboration in mouse T-cell leukemia. *Oncogene.* 2008 Oct 23; 27(49):6356-64.

- **Chapitre de livre**

**Lebert-Ghali CE**, Ramsey JM, Thompson A, Bijl JJ. Chapter 2: Sensitivity of hematopoietic and leukemic stem cells to HoxA gene Levels. *Stem Cells and Cancer Stem Cells: Therapeutic Applications in Disease and Injury*, Volume 4, Springer. 2012 Feb 7



