

Université de Montréal

**Rôle des gènes *HOX* du paralogue 4
dans l'autorenouvellement des cellules souches
et progéniteurs hématopoïétiques**

par

Marilaine Fournier

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

Août 2014

© Marilaine Fournier, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Rôle des gènes *HOX* du paralogue 4
dans l'autorenouvellement des cellules souches
et progéniteurs hématopoïétiques**

Présentée par :
Marilaine Fournier

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Sylvie Lesage, président-rapporteur
Dr. Janetta Bijl, directeur de recherche
Dr. Tarik Moröy, membre du jury
Dr. Nicolas Pineault, examinateur externe
Dr. Jean-Sébastien Delisle, représentant du doyen de la FES

Résumé

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est un traitement couramment utilisé pour traiter plusieurs types de maladies hématologiques telles que les leucémies. Par contre, une limite importante de ce type de traitement est la quantité restreinte de CSH disponibles pour la transplantation. Il importe donc de trouver des moyens pour expandre efficacement ces cellules *ex vivo* tout en préservant leurs propriétés. Le gène *HOXB4* est présentement un candidat très prometteur pour atteindre cet objectif. Il a en effet été montré que *HOXB4* est capable d'expandre les CSH *in vivo* et *in vitro* sans mener au développement de leucémie. Le gène *HOXC4*, qui appartient au même paralogue est aussi en mesure d'expandre les cellules hématopoïétiques primitives suggérant un rôle commun pour les gènes *HOX* du paralogue 4 dans l'autorenouvellement des CSH.

Le gène *HOXA4* est dix fois plus exprimé que le gène *HOXB4* dans des CSH du foie fœtal au moment de leur principale expansion. De plus, les CSH mutantes pour *Hoxa4*, contrairement aux CSH mutantes pour *Hoxb4*, sont incapables de reconstituer un receveur irradié lorsqu'elles sont transplantées en condition de compétition. *HOXA4* pourrait donc jouer un rôle plus important que les autres gènes du paralogue 4 pour l'expansion des CSH au niveau physiologique. Nous avons donc posé l'hypothèse que *HOXA4* est capable d'expandre des CSH de façon plus importante que *HOXB4*.

Les résultats obtenues dans le cadre de ce projet de recherche ont montré que la surexpression de *HOXA4* était capable d'expandre les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques primitifs dans le même ordre que ce qui est connu pour *HOXB4*. Des cultures et des essais de transplantation en situation de compétition ont confirmé la capacité égale des CSH surexprimant *HOXA4* et *HOXB4* de proliférer et de reconstituer les receveurs irradiés à long terme. Par contre, nous avons observé une meilleure reconstitution périphérique à court terme par les CSH *HOXA4*⁺ par rapport aux CSH *HOXB4*⁺, associée à une meilleure reconstitution lymphoïde. Nous avons aussi comparé les niveaux d'expression de gènes cibles potentiels dans des CSH surexprimant *HOXA4* ou *HOXB4* et observer que plusieurs gènes importants pour la fonction des CSH était régulé positivement suite à leur surexpression, notamment plusieurs gènes impliqués dans les voies de signalisation Notch et Wnt, tels que

des récepteurs et ligands. Les gènes *HOX* du paralogue 4 pourraient donc réguler la communication entre les CSH et leur microenvironnement via ces voies de signalisation majeures et ainsi réguler leur autorenouveaulement. La modulation de différents gènes codant pour des facteurs de transcription et des molécules impliquées dans la pluripotence suggère également que *HOXA4* et *HOXB4* utilisent des mécanismes intrinsèques et extrinsèques pour réguler leur potentiel d'autorenouveaulement.

Ces connaissances pourront ainsi être utilisées pour optimiser les protocoles d'expansion *ex vivo* des CSH dans un but thérapeutique.

Mots-clés : Cellule souche hématopoïétique (CSH), transplantation de CSH, *HOXA4*, *HOXB4*

Abstract

Transplantation of hematopoietic stem cells (HSC) is a treatment commonly used to treat several types of hematological diseases such as leukemia. However, a major limitation of this type of treatment is the limited number of HSC available for transplantation. It is therefore important to develop ways to expand these cells *ex vivo*. The *HOXB4* gene is a promising candidate for achieving this goal. It has indeed been shown that *HOXB4* is able to expand HSC *in vivo* and *in vitro* without inducing leukemia. *HOXC4*, which belongs to the same paralog group, is also able to expand primitive hematopoietic cell suggesting a common role for paralog 4 *HOX* genes in the self-renewal of HSC.

HOXA4 is ten times more expressed in fetal liver HSC during their primary expansion. Furthermore, *Hoxa4* mutant HSC, unlike *Hoxb4* mutant HSC, are unable to reconstitute an irradiated recipient when transplanted in competition. Therefore, *HOXA4* could play a more important role than other paralog 4 genes for HSC expansion at the physiological level and we hypothesized that *HOXA4* can expand HSC more efficiently than *HOXB4*.

The results obtained during this research project showed that the overexpression of *HOXA4* expand HSC and primitive hematopoietic progenitors in the same order as *HOXB4*. Direct competitive culture and transplantation assays confirmed the equal capacity of HSC overexpressing *HOXA4* and *HOXB4* to proliferate and engraft at long-term. However, we observed a better short-term peripheral reconstitution by *HOXA4*⁺ HSC compared to *HOXB4*⁺ HSC, which was associated with a better lymphoid reconstitution. We also compared the expression levels of potential target genes in HSC overexpressing *HOXA4* or *HOXB4* and observed that many genes important for HSC function were upregulated following their overexpression, including several genes involved in the Notch and Wnt signaling pathway. These included both receptors as well as ligands, indicating that *HOX4* genes might regulate the communication of primitive HSCs with their environment through these major signaling pathways and promote self-renewal. In addition, modulation of genes coding for transcription factors and molecules known for their function in pluripotency suggest that *HOXA4* and *HOXB4* have both intrinsic and extrinsic potential to control self-renewal potential.

This knowledge can then be further explored and used to optimize *ex vivo* HSC expansion protocols for clinical purposes.

Keywords: Hematopoietic stem cell (HSC), HSC transplantation, *HOXA4*, *HOXB4*

Table des matières

Résumé.....	iv
Abstract.....	vi
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations	xiv
Remerciements	xviii
Chapitre 1: Introduction	1
1.1 Hématopoïèse.....	1
1.1.1 Développement hématopoïétique : origine des cellules souches hématopoïétiques..	2
1.1.2 La cellule souche hématopoïétique.....	4
1.1.3 La niche hématopoïétique	6
1.1.4 Différenciation des cellules souches hématopoïétiques.....	10
1.1.5 Vieillessement des cellules souches hématopoïétiques	12
1.2 Mécanismes d'autorenouvellement des cellules souches	14
1.2.1 Différents types de cellules souches pluripotentes	14
1.2.2 Division asymétrique des cellules souches hématopoïétiques.....	15
1.2.3 Voies de signalisation importantes pour l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques	17
1.2.4 Régulateurs de l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques	20
1.3 Les gènes homéobox de classe I	22
1.3.1 Structure et organisation des gènes <i>HOX</i>	22
1.3.2 Rôle des gènes <i>HOX</i> dans le développement embryonnaire	23
1.3.3 Régulation de l'expression des gènes <i>HOX</i>	24
1.3.4 Rôle des gènes <i>HOX</i> dans l'hématopoïèse.....	26
1.3.5 Implication des gènes <i>HOX</i> dans les maladies hématologiques	28
1.3.6 Mécanismes d'action des protéines HOX.....	30
1.4 La transplantation de cellules souches hématopoïétiques.....	32
1.4.1 Différents types de greffes de cellules souches hématopoïétiques	32

1.4.2 Différentes sources de cellules souches hématopoïétiques pour la transplantation.	32
1.4.3 Complications associées aux transplantations de cellules souches hématopoïétiques	
.....	33
1.5 Expansion des cellules souches hématopoïétiques	35
1.5.1 Induction de l'expansion par un stress hématopoïétique	35
1.5.2 Optimisation des milieux de culture par des combinaisons de cytokines	36
1.5.3 Utilisation de facteurs intrinsèques des cellules souches hématopoïétiques	37
1.5.4 Utilisation de régulateurs développementaux	38
1.5.5 Utilisation de modulateurs chimiques	39
1.5.6 Conditions de culture	40
1.6 Les gènes <i>HOX</i> du paralogue 4	41
1.6.1 Le gène <i>homéobox A4</i>	41
1.6.2 Le gène <i>homéobox B4</i>	42
1.6.3 Le gène <i>homéobox C4</i>	45
1.6.4 Gènes cibles des gènes <i>HOX</i> du paralogue 4	46
1.7 Rationnelle, hypothèse et méthodes	49
1.7.1 Rationnelle et hypothèse du projet de recherche	49
1.7.2 Objectifs spécifiques du projet de recherche	49
1.7.3 Principales méthodes pour l'étude des cellules souches et progéniteurs	
hématopoïétiques utilisées dans le cadre de ce projet de recherche	50
1.7.4 Modèle murin de leucémie lymphoblastique aigüe <i>E2A-PBX1</i>	51
Chapitre 2 : Article 1	52
Abstract	54
Introduction	55
Material and methods	57
Results	60
Discussion	65
Acknowledgments	67
Disclosure of potential conflict of interest	67
Reference list	68
Figures and legends to the figures	74

Supplemental tables	79
Supplemental figures and legend to the supplemental figures	85
Chapitre 3 : Article 2	89
Abstract.....	91
Introduction.....	92
Methods.....	93
Discussion.....	99
Author disclosure statement	102
References	103
Tables	107
Figures and legend of the figures.....	110
Supplemental tables	116
Supplemental figure.....	118
Chapitre 4 : Article 3	119
Abstract.....	121
Introduction.....	122
Material and methods.....	124
Results	128
Discussion.....	132
Support and financial disclosure declaration.....	134
Acknowledgments	135
Reference list	136
Figures and legends to the figures	141
Supplemental table.....	148
Supplemental figures and legends to the supplemental figures.....	149
Chapitre 5 : Discussion et conclusion.....	153
5.1 Expansion des cellules souches hématopoïétiques par les gènes <i>HOX</i> du paralogue 4.....	153
5.1.1 Expansion des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques par <i>HOXA4</i>	153
5.1.2 Étude comparative de la surexpression de <i>HOXA4</i> par rapport à <i>HOXB4</i> sur les cellules souches hématopoïétiques	155

5.1.3 Comparaison de l'expansion des cellules souches hématopoïétiques par les gènes <i>HOX</i> du paragraphe 4 et les autres méthodes d'expansion.....	156
5.1.4 Différences dans le potentiel d'expansion de <i>HOXB4</i> sur les cellules souches hématopoïétiques humaines et murines	159
5.2 Potentiel oncogénique des gènes <i>HOX</i> du paragraphe 4 : implications pour leur utilisation dans un but thérapeutique	161
5.2.1 Potentiel oncogénique des gènes <i>HOX</i> du paragraphe 4	161
5.2.2 Incapacité de <i>HOXB4</i> à expandre ou transformer les cellules B malignes.....	163
5.3 Identification des mécanismes d'action des gènes <i>HOXA4</i> et <i>HOXB4</i>.....	164
5.3.1 Évaluation de l'expression des gènes cibles de <i>HOXA4</i> et <i>HOXB4</i>	165
5.3.2 Implications des gènes cibles de <i>HOXA4</i> et <i>HOXB4</i> dans l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques	165
5.3.3 Mécanismes d'action possibles des gènes <i>HOX</i> du paragraphe 4	168
5.4 Conclusions et perspectives	169
Bibliographie	i
Annexe 1: Liste des publications	xxvi

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux gènes cibles des protéines HOX du paralogue 4 identifiés

Tableau 2 : Niveaux d'expansion des cellules souches hématopoïétiques *in vitro* obtenues par différentes méthodes

Liste des figures

Figure 1 : Hiérarchie du système hématopoïétique

Figure 2 : Génération, développement et autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques

Figure 3 : Structure et interactions de la niche hématopoïétique de la moelle osseuse

Figure 4: Structure et organisation des gènes *HOX* chez les mammifères

Figure 5 : Mécanismes d'action possibles des gènes *HOX* du paralogue 4

Liste des abréviations

AGM : aorte-gonade-mésonéphros

AID : désaminase de cytidine induite par l'activation (*Activation-Induced cytidine Deaminase*)

ALL : leucémie lymphoïde aigüe (*Acute Lymphoid Leukemia*)

AML : leucémie myéloïde aigüe (*Acute Myeloid Leukemia*)

ANGPTL : *Angiopoietin-like Protein*

ATRA : récepteur de l'acide rétinoïque

BCL2 : *B-cell Lymphoma 2*

BFU-E : *Burst Forming Unit Erythrocytes*

BM : moelle osseuse (*Bone Marrow*)

BMP : protéine morphogénétique osseuse (*Bone Morphogenic Protein*)

BMPR : récepteur de BMP (*BMP Receptor*)

CDK : kinases dépendantes des cyclines (*Cyclin-Dependant Kinase*)

CDKI : inhibiteurs de CDK (*Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor*)

Cdx: *Caudal Type Homeobox*

CFC : cellule formatrice de colonie (*Colony Forming Cell*)

CFC-B : CFC progéniteurs de cellules B

CFC-E : CFC érythrocyte

CFC-G : CFC granulocyte

CFC-GEMM : CFC granulocyte-érythrocyte-macrophage-mégakaryocyte

CFC-GM : CFC granulocyte-macrophage

CFC-M : CFC macrophage

CLP : progéniteur lymphoïde commun (*Common Lymphoid Progenitor*)

CML : leucémie myéloïde chronique (*Chronic Myeloid leukemia*)

CMP : progéniteur myéloïde commun (*Common Myeloid Progenitor*)

CPH : cellule progénitrice hématopoïétique

CRU : unité de repopulation compétitive (*Competitive Repopulation Unit*)

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSL : cellule souche leucémique

CXCR4 : récepteur de chimiokine-CXC 4 (*CXC-chemokine Receptor 4*)

ES : souche embryonique (*Embryonic Stem*)
ETP : progéniteur thymique précoce (*Early Thymic Progenitor*)
Fgf : facteur de croissance fibroblastique (*Fibroblast Growth Factor*)
FLT-3 : (*FMS-Related Tyrosine Kinase 3*)
Fzd : *Frizzled*
G-CSF : facteur de stimulation des colonies granulocytiques (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*)
GMP : progéniteur de granulocytes et de macrophages (*Granulocyte/Macrophage Progenitor*)
GVHD : maladie du greffon contre l'hôte (*Graft Versus Host Disease*)
Hes1 : *Hairy and Enhancer of Split 1*
Hh : Hedgehog
HLA : antigène de leukocytes humains (*Human Leukocyte Antigen*)
HOX : homéobox
Hsc70 : protéine apparentée au choc thermique 70 (*Heat Shock Cognate protein 70*)
iCSH : cellule souche hématopoïétique induite
IGF-2 : facteur de croissance ressemblant à l'insuline 2 (*Insulin-like Growth Factor 2*)
IGFBP-2 : protéine se liant aux IGF 2 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2*)
IL : Interleukine
iPS : souche pluripotentes induites (*induced Pluripotent Stem*)
Lef : facteur de liaison activateur de lymphocytes (*Lymphocyte-Enhancer-binding Factor*)
LIN : marqueurs de lignées hématopoïétiques (*Lineage*)
LKS : Lin⁻c-Kit⁺Sca1⁺
LMPP : MPP amorcés vers la lignée lymphoïde
LT : long terme
LT-CIC : cellule initiatrice de culture à long terme (*Long-Term Culture Initiating Cell*)
Mcl1: *Myeloid cell leukemia 1*
MDR : *MultiDrug Resistance*
MEP : progéniteur de mégacaryocytes et d'érythrocytes (*Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitors*)
MLL : *Mixed Lineage Leukemia*
MPP : progéniteur multipotent (*MultiPotent Progenitor*)

NK : cellule tueuse (*Natural Killer*)
NOD-SCID : *Non Obese Diabetic-Severe Combined Immuno Deficiency*
NPM1 : nucléophosmine 1
OPN : ostéopontine
pb : paires de bases
PBX : *Pre-B-cell leukemia homeobox*
PcG : groupe Polycomb
PolII : polymérase d'ARN II
PRC1/2 : *Polycomb Repressive Complex 1/2*
RA : acide rétinoïque
RARE : *Retinoic Acide Response Element*
ROS : dérivé réactif de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
SCF : facteur de cellules souche (*Stem Cell Factor* ou *Steel Factor*)
SDF-1 : facteur dérivé des cellules stromales 1 (*Stomal cell-Derived Factor 1*)
Shh : Sonic Hedgehog
SLAM : molécule de signalisation et d'activation lymphocytaire (*Signaling Lymphocytic Activation Molecule*)
SP : population de côté (*Side Population*)
SR1 : *StemRegenin1*
SRC : cellule repopulatrice de souris NOD-SCID (*NOD-SCID mouse Repopulating Cell*)
ST : court terme (*Short Term*)
TALE : *three amino acid loop extension*
TAT : trans-activateur
Tcf ; facteur de cellules T (*T Cell Factor*)
TCR : récepteur de cellules T (*T-Cell Receptor*)
TGF- β : facteur de croissance tumorale bêta (*Tumor Growth Factor*)
Tie2 : récepteur endothélial de l'angiopoïétine (*endothelial receptor for angiopoietin1 and 2*)
TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha (*Tumor Necrosis Factor*)
TPO : thrombopoïétine
TrxG : groupe Thritorax

À ma famille et mes amis

Remerciements

Tout au long de mon cheminement aux études graduées, j'ai pu compter sur le soutien de plusieurs personnes sans qui la réalisation de cette thèse aurait été impossible. Je tiens donc à remercier tous les gens qui ont contribué de près ou de loin à ma formation.

Je veux tout d'abord remercier ma directrice de recherche, le Dr. Janet Bijl, qui m'a acceptée il y a sept ans dans son laboratoire et qui m'a accompagnée durant ma formation doctorale. En travaillant sous sa supervision, j'ai pu profiter de son expérience et de sa passion. Merci de m'avoir confié un projet aussi intéressant et de m'avoir soutenue durant sa réalisation.

Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de thèse, Dr. Sylvie Lesage, Dr. Tarik Moröy, Dr. Nicolas Pineault et Dr. Jean-Sébastien Delisle, pour avoir pris le temps de lire et commenter ma thèse. Je remercie par la même occasion les Dr. Nathalie Labrecque et Dr. Javier Di Noia pour avoir suivi mon travail dans le cadre de mes comités de suivis annuels et de mon examen pré-doctoral.

Au cours des dernières années, j'ai eu la chance de travailler au laboratoire avec plusieurs collègues qui ont contribué au succès des mes travaux de recherche. Je tiens donc à remercier Dr. Charles-Étienne Lebert-Ghali, Héloïse Frison, Mona Hassawi, Gloria Giono, Gratianne Vaisson, François Desmeules et Félix Jules.

Le travail des équipes de recherche serait impossible sans le soutien continu du personnel du centre de recherche. J'aimerais donc remercier tous le personnel du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont dont plusieurs sont devenus des amis très précieux notamment Martine Dupuis, Ian Boisseau, Nathalie Tessier, Anthony Haddad, Nathalie Henley, Rocksan Dubé et Line Beauregard. Je remercie aussi les membres des autres laboratoires qui m'ont fait profiter de leur expérience précieuse à de multiples occasions.

Enfin, le travail en recherche ne serait pas possible sans l'apport financier des différents organismes subventionnaires qui ont soutenu le laboratoire durant ces années. Je remercie donc la Société de leucémie et lymphome du Canada et la Société canadienne du cancer qui ont financé les projets de recherches du laboratoire ainsi que la fondation Cole, le

département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal et la Faculté des études supérieures et postdoctorales qui m'ont accordé des bourses d'études.

Je me dois de remercier tous mes amis, plus particulièrement Félix Jules, Édith Boileau et Renée-Alexandra Lessard pour le support moral durant mes études. Je tiens finalement à remercier tous les membres de ma famille. Merci à mes parents, Daniel et Lucille, pour leur soutien inconditionnel. Merci à ma mère pour avoir corrigé tous mes textes même si le contenu devait être particulièrement incompréhensible. Merci aussi à ma sœur Justine, mon beau-frère Vincent et mes neveux pour être toujours présents pour moi.

Chapitre 1: Introduction

1.1 Hématopoïèse

Le système sanguin est composé de différents types de cellules matures des lignées érythroïdes, myéloïdes et lymphoïdes (Figure 1). De par leur durée de vie limitée, les cellules du sang doivent constamment être régénérées durant la vie adulte afin de subvenir aux besoins en oxygène du corps et de permettre la défense immunitaire contre les différents pathogènes auxquels il est continuellement exposé. Ce processus de formation des cellules sanguines, appelé l'hématopoïèse, repose sur la présence d'un petit nombre de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ayant la capacité de se différencier en tous les types de cellules matures du sang et de s'autorenouveler de façon à garder leur nombre constant tout au long de la vie d'un individu. L'hématopoïèse est donc un enchaînement hautement régulé de divisions cellulaires et de décisions menant à la différenciation ou à l'autorenouvellement des CSH.

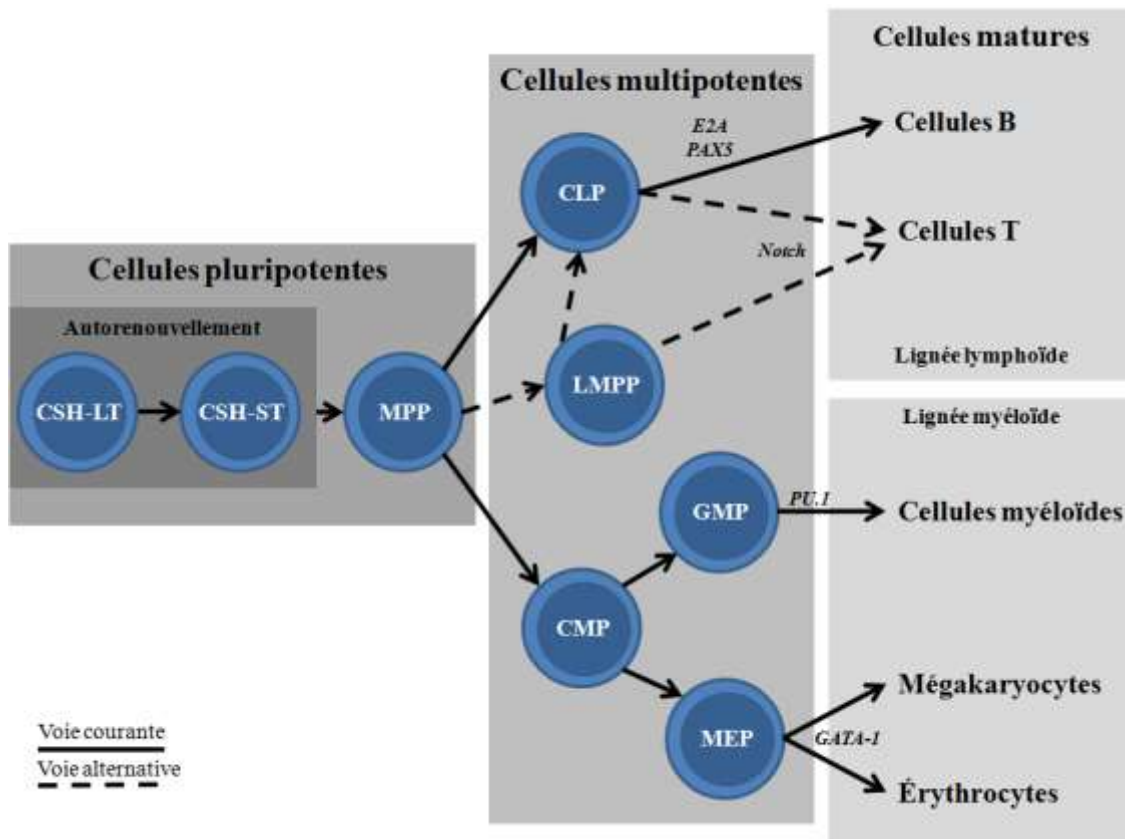


Figure 1 : Hiérarchie du système hématopoïétique

1.1.1 Développement hématopoïétique : origine des cellules souches hématopoïétiques

Chez les mammifères, la génération des CSH a lieu durant l'embryogénèse et plusieurs sites anatomiques ont la capacité de générer des cellules hématopoïétiques à différents moments du développement (Figure 2). Il existe deux phases de l'hématopoïèse, soit la phase fœtale ou primitive, et adulte, aussi appelée l'hématopoïèse définitive.

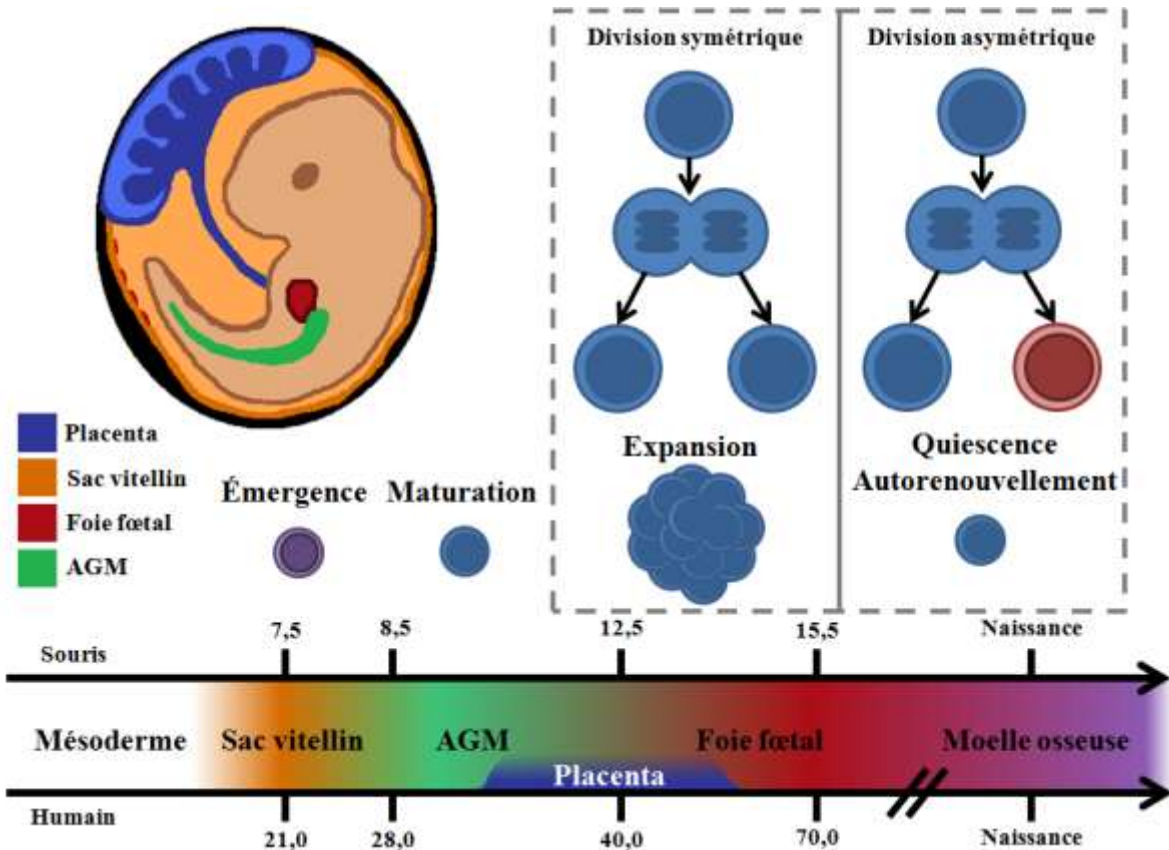


Figure 2 : Génération, développement et autorenewement des cellules souches hématopoïétiques

Durant le développement embryonnaire murin, le système hématopoïétique est parmi les premiers à être développés afin de combler les différents besoins cardiovasculaires de l'embryon (Copp, 1995). Les premières cellules hématopoïétiques à être formées sont originaires des îlots sanguins situés à la surface du sac vitellin et sont des cellules érythroïdes nucléées primitives caractérisées par une taille 6 fois plus importante que les cellules érythroïdes adultes et par la présence de 6 fois plus d'hémoglobine (McGrath & Palis, 2005), exprimant tant les formes embryonniques que les formes adultes de cette molécule (Kingsley et

al., 2004). Durant cette période du développement, le sac vitellin produit aussi des macrophages et des mégakaryocytes primitifs puis, dans une seconde vague, des progéniteurs de granulocytes-macrophages et des progéniteurs érythroïdes primitifs (Palis et al., 1999; Xu et al., 2001). Des progéniteurs hématopoïétiques définitifs sont donc originaires du sac vitellin jusqu'à l'établissement de la circulation sanguine au jour embryonnaire E8,25 qu'ils empruntent ensuite pour coloniser le foie fœtal, site principal de l'hématopoïèse durant l'embryogénèse (Palis et al., 1999).

Chez la souris adulte, toutes les cellules du sang sont dérivées des CSH. Ces cellules sont principalement originaires de la région de l'aorte-gonade-mésonephros (AGM) au jour embryonnaire E10,5 (A. M. Muller et al., 1994). Les CSH vont coloniser le foie fœtal et ultimement la moelle osseuse. L'hématopoïèse du foie fœtal provient donc de deux sources distinctes de progéniteurs hématopoïétiques : la région de l'AGM et le sac vitellin (McGrath & Palis, 2005). Par contre, la région de l'AGM n'est pas la seule source de CSH définitives. Des études ont montré que le placenta et le sac vitellin constituent aussi des sites d'expansion de CSH durant la période E11 à E13 (Gekas et al., 2005; Kumaravelu et al., 2002).

Contrairement à l'hématopoïèse du sac vitellin, l'hématopoïèse du foie fœtal permet la production de cellules érythroïdes définitives, de cellules myéloïdes, de mégakaryocytes et de cellules lymphoïdes. (Palis et al., 1999) De plus, les CSH du foie fœtal, prolifèrent abondamment durant les jours suivant sa colonisation, menant au doublage quotidien du nombre absolu de CSH jusqu'au jour embryonnaire E15. Les CSH fœtales sont en effet plus efficaces que les CSH adultes pour effectuer des divisions symétriques d'autorenouvellement ce qui mène à leur expansion. Un mécanisme possible implique la signalisation via le récepteur c-kit puisque les CSH fœtales et adultes ne répondent pas avec la même avidité à son ligand, le SCF. (Bowie et al., 2007) Après cette période, le nombre de CSH présentes dans le foie fœtal diminue suite à la mobilisation de ces dernières vers la rate et la moelle osseuse (Morrison et al., 1995). Peu de temps avant la naissance, les CSH vont ainsi migrer du foie fœtal vers la moelle osseuse, qui demeurera le site principal de l'hématopoïèse définitive durant la vie post-natale.

Chez l'humain, le développement du système hématopoïétique est sensiblement comparable à celui retrouvé chez la souris, en tenant compte des différences dans les périodes

du développement embryonnaire (Figure 2). Le processus de différenciation est également conservé entre les espèces (Parekh & Crooks, 2013). Des différences notables existent toutefois au niveau du phénotype, de la fonction et dans les mécanismes de régulation des CSH entre les cellules humaines et murines.

1.1.2 La cellule souche hématopoïétique

La CSH est définie par ses capacités à s'autorenouveler, c'est-à-dire de produire d'autres CSH, et à se différencier de façon à produire tous les types de cellules matures du sang. Ces caractéristiques sont particulièrement importantes pour assurer le succès des transplantations de moelle osseuse. Plusieurs études se sont penchées sur l'identification de marqueurs définissant le phénotype des CSH et permettant ainsi leur isolation. Présentement, la caractérisation des CSH se base sur leur capacité à régénérer à long terme un système hématopoïétique. Il est toutefois bien établi que chez la souris, les CSH se retrouvent dans la population de la moelle osseuse qui n'exprime pas les marqueurs de lignées hématopoïétiques (LIN), tels que CD3, B220, MAC1, Gr-1 et TER119, et qui exprime le récepteur de tyrosine kinase c-Kit (CD117) et la glycoprotéine membranaire Sca1 (Okada et al., 1992). Chez la souris, les CSH peuvent être purifiées davantage en utilisant des marqueurs de la famille de molécules de signalisation et d'activation lymphocytaires (SLAM). Il a entre autres été montré que les CSH se trouvaient fortement purifiées (47%) dans les cellules LIN⁻c-Kit⁺ Sca1⁻ (LKS) CD150⁺CD244⁻CD48⁻. Les marqueurs SLAM peuvent également distinguer les CSH des différents types de progéniteurs plus matures (Oguro et al., 2013). Plusieurs autres marqueurs tels que Thy1.1, CD34 et Flt-3 sont aussi en mesure de purifier les CSH dans la population LKS (Christensen & Weissman, 2001; Morrison & Weissman, 1994; Osawa et al., 1996).

Les CSH ont la propriété d'excréter les colorants de viabilité cellulaire, tel que le Hoechst 33342, plus efficacement que les autres cellules de la moelle osseuse grâce entre autres à la présence de pompes à efflux de la famille *MultiDrug Resistance* (MDR) (Goodell et al., 1996). Lorsque l'on observe des cellules marquées au Hoechst 33342 simultanément excitées par les lasers bleu rouge en cytométrie en flux, une population de cellules se distingue des autres cellules de la moelle. Cette population, appelée *Side Population* (SP), est fortement enrichie en CSH (LKS Thy1.1^{lo}CD34⁻Flt3⁻) (Camargo et al., 2006). Les MDR sont également

responsables du trafic de la rhodamine-123 (Rho123), un colorant fluorescent qui se lie aux mitochondries des cellules en fonction de leur statut métabolique. Il est possible d'enrichir les CSH en utilisant cette propriété. En effet, il a été montré que les CSH étaient 4 fois plus présentes dans la fraction Rho123^{lo} des cellules LIN⁻CD34⁺CD38^{lo} humaines (McKenzie et al., 2007).

Malgré les différentes techniques de purification de CSH disponibles, l'isolation d'une population parfaitement pure est présentement impossible. Ceci peut s'expliquer par le fait que le bassin de CSH n'est pas uniforme, comme il a longtemps été pensé, mais qu'il existe une certaine hétérogénéité au sein des CSH (Sieburg et al., 2006). Ce concept a été développé à partir de l'évaluation de la reconstitution hématopoïétique de receveurs irradiés suite à une transplantation d'une seule CSH. Ces études ont d'abord permis d'identifier des sous-catégories de CSH présentant une reconstitution soit biaisée vers la lignée lymphoïde, la lignée myéloïde ou permettant une reconstitution plus équilibrée (Muller-Sieburg et al., 2002). Un autre groupe a aussi observé une différence dans les patrons de différenciation des CSH et a identifié 4 sous-types de CSH. Les CSH- α , déficientes en reconstitution lymphoïde; - β présentant une reconstitution équilibrée; - γ/δ qui présente différents niveaux de déficience dans la reconstitution myéloïde (Dykstra et al., 2007). Ils ont également montré que les patrons de différenciation de ces sous-types de CSH étaient maintenus lors de transplantations en série dans des receveurs irradiés. Finalement, le groupe de Margaret Goodell a montré que même au sein de la SP, il existe une hétérogénéité qui peut être caractérisée avec le marqueur SLAMF7 CD150. En effet, la SP inférieure exprime ce marqueur plus intensément et l'expression est progressivement perdue vers la SP supérieure (Weksberg et al., 2008). Des différences dans le phénotype des CSH de ces populations ont également été identifiées. La SP supérieure montre en effet une différenciation biaisée vers la lignée lymphoïde, prolifère davantage et a une durée de vie réduite, alors que la SP inférieure est biaisée vers la lignée myéloïde et est plus quiescente (Challen et al., 2010).

Chez l'adulte, les CSH sont majoritairement quiescentes, c'est-à-dire qu'elles sont en phase G₀ du cycle cellulaire et proliférativement inactives. Ainsi, 70% des CSH seraient en phase G₀ alors que moins de 2% seraient activement en cycle cellulaire. Chez la souris, il a été établi que le compartiment de CSH serait composé de 2 populations en fonction de leur

cinétique de prolifération. Les CSH passeraient d'un stade activé, se divisant toutes les 5 semaines, à un stade dormant, ayant une période de renouvellement de 21 semaines (Wilson et al., 2008). La quiescence des CSH est extrêmement importante pour le maintien du bassin de CSH et les mutations de gènes menant à la perte de cette propriété mènent à la perte des CSH causée par leur épuisement progressif. C'est le cas des CSH incapables d'exprimer le récepteur du facteur de croissance tumorale bêta (TGF- β), qui permet l'arrêt du cycle cellulaire des cellules hématopoïétiques primitives (Yamazaki et al., 2009) et des cellules mutantes pour les gènes *Hsc70* et *Cyclin D2* (Zou et al., 2011). Le facteur de transcription Gfi1 est également impliqué dans la régulation de l'autorenouvellement des CSH en restreignant leur prolifération. Les CSH mutantes pour *Gfi1* présentent un défaut important de reconstitution à long terme causé par une augmentation du nombre de CSH en cycle cellulaire (Zeng et al., 2004). Un autre facteur de transcription, *Nurr1*, joue finalement un rôle critique pour la quiescence des CSH. Les CSH surexprimant *Nurr1* sont en effet incapables de contribuer à la reconstitution hématopoïétique même si elles migrent efficacement à la moelle osseuse puisqu'elles restent dans un stade quiescent. À l'inverse, la délétion de *Nurr1* mène à une prolifération anormale des CSH (Sirin et al., 2010).

En condition d'homéostasie, le nombre de CSH demeure constant dans la moelle osseuse. Pour ce faire, elles doivent constamment décider entre un destin de différenciation ou d'autorenouvellement. De façon générale, les CSH de la moelle osseuse effectuent des divisions asymétriques où l'une des cellules filles va conserver l'identité de cellule souche de la cellule mère alors que l'autre deviendra un progéniteur plus différencié (Conboy et al., 2007) (Figure 2). Les mécanismes impliqués dans l'autorenouvellement seront adressés plus en détail à la section 1.2.

1.1.3 La niche hématopoïétique

Durant la vie adulte, la majorité des CSH résident dans un microenvironnement situé dans la moelle osseuse, appelé la niche hématopoïétique, qui régule leur différenciation et autorenouvellement (Schofield, 1978). L'interaction des CSH avec le microenvironnement de la niche est essentielle pour le maintien et la fonction des CSH. Par exemple, la moelle osseuse des souris mutantes pour le récepteur du facteur de cellules souches SCF (*Sl/Sl^d*) ne permet pas

la reconstitution par des CSH normales, ce qui entraîne une insuffisance médullaire (McCulloch et al., 1965). Au sein de la niche, les CSH demeurent quiescentes, mais peuvent recevoir différents signaux menant à leur différenciation et à leur entrée dans la circulation sanguine. En effet, en situation d'homéostasie, un petit nombre de CSH est constamment retrouvé dans la périphérie (Abkowitz et al., 2003).

Il existe en fait deux niches dans la moelle osseuse : la niche endostéale, située à la surface de la région trabéculaire des longs os, et la niche vasculaire, retrouvée dans les sinusoides de la région plus centrale de la moelle osseuse (Morrison & Scadden, 2014) (Figure 3). La niche endostéale est composée de cellules ostéoblastes qui sont notamment impliquées dans la formation des os. Ces cellules sécrètent une grande quantité de cytokines et facteurs de croissance connus pour promouvoir la prolifération des cellules hématopoïétiques *in vitro* (Taichman & Emerson, 1998).

Les CSH et les progéniteurs les plus primitifs interagissent avec les ostéoblastes de cette niche. L'augmentation du nombre d'ostéoblastes corrèle d'ailleurs avec une augmentation du nombre de CSH (J. Zhang et al., 2003). La molécule d'adhésion N-cadherine, qui est exprimée par les CSH et les ostéoblastes, pourrait jouer un rôle primordial dans l'interaction avec les ostéoblastes puisqu'il a été montré qu'elle est essentielle pour la régulation de l'activité des CSH dans la moelle osseuse (Arai et al., 2012). La régulation positive de la N-cadherine sur les ostéoblastes est associée à une meilleure adhérence des CSH à la niche, à leur quiescence et à la diminution de leur différenciation. L'expression de la N-cadherine à la surface des CSH est entre autres contrôlée par le proto-oncogène c-Myc qui régule la balance entre l'autorenouvellement et la différenciation des CSH (Wilson et al., 2004). Par contre, une certaine controverse existe à ce sujet et d'autres groupes ont montré que la N-cadherine n'était pas nécessaire au maintien des CSH dans la niche hématopoïétique endostéale (Kiel et al., 2009).

D'autres cellules telles que des ostéoclastes, des fibroblastes et des cellules endothéliales pourraient aussi contribuer à la niche endostéale (Wilson & Trumpp, 2006). Une fonction importante de la niche endostéale est de maintenir la population de CSH dites long terme (CSH-LT) (Arai et al., 2004). La niche vasculaire est quant à elle un environnement plus hétérogène composé de cellules péri-vasculaires et de cellules stromales comprenant des

adipocytes, des cellules endothéliales sinusoidales et les progéniteurs mésenchymateux (Kopp et al., 2005; Sugiyama et al., 2006). Les cellules endothéliales sinusoidales sont importantes pour la différenciation, la mobilisation et le *homing* des CSH dans la moelle osseuse (Kopp et al., 2005). La molécule d'adhésion E-sélectine est exprimée sur ces cellules et promeut la prolifération des CSH (Rudolf et al., 2005). Les cellules hématopoïétiques dérivées des CSH quiescentes de la niche endostéale migrent donc vers la niche vasculaire avant de se différencier et d'entrer dans la circulation sanguine. Même si la majorité des CSH résident dans la moelle osseuse chez l'adulte, elles sont capables d'une grande mobilité suite à un dommage à la moelle osseuse, à une hémorragie ou à un traitement à la cyclophosphamide et au facteur de stimulation des colonies granulocytiques (G-CSF) (Lapidot & Kollet, 2002). Certaines études ont également montré avec des modèles de souris mutantes pour le gène *Scf*, qu'une grande partie des CSH résidaient dans la niche péri-vasculaire de la moelle osseuse (Ding et al., 2012). En utilisant le même modèle, il a aussi été montré que les CSH occupaient une niche distincte de celle des progéniteurs plus matures tels que les progéniteurs lymphoïdes précoces que l'on retrouve plus dans la niche endostéale que vasculaire (Ding & Morrison, 2013).

Les mécanismes de régulation du bassin, de maintenance et de la différenciation des CSH au sein de la niche hématopoïétique sont multiples. Plusieurs récepteurs, protéines membranaires et facteurs sécrétés sont exprimés par les CSH et les différents types de cellules de la niche. Le facteur dérivé des cellules stromales 1 (SDF-1), qui est exprimé par plusieurs cellules stromales de la moelle osseuse notamment les ostéoblastes, est impliqué dans la migration et la rétention des CSH vers la niche. Les CSH migrent en effet spécifiquement vers le SDF-1 qui est sécrété dans la moelle osseuse suite à un stress hématopoïétique (Wright et al., 2002). Le SDF-1 contrôle également la quiescence des CSH, qui expriment le récepteur de chimiokine-CXC 4 (CXCR4). Il a d'ailleurs été montré que l'inactivation du CXCR4 dans les CSH menait à leur prolifération excessive (Nie et al., 2008). La signalisation via la prostaglandine E2, qui est connu pour être un régulateur positif de l'expression de CXCR4 sur les CSH (Ding et al., 2012), est également importante puisqu'elle régule la rétention des CSH au sein de la niche hématopoïétique (Hoggatt & Pelus, 2011). Les CSH expriment aussi Tie2,

un récepteur tyrosine kinase qui se lie à l'angiopoïétine, régulant l'adhésion aux ostéoblastes, ainsi que la quiescence des CSH dans la niche (Arai et al., 2004).

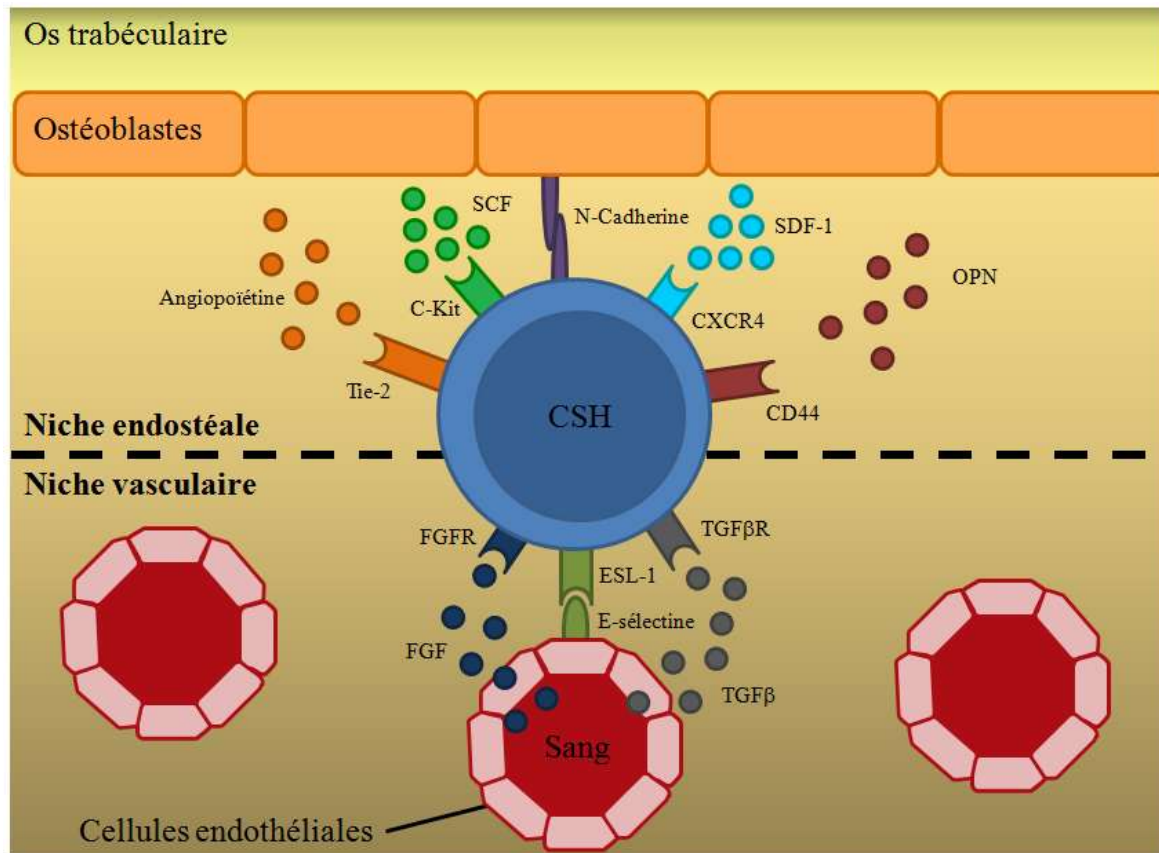


Figure 3 : Structure et interactions de la niche hématopoïétique de la moelle osseuse

Les ostéoblastes sécrètent aussi de l'ostéopontine (OPN) une glycoprotéine acide qui est impliquée dans la régulation négative de la prolifération des CSH par sa liaison à l'intégrine $\beta 1$ et au récepteur CD44. Les souris $OPN^{-/-}$ montrent en effet une augmentation du nombre total de CSH impliquant l'OPN dans le maintien de la quiescence des CSH, en inhibant leur entrée dans le cycle cellulaire (Nilsson et al., 2005).

La niche hématopoïétique sécrète également certains facteurs importants pour l'autorenouvellement des CSH. C'est le cas du SCF qui existe sous deux formes, membranaire et sécrétée. Ce facteur est exprimé par les ostéoblastes et se lie au récepteur c-Kit qui est fortement exprimé sur les CSH. Le SCF n'est pas essentiel pour la génération des CSH, mais est nécessaire pour le maintien à long terme et l'autorenouvellement des CSH (Wilson & Trumpp, 2006).

Pour conclure, la niche hématopoïétique de la moelle osseuse adulte est un environnement complexe et dynamique permettant de maintenir le bassin de CSH stable en condition d'homéostasie. Les interactions entre les cellules stromales de la moelle osseuse et les CSH sont multiples et permettent aux CSH de recevoir les différents signaux extrinsèques de différenciation nécessaires à la production des cellules sanguines matures. Plusieurs mécanismes contrôlant la maintenance et la différenciation des CSH dans la niche restent par contre à être identifiés.

1.1.4 Différenciation des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules sanguines matures appartiennent à de multiples lignées hématopoïétiques telles que les érythrocytes, les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les mégakaryocytes et plaquettes, les mastocytes et les lymphocytes B et T. Des mécanismes de régulation complexes participent à l'engagement des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques vers ces lignées. Plusieurs facteurs de transcription et signaux environnementaux sont connus pour leur rôle dans l'engagement des CSH vers une lignée spécifique ou pour leur capacité à inhiber une ou plusieurs lignées (Figure 1).

Les CSH-LT, seules cellules capables de la reconstitution à long terme d'un système hématopoïétique, se différencient d'abord en CSH court terme (ST) puis en progéniteurs multipotent (MPP). Ces trois populations ont toutes un potentiel de différenciation multi-lignées, mais diffèrent dans leur capacité d'autorenouvellement (Christensen & Weissman, 2001; Morrison et al., 1997). Un processus décisionnel entre les lignées lymphoïdes et myéloïdes a ensuite lieu chez les MPP qui peuvent se différencier en progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) ou myéloïdes (CMP) (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997). Il a récemment été montré que les marqueurs de la famille SLAM (CD150, CD48, CD229 et CD244), connus pour leur capacité à identifier et purifier les CSH, sont aussi en mesure de différencier les progéniteurs tels que les MPP en différentes sous-populations (MPP1-3) possédant des niveaux différents d'autorenouvellement (Oguro et al., 2013).

Les lymphocytes sont impliqués dans la réponse de l'organisme aux antigènes externes. Il existe deux types de réponse soit la réponse humorale effectuée par les cellules B, et la réponse cellulaire accomplie par les cellules T. Il a longtemps été admis que tous les

lymphocytes, incluant les cellules tueuses naturelles (NK), dérivait du CLP. Par contre, de récentes études ont montré que les cellules T pourraient également suivre une autre voie de différenciation. En effet, des progéniteurs MPP amorcés vers la lignée lymphoïde (LMPP) et les CLP sont tous les deux capables de coloniser le thymus et créer les progéniteurs thymiques précoces (ETP) qui vont initier le développement des cellules T (Allman et al., 2003; Karsunky et al., 2008; Lai & Kondo, 2007). Une fois dans le thymus, une exposition à de hauts niveaux de stimulation par la voie de signalisation Notch entraîne un blocage des potentiels de différenciation vers les lignées myéloïdes et de cellules B chez ces progéniteurs (Pui et al., 1999). L'inhibition de Notch mène en effet au développement de cellules B dans le thymus (Wilson et al., 2001) et son expression constitutive entraîne un développement de cellules T à l'extérieur du thymus (Pui et al., 1999). Le CLP est aussi le progéniteur principal des lymphocytes B. Les premiers progéniteurs de cellules B, les cellules pré-pro B, émergent donc des CLP dans la moelle osseuse (Rumfelt et al., 2006). L'engagement définitif vers la lignée B est contrôlé par le régulateur transcriptionnel Pax5 qui agit en réprimant des récepteurs essentiels pour les autres voies de différenciation (Nutt & Kee, 2007). La surexpression de *Pax5* inhibe entre autres le développement de la lignée T (Cotta et al., 2003).

Les CMP quant à eux sont restreints aux lignées myéloïdes et se différencient en deux types de progéniteurs, les progéniteurs de granulocytes/macrophages (GMP) et les progéniteurs de mégakaryocytes/érythrocytes (MEP). (Akashi et al., 2000) Ces progéniteurs vont ensuite engendrer les différents types de cellules myéloïdes ainsi que les érythrocytes et mégakaryocytes respectivement.

Les facteurs de transcription sont des régulateurs clés des programmes génétiques associés à la différenciation des CSH en cellules matures des différentes lignées (Figure 1). Le facteur GATA-1 est important pour la différenciation des mégakaryocytes et érythrocytes, mais aussi des éosinophiles de façon dose dépendante. En effet, de hauts niveaux d'expression entraînent l'engagement vers la lignée mégakaryocyte/érythrocyte alors que des niveaux plus faibles entraînent le développement des éosinophiles (Kulesa et al., 1995). GATA-1 est également essentiel pour le développement érythroïde (Pevny et al., 1991). À l'inverse, le facteur de transcription PU.1 réprime la lignée érythroïde au profit de la différenciation myéloïde (Yamada et al., 2001). Ceci peut être expliqué par le fait que ces deux facteurs

interagissent directement et peuvent ainsi antagoniser l'effet de l'autre (Rekhtman et al., 1999; P. Zhang et al., 1999). L'interaction entre les protéines GATA et PU.1 joue donc un rôle important dans le processus de décision des CSH de s'engager vers la lignée érythroïde ou myéloïde. PU.1 est aussi connu pour son rôle critique dans la lymphopoïèse puisque sa mutation entraîne entre autres un défaut dans la génération des lymphocytes B et T (Scott et al., 1994). Le facteur de transcription Ikaros est quant à lui essentiel pour la différenciation des CSH vers les lignées lymphoïdes. Les souris mutantes pour Ikaros sont dépourvues de cellules B, T et NK, mais leurs lignées myéloïdes et érythroïdes ne sont pas affectées (Georgopoulos et al., 1994). D'autres gènes sont également connus pour leur rôle essentiel dans la génération des lymphocytes B. C'est le cas des gènes *E2A* et *Pax5*. Les souris mutantes pour l'un de ces gènes montrent toutes un défaut dans le développement des cellules B à un stade précoce (Bain et al., 1994; Urbanek et al., 1994). Finalement, il a été montré que le facteur de transcription GATA-3 est un régulateur essentiel du développement précoce des thymocytes (Ting et al., 1996).

Pour conclure, le modèle de différenciation hématopoïétique hiérarchique couramment accepté ne doit pas être vu comme étant rigide, mais plutôt comme la voie générale de différenciation. En effet, plusieurs progéniteurs retiennent un certain potentiel de différenciation vers les autres lignées et l'hématopoïèse présente un niveau de plasticité qui n'est pas encore parfaitement compris.

1.1.5 Vieillesse des cellules souches hématopoïétiques

Les CSH sont responsables de la production des cellules sanguines tout au long de la vie d'un individu. Par contre, il existe de nombreux changements dans la quantité et la fonction des cellules sanguines chez les aînés, menant à une augmentation de la morbidité et de la mortalité dans cette population (Berkahn & Keating, 2004).

Une des caractéristiques importantes des CSH âgées, tant chez la souris que chez l'humain, est un biais dans la différenciation lymphoïde vs myéloïde (Signer & Morrison, 2013). Des études de *microarray* ont d'ailleurs montré que les gènes impliqués dans la différenciation myéloïde étaient plus fortement exprimés dans les CSH âgées alors que les gènes associés à la fonction et à la différenciation lymphoïdes étaient régulés négativement

(Rossi et al., 2005). Ceci se reflète par une diminution de la production des cellules T naïves ainsi que par une diminution du nombre de cellules B chez les aînés (Dorshkind et al., 2009). À l'inverse, une expansion des CSH biaisées vers la différenciation myéloïde est observée avec l'âge (Gekas & Graf, 2013).

Certains changements épigénétiques sont également observés chez les CSH avec l'âge. En effet, il a été montré que le statut de méthylation de l'ADN change à certain sites spécifiques au potentiel de différenciation hématopoïétique et cible plus précisément les gènes exprimés dans les cellules plus différenciées. Des modifications épigénétiques contribuent donc également au phénotype observé chez les CSH âgées (Beerman et al., 2013).

Une autre caractéristique de l'hématopoïèse observée avec l'âge est l'augmentation de la taille du bassin de CSH. Il a en effet été montré par cytométrie en flux chez la souris (Morrison et al., 1996) et chez l'homme (Pang et al., 2011) que la fréquence des CSH était plus élevée chez les individus plus âgés.

Les mécanismes impliqués dans le vieillissement des CSH ne sont pas tous connus. Plusieurs modèles de souris mutantes pour des voies de réparation de l'ADN, de réponse au stress oxydatif et du maintien des télomères ont été utilisés pour identifier ces mécanismes. Ces souris ont montré des défauts dans la fonction des CSH et des progéniteurs indiquant que ces fonctions sont requises pour le maintien à long terme des CSH (Nijnik et al., 2007; Rossi et al., 2007; Samper et al., 2002; Yahata et al., 2011). La protéine Cdc42, qui montre une activité plus élevée dans les CSH âgées serait aussi impliquée dans le vieillissement des CSH en agissant sur leur polarité. L'inhibition pharmacologique de Cdc42 permet en effet de contrer cet effet et de « rajeunir » les CSH (Florian et al., 2012).

La transplantation de CSH est un traitement utilisé pour des maladies retrouvées particulièrement chez les aînés. Par contre, ce traitement est beaucoup moins efficace chez des patients âgés comparativement à des patients plus jeunes (Kollman et al., 2001). De plus, il a été montré que la prolifération forcée était capable de récapituler le phénotype associé au vieillissement des CSH (Beerman et al., 2013). Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes impliqués dans le vieillissement des CSH pour permettre le développement de thérapies impliquant l'expansion des CSH autologues pour la transplantation.

1.2 Mécanismes d'autorenouvellement des cellules souches

La majorité des tissus adultes possèdent une population de cellules souches qui ont la capacité de s'autorenouveler et de se différencier en cellules matures spécifiques au tissu de façon à le maintenir ou à le réparer. Les mécanismes régulant ces propriétés sont par contre encore mal connus. La compréhension de ces procédés est importante particulièrement avec le développement de nouvelles approches thérapeutiques utilisant des cellules souches embryonnaires (ES) ou pluripotentes induites (iPS).

1.2.1 Différents types de cellules souches pluripotentes

Des lignées de cellules ES, dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyte, ont été isolées chez la souris dans les années 1980 (Lerou & Daley, 2005) puis chez l'humain à la fin des années 1990 (Thomson et al., 1998). Ces cellules, qui ont la capacité de s'autorenouveler à l'infini et qui peuvent potentiellement se différencier en tous les types de cellules de l'organisme, représentent une source prometteuse de cellules pouvant être utilisées dans le traitement de nombreuses maladies dégénératives, en plus d'être un outil inestimable pour des études développementales. Dans les dernières années, l'utilisation de différents facteurs et conditions de culture a permis la production de plusieurs types cellulaires à partir de cellules ES humaines. Il a entre autres été montré que l'utilisation de l'acide rétinoïque (RA) et du facteur de croissance neuronale permet la différenciation de cellules ES en cellules neuronales (Schuldiner et al., 2001). Des cellules bêta capables de produire efficacement de l'insuline ont également été produites à partir de cellules ES, ce qui pourrait constituer une source intéressante de cellules pour une thérapie chez les patients diabétiques (Assady et al., 2001). Des progéniteurs hématopoïétiques ont aussi été produits à partir de cellules ES en présence de différentes cytokines et de la protéine morphogénétique osseuse (BMP) 4 (Chadwick et al., 2003). Malgré le grand potentiel des cellules ES pour la recherche et la médecine, plusieurs débats éthiques et culturels limitent leur utilisation étant donné leur origine. De plus, leur pluripotence augmente le risque de développement de tératome suite à leur transplantation, ce qui constitue aussi une limite à leur utilisation.

Plus récemment, il a été montré que les cellules somatiques pouvaient être reprogrammées en cellules ayant un statut ressemblant aux cellules ES. En effet, la

transfection de 4 facteurs de transcriptions, *Nanog*, *Sox2*, *c-Myc* et *Klf4*, dans des cellules somatiques humaines et murines a permis de leur redonner les propriétés morphologiques, de pluripotente et de différenciation des cellules ES (Takahashi et al., 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006). Ces cellules, nommées iPS, ont également pu être générées avec d'autres combinaisons de facteurs telles qu'*Oct4*, *Sox2*, *Nanog* et *Lin28* (Yu et al., 2007). Les cellules iPS offrent de nombreuses promesses pour la médecine régénérative. Elles ont entre autres l'avantage, comparativement aux cellules ES, d'être autologues, évitant ainsi les rejets immunologiques et le besoins de thérapies immunosuppressives. De plus, les considérations éthiques soulevées pour l'utilisation de cellules ES ne s'appliquent pas aux cellules iPS. Par contre, tout comme les cellules ES, elles possèdent un certain potentiel tumorigène et ne devraient être utilisées qu'avec précautions. Elles offrent toutefois un potentiel thérapeutique intéressant pour le criblage de médicaments spécifiques et pour le développement de traitements personnalisés (Romeo et al., 2012).

Dans les dernières années, de nombreuses études ont tenté de générer des CSH-LT à partir de cellules ES ou iPS (Choi et al., 2009; Doulatov et al., 2013). Même si des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules sanguines matures ont pu être générés, aucune CSH fonctionnelles n'avaient été produites jusqu'à récemment. Cependant, une étude effectuée par le groupe de Derrick Rossi vient tout juste de remédier à cette situation. En effet, ils ont montré que l'expression transitoire de 6 facteurs de transcription : *Run1t1*, *Hlf*, *Lmo2*, *Prdm5*, *Pbx1* et *Zfp37*; pouvait redonner le potentiel de différenciation et d'autorenouvellement des CSH à des progéniteurs hématopoïétiques déjà engagés vers la lignée myéloïde ou lymphoïde. Ces CSH induites (iCSH) sont capables de reconstituer les compartiments hématopoïétiques d'un receveur et d'être transplantées en série (Riddell et al., 2014). Cette découverte constitue un avancement important pour le développement de CSH autologues pour des applications cliniques.

1.2.2 Division asymétrique des cellules souches hématopoïétiques

En condition d'homéostasie, les CSH maintiennent leur nombre constant en effectuant des divisions cellulaires asymétriques où l'une des cellules filles va conserver les caractéristiques de cellule souche de la cellule mère tandis que l'autre va se différencier en

progéniteur plus mature (Figure 2). Alors que plusieurs signaux extrinsèques produits par la niche hématopoïétique sont responsables de contrôler la balance entre des divisions de différenciation et des divisions d'autorenouveau, des mécanismes intrinsèques aux CSH sont aussi importants pour la régulation des divisions asymétriques.

Un de ces mécanismes intrinsèques est la distribution inégale de facteurs importants pour le destin cellulaire lors de la division, faisant en sorte qu'après la mitose, une seule cellule fille aura reçu ce facteur. Le résultat est la production de deux cellules filles non identiques. La protéine NUMB, qui est un modulateur négatif de la voie de signalisation Notch, est connue pour son rôle dans la balance entre les divisions symétriques et asymétriques chez la drosophile, et a aussi été impliquée dans cette fonction au niveau de l'hématopoïèse. En effet, il a été démontré par des essais de microscopies couplés à des marquages de prolifération, qu'une fraction des cellules CD34⁺ humaines avait une distribution asymétrique de la protéine NUMB au moment de la division cellulaire et que cette distribution corrélait inversement avec la distribution asymétrique de Notch (Nteliopoulos & Gordon, 2012). D'autres protéines, telles que CD53, CD62L, CD63 et CD71, sont également connues pour être distribuées asymétriquement dans une fraction des cellules humaines CD34⁺ primitives (Beckmann et al., 2007).

Un mécanisme important pour la division asymétrique est l'orientation de l'axe mitotique suite à la ségrégation des facteurs mentionnés précédemment. Il a été montré que *Lis1*, qui code pour une protéine de liaison à la dynéine, est essentiel pour l'autorenouveau des CSH puisqu'il régule l'établissement de l'axe mitotique lors des divisions asymétriques (Zimdahl et al., 2014).

La division asymétrique des CSH est cruciale au maintien de leur nombre durant la vie d'un individu. Même si de nombreuses avancées ont été effectuées dans l'identification des mécanismes impliqués dans ces divisions, les voies moléculaires empruntées ne sont pas encore bien comprises.

1.2.3 Voies de signalisation importantes pour l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques

Plusieurs voies de signalisation importantes jouent un rôle crucial dans l'autorenouvellement des CSH. La niche hématopoïétique procure différents signaux permettant l'activation de ces voies dans les CSH et subséquemment le maintien de leur population via l'autorenouvellement. C'est le cas des voies Notch, Wnt, BMP et Hedgehog (Hh).

La voie de signalisation Notch, qui est très conservée au cours de l'évolution, utilise des interactions entre deux cellules via la liaison du récepteur Notch avec l'un des ses ligands. Notch est entre autres impliquée dans la régulation, positive ou négative, de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération et la survie dépendamment du contexte. Dans la voie canonique de Notch, la liaison d'un ligand au récepteur entraîne deux clivages protéolytiques successifs qui permettent la libération du domaine intracellulaire de Notch, qui est la forme active du récepteur capable d'entrer au noyau pour agir comme régulateur transcriptionnel (Schweisguth, 2004). Dans l'hématopoïèse, les quatre récepteurs Notch (Notch1-4) identifiés chez les vertébrés sont exprimés à différents niveaux dans les cellules hématopoïétiques, incluant les CSH (Kojika & Griffin, 2001; Milner et al., 1994). Par contre, la majorité des études focussent sur le récepteur Notch1. Les ligands de Notch (*Delta-like 1, 3-4* et *Jagged-1/2*) sont quant à eux exprimés dans différentes populations de cellules stromales telles que les cellules épithéliales du thymus (Anderson et al., 2001) et les cellules de la niche hématopoïétique dans la moelle osseuse (Karanu et al., 2001; Varnum-Finney et al., 1998). Il a entre autres été démontré que les ostéoblastes expriment des niveaux élevés du ligand *Jagged-1* (Calvi et al., 2003). Plusieurs études ont confirmé le rôle de la voie Notch dans l'autorenouvellement des CSH. Il a d'abord été montré que la surexpression rétrovirale de la forme constitutivement active du domaine intracellulaire de Notch mène à l'immortalisation de cellules hématopoïétiques murines primitives entraînant la formation d'une lignée cellulaire pluripotente ayant des caractéristiques similaires aux CSH (Varnum-Finney et al., 2000). La transplantation de cellules de moelle osseuse murines transfectées avec des rétrovirus exprimant un récepteur Notch1 constitutivement actif dans des receveurs irradiés a également permis d'expandre les CSH *in vivo* (Stier et al., 2002). Il est aussi

possible d'expandre les CSH-ST *in vitro* en cultivant des cellules de moelle murine avec le ligand Delta1 et différents facteurs de croissance (Varnum-Finney et al., 2003). Une expansion *ex vivo* de CSH humaines fonctionnelles a d'ailleurs été obtenue avec une méthode similaire utilisant une forme soluble du ligand Delta-like 1 (Tian et al., 2013). Un des principaux gènes cibles de la voie Notch est *Hes1*, qui est requis pour le développement des CSH dans l'embryon (Guiu et al., 2013). *Hes1* est impliqué dans l'autorenouvellement des CSH puisque sa surexpression rétrovirale dans des cellules primitives murines préserve la capacité de reconstitution à long terme des CSH *ex vivo* (Kunisato et al., 2003). Ces données supportent donc le rôle crucial de la voie de signalisation Notch dans la régulation de l'autorenouvellement des CSH.

La voie de signalisation Wnt est aussi impliquée dans la régulation du destin cellulaire des CSH. Il existe 19 protéines Wnt et 10 récepteurs Frizzled (Fzd) chez l'humain et la souris. Dans la voie canonique, la protéine Wnt se lie à son récepteur Fzd de façon à empêcher la dégradation de son médiateur, la β -catenin. Ceci permet l'accumulation cytoplasmique de la β -catenin qui est transloquée au noyau cellulaire où elle forme un complexe d'activation transcriptionnelle avec les facteurs Tcf ou Lef (Staal & Luis, 2010). Ces facteurs sont d'ailleurs exprimés dans les CSH et la voie de signalisation est connue pour être active dans ces cellules (Reya et al., 2003). La voie Wnt est impliquée dans le maintien et l'expansion des CSH murines puisque la surexpression rétrovirale de la forme constitutivement active de la β -catenin augmente le nombre de CSH et leur capacité de reconstitution *in vivo* (Reya et al., 2003). Par contre, il a aussi été montré que l'expression constitutive de la β -catenin pouvait entraîner la perte des CSH dû à un épuisement de la population (Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006) ce qui indique que l'effet de la voie Wnt pourrait être dépendant de la dose. De façon inverse, la mutation de l'une des formes de Wnt, *Wnt3a*, dans un modèle murin empêche les CSH de s'autorenouveler. Ces souris ont également un nombre réduit de CSH (Luis et al., 2009). Dans la niche hématopoïétique, les cellules stromales expriment fortement certains ligands et récepteurs de la voie Wnt (Buckley et al., 2011). L'activation de la voie de signalisation Wnt dans la moelle osseuse est donc nécessaire à l'autorenouvellement des CSH où elle limite leur prolifération et conserve leur capacité de reconstitution (Fleming et al., 2008). Il est intéressant de noter qu'une régulation croisée entre les voies de signalisation

Notch et Wnt a été identifiée dans les CSH. En effet, ces voies agissent en synergie dans le but de maintenir le bassin de CSH. La voie Notch est en fait requise pour la conservation du stade indifférencié des CSH médiée par la voie Wnt (Duncan et al., 2005).

Deux autres voies de signalisation importantes, la voie Hh et la voie BMP, sont également en mesure de collaborer pour réguler la fonction des CSH. Les protéines BMP sont des morphogènes de la famille du TGF- β très conservée au cours de l'évolution (Bhardwaj et al., 2001). Dans cette voie, les protéines BMP se lient à un récepteur de BMP (BMPR) de type II, ce qui entraîne le recrutement et la phosphorylation d'un récepteur BMPR de type I. Ces deux récepteurs se dimérisent ensuite et activent la voie de régulation transcriptionnelle des protéines SMAD (Soderberg et al., 2009). La voie BMP a été impliquée dans l'hématopoïèse puisque la signalisation via le récepteur BMPR de type IA est connue pour contrôler le nombre de CSH en régulant la taille de la niche hématopoïétique (J. Zhang et al., 2003). Il a également été montré qu'alors que de faibles concentrations de BMP4 entraînaient la prolifération et la différenciation des CSH humaines *ex vivo*, de fortes concentrations permettaient de conserver la capacité de repopulation des cultures pour une plus longue période de temps (Bhatia et al., 1999). La voie de signalisation Hh comporte quant à elle trois ligands, dont le principal est la protéine Sonic Hedgehog (Shh), qui vont se lier au récepteur Ptc, ce qui va activer la protéine Smo et initier la signalisation via les facteurs de transcription de la famille Gli (Mullor et al., 2002). Cette voie est d'ailleurs capable de modifier l'expression de protéines des voies Wnt et BMP. Les récepteurs Ptc et Smo sont exprimés sur les cellules hématopoïétiques primitives humaines et le traitement de ces cellules avec la protéine Shh induit l'expansion des cellules hématopoïétiques pluripotentes par un mécanisme dépendant de la signalisation par la voie BMP (Bhardwaj et al., 2001).

L'intégration des différentes voies de signalisation conservées dans l'évolution et jouant un rôle important dans le développement embryonnaire semble donc jouer un rôle important dans l'autorenouvellement des CSH, soit directement ou par la régulation de leur niche dans la moelle osseuse.

1.2.4 Régulateurs de l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques

Outre la niche hématopoïétique et les voies de signalisation développementales, différents régulateurs contrôlant l'autorenouvellement des CSH ont été identifiés tels que des modulateurs du cycle cellulaire, de la quiescence, des facteurs anti-apoptotiques, des facteurs de transcription, et des répresseurs transcriptionnels de la famille Polycomb (PcG).

La balance entre la quiescence et la prolifération des CSH dépend de la progression du cycle cellulaire dans ces cellules. Alors que les CSH cyclent activement dans le foie fœtal, dans la moelle osseuse adulte, elles demeurent relativement quiescentes (Bowie et al., 2006). En effet, il a été montré que les CSH alternent d'un stade quiescent à un stade d'autorenouvellement et qu'une fraction du bassin de CSH est continuellement en cycle cellulaire (Wilson et al., 2008). La régulation du cycle cellulaire est effectuée par les effets opposés des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines (CDK), qui agissent ensemble pour permettre la progression du cycle cellulaire; et des inhibiteurs de CDK (CDKI) qui empêchent cette progression (Morgan, 1997). Les cyclines de la famille D sont d'ailleurs exprimées dans les CSH (Passegue et al., 2005) et les souris mutantes pour ces cyclines meurent durant l'embryogénèse à cause d'une insuffisance hématopoïétique causée par une diminution du nombre de CSH en cycle cellulaire dans le foie fœtal (Kozar et al., 2004). Le facteur de transcription PU.1 régule aussi la balance entre la quiescence et la prolifération des CSH en agissant en amont de ces régulateurs du cycle cellulaire. En effet, il a été montré que de faibles niveaux de PU.1 menaient à une diminution de l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire et à une augmentation de l'expression d'activateurs du cycle cellulaire entraînant un déséquilibre entre la quiescence et la prolifération (Staber et al., 2013). Certains signaux membranaires sont également requis pour maintenir les CSH hors du cycle cellulaire. La signalisation via le récepteur c-Kit est par exemple essentielle pour maintenir les CSH dans un état dormant et les souris mutantes pour c-Kit ou son ligand, le SCF, ont un phénotype important au niveau de l'autorenouvellement des CSH (Thoren et al., 2008). L'intensité du signal par le SCF affecte aussi la capacité de reconstitution à long terme des CSH. (Kent et al., 2008) Le maintien du bassin de CSH requiert aussi la suppression des voies menant à la sénescence et à l'apoptose de ces cellules. Des protéines anti-apoptotiques, telles que BCL2 et MCL1 sont par exemple connues pour leur rôle dans la survie des CSH (Akala & Clarke,

2006). Les souris transgéniques pour *BCL2* ont d'ailleurs un plus grand nombre de CSH (Domen et al., 2000).

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans l'autorenouvellement des CSH. Il a été montré que la voie JAK-STAT, qui active la transcription de gènes cibles en réponse aux cytokines, peut promouvoir l'autorenouvellement des CSH. L'expression rétrovirale constitutive d'une des protéines de cette voie, Stat5, chez la souris mène en effet à une expansion des CSH causée par une augmentation de l'autorenouvellement (Kato et al., 2005). La surexpression d'un autre facteur de transcription, *NF-Ya*, mène aussi à la régulation positive de plusieurs gènes importants pour les CSH pour mener à une augmentation de l'autorenouvellement (Zhu et al., 2005). De nombreux facteurs de transcription ont été identifiés dans une étude du groupe d'Irving Weissman qui comparait les profils d'expression globaux des CSH-LT par *microarray* avec les autres populations de progéniteurs hématopoïétiques primitifs dans le but d'identifier de nouveaux régulateurs de l'autorenouvellement des CSH (Forsberg et al., 2005). Finalement, les gènes homéobox (*Hox*) sont une famille de facteurs de transcription parmi les plus importants dans la régulation de l'hématopoïèse, et plus particulièrement des CSH. Leur implication dans l'hématopoïèse sera abordée à la section 1.3.4.

Il a récemment été montré que l'autorenouvellement des CSH est régulé par des hormones sexuelles, telles que l'estrogène, menant à des différences dans le statut des CSH dans le cycle cellulaire entre les sexes chez la souris. En effet, les CSH femelles se divisent plus fréquemment que celles des mâles et l'administration d'estrogène entraîne ce même effet chez les 2 sexes. Les CSH expriment d'ailleurs de hauts niveaux de récepteur de l'estrogène. (Nakada et al., 2014)

L'autorenouvellement des CSH peut aussi être influencé par des régulateurs épigénétiques tels que les PcG. Ces protéines forment des complexes qui permettent de maintenir une répression transcriptionnelle de gènes cibles par des modifications de la chromatine. Il existe deux complexes PcG principaux appelés complexes Polycomb répressifs 1 et 2 (PCR1 et PCR2). Le PCR1 regroupe les protéines RING1B, BMI1, HPH et CBX; et joue un rôle dans le maintien de la répression transcriptionnelle. Le PCR2 quant à lui regroupe les protéines EZH2, EED et SUZ12 et tri-méthyle la lysine 27 de l'histone H3 de façon à

initier la répression transcriptionnelle (Simon & Kingston, 2009). Les protéines PcG maintiennent donc la capacité d'autorenouvellement des CSH en réprimant l'expression des gènes de différenciation. Les membres du PCR1, qui sont exprimés dans les cellules hématopoïétiques primitives, sont d'ailleurs connus pour leur rôle dans l'autorenouvellement. En effet, les souris mutantes pour des gènes de ce complexe montrent un effet important sur le système hématopoïétique. Par exemple, les souris mutantes pour *Bmi1* sont incapables de maintenir un système hématopoïétique à long terme, ce qui mène à une perte graduelle des CSH causée par un défaut d'autorenouvellement (I. K. Park et al., 2003). Aussi, la surexpression rétrovirale de *Bmi1* dans les CSH induit une forte expansion des progéniteurs multipotent *ex vivo* et augmente leur capacité de repopulation *in vivo* (Iwama et al., 2004). Par contre, le rôle du PCR2 dans l'autorenouvellement des CSH est moins bien établi et les CSH mutantes pour certaines de ses composantes ne montrent pas de défauts hématopoïétiques.

En conclusion, l'autorenouvellement est certainement la propriété des CSH la plus importante pour maintenir l'homéostasie hématopoïétique durant toute la vie d'un individu. Plusieurs mécanismes ont été identifiés pour leur rôle dans le maintien de la quiescence et l'autorenouvellement du bassin de CSH. La régulation de l'autorenouvellement est toutefois encore mal comprise et il est important d'éclaircir les interactions entre les différents mécanismes connus et les signaux requis pour contrôler la balance entre le maintien, l'expansion ou la différenciation des CSH dépendamment du contexte.

1.3 Les gènes homéobox de classe I

Les gènes *HOX* de classe I ont d'abord été identifiés dans les années 1980 chez des mutants de *Drosophila melanogaster* comme étant des régulateurs importants du développement embryonnaire. Par ailleurs, depuis le milieu des années 1990, de nombreuses études ont démontré que ces gènes jouent un rôle primordial dans l'hématopoïèse.

1.3.1 Structure et organisation des gènes *HOX*

Les gènes *HOX* codent pour des facteurs de transcription hautement conservés durant l'évolution et caractérisés par la présence d'un motif de liaison à l'ADN appelé l'homéodomaine (Abramovich et al., 2005). L'homéodomaine est un segment d'ADN de 183 paires de bases qui est généralement situé dans la partie 3' du gène (Gehring & Hiromi, 1986),

Ce segment encode un domaine hélice-tour-hélice qui permet la liaison à l'ADN (Hill et al., 1989). Chez les mammifères, on compte 39 gènes *HOX* de classe I qui sont répartis en 4 groupes (A, B, C et D), situés sur 4 chromosomes, résultats de duplications génomiques ayant eu lieu durant l'évolution des vertébrés (Ohno, 1999). Les gènes *HOX* sont également organisés en 13 paralogues en fonction de l'homologie de leurs séquences (McGinnis & Krumlauf, 1992) (Figure 4).

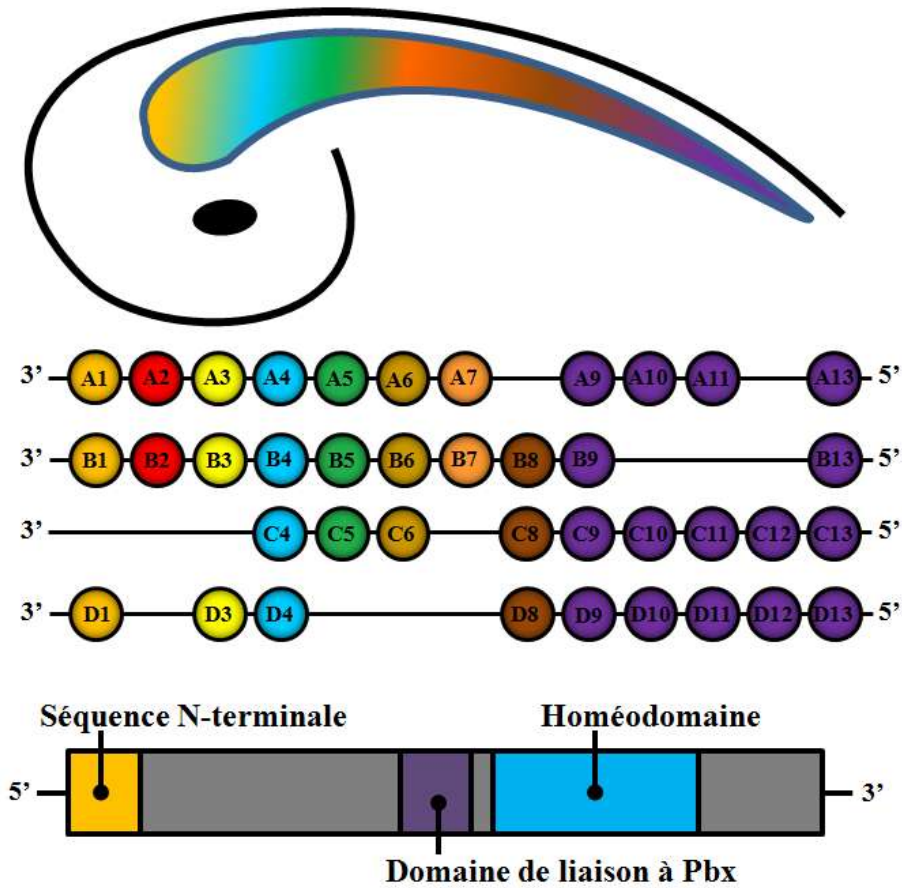


Figure 4 : Structure et organisation des gènes *HOX* chez les mammifères

1.3.2 Rôle des gènes *HOX* dans le développement embryonnaire

Les gènes *HOX* sont impliqués dans la détermination de l'identité cellulaire selon l'axe antéro-postérieure de l'embryon. Cette fonction est extrêmement conservée dans l'évolution puisqu'elle a été identifiée par l'étude des défauts morphologiques associés à des mutations des gènes *HOX* chez une variété d'animaux allant des nématodes jusqu'aux mammifères (Pearson et al., 2005). Il existe une correspondance entre la position d'un gène *HOX* au sein de

son groupe et son domaine d'expression dans l'embryon de façon à ce que les gènes situés en 3' sont transcrits dans les segments antérieurs du corps, alors que les gènes situés en 5' sont progressivement exprimés dans les parties plus postérieures. Ce phénomène caractéristique des gènes *HOX* est appelé la colinéarité spatiale (Soshnikova, 2014) (Figure 4). Les gènes *HOX* sont aussi régulés selon une colinéarité temporelle où les gènes sont activés dans une séquence chronologique reflétant leur position dans leur groupe respectif. Les gènes situés en 3' sont activés en premier alors que les gènes situés en 5' sont subséquentement activés (Izpisua-Belmonte et al., 1991). En plus des colinéarités spatiale et temporelle, il existe une prévalence postérieure dans les patrons d'expression des gènes *HOX*, ce qui fait que les produits des gènes situés plus postérieurement dans le groupe ont tendance à être plus prévalent par rapport aux gènes plus antérieurs. Cela a pour effet d'augmenter la quantité et la diversité des produits de gènes *HOX* dans la région caudale de l'embryon. Enfin, il existe un certain chevauchement de l'expression des gènes *HOX*, c'est-à-dire que la plupart des gènes *HOX* appartenant à un même paralogue ont des domaines d'expression comparables ou identiques (Duboule & Morata, 1994). Ensemble, ces caractéristiques constituent le code *HOX*, qui décrit les patrons d'expression des gènes *HOX* durant l'embryogénèse.

1.3.3 Régulation de l'expression des gènes *HOX*

Les gènes *HOX* doivent être exprimés de façon coordonnée dans le temps et dans l'espace pour assurer le développement normal de l'embryon. La régulation de leur expression est donc extrêmement rigoureuse et implique différents mécanismes d'initiation, d'établissement et de maintien de l'expression.

La séquence dans laquelle la transcription des gènes *HOX* est initiée permet l'établissement de l'identité cellulaire dans les différents domaines d'expression de l'axe antéropostérieur de l'embryon (Deschamps & van Nes, 2005). Plusieurs facteurs de régulation agissant en amont des gènes *HOX* ont été identifiés, notamment la voie de signalisation Wnt, le facteur de croissance fibroblastique (Fgf), la RA et les protéines Cdx.

Les membres de la famille Wnt encodent des glycoprotéines sécrétées et sont essentiels pour la formation du mésoderme chez la souris (Liu et al., 1999). La voie de signalisation Wnt

régule la formation et la fonction du sillon primitif et module l'expression des gènes *HOX* durant sa progression antéropostérieure (Forlani et al., 2003).

Les membres de la famille de Fgf sont également fortement exprimés dans la partie postérieure de l'embryon avant la formation du sillon primitif et sont connus pour induire l'expression des gènes *HOX* (Liu et al., 1999). De nombreuses études ont montré que la signalisation par les Fgf régule les patrons d'expression antéropostérieurs de l'embryon en régulant l'expression des gènes *HOX* (Bottcher & Niehrs, 2005).

Un autre facteur important de la régulation temporelle de l'initiation des gènes *HOX* est la RA (Kessel & Gruss, 1991) qui est exprimée dans la partie postérieure de l'embryon (Hogan et al., 1992). La signalisation par la RA et ses récepteurs est initiée par la liaison de ces derniers aux éléments de réponses à la RA (RARE) présents sur l'ADN (Rhinn & Dolle, 2012). Ces éléments de régulation ont été identifiés dans plusieurs gènes *HOX* notamment, *Hoxa1*, *Hoxb1*, *Hoxb4*, *Hoxd4*, *Hoxb5*, *Hoxb6* et *Hoxb8* (Oosterveen et al., 2003a; Oosterveen et al., 2003b) et sont nécessaires à l'initiation de la transcription de ces gènes (Gavalas et al., 1998). Par contre, la RA serait plus importante pour l'établissement des domaines d'expression des gènes *HOX* dans les différents segments de l'embryon (Moreno & Kintner, 2004). Un gradient décroissant de RA, en combinaison avec des gradients de Fgf (Dubrulle et al., 2001) et de signaux de la voie Wnt (Aulehla et al., 2003) restreignent ainsi l'expression des gènes *HOX* à leur domaine respectif.

Les protéines Cdx, qui sont des facteurs de transcription à homéodomaine, sont aussi d'importants régulateurs en amont des gènes *HOX*. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que les gènes *Cdx* seraient des cibles de Wnt, de la RA et de Fgf, ce qui suggère qu'ils seraient impliqués dans l'intégration de ces différents signaux pour assurer une expression adéquate des gènes *HOX* (Bel-Vialar et al., 2002).

Une fois l'expression des gènes *HOX* initiée et les domaines d'expression établis, des mécanismes de régulation épigénétiques assurent le maintien de leur expression durant le développement. Les membres des groupes PcG et Trithorax (TrxG) sont des facteurs essentiels impliqués dans le maintien de l'expression des gènes *HOX*. Les groupes PcG et TrxG forment des complexes protéiques possédant une activité méthyltransférase d'histone

(Schuettengruber et al., 2007). Les protéines du PcG maintiennent les gènes *HOX* dans un stade silencieux, alors que les gènes du TrxG sont en mesure de contrer cet effet pour maintenir l'expression des gènes *HOX* (Soshnikova & Duboule, 2009). Pour ce faire, les composantes du PRC2 ajoutent des groupements tri-méthyles aux résidus K27 des histones H3. Le PRC2 est aussi en mesure de se lier à ces marques H3K27, ce qui assure une répression héritable des gènes cibles (J. Muller et al., 2002). Le complexe PRC1 est également recruté aux marques H2K27 et contribue à la répression des gènes *HOX* en interférant avec l'activité de la polymérase ARN II (Stock et al., 2007). Les membres du TrxG, en particulier les protéines de la famille MLL, effectuent quant à eux la tri-méthylation des résidus K4 des histones H3, marques retrouvées en grande quantité aux promoteurs des gènes transcriptionnellement actifs (Soshnikova & Duboule, 2009).

Les complexes des groupes PcG et TrxG s'associent aussi avec des déméthylases d'histone (Nottke et al., 2009), ce qui permet des changements dynamiques au niveau de la chromatine. De cette façon, la balance entre les marques d'activation et de répression permet aux patrons d'expression des gènes *HOX* établis d'être maintenus de façon clonale durant le développement (He et al., 2011).

1.3.4 Rôle des gènes *HOX* dans l'hématopoïèse

En plus de leur rôle primordial durant le développement embryonnaire, des dizaines d'études effectuées au cours des vingt dernières années ont bien établi le rôle que jouent les gènes *HOX* dans la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques (Magli et al., 1997). Les progéniteurs hématopoïétiques expriment les gènes *HOX* selon un patron caractéristique de leur lignée et de leur stade de différenciation. Les gènes *HOX* des groupes A et B sont préférentiellement exprimés dans les populations enrichies en CSH et leur expression diminue dans les populations plus matures (Pineault et al., 2002). En général, les gènes *HOX* situés en 3' du groupe sont plus fortement exprimés dans les CSH, où 22 des 39 gènes *HOX* sont exprimés (Grier et al., 2005), alors que les gènes situés plus en 5' sont exprimés progressivement dans les cellules plus différenciées. De cette façon, dans l'hématopoïèse définitive, l'expression des gènes *HOX* diminue avec la différenciation pour atteindre des niveaux faibles et même nuls dans les cellules les plus matures de la moelle osseuse (Pineault

et al., 2002; Sauvageau et al., 1994). L'évaluation des niveaux d'expression des gènes *HOX* dans les cellules humaines primitives CD34⁺ a révélé que les gènes du groupe A sont exprimés avec les niveaux les plus élevés, suivis par les gènes des groupes B et C. Les gènes du groupe D ne sont par contre pas exprimés dans les cellules hématopoïétiques (Sauvageau et al., 1994).

Afin d'élucider les rôles respectifs des différents gènes *HOX* dans l'hématopoïèse, des études de délétion et de surexpression ont été effectuées. De façon générale, la surexpression d'un gène *HOX* entraîne une expansion des populations de cellules souches et progéniteurs, en plus d'être associée à un blocage au niveau de la différenciation cellulaire. C'est le cas du gène *Hoxb6* pour qui la surexpression rétrovirale cause une expansion des CSH et progéniteurs myéloïdes et une inhibition de l'érythropoïèse et de la lymphopoïèse (Fischbach et al., 2005). La surexpression du gène *Hoxb3* chez la souris cause également des défauts hématologiques en bloquant la différenciation des lymphocytes B et T (Sauvageau et al., 1997). L'expression constitutive du gène *HOXA5* humain est associée à une augmentation du nombre de progéniteurs myéloïdes et à un blocage de l'érythropoïèse (Crooks et al., 1999). Enfin, la surexpression rétrovirale de *HOXA10* dans les cellules CD34⁺ humaines entraîne une production significative de cellules blastiques associée à un blocage complet de la différenciation érythroïde et à une sévère diminution du développement des cellules B (Buske et al., 2001).

Différents modèles de souris mutantes pour des gènes *Hox* ont également apporté des informations importantes à la compréhension du rôle des gènes *Hox* dans l'hématopoïèse. Les souris mutantes pour *Hoxb3* présentent une réduction des progéniteurs de cellules B et une réduction de la cellularité de la moelle osseuse et ce, sans réduction significative du nombre de cellules B matures dans la rate (Ko et al., 2007). Les souris mutantes pour le gène *Hoxa9* ont un manque important au niveau des cellules myéloïdes et lymphoïdes associé à un défaut important de la capacité de repopulation (Lawrence et al., 1997; Magnusson et al., 2007a). La délétion de *Hoxb6* entraîne quant à elle une augmentation des progéniteurs érythroïdes primitifs de la moelle osseuse et du foie fœtal (Kappen, 2000), alors que les souris mutantes pour *Hoxc3* présentent une réduction des progéniteurs érythroïdes plus tardifs (Takeshita et al., 1993).

Les gènes *HOX* jouent ainsi un rôle important pour l'hématopoïèse et leur expression doit être correctement régulée pour assurer une différenciation adéquate des CSH. Plusieurs gènes *HOX*, par exemple *HOXA9* (Thorsteinsdottir et al., 2002) et *HOXA10* (Magnusson et al., 2007b), sont également capables d'expandre la population de CSH. Par contre, dans plusieurs cas, on observe une apparition de défauts de différenciation pouvant mener au développement de maladies hématologiques. Parmi ces gènes, *HOXB4* fait toutefois exception à la règle en permettant une expansion importante des CSH sans causer de leucémie. Plusieurs études sur *HOXB4* et sur les autres gènes du paralogue 4 ont donc été effectuées et seront traitées à la section 1.6.

1.3.5 Implication des gènes *HOX* dans les maladies hématologiques

L'implication des gènes *HOX* dans les maladies hématologiques humaines telles que les leucémies est supportée par différentes études qui ont montré leur expression aberrante dans certains types de leucémies. La comparaison des niveaux d'expression des gènes *HOX* retrouvés dans des cellules blastiques de leucémies myéloïdes aiguës (AML) par rapport à des cellules hématopoïétiques normales a démontré que la régulation négative des gènes *HOX* normalement observée chez les cellules normales n'avait pas lieu dans les AML et contribuait au développement de la maladie (Kawagoe et al., 1999). Des études de profilage génique global ont aussi identifié une régulation positive de plusieurs gènes *HOX* dans des leucémies de différentes origines (Drabkin et al., 2002; Quentmeier et al., 2004). La régulation positive de *HOXA9* et *HOXA10* est observée et associée à la pathogénèse de plusieurs cas de leucémies lymphoïdes aiguës (ALL) et AML humaines (Rozovskaia et al., 2001). La dérégulation de l'expression des gènes *HOX* est aussi associée à des mutations spécifiques telles que la mutation de la nucléophosmine 1 (Mullighan et al., 2007). Les gènes humains *HOXA9*, *HOXA10*, et *HOXC6* sont également régulés positivement dans les ALL, particulièrement lorsque des translocations impliquant le gène *MLL* sont impliquées (Ferrando et al., 2003). Les protéines de fusion impliquant *MLL* constituent environ 10% des AML développées suite à une thérapie et 3% des nouveaux cas d'AML. Ces protéines de fusion activent la transcription des gènes *HOX* plus efficacement que *MLL* seul (Slany, 2009). Une signature commune de surexpression des gènes *HOX* du groupe A incluant *HOXA3*, *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXA9* et *HOXA10* est d'ailleurs associée aux réarrangements de *MLL* chez les AML et les ALL

humaines (Zangrando et al., 2009). D'autres translocations impliquent aussi une surexpression des gènes *HOX* menant au développement de leucémie. C'est le cas de CALM-AF10 qui est associé aux T-ALL et mène à la surexpression de *HOXA6*, *HOXA9*, *HOXA10* et *MEIS1* (Dik et al., 2005). La surexpression des gènes *HOX* est donc la conséquence de translocations chromosomiques impliquant des gènes agissant en amont dans plusieurs cas de leucémies.

Les gènes *HOX* peuvent également être directement impliqués dans des fusions protéiques résultant de translocations. Un des partenaires de fusion les plus fréquents des gènes *HOX* est *NUP98*, membre de la famille des nucléoporines. Les protéines de fusion NUP98-*HOX* sont retrouvées dans plusieurs types de leucémies et sont associées à la translocation t(7;11) chez les AML (Nakamura et al., 1996). Plusieurs gènes *HOX*, soit *HOXA9*, *HOXA11*, *HOXA13*, *HOXC11*, *HOXC13*, *HOXD11* et *HOXD13*, sont des partenaires de fusion connus de *NUP98* (Slape & Aplan, 2004). En général, seuls les gènes *HOX* situés en 5' du complexe *HOX* sont des partenaires de fusion de *NUP98* (Pineault et al., 2004). En plus de *NUP98*, les gènes *HOX* du groupe A sont directement impliqués dans des fusions avec le gène du récepteur de cellules T (*TCRB*) dans les T-ALL. Cette fusion entraîne une surexpression globale des gènes *HOX* du groupe A (Soulier et al., 2005).

Dans les modèles murins, les leucémies associées à la surexpression des gènes *HOX* se développent après de longues périodes de latence, ce qui suggère que des modifications génétiques additionnelles sont requises pour le développement de leucémie. Le fait que le cofacteur des gènes *HOX* *MEIS1* coopère avec plusieurs fusions impliquant les gènes *HOX* pour accélérer la leukemogénèse supporte cette notion (Pineault et al., 2004; Pineault et al., 2003).

Dans les leucémies humaines, les niveaux d'expression des gènes *HOX* sont maintenant utilisés comme facteurs pronostiques des cas d'AML. Une corrélation entre de hauts niveaux d'expression des gènes *HOX* et un mauvais pronostic a d'ailleurs été établie (Drabkin et al., 2002). En effet, la surexpression des gènes *HOX* est associée à une catégorie cytogénétique intermédiaire non favorable des AML. *HOXA9* a par ailleurs été identifié parmi plus de 6800 gènes comme étant associé avec le plus de cas d'échec du traitement et un faible taux de survie (Golub et al., 1999). D'autre part, une faible expression de *HOXA4* et de *MEIS1* constitue un signe favorable pour les patients atteints d'AML (Zangenberg et al., 2009). Les

niveaux globaux d'expression des gènes *HOX* reflètent donc l'issue de la maladie et leur faible expression est généralement associée à des pronostics plus favorables dans les cas d'AML (Andreeff et al., 2008).

1.3.6 Mécanismes d'action des protéines HOX

Les protéines HOX agissent principalement comme facteurs de transcription qui se lient à des cibles d'ADN et permettent la transcription des gènes cibles par la polymérase d'ARN II (PolII). C'est l'homéodomaine des HOX qui joue le rôle central à leur activité puisqu'il est requis pour la liaison directe à l'ADN aux séquences TAAT situées dans les régions régulatrices de leurs gènes cibles. Par contre, les protéines HOX seules ne possèdent qu'une faible affinité et spécificité pour ces séquences d'ADN (Levine & Hoey, 1988). De plus, l'activité transcriptionnelle des protéines HOX varie selon le contexte (Krasnow et al., 1989), ce qui indique que différents partenaires ou cofacteurs sont nécessaires pour augmenter leur spécificité et permettre une régulation adéquate de leurs gènes cibles. Les protéines HOX contiennent différentes surfaces pouvant interagir avec d'autres protéines et fonctionnent principalement au sein de complexes protéiques de régulation (Ladam & Sagerstrom, 2014).

Les cofacteurs les plus connus des protéines HOX, les protéines PBX et MEIS, font partie de la famille *three amino acid loop extension* (TALE). Les protéines MEIS se lient aux HOX dite abdominales (paralogues 9 à 13), mais pas aux HOX antérieures (paralogues 1 à 8) alors que PBX se lie spécifiquement à ces dernières (Shen et al., 1997b). PBX et MEIS sont aussi capables de se lier entre eux faisant en sorte que des complexes trimériques HOX-PBX-MEIS peuvent se former avec la majorité des protéines HOX (Shanmugam et al., 1999). Les protéines HOX interagissent avec les protéines PBX via un domaine YPWM situé en 5' de leur homéodomaine (Mann & Chan, 1996) (Figure 4). Il existe 3 protéines PBX (PBX1-3) qui ont été identifiées dans des fusions résultant de translocations chromosomiques menant à des leucémies des cellules pré-B chez l'humain (Korsmeyer, 1992). PBX1 est particulièrement exprimé dans les CSH et son expression diminue avec la différenciation vers des progéniteurs plus matures (Ficara et al., 2013). Les protéines PBX sont requises pour les fonctions associées à HOX dans une variété de systèmes biologiques au niveau de l'embryogénèse (Manley et al., 2004) et dans l'hématopoïèse où elles sont nécessaires pour l'hématopoïèse

définitive (DiMartino et al., 2001). Les protéines PBX contiennent un homéodomaine de type TALE qui est essentiel pour leur interaction avec les HOX. Les complexes PBX-HOX augmentent de beaucoup l'affinité des protéines HOX pour leurs gènes cibles (Chang et al., 1995). En plus des protéines HOX, PBX peut recruter d'autres facteurs au complexe, favorisant ainsi la transcription des gènes cibles, par exemples, des déacétylases d'histones (HDAC) et des acétyl transférase d'histone (HAT) (Saleh et al., 2000). Le locus *MEIS1* a été identifié comme étant un site fréquent d'intégration virale dans les cas de leucémies myéloïdes dans un modèle murin (Steelman et al., 1997). Les protéines MEIS peuvent aussi interagir directement avec certaines protéines HOX via leur homéodomaine (Shen et al., 1997a). Les protéines MEIS, qui font aussi partie de la famille TALE, ont d'abord été identifiées comme proto-oncogènes qui étaient co-activés avec les gènes *HOX* dans les leucémies (Moskow et al., 1995). Tout comme PBX, MEIS est requise pour la fonction des gènes *HOX* dans plusieurs contextes (Choe et al., 2009; Jacobs et al., 1999). Par contre, contrairement à PBX, MEIS ne serait pas impliquée dans la spécificité de la liaison à l'ADN des gènes *HOX*, mais plutôt dans la stabilité de PBX. En effet, il a été montré chez le poisson zébré qu'en plus d'être un partenaire de liaison de l'ADN de Pbx, Meis est impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de Pbx (Waskiewicz et al., 2001). Meis serait aussi capable de moduler les interactions entre PBX et ses co-régulateurs (Hudry et al., 2012). Meis neutralise entre autres l'activité de répression génique des HDAC en disputant le même site de liaison que Pbx chez le poisson zébré, empêchant ainsi sa liaison au complexe (Choe et al., 2009). Les protéines MEIS et PBX participent donc de façon complémentaire à la régulation de la transcription des gènes cibles des HOX.

En plus de leur fonction de facteurs de transcription, les protéines HOX peuvent agir comme régulateurs post transcriptionnels de certaines protéines. Il a été montré que Hoxb4 agit au sein d'un complexe d'ubiquitine ligase E3 qui est responsable de la dégradation via le protéasome de la protéine Geminin, protéine requise pour le maintien de la pluripotence des CSH (Yasunaga et al., 2013). Les gènes *HOX* du paralogue 13 sont aussi capables de moduler l'activité transcriptionnelle des protéines Smad en interagissant directement avec la protéine et ce, de façon indépendante de leur capacité de liaison à l'ADN (T. M. Williams et al., 2005).

Pour conclure, les gènes *HOX* encodent des facteurs de transcription très conservés au cours de l'évolution. L'expression de ces gènes est hautement régulée tant au niveau de l'embryogénèse que durant la vie adulte. Les mécanismes d'action des gènes *HOX* varient selon le contexte. Ils jouent entre autres un rôle primordial dans l'hématopoïèse où leur dérégulation est associée à diverses maladies hématologiques.

1.4 La transplantation de cellules souches hématopoïétiques

La transplantation de CSH est un traitement qui consiste à injecter des CSH à un patient dans le but de reconstituer à long terme son système hématopoïétique (Ljungman et al., 2006). Cette méthode qui est utilisée depuis plusieurs décennies, sert à traiter les personnes atteintes non seulement de maladies hématologiques telles que les leucémies et lymphomes, mais aussi des maladies non-hématologiques tels que certains types de carcinomes (Rafeah & Fadilah, 2009). Les transplantations de CSH sont entre autres définies par le type de donneur (autologue ou allogénique) ainsi que par la provenance des CSH.

1.4.1 Différents types de greffes de cellules souches hématopoïétiques

Les greffes de CSH peuvent être caractérisées selon le type de donneur. Dans les greffes autologues, les CSH d'un patient seront prélevées avant une thérapie myéloablatrice intensive. Les CSH prélevées seront ensuite retransplantées au patient pour reconstituer sa moelle osseuse (Rafeah & Fadilah, 2009). Dans les greffes allogéniques, les CSH transplantées au patient proviennent d'une autre personne. Étant donné que le patient et le donneur ne sont pas identiques au niveau immunologique, on privilégie les donneurs partageant les mêmes loci HLA, souvent retrouvés parmi les membres de la famille du patient (Singhal et al., 2002). En absence de donneur parfaitement compatible, il est toutefois possible de greffer des CSH provenant d'un donneur haplo-identique où un certain nombre d'allèles HLA ne sont pas les mêmes que celles du patient. Le risque d'échec de la greffe est alors plus élevé.

1.4.2 Différentes sources de cellules souches hématopoïétiques pour la transplantation

Les CSH utilisées pour les transplantations peuvent être prélevées à partir de la moelle osseuse, du sang périphérique ou encore à partir de sang de cordon ombilical. La moelle

osseuse a été la première source de CSH utilisée pour la transplantation. Cette technique est particulièrement fastidieuse puisque le donneur doit être anesthésié et qu'une grande quantité de moelle osseuse est nécessaire pour assurer une bonne reconstitution et une augmentation de la survie chez les donneurs compatibles (Bittencourt et al., 2002). Le sang périphérique contient quant à lui très peu de CSH en situation d'homéostasie avec une concentration de cellules CD34⁺ trop faible pour permettre la récupération (Korbling et al., 1995). Pour que le sang périphérique devienne une source appréciable de CSH, il est possible de mobiliser les CSH de la moelle osseuse vers la périphérie en utilisant le G-CSF. Ce traitement permet de concentrer jusqu'à 23 fois les CSH dans le sang périphérique en altérant les protéines qui retiennent les CSH dans la moelle osseuse, ce qui entraîne leur relâche dans le sang (Hoggatt & Pelus, 2011). Une fois les CSH mobilisées dans le sang, elles peuvent être récupérées par leukocytaphérèse. La transplantation de CSH mobilisées a comme avantage d'accélérer la reconstitution de la moelle osseuse, comparativement à une transplantation à partir de CSH de moelle osseuse puisque le greffon a une plus haute teneur en progéniteurs hématopoïétiques (Devetten & Armitage, 2007). Finalement, le cordon ombilical peut constituer une source de CSH puisqu'il contient une concentration de cellules CD34⁺ similaire celle de la moelle osseuse. Les avantages du sang de cordon sont multiples. Il n'y a entre autres aucun risque pour le donneur puisque les CSH sont prélevées après que son cordon ait été coupé. Il est aussi possible de greffer des CSH de sang de cordon qui ne sont pas parfaitement compatibles au niveau du locus HLA (Hwang et al., 2007). De plus, comme le sang de cordon ne contient pas ou peu de cellules T matures, les risques de complications associées à leur utilisation sont plus faibles que lors de l'utilisation d'autres sources de CSH (Brunstein & Wagner, 2006). L'utilisation de CSH de sang de cordon diminue aussi le risque de transmission d'infection. À l'inverse, le sang de cordon présente certains inconvénients, notamment le nombre limité de CSH qui mène à un délai dans la reconstitution hématopoïétique ainsi qu'à une augmentation du risque d'échec de la greffe.

1.4.3 Complications associées aux transplantations de cellules souches hématopoïétiques

Il existe plusieurs complications associées aux transplantations de CSH. Les principaux obstacles incluent les infections opportunistes, la rechute de la tumeur maligne, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et la quantité de CSH disponibles pour la transplantation.

Les infections font partie des complications fréquentes causées par la suppression du système immunitaire du patient et sont associées à la mortalité et la morbidité des patients transplantés. En effet, ces derniers sont plus susceptibles aux infections bactériennes, virales et fongiques, particulièrement durant la période aplasique qui est associée à une neutropénie et une altération des barrières muco-sales (Rafeah & Fadilah, 2009). Dans les dernières années, plusieurs traitements prophylactiques ainsi que des stratégies de vaccination ont permis de réduire l'incidence des infections sans toutefois les prévenir complètement (Marr, 2012).

Une autre cause d'échec commune de la transplantation de CSH est la rechute de la maladie initiale après la greffe. Une contamination de la moelle osseuse avec les cellules tumorales peut par exemple mener à une rechute de la leucémie lors des greffes autologues. Le risque de la rechute dépend donc de plusieurs facteurs tels que le stage de la maladie lors de la transplantation, la source et le type de transplantation effectuée (Devetten & Armitage, 2007). Toutefois, le pronostic des patients ayant une rechute n'est pas très favorable.

Dans les cas de greffes allogéniques, les cellules T matures présentes dans le greffon sont en mesure de reconnaître les tissus du patient receveur comme faisant partie du non-soi et des les attaquer. Ce phénomène est appelé la GVHD (Korngold & Sprent, 1978). La GVHD existe sous deux formes; la phase aiguë et la phase chronique. La première, qui se manifeste dans les 100 jours suivant la transplantation, est caractérisée par des dommages à la peau, au foie et au tractus gastro-intestinal. La seconde ressemble quant à elle à un syndrome auto-immun et se manifeste plus de 100 jours après la transplantation (Shlomchik, 2007). Pour contrer les effets de la GVHD, il est possible d'administrer des agents immunosuppresseurs au patient ou encore de dépléter les cellules T du greffon avant de le transplanter. Ces traitements augmentent cependant les risques d'infection en diminuant la reconstitution immunitaire et supprime aussi l'effet bénéfique des cellules T qui sont en mesure de détruire les cellules leucémiques (Shlomchik, 2007).

Finalement, une autre limite associée à la transplantation de CSH est la quantité de CSH disponible. Alors que les CSH prélevées à partir de la moelle osseuse sont de moins en moins utilisées, les CSH provenant de sources alternatives sont plus limitées. Dans les transplantations de CSH périphériques mobilisées, plusieurs sessions de mobilisation et de leukocytophérèse peuvent être requises afin d'obtenir suffisamment de CSH pour la

transplantation efficace d'un patient (Cutler & Antin, 2001). La situation est similaire avec l'utilisation de CSH prélevées à partir de sang de cordon puisque le nombre restreint de CSH pouvant être prélevées dans un cordon oblige l'utilisation de plusieurs unités pour la transplantation d'un patient adulte (Brunstein & Wagner, 2006).

En conclusion, malgré les différentes complications associées à la transplantation de CSH, ce traitement demeure une méthode efficace pour le traitement de plusieurs maladies hématologiques. Alors que la plupart des complications peuvent être traitées ou atténuées, les limites associées à la quantité de CSH disponibles constituent un frein majeur pour l'accessibilité des malades à cette thérapie. Il importe donc de développer des outils permettant l'expansion clinique des CSH en quantité suffisante pour combler les besoins de transplantation.

1.5 Expansion des cellules souches hématopoïétiques

Les CSH offrent de nombreuses perspectives pour le traitement des maladies hématologiques et pour les thérapies cellulaires. Par contre la principale limite à la transplantation de CSH est la disponibilité d'un nombre suffisant de cellules compatibles. De plus, il a été démontré que la quantité de CSH transplantées à un patient a un impact direct sur la survie et la période nécessaires à la régénération du système hématopoïétique (Wagner et al., 2002). L'identification de moyens permettant l'expansion du nombre de CSH *ex vivo* est donc primordiale pour permettre l'amélioration des thérapies basées sur la transplantation de CSH et pour augmenter leur accessibilité.

1.5.1 Induction de l'expansion par un stress hématopoïétique

En situation d'homéostasie, les CSH présentes dans la moelle osseuse se maintiennent à un nombre constant par autorenouvellement. Par contre, lors de stress hématopoïétiques, par exemple suite à une transplantation, les CSH augmentent leur taux d'autorenouvellement, ce qui mène à une expansion nette de leur nombre *in vivo*. La transplantation de CSH dans un receveur irradié de façon létale mène d'ailleurs à une expansion allant de 10 à 20 fois des CSH injectées (Pawliuk et al., 1996). En réinjectant ces mêmes CSH dans des receveurs subséquents par des transplantations sérielles, il a été possible d'expandre davantage ces cellules pour obtenir une expansion cumulative de 8400 fois après 4 transplantations (Iscove

& Nawa, 1997). Les différents facteurs auxquels sont exposées les CSH dans l'environnement de la niche sont donc en mesure d'augmenter largement leur capacité d'autorenouvellement et d'expandre ces cellules de façon importante. Par contre, l'expansion des CSH *in vitro* n'est pas aussi facile et les mécanismes permettant l'expansion des CSH sont étudiés intensivement afin de pouvoir expandre efficacement ces cellules *in vitro*.

1.5.2 Optimisation des milieux de culture par des combinaisons de cytokines

Les premières tentatives pour expandre *ex vivo* les CSH ont cherché à récapituler les signaux du microenvironnement retrouvés dans la moelle osseuse en utilisant les différentes cytokines produites par ce dernier. Les cytokines sont en effet connues pour leur capacité à réguler l'autorenouvellement, le destin cellulaire, la différenciation et la maturation des cellules hématopoïétiques (Ogawa, 1993). De nombreuses cytokines, notamment le SCF, la thrombopoïétine (TPO), le ligand de FLT-3, l'interleukine (IL)-11, l'IL-3 et l'IL-6, ont été utilisées dans différentes combinaisons pour expandre les CSH humaines et murines *in vitro*. Il a été montré que l'utilisation de SCF, de TPO et du ligand de FLT-3 a permis d'expandre des cellules CD34⁺ humaines de façon très importante. En effet, une expansion nette du nombre absolu de cellules allant jusqu'à 16 000 fois en 8 semaines de culture a pu être obtenue. Par contre, la majorité des cellules de ces cultures perdaient l'expression du CD34 et se différenciaient en précurseurs de cellules dendritiques (Arrighi et al., 1999). Une autre étude a démontré que l'ajout d'IL-3 ou d'IL-11 à ce cocktail entraînait une expansion des cellules multipotentes capables de reconstitution hématopoïétiques à long terme chez la souris tel que déterminé par des transplantations en situation de compétition dans des receveurs irradiés de façon létale (Bryder & Jacobsen, 2000). La combinaison de ligand de FLT-3, de SCF, d'IL-3 et d'IL-6 permet aussi d'induire la prolifération des cellules CD34⁺ et progéniteurs humains *in vitro* tout en préservant leur phénotype primitif (Shah et al., 1996). Toutefois, bien que l'optimisation des cocktails de cytokines dans les milieux de culture permet la survie et la prolifération des CSH, elle n'influence que modestement leur capacité d'autorenouvellement et d'expansion et favorise la différenciation des CSH et la perte progressive de ces cellules *in vitro* (Walasek et al., 2012). Par contre, dans certain cas, seule l'utilisation de facteurs de croissance spécifiques dans le milieu de culture permet à un facteur d'expansion des CSH d'être efficace. En effet, il a été montré qu'en présence de SCF, de TPO, d'IGF-2 et de FGF-1,

les protéines Angptl sont en mesure d'expandre les CSH murines alors que sans ces facteurs, elles ne permettent que leur survie. (Akhter et al., 2013)

1.5.3 Utilisation de facteurs intrinsèques des cellules souches hématopoïétiques

Plusieurs facteurs intrinsèques aux CSH ont été impliqués dans leur capacité d'autorenouvellement et pourraient conséquemment être utilisés pour expandre efficacement ces cellules *in vitro*. Parmi ceux-ci, plusieurs facteurs de transcription sont connus pour leur capacité à augmenter l'autorenouvellement des CSH. Les plus connus sont sans doute les gènes *HOX* abordés à la section 1.3, et plus particulièrement le gène *HOXB4* qui sera traité à la section 1.6.2. D'autres facteurs de transcription importants pour les CSH, tels que NF-Y (Section 1.2) et Gfi1 (Section 1.1), sont également en mesure d'expandre les CSH. Aussi, il a récemment été montré par un essai de reconstitution en situation de compétition (CRU) que la surexpression rétrovirale d'une isoforme du facteur de transcription RUNX/AML, ALM1a, peut expandre les CSH murines *ex vivo* en augmentant leur activité d'autorenouvellement lorsqu'elle est surexprimée (Tsuzuki & Seto, 2012). Un autre facteur de transcription a également été récemment utilisé pour expandre les CSH humaines. En effet, la surexpression lentivirale d'une isoforme de *SALL4* a permis d'expandre jusqu'à 10 000 fois des cellules CD34⁺ mobilisées à partir de sang périphérique et d'augmenter la reconstitution hématopoïétique de ces cellules *in vivo* dans un essai de cellules repopulatrices de souris NOD-SCID (SRC) (Aguila et al., 2011). Finalement, il est possible d'expandre des CSH en supprimant l'expression de facteurs de transcription normalement exprimés avec la différenciation hématopoïétiques. C'est le cas du facteur de transcription de la famille homéobox *VentX*. En effet, la suppression de l'expression de *VentX* permet une forte expansion des CSH et MPP humain *ex vivo* entre autres en influençant l'expression de régulateurs du cycle cellulaire (Gao et al., 2012).

En plus des facteurs de transcription, certaines protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine sont en mesure d'expandre les CSH lorsqu'elles sont surexprimées. Le membre de la famille PcG, Bmi1 (section 1.2), est un bon exemple puisqu'il est en mesure d'augmenter l'autorenouvellement des CSH. La perte d'un autre facteur

épigénétique, la méthyltransférase Dnmt3a, entraîne aussi une augmentation du nombre de CSH en affectant leur capacité de différenciation (Challen et al., 2012).

Enfin, les ARN non-codants, tels que les micro-ARN, ont récemment été impliqués dans la régulation des CSH. Ces molécules sont en mesure de réguler l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle en ciblant les ARN messagers. L'importance des micro-ARN dans la fonction des CSH a été confirmée dans un modèle de souris démontrant que l'altération de composants de la machinerie des micro-ARN, tel que Dicer, a un impact négatif sur le bassin de CSH et progéniteurs en augmentant l'apoptose de ces cellules (Guo et al., 2010). Plusieurs micro-ARN ont été impliqués directement dans l'autorenouvellement des CSH. C'est le cas de miR-125 qui est en mesure d'expandre le nombre de CSH lorsqu'il est exprimé ectopiquement dans des cellules de moelle osseuse (Guo et al., 2010). Un autre exemple est miR-126, connu pour son importance dans le maintien de la quiescence des CSH humaines et murines. Il a été montré que la régulation négative de ce micro-ARN peut expandre les CSH en augmentant leur prolifération et ce, sans mener à leur épuisement (Lechman et al., 2012).

Les mécanismes intrinsèques sont donc en mesure d'expandre efficacement les CSH, particulièrement lorsque ces gènes sont surexprimés. L'administration des protéines où l'activation transitoires de ces facteurs peuvent également expandre les CSH dans plusieurs cas, mais souvent avec une efficacité réduite.

1.5.4 Utilisation de régulateurs développementaux

Il est maintenant bien établi que de nombreux facteurs importants lors de l'embryogénèse et de l'ontologie des CSH jouent un rôle notoire dans leur autorenouvellement chez l'adulte et peuvent être utilisés pour les expandre *in vitro*. Plusieurs de ces facteurs, notamment les voies Wnt, Notch et Shh ont d'ailleurs été abordés à la section 1.2. Le facteur IGF-2, exprimé par les cellules du foie fœtal qui supportent la principale expansion des CSH durant l'embryogénèse, est également capable d'expandre les CSH-LT murines lorsqu'il est additionné au milieu de culture (C. C. Zhang & Lodish, 2004). IGFBP-2, qui régule l'effet biologique de IGF-1 et IGF-2, notamment en contrôlant sa distribution, est aussi capable de supporter l'expansion *ex vivo* des CSH humaines et murines en permettant leur survie et leur

entrée en cycle cellulaire (Huynh et al., 2008; Huynh et al., 2011; C. C. Zhang et al., 2008). D'autres exemples de facteurs exprimés dans le foie fœtal sont les protéines ANGPTL qui peuvent aussi expandre les CSH-LT *in vitro* (C. C. Zhang et al., 2006). Finalement, il a récemment été montré que la pléiotrophine, un facteur microenvironnemental se liant à l'héparine jusqu'alors inconnu pour son rôle dans l'hématopoïèse, est capable d'expandre les CSH murines et humaines (Himburg et al., 2010). Les différentes voies et mécanismes impliqués dans le développement du système hématopoïétique pourraient donc être employés pour expandre *ex vivo* les CSH dans un but thérapeutique.

1.5.5 Utilisation de modulateurs chimiques

Étant donné que la manipulation génétique des CSH ne constitue pas une méthode sans danger pour une expansion clinique, de nombreux efforts ont été déployés pour identifier de petites molécules pouvant expandre les CSH en étant administrées de façon transitoire au milieu de culture. Une de ces molécules, retrouvée naturellement dans le sérum, est la RA. Il a d'ailleurs été démontré que l'ajout d'un agoniste du récepteur de la RA (ATRA) à des cultures de CSH et progéniteurs murins augmente le maintien et l'autorenouvellement de ces cellules (Purton et al., 2000). La molécule BIO (6-bromoindirubin 3'-oxime) peut cibler un régulateur négatif de la voie de signalisation Wnt menant à une meilleure capacité de reconstitution de cellules CD34⁺ humaines cultivées en sa présence (Ko et al., 2011). Enfin, deux autres petites molécules, NR-101 et SR1, ont récemment été identifiées comme ayant la capacité d'expandre les CSH humaines *ex vivo*. NR-101, un agoniste du récepteur de la TPO, favorise en effet l'expansion de CSH de sang de cordon humain de façon plus efficace que la TPO elle-même (Nishino et al., 2009). SR1 est quant à elle un antagoniste du récepteur des hydrocarbures aryliques qui a été identifiée dans un criblage visant à trouver des facteurs permettant l'expansion des CSH humaines. SR1 a été montrée capable d'expandre jusqu'à 50 fois les cellules CD34⁺ humaines *ex vivo*, incluant une expansion importante de 17 fois SRC (Boitano et al., 2010).

L'identification d'agents chimiques aptes à influencer l'autorenouvellement des CSH constitue donc une stratégie propice à l'expansion *ex vivo* de ces cellules dans un but thérapeutique.

1.5.6 Conditions de culture

Les conditions de culture utilisées pour l'expansion des CSH peuvent aussi influencer l'efficacité de cette méthode. Étant donné que les CSH résident dans la partie la plus hypoxique de la niche hématopoïétique avant de se différencier dans la région vasculaire plus riche en oxygène, des études ont comparé l'expansion des CSH en condition hypoxiques (5% O₂) et normoxique (21% O₂). Ils ont ainsi révélé que la culture en condition hypoxique augmentait significativement la capacité d'autorenouvellement des CSH humaines provenant de sang de cordon (Roy et al., 2012). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et des dommages à l'ADN qui leur sont associés limitent la capacité d'autorenouvellement des CSH humaines *in vivo* (Yahata et al., 2011).

Il est aussi possible d'effectuer des co-cultures de CSH et de différents types de cellules stromales permettant l'expansion des CSH. Les cellules stromales récapitulent le microenvironnement retrouvé dans la niche hématopoïétique et procurent un milieu contenant les facteurs de croissance requis pour l'autorenouvellement des CSH. Plusieurs lignées cellulaires sont connues pour leur capacité à supporter la croissance et l'expansion des CSH. C'est le cas des cellules OP9, dérivées d'une lignée de cellules stromales de moelle osseuse de souris. Il a d'ailleurs été montré que les cellules OP9 exprimaient le gène *mKirre*, codant pour une protéine membranaire responsable de leur support à la croissance des CSH (Ueno et al., 2003). Les cellules stromales peuvent également être modifiées afin de délivrer des facteurs permettant l'expansion des CSH. Par exemple, il est possible d'utiliser des cellules stromales murines exprimant la protéine recombinante HOXB4 pour expandre les CSH (Amsellem et al., 2003).

En conclusion, même si la transplantation de CSH est couramment utilisée comme traitement depuis plusieurs années, la disponibilité d'une source suffisante de CSH limite grandement ce type de thérapie. Plusieurs études ont permis d'identifier des modulateurs importants de l'autorenouvellement et ces mécanismes pourront sans doute contribuer au développement de méthodes sécuritaires et efficaces pour expandre les CSH *ex vivo*. Dans cette optique, l'utilisation de petites molécules chimiques permettant de reproduire ou d'activer les mécanismes intrinsèques responsables de la régulation de l'autorenouvellement des CSH font partie des stratégies les plus prometteuses. L'optimisation des conditions de

culture par l'addition de meilleures combinaisons de cytokines et facteurs de croissance ainsi que l'utilisation de concentrations d'oxygènes favorables à l'expansion, permettront de maximiser la capacité d'expansion des CSH *in vitro* pour améliorer les traitements présentement utilisés.

1.6 Les gènes *HOX* du paralogue 4

Les gènes *HOX* d'un même paralogue présentent une forte homologie et une redondance fonctionnelle dues à leur organisation chromosomique. Les gènes du paralogue 4 sont d'ailleurs connus pour leur redondance fonctionnelle dans la spécification de l'identité régionale durant l'embryogénèse (Horan et al., 1995). De nombreuses études ont également montré que les gènes *HOX* du paralogue 4 jouent un rôle important dans l'hématopoïèse, principalement chez les CSH. En fait, les gènes *HOXA4*, *HOXB4* et *HOXC4* sont tous exprimés à différents degrés dans les cellules hématopoïétiques primitives, incluant les CSH, alors que le gène *HOXD4* n'est que peu ou pas exprimé dans l'hématopoïèse humaine ou murine (Sauvageau et al., 1994). *HOXD4* est cependant important pour le développement de l'hématopoïèse chez le poisson zébré où il agit en amont de *Meis1.1* (Amali et al., 2013).

1.6.1 Le gène *homéobox A4*

Le gène *Hoxa4* est l'un des gènes *HOX* les plus fortement exprimés dans les cellules LKS du foie fœtal, population très enrichie en CSH. Il est d'ailleurs le gène du paralogue 4 le plus exprimé avec un niveau d'expression au moins dix fois plus élevé que les autres (Bijl et al., 2006). De plus, dans les CSH murines, le gène *Hoxa4* est plus de deux fois plus exprimé que *Hoxb4* dans les populations de CSH-LT et trois fois plus exprimé dans les populations de CSH-ST (Lebert-Ghali et al., 2010).

Les gènes *HOX* du groupe A, dont fait partie *HOXA4*, sont importants pour l'hématopoïèse adulte. En particulier, il a été montré que les CSH et les progéniteurs sont sensibles au niveau d'expression des gènes *HoxA* puisque leur fonction est altérée chez les souris hétérozygotes pour le groupe A (Lebert-Ghali et al., 2010). Ces souris montrent également un défaut de maintien des progéniteurs de cellules B, particulièrement avec l'âge. De plus, il a récemment été montré que la délétion complète des gènes *Hox* du groupe A dans les CSH murines affectait la fonction et le maintien à long terme des CSH (Lebert-Ghali et al.,

En préparation). Ces données soulignent l'importance des gènes *HOX* du groupe A dans l'hématopoïèse adulte. Les gènes *HOX* du groupe A, incluant *HOXA4*, ont également été associés à un certain potentiel de transformation leukémogénique. En effet, tous les gènes du groupe à l'exception de *HOXA2* et *HOXA5* ont été en mesure de transformer des cellules hématopoïétiques primaires *in vitro*. Cette propriété est par contre plus importante pour les gènes *HOX* postérieurs tels que *HOXA7* à *HOXA10* (Bach et al., 2010).

Chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique (CML), l'inactivation de *HOXA4*, associée à l'hyperméthylation de son promoteur, a été associée avec la progression de la maladie vers la phase blastique (Strathdee et al., 2007). L'hyperméthylation de *HOXA4* est également associée à une augmentation du risque de résistance à l'Imatinib, un inhibiteur spécifique à la protéine de fusion BCR-ABL retrouvée chez les patients atteint de CML positive pour le chromosome de Philadelphie (Elias et al., 2013). L'hyperméthylation de la région promotrice de *HOXA4* est également observée dans un grand nombre d'AML où elle est associée au développement de la maladie (Zangenberg et al., 2009).

Enfin, l'utilisation d'un modèle de cancer des ovaires, a permis de démontré que *HOXA4* inhibe la mobilité et l'infiltration cellulaire en plus d'augmenter l'adhésion cellulaire, contribuant ainsi à répondre aux comportements cellulaires aberrants associés à la maladie (Klausen et al., 2009). *HOXA4* est d'ailleurs fortement exprimé dans les carcinomes ovariens (Ota et al., 2009).

1.6.2 Le gène *homéobox B4*

Le gène *HOXB4* est certainement le facteur de transcription le plus connu et le plus étudié dans le but d'expandre les CSH *in vitro* et *in vivo*, ainsi que pour sa capacité à permettre la différenciation des cellules ES en cellules hématopoïétiques.

Les premières études qui ont permis d'identifier la fonction de *HOXB4* dans les CSH ont été effectuées avec des essais de transplantation en série de cellules de moelle osseuse murine surexprimant *HOXB4* de façon rétrovirale. Une augmentation de la capacité des cellules *HOXB4*⁺ à régénérer les compartiments hématopoïétiques et une expansion importante du nombre de CSH *in vivo* ont été observées et ce, sans anomalie hématologique ni développement de leucémie (Sauvageau et al., 1995). De plus, *HOXB4* n'expand pas les CSH

à des niveaux supérieurs à ceux normalement présents chez des souris de type sauvage à long terme, ce qui indique que sa surexpression n'affecte pas les mécanismes impliqués dans le maintien de la taille du réservoir de CSH (Antonchuk et al., 2001; Thorsteinsdottir et al., 1999). En plus des études effectuées sur les CSH murines, *HOXB4* a été surexprimé de façon rétrovirale dans des cellules CD34⁺ humaines prélevées à partir de sang de cordon et transplantées dans des modèles de souris humanisées. Ces études ont montré que les cellules CD34⁺ avaient un avantage de croissance significatif en situation de compétition. Par contre, *HOXB4* compromettait le programme de différenciation lymphomyéloïde de ces cellules (Schiedlmeier et al., 2003). D'autres études utilisant un modèle de surexpression permettant une expression transitoire de *HOXB4* dans le même type de cellules n'ont toutefois pas été en mesure de confirmer ces résultats, indiquant que le niveau d'expression de *HOXB4* doit être optimal pour permettre une expansion efficace des CSH (Brun et al., 2003). Il a d'ailleurs été démontré que seules les populations fortement enrichies en progéniteurs et CSH étaient en mesure de répondre à de hauts niveaux d'expression de *HOXB4*. De plus faibles niveaux ont néanmoins différents effets sur des populations distinctes de cellules hématopoïétiques plus matures (Klump et al., 2005).

La surexpression de *HOXB4* peut aussi expandre les CSH *ex vivo*. La culture de cellules de moelle osseuse *in vitro* entraîne normalement la perte des CSH dans une période de 2 semaines. En revanche, les cellules surexprimant *HOXB4* montrent une expansion menant à une expansion nette de CSH de 40 fois durant la même période. Ces résultats ont été obtenus par des essais de CRU et il a aussi été montré par *Southern blot* que cette expansion était polyclonale. Lorsque transplantées, ces CSH ont été en mesure de reconstituer les compartiments lymphoïdes et myéloïdes des receveurs irradiés et ont démontré un potentiel de reconstitution *in vivo* supérieur aux CSH contrôles (Antonchuk et al., 2002).

L'effet sur les CSH que possède *HOXB4* en fait un bon candidat pour l'expansion *ex vivo* des CSH dans un but thérapeutique. Par contre, les premières études ayant démontré cette capacité ont utilisé des surexpressions rétrovirales, méthode nécessitant l'intégration du provirus au génome et allant à l'encontre d'une utilisation clinique chez l'humain. Différentes études ont donc évalué la capacité de la protéine soluble HOXB4 à expandre les CSH *ex vivo*. La protéine de fusion recombinante TAT-HOXB4 a été utilisée pour expandre des CSH

murines. Les CSH exposées à TAT-HOXB4 pendant une période de 4 jours ont ainsi subi une expansion menant à un nombre de 8 à 20 fois plus élevé que chez les cultures contrôles (J. Krosi et al., 2003a). Un modèle de cellules stromales capables de sécréter la protéine HOXB4 a aussi été utilisé sur des cellules humaines et a permis d'expandre des populations de cellules hématopoïétiques très primitives (Amsellem et al., 2003).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'expansion des CSH par *HOXB4* ne sont pas bien connus à ce jour. L'utilisation de mutants de *HOXB4* au niveau de l'homéodomaine, empêchant de ce fait la liaison du facteur de transcription à l'ADN, a permis de déterminer que la capacité d'expansion des CSH par *HOXB4* était dépendante de sa liaison à l'ADN (Beslu et al., 2004). Dans la même étude, il a aussi été montré que la fonction de *HOXB4* était non seulement indépendante de sa capacité à lier au cofacteur des gènes *HOX* *PBX*, mais que la mutation du domaine d'interaction à *PBX* conférait un avantage de prolifération important aux cellules de moelle osseuse transfectées par ce mutant *in vitro* (Beslu et al., 2004). La surexpression de *HOXB4* avec une séquence anti-sens de *PBX*, entraînant une régulation négative de son expression, a confirmé ces résultats en permettant une expansion très importante de 10 000 fois des CSH murines en deux semaines *in vitro* (Cellot et al., 2007; J. Krosi et al., 2003b). Ces résultats indiquent que la capacité d'expansion de *HOXB4* est limitée par son cofacteur *PBX*.

Une autre stratégie pour produire des CSH à des fins thérapeutiques réside dans la différenciation de cellules ES ou iPS en CSH. *HOXB4*, lorsque surexprimé dans des cellules ES murines, est en mesure d'augmenter la différenciation de ces cellules en cellules hématopoïétiques (Helgason et al., 1996). Cependant, peu d'études ont été en mesure de générer de véritables CSH à partir de cellules ES, particulièrement à partir de cellules ES humaines (Forrester & Jackson, 2012). Par contre, il a été montré que l'expression ectopique de *HOXB4* dans des progéniteurs hématopoïétiques dérivés soit de sacs vitellins ou de cellules ES murines, qui sont trop immatures pour reconstituer le système hématopoïétique d'un receveur irradié, leur conférait cette propriété. (Kyba et al., 2002)

Les CSH ayant subi une expansion suite à la surexpression de *HOXB4* sont fonctionnelles et capables de reconstituer un receveur irradié de façon normale et ce, sans mener à des anomalies hématologiques. Par contre, la surexpression de *HOXB4* modifie

légèrement les patrons de différenciation des CSH vers les différents types de cellules matures du sang. La surexpression de *HOXB4* augmente en effet le développement primitif des mégakaryocytes chez l'humain (Y. Zhong et al., 2010). Aussi, la surexpression de *HOXB4* augmente le nombre de progéniteurs de granulocytes-macrophages chez la souris (Miyake et al., 2006). Par contre, *HOXB4* n'est pas en mesure d'expandre les progéniteurs de cellules B, malgré le fait qu'il puisse agir sur les progéniteurs hématopoïétiques à l'origine de ces derniers (Haddad et al., 2008).

En plus des études sur les CSH humaines et murines, quelques groupes se sont penchés sur la capacité d'expansion de *HOXB4* chez d'autres espèces de mammifères. Il a ainsi été démontré que la surexpression de *HOXB4* dans les cellules CD34⁺ canines leur donnait un avantage de croissance supérieure à ce qui est observé dans le même type de cellules chez l'humain, la souris ou le babouin (X. B. Zhang et al., 2007). Un autre groupe a observé que *HOXB4* avait un effet plus important sur les CSH court terme que chez les CSH long terme en utilisant un modèle de macaque (X. B. Zhang et al., 2006). Ces groupes ont toutefois noté une haute incidence de développement tardif de leucémie chez ces modèles de grands mammifères (X. B. Zhang et al., 2008).

En dépit de la capacité d'*HOXB4* à expandre les CSH, la mutation du gène n'affecte que peu l'hématopoïèse chez la souris. En effet, des études effectuées sur des souris *Hoxb4*^{-/-} on montré une réduction subtile de la cellularité des organes hématopoïétiques ainsi qu'une réduction modérée de la capacité de prolifération des CSH de la BM et du foie fœtal sans toutefois affecter la différenciation vers les différentes lignées hématopoïétiques (Brun et al., 2004). *Hoxb4* n'est donc pas requis pour la génération des CSH ni pour leur maintien dans un contexte d'homéostasie.

1.6.3 Le gène *homéobox C4*

Même si le gène *HOXC4* n'a pas autant été étudié que son paralogue *HOXB4*, il joue un rôle similaire à ce dernier sur les CSH. En effet, la surexpression rétrovirale de *HOXC4* dans des cellules CD34⁺ humaines augmente le potentiel de prolifération de celles-ci et permet l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques primitifs *in vitro* (Daga et al., 2000). Aussi, la culture de cellules CD34⁺ humaines en présence de cellules stromales sécrétant la protéine

HOXC4 a permis d'expandre jusqu'à 6 fois les progéniteurs hématopoïétique *ex vivo*. La transplantation de ces cellules dans des souris humanisées a montré que leur capacité de reconstitution était significativement améliorée par rapport aux cellules contrôles (Auvray et al., 2012). De plus, le même groupe a observé que les mêmes gènes étaient régulés par HOXC4 et HOXB4, incluant des facteurs connus pour leur importance dans l'hématopoïèse, indiquant que les mêmes mécanismes moléculaires pourraient être utilisés par *HOXB4* et *HOXC4* pour permettre l'expansion des cellules hématopoïétiques primitives.

HOXC4 est aussi connu pour être le seul gène *HOX* du paralogue 4 à être exprimé dans les lymphocytes du sang périphérique. Il est aussi exprimé dans les cellules lymphoïdes activées, suggérant qu'il est impliqué dans la régulation de gènes contrôlant l'activation et la prolifération de ces cellules (Meazza et al., 1995). *HOXC4* induit d'ailleurs l'expression de la désaminase AID, protéine essentielle à la recombinaison, permettant le changement de classe des immunoglobulines ainsi que l'hyper-mutation somatique qui a lieu chez les lymphocytes B activés, en se liant directement au promoteur d'AID (S. R. Park et al., 2009).

1.6.4 Gènes cibles des gènes *HOX* du paralogue 4

La compréhension des mécanismes impliqués dans l'expansion des cellules hématopoïétiques primitives par les protéines HOX du paralogue 4 passe par l'identification des gènes cibles de ces facteurs de transcription. La majeure partie des gènes cibles identifiés à ce jour sont ceux de HOXB4. Par contre, les gènes *HOX* du paralogue 4 encodent des protéines hautement homologues, particulièrement au niveau de leur homéodomaine, de leur motif de liaison à PBX et de leur séquence N-terminale (Iacovino et al., 2009), ce qui implique que les gènes cibles de HOXB4 pourraient aussi être régulés par les autres gènes du paralogue.

Différentes études ont travaillé à identifier les gènes cibles de HOXB4 (Tableau 1). Le profil d'expression génique a d'abord été effectué sur des cellules LKS primaires murines et dans des cellules hématopoïétiques différenciées à partir de cellules ES et a permis d'identifier plus de 700 gènes dont l'expression était modulée par HOXB4. Parmi ces gènes, notons que plusieurs sont connus pour faire partie de voies de signalisation importantes, telles que les voies Notch et Wnt, pour être impliqués dans le cycle cellulaire, dans la réponse au FGF, au TNF- α et au TGF- β (Schiedlmeier et al., 2007). Cette étude a d'ailleurs confirmé par des

essais fonctionnels que *HOXB4* protégeait les CSH des effets négatifs du TNF- α et qu'il modulait la signalisation via le FGF.

Tableau 1 : Principaux gènes cibles des protéines HOX du paralogue 4 identifiés

Principaux gènes cibles	Modèle expérimental	Population cellulaire	Références
<i>Bambi, Cdkn1a, Cyclin G2, Dach1, Dll-1, Dll-3, Dusp6, Egr1, Foxo3a, Hey2, Jagged 2, Klf3, Mad, Ptgs2, Socs2, Socs6, Tle1, Tnfrsf1b, Trim27, Zfx</i>	Surexpression inductible de <i>HOXB4</i> Technologie Affimetrix 4 heures après l'arrêt de l'expression de <i>HOXB4</i>	Cellules LKS murines Cellules ES murines	(Schiedlmeier et al., 2007)
<i>CD34, Dntt, Gp49a, Hlf, Laptm4b, Meis1, Runx2</i>	Surexpression constitutive de <i>HOXB4</i> Technologie Affimetrix	Lignée cellulaire hématopoïétique primitive EML	(Lee et al., 2010)
<i>Cldn11, Ephx2, Hemgn, Mettl1, Ms4a4c, Pltp, Slc22a3, Thy1</i>	Surexpression inductible de <i>HOXB4</i> Technologie Affimetrix 6-12 heures après l'induction de l'expression de <i>HOXB4</i>	Cellules de BM négatives pour les marqueurs de lignées	(Jiang et al., 2010)
<i>AhR, Cebpa, Erg, Gata2, Gfi, Hemgn, Lmo2, Meis1, Nov, Pbx1, Runx1, Scl/Tal, Sox4</i>	Surexpression inductible de <i>HOXB4</i> Technologie Affimetrix 14 jours après l'induction de l'expression de <i>HOXB4</i>	CPH/CSH dérivés de cellules ES murines	(Oshima et al., 2011)
<i>CEBPB, EGR1, EZH2, GATA3, HOXA9, IKZF1, MEF2C, TRIM28, KLF10</i>	Co-culture avec cellules stromales produisant <i>HOXB4</i> ou <i>HOXC4</i> 24 heures de culture en présence de <i>HOXB4</i>	Cellules CD34+ humaines	(Auvray et al., 2012)
<i>Cited2, Gata2, Ezh1, Ezh2, Meis1, Mll2, Mll5, Pbx1, Rb1, Runx2, Sox2, Stat5, Zbtb16</i>	Surexpression constitutive de <i>HOXB4</i> Technologie Affimetrix 0-26 jours de différenciation de cellules ES	Stades de différenciation de cellules ES murines en cellules hématopoïétiques	(Fan et al., 2012)

Note : Les listes de gènes cibles présentées ne sont pas exhaustives

La lignée de progéniteurs hématopoïétiques primitifs KSL-EML a aussi été utilisée pour des essais de *microarray* et d'immunoprécipitation de la chromatine, menant à l'identification de 465 gènes différentiellement exprimés par les cellules surexprimant *HOXB4* (Lee et al., 2010). Parmi les gènes identifiés, plusieurs gènes spécifiques à la lignée érythroïde étaient régulés négativement par *HOXB4*.

Le groupe de Mitsujiro Osawa a montré dans des CSH/CPH dérivées de cellules ES que plusieurs gènes essentiels pour le développement des CSH étaient directement régulés par

HOXB4 (Tableau 1) et que l'expression de plusieurs autres gènes importants pour les CSH était affectée par sa surexpression (Oshima et al., 2011). En utilisant un modèle semblable de différenciation de cellules ES, une autre équipe a étudié les profils de régulation de HOXB4 à différents stades de différenciation. Ils ont montré que HOXB4 agissait comme régulateur en amont de plusieurs facteurs de transcription et d'enzymes de modification de la chromatine (Fan et al., 2012).

Le contexte cellulaire est extrêmement important pour identifier les gènes cibles impliqués dans une fonction donnée. Dans cet ordre d'idée, deux groupes ont utilisé des cellules primaires; dans un cas des cellules murines de moelle osseuse négatives pour les marqueurs de lignées; et dans l'autre, des cellules CD34⁺ humaines isolées à partir de sang de cordon, pour identifier des gènes cibles. Dans le premier cas, le groupe de Sorrentino a identifié par *microarray* 77 gènes différentiellement régulés après l'induction de la surexpression de *HOXB4*. Parmi eux, le gène *Hemgn* était régulé positivement de façon importante et des essais de surexpression ont permis de confirmer son implication dans l'expansion des cellules de moelle osseuse *in vitro* (Jiang et al., 2010). Finalement, une étude a utilisé un modèle de cellules stromales conçues pour sécréter les protéines HOXB4 ou HOXC4, ce qui a permis d'identifier plusieurs gènes régulés de la même façon par ces deux protéines HOX, particulièrement des facteurs clés de l'hématopoïèse impliqués dans l'expansion ou la détermination du destin cellulaire (Auvray et al., 2012).

Pour conclure, une étude a comparé directement l'effet des gènes *HOX* du paralogue 4 sur l'autorenouvellement, en utilisant des progéniteurs hématopoïétiques dérivés de cellules ES murines, et a permis de montrer que les 4 gènes étaient en mesure d'augmenter la prolifération et d'inhiber la différenciation, permettant ainsi l'expansion de progéniteurs hématopoïétiques non différenciés *in vitro* (Iacovino et al., 2009). Comme certains gènes sont connus pour être régulés de la même façon par plus d'une protéine du paralogue 4, les gènes *HOX* du paralogues 4 pourraient jouer un rôle similaire permettant l'expansion des CSH *in vitro*.

1.7 Rationnelle, hypothèse et méthodes

1.7.1 Rationnelle et hypothèse du projet de recherche

Le rôle des gènes *HOX* sur la formation, le maintien et la fonction des CSH est maintenant bien établi. Le gène *HOXB4* est d'ailleurs l'un des candidats les plus étudiés pour sa capacité à expandre les CSH murines et humaines *in vitro* et ce, sans mener au développement de leucémie chez la souris. Étant donné la grande redondance fonctionnelle qui existe au sein des gènes *HOX*, particulièrement ceux d'un même paralogue, les autres gènes du paralogues 4 pourraient être en mesure de réaliser une expansion similaire. Le gène *HOXC4* est d'ailleurs connu pour sa capacité à expandre les cellules CD34⁺ humaines. Le gène *Hoxa4*, quant à lui figure parmi les gènes les plus exprimés dans les fractions de cellules de foie fœtal enrichies en CSH au moment de leur principale expansion. Il est plus spécifiquement exprimé à des niveaux 10 fois plus élevés que *Hoxb4*. De plus, alors que les souris mutantes pour *Hoxb4* n'ont pas de phénotypes important au niveau des CSH, les CSH mutantes pour *Hoxa4* présentent des défauts de reconstitution en situation de compétition (non publié). Ces données indiquent donc que le gène *HOXA4*, pourrait jouer un rôle plus important que *HOXB4* dans l'autorenouvellement des CSH au niveau physiologique. L'hypothèse à l'origine du projet de recherche est donc que le gène *HOXA4* est capable d'expandre les CSH de façon plus importante que son paralogue, le gène *HOXB4*. L'évaluation de cette hypothèse permettra de comprendre davantage les mécanismes par lesquels les gènes *HOX* sont en mesure d'expandre les CSH et pourraient être utilisée pour élaborer des protocoles d'expansion de CSH dans une approche clinique.

1.7.2 Objectifs spécifiques du projet de recherche

Le premier objectif du projet de recherche est de déterminer si le gène *HOXA4*, est capable d'expandre les CSH et progéniteurs hématopoïétiques *in vitro*. Cet objectif est adressé dans l'article du chapitre 2 qui a utilisé des cultures de cellules de BM de souris en combinaison avec des essais de formation de colonies (CFC) et de reconstitution en situation de compétition (CRU) (Section 1.7.3).

Suite à cela, le second objectif est de comparer l'effet de *HOXA4* avec celui de *HOXB4* sur les cellules de BM et les progéniteurs hématopoïétiques *in vitro*, notamment par des

cultures de cellules de BM et des essais de CFC, ainsi que sur les CSH *in vivo*, en évaluant la contribution des CSH surexprimant ces gènes aux différents compartiments hématopoïétiques dans un modèle de chimères murines. Le troisième objectif est d'identifier des mécanismes d'action possibles des gènes HOX du paralogue 4 en évaluant l'expression de gènes cibles candidats par Q-RT-PCR dans des populations de CSH purifiées. Ces deux objectifs sont présentés dans l'article du chapitre 3.

Finalement, le dernier objectif de ce projet de recherche, abordé au chapitre 5, est de déterminer si *HOXB4* permet d'augmenter l'autorenouvellement des cellules souches leucémiques (CSL) ou d'influencer le développement de leucémies des cellules B dans un contexte de transplantation de CSH. Cet article utilise entre autres un modèle d'ALL de type pré-B murin (Section 1.7.4) en combinaison avec des lignées cellulaires humaines et murines.

1.7.3 Principales méthodes pour l'étude des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques utilisées dans le cadre de ce projet de recherche

L'étude du système hématopoïétique *in vitro* est compliquée par sa complexité et par l'incapacité jusqu'à ce jour de purifier efficacement les CSH. Alors que la cytométrie en flux permet de caractériser et de quantifier aisément les populations de cellules hématopoïétiques matures, les progéniteurs hématopoïétiques multipotents et les CSH doivent être caractérisés par leur potentiel de différenciation et l'évaluation de leur progéniture est nécessaire à leur identification.

L'essai CFC en milieu semi-solide, la méthylcellulose, permet de détecter et de quantifier les progéniteurs hématopoïétiques de façon rétrospective. Il consiste à mettre des cellules sanguines en culture à une faible concentration en méthylcellulose supplémentée en cytokines. Les progéniteurs présents dans la culture seront ainsi en mesure de former des colonies et la composition des colonies différera en fonction du type de progéniteur à son origine, les progéniteurs plus primitifs étant capables de générer des cellules de plusieurs types. L'essai CFC permet donc de caractériser les progéniteurs de granulocytes (CFC-G), de macrophages (CFC-M), de granulocytes-macrophages (CFC-GM), de granulocytes-érythrocytes-macrophages-mégakaryocytes (CFC-GEMM) et deux types de progéniteurs érythroïdes (CFC-E et BFU-E). Parmi ceux-ci, le CFC-GEMM est le progéniteur

hématopoïétique le plus primitif pouvant être observé *in vitro*. Il est également possible de modifier la composition des cytokines de cet essai pour détecter les progéniteurs de cellules B (CFC-B).

Contrairement aux progéniteurs hématopoïétiques, il est impossible de quantifier exactement les CSH par des méthodes *in vitro*. Pour évaluer la fréquence des CSH dans une population il est donc nécessaire d'utiliser une méthode *in vivo* permettant de confirmer leur propriété de pluripotence. L'essai CRU permet d'évaluer rétrospectivement la fréquence des CSH et comporte deux éléments clés : (1) l'utilisation de conditions de transplantation compétitives et (2) la transplantation de cellules en situation de dilution limite. Il est également essentiel de pouvoir distinguer les cellules tests des cellules compétitives. Dans ces conditions, il est possible de déterminer combien de receveurs par groupes ont été reconstitués aux niveaux lymphoïdes et myéloïdes à long terme après la transplantation et ainsi utiliser la statistique de Poisson pour déterminer la fréquence des CRU, qui correspondent aux CSH (Szilvassy et al., 1990).

1.7.4 Modèle murin de leucémie lymphoblastique aigüe *E2A-PBX1*

La leucémie peut être induite par des translocations chromosomiques qui affectent les mécanismes régulant l'hématopoïèse. C'est le cas de la translocation t(1 :19) qui est impliqué dans 25% des cas de ALL pédiatriques humaines de type pré-B (Carroll et al., 1984; D. L. Williams et al., 1984). Le résultat de cette translocation est la protéine de fusion E2A-PBX1, où 2 domaines de transactivation de la protéine E2A sont fusionnés à la portion C-terminale du cofacteur des gènes *HOX* PBX1. *E2A-PBX1* est donc un puissant oncogène capable de transformer plusieurs types cellulaires, notamment les fibroblastes, les cellules myéloïdes et lymphoïdes (Kamps & Baltimore, 1993; Kamps et al., 1991; Sykes & Kamps, 2004).

Dans l'article présenté au chapitre 4, un modèle murin d'ALL pré-B, phénotypiquement similaire à la maladie retrouvée chez l'humain a été utilisé. Ces souris transgéniques expriment l'oncogène *E2A-PBX1* sous un promoteur spécifique aux cellules lymphoïdes et sont gardées sur un fond génétique *CD3ε^{-/-}*, empêchant ainsi le développement de leucémie des cellules T. Elles développent donc spontanément des leucémies ALL pré-B après une période de latence d'environ 1 an (Bijl et al., 2005).

Chapitre 2 : Article 1

***HOXA4* induces expansion of hematopoietic stem cells *in vitro* and confers enhancement of Pro-B cells *in vivo*.**

L'article présenté dans ce chapitre montre l'effet de la surexpression du gène *HOXA4* sur les CSH et progéniteurs hématopoïétiques *in vivo* et *in vitro*. Pour cet article, j'ai effectué la grande majorité des expériences en plus de participer à l'écriture, la mise en forme et la correction.

Publié en janvier 2011 dans « Stem Cells and Development »

***HOXA4* Induces Expansion of Hematopoietic Stem Cells *in vitro*
and Confers Enhancement of Pro-B-cells *in vivo*.**

Marilaine Fournier¹, Charles-Étienne Lebert-Ghali¹, Gorazd Krosl¹, and Janet J Bijl^{1,2*}

¹Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (HMR), HMR, Montréal, H1T 2M4; ²Département of Médecine, Université de Montréal, H3C 3J7, Montréal

*Correspondence:

Dr. Janet Bijl, PhD.

Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415 boul. de l'Assomption, Montréal, QC, Canada H1T 2M4

Abstract

Members of the homeobox (*Hox*) gene family are known to mediate expansion of hematopoietic stem cells (HSC) and progenitors. The absence of oncogenic properties promoted *HOXB4* as prime candidate in the quest to expand HSCs for clinical purposes. Despite its potential to expand HSCs studies with mutant mice showed that *Hoxb4* is not essential for HSCs generation and function under physiological conditions. Expression studies and the existence of functional redundancy in particular between paralog *Hox* genes suggest that *HOXA4* might have potent properties to expand HSCs. Here we measured the ability of *HOXA4* to promote *ex vivo* expansion of HSCs and progenitors using retroviral mediated overexpression. Our results provide evidence that *HOXA4* transduced HSCs and primitive progenitors expand in culture conditions and demonstrate that the potential of expanded *HOXA4* HSCs to give rise to mature myeloid and lymphoid progeny in normal proportions remained intact. Interestingly, constitutive overexpression of *HOXA4* resulted in an unbalanced expansion of lymphoid/myeloid progenitors in bone marrow (BM) chimeras favourable to B cell progenitors responsive to interleukin-7. This expansion was specific for these progenitors and not for the more primitive Whitlock-Witte-initiating-cells. These data indicate that early stages of B cell development associated with proliferation are in particular sensitive to *HOXA4*. Thus this study supports the potential use of *HOXA4* to expand both HSCs and B cell progenitor populations for therapeutic strategies.

Introduction

Homeobox (*Hox*) transcription factors initially identified as fate determinants of embryonic development have also emerged as important regulatory genes in early stages of hematopoiesis [1, 2]. Expression of multiple *Hox* genes in primitive hematopoietic stem cells (HSC) enriched populations of hematopoiesis progressively diminishes to undetectable levels in mature cells [3, 4]. Based on these observations it has been suggested that the *Hox* pathway plays a decisive role in HSC self-renewal, controlling the nature of their divisions by determining the fate of daughter cells into identical parental cells and/or into differentiated progenitors. Indeed, modulation of expression levels of several *Hox* genes in mouse models have been shown to interfere with hematopoietic proliferation and differentiation programs, including lineage commitment and self-renewal, resulting frequently in leukemia [5-10]. *HOXB4* appeared unique, so far, in its ability to promote the self-renewal properties of both mouse and human HSCs under *in vivo* and *in vitro* conditions, resulting in the expansion of HSCs, without oncogenic transformation [5, 11-13]. This capacity of HSC expansion was not mediated through HOX/PBX1 complexes as downregulation of PBX1 expression using retroviral *PBX1* antisense expression led to even elevated expansions of HSCs [14]. Despite the increased self-renewal capacity of HSCs overexpressing *HOXB4*, apparent post-transplantation and in culture, the absence of hematopoietic perturbations in two different *Hoxb4* knockout mouse models indicates that generation of the HSCs population and the maintenance of its size under homeostatic conditions is completely independent of *Hoxb4* [15, 16].

Redundancy within the *Hox* network for controlling developmental programs in the embryo that emerged from studies with compound mutants [17, 18] might also apply to their regulatory functions in hematopoiesis, as shown by lack of strong hematopoietic phenotypes in single *Hox* gene mutants. Surveys of *Hox* gene expression in HSC enriched populations by us and others showed dominancy of the *Hoxa* cluster genes in primitive hematopoiesis [4, 15, 19, 20]. Quantitative-reverse transcription (Q-RT)-PCR analysis showed one log higher expression levels for *Hoxa4* than *Hoxb4* in d14.5 fetal liver populations enriched for HSCs. The fact that during this phase of development HSCs undergo their major expansion [21] suggests that *Hoxa4* might be an important determinant of HSC self-renewal expansion

divisions under physiological conditions. In addition, adult long-term (LT)-HSCs still expressed *Hoxa4* at superior levels compared to *Hoxb4* although with reduced magnitude [22]. In this respect it is interesting to note that although adult LT-HSCs are also subjected to self-renewal, the nature of their divisions is asymmetric giving rise to only one HSC post-mitosis instead of two for fetal HSCs and serves to maintain the HSC population throughout the life-span of the organism. The high expression levels of *Hoxa4* in HSCs combined with the high homology and functional redundancy found within *Hox* paralog groups [17, 23, 24] suggests not only that *Hoxa4* might have the ability to expand HSCs, but also that the oncogenic potential of *Hoxa4* could be negligible or absent. A publication by Iacovina et al. showing an increase in hematopoietic progenitors from *HOXA4* overexpressing ES cells further support the potential capacity of *HOXA4* to expand HSCs [25]. Moreover, some studies attributed to *HOXA4* a role as potential tumor suppressor rather than as oncogene, which was based on the observation that the *HOXA4* promoter was frequently hypermethylated in acute myeloid leukemia samples and that resultant low *HOXA4* expression in particular combined with high *Meis1* expression was found to be an adverse prognostic marker [26, 27]. Since the expansion of human severe combined immunodeficiency (SCID) repopulating cells (SRC) followed by transplantation induced by *HOXB4* was rather moderate [12] to the HSC expansion observed in mice [5] there is a need to find other genes inducing larger regeneration of HSCs. For this reason we examined *Hox* candidate *HOXA4* for its capacity to expand HSCs *in vitro*.

Using retroviral overexpression we showed that *HOXA4* overexpressing HSCs expanded 6.6-fold during a week culture. In addition *HOXA4* induced massive proliferation of myeloid progenitors with relative higher impact on the very primitive progenitors. *HOXA4* HSCs produced mature myeloid and lymphoid progeny without bias in irradiated recipient mice and thus is not interfering with hematopoietic differentiation. Furthermore, we provide evidence that *in vivo* *HOXA4* is preferentially expanding interleukin (IL)-7 responding B cell progenitors above myeloid progenitors. These data show that regulatory mechanisms controlling hematopoiesis within its natural context are still intact in the presence of *HOXA4*, allowing largest expansions in populations that are most permissive to proliferation.

Material and methods

Animals

For transplantation assays congenic mice C57BL/6 (CD45.2) and B6SJL (CD45.1) (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) were used. Mice were bred and maintained in a specific pathogen free animal facility of the HMR Research Center. All mouse experiments protocols were approved by the Animal Care Committee of the HMR Research Center.

Retroviral constructions

Human HOXA4 cDNA (NM_002141.3) was purchased from OriGene Technologies (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD). To allow detection of the retrovirally overexpressed protein a FLAG (DYKDDDDK) sequence was added C-terminal of HOXA4 together with EcoRI (GAATTC) sequences by PCR using KlenTaq LA DNA Polymerase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). The amplicon was digested by EcoRI (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) and inserted in the MSCV-pgk-GFP retroviral vector.

Retroviral overexpression and in vitro expansion

B6SJL (CD45.1) mice were intravenously injected with 150 mg/kg of 5-fluorouracil (5-FU, Mayne Pharma (Canada) Inc., Montréal, QC) to recruit HSCs into cell cycle. After four days bone marrow (BM) cells were isolated from these mice and co-cultured for two days on irradiated confluent layers of packaging cell line (GP+E-86) stably producing MSCV-HOXA4-GFP or MSCV-GFP retrovirus [28] in Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM, Wisent Inc., St-Bruno, QC) supplemented with 15% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories Inc., Etobicoke, ON), 6 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 100 ng/ml stem cell factor (SCF), 10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ), 50 µg/ml Gentamycin (Wisent), 10 µg/ml Ciprofloxacin (Wisent) and 6 ng/ml polybrene (Tekniscience Inc., Terrebonne, QC). *HOXA4*-GFP or MSCV-GFP transduced BM cells were sorted on a FACS Vantage with DiVa software (BD Bioscience, Mississauga, ON) and seeded at different doses in duplicate in BM expansion medium

(DMEM, 15% FBS, 6 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 100 ng/ml SCF, 10^{-5} M 2-mercaptoethanol and 10 μ g/ml Ciprofloxacin (Wisent).

Clonogenic progenitor assays

Clonogenic progenitor assays for myeloid progenitors were performed by plating cells from *HOXA4* and control transduced BM cultures or from long-term repopulated chimeras in DMEM containing 1% Methocel MC (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS, 5.7% bovine serum albumin (BSA, Tekniscience), 10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 5 U/ml erythropoietin, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 50 ng/ml SCF, 2 mM glutamine (Invitrogen), and 200 mg/ml transferrin (Sigma-Aldrich). Clonogenic progenitor assays for B cell progenitors were performed by plating cells from BM isolated from *HOXA4* or control chimeras in DMEM containing 1% Methocel MC supplemented with 30% FBS selected for B cells (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC), 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 2 mM glutamine and 10 ng/ml IL-7 (Invitrogen). Colonies were scored as previously described [29]. For serial re-plating experiments individual GFP⁺ Granulocytic/Erythrocytic/Monocytic/Megakaryocytic (GEMM) colonies were harvested after seven days, dispensed and further grown in 1 ml of methylcellulose medium supporting myeloid progenitors.

Transplantation assays

Competitive repopulation unit (CRU) assays were performed by transplanting *HOXA4*-GFP or GFP transduced 5-FU BM cells derived from B6SJL (CD45.1) mice intravenously in lethally irradiated (800 cGy) C57Bl/6 (CD45.2) congenic mice at limiting dilution in competition with 2×10^5 total BM cells derived from a healthy C57Bl/6 (CD45.2) mouse. Peripheral blood (PB) repopulation was monitored every 4 weeks by flow cytometry for the presence of GFP⁺ cells. Twenty weeks post-transplantation, mice were sacrificed and analysed by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) for the contribution of GFP⁺ cells to the myeloid, lymphoid and erythroid lineages, using following conjugated antibodies: CD4-PE, CD8a-APC, CD45.1-PE, CD45.2-biotin, Ly-6G(Gr-1)-biotin, CD3e-Biotin, TER119-biotin CD45R/B220-PE, CD11b(MAC-1)-PE, CD45R/B220-APC and

CD45.2-Pacific Blue (BioLegend, San Diego, CA). Biotinylated antibodies were stained with APC, APC/Cy7 or PerCP-Cy5.5 conjugated streptavidin (BioLegend or BD Pharmingen, Mississauga, ON). FACS data were analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR). Mice with $\geq 1\%$ of GFP⁺ cells contributing to both myeloid and lymphoid (B and T cells) lineages were considered reconstituted. HSC frequencies were calculated using Poisson statistics [30].

Clonal analysis by southern blotting

Genomic DNA was isolated from BM, spleen and thymus cells derived from *HOXA4* or GFP chimeras using DNAzol (Invitrogen), digested with BglII or EcoRI (New England Biolabs, Pickering, ON) and analyzed by Southern blotting using a probe against the GFP gene.

Western blot analysis

Cells were lysed in cell lysis buffer [2.5 mM Tris, 50 μ M EDTA, 0.00001% NP-40 and 0,835 mM KCL (Mallinckrodt Baker)]. Proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Membranes were incubated with a polyclonal anti-Flag antibody (1:1000 dilution, Sigma-Aldrich) followed by a secondary polyclonal anti-rabbit antibody coupled with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Westgrove, PA).

Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from total GFP⁺ BM of *HOXA4* and control chimeras using Trizol reagent (Invitrogen) and DNase-I-treated (Invitrogen). cDNA was prepared from 5 μ g total RNA using MMLV-RT (Invitrogen) and random primers (Invitrogen) according to the manufacturer's protocols. Q-PCR was carried out using SYBR Green (Applied Biosystems, Streetville, ON) and thermal cycler ABI 7500 (Applied Biosystems). Oligonucleotides for all

Hox genes were used according to previously validated sequences [31]. Triplicates were accepted in a 0.5 CT range.

Results

HOXA4 bone marrow cultures

To evaluate the effect of *HOXA4* on the growth of primitive hematopoietic cells in response to cytokines, a series of BM cultures were performed with BM cells overexpressing *HOXA4*-GFP or GFP only. Generation of these cells was achieved by stable transfection of BM cells derived from 5-FU treated wild type mice (CD45.1) with either MSCV-*HOXA4*-FLAG-pgk-GFP or control MSCV-pgk-GFP bi-cistronic retroviral vectors (Figure 1A and B). The expression of *HOXA4* in those cells was confirmed by western blot analysis (Figure 1D). GFP⁺ cells were sorted and seeded in duplicate at 50 000 or 100 000 cells in BM expansion medium and cultured for 3 weeks (Figure 1B). At the initial phase of the culture period the numbers of cells in both *HOXA4* and control cultures increased at similar rate (Figure 1C and Supplemental Figure 1). Beyond day 7 the expansion of *HOXA4* BM cultures was consistently larger than the control cultures throughout all the experiments (n=5). Over the 21 days of culturing, fold differences in absolute numbers of cells between *HOXA4* and control cultures of up to 100 times have been observed. As growth of cells is defined by an exponential equation, variations in culture conditions and length of recovery period after sorting resulted in differences of values for absolute cell numbers between different experiments, and therefore cannot be pooled. However, intra-experimental variations between duplicate cultures were consistently less than one division. For that reason the number of divisions that *HOXA4* BM cells underwent to reach end-values at day 21 were calculated and compared with those for control BM cells within each independent experiment. *HOXA4* BM cells underwent at average 4.5 ± 1.9 more cell divisions than control BM cells (Supplemental Table 1). In addition, doubling times for both BM cultures, calculated based on trend line analysis, were significantly shorter for *HOXA4* than for control (29.4 ± 3.4 hrs vs 41.3 ± 6.2 hrs, respectively, $p < 0.01$, Figure 1E). No significant number of apoptotic cells was observed in both cultures, using Annexin V analysis (data not shown),

suggesting that either the proliferation rate in *HOXA4* BM cultures was enhanced or a larger proportion of cells are in cycle. Thus, *HOXA4* has an overall enhanced effect on the proliferation of BM cells.

HOXA4 overexpression in myeloid progenitors

BM cells in culture undergo a massive proliferation and differentiation in response to growth factors leading to exhaustion of the culture over time. The enhanced growth of *HOXA4* BM cultures was apparent only after seven days, suggesting that *HOXA4* might act on primitive progenitors. Weekly performed colony forming cell assays (CFC) showed an increase in absolute number of myeloid progenitors over the initial values with the progression of both *HOXA4* and control cultures (Figure 2A). The expansion of the *HOXA4* progenitor population was significantly larger than control in all experiments (n=4), reaching maximum fold expansions of more than one million versus thirty thousand, respectively, after 3 weeks of culture. Analysis of differential counts showed that in particular numbers of multi-potent progenitors (Granulocytic/Monocytic (GM)-CFC and GEMM-CFC) were higher in *HOXA4* than in control cultures (Figure 2B and C). While 39 times more GM-CFC progenitors were measured in *HOXA4* than in control cultures, GEMM-CFC progenitors were not detected after seven days in control cultures, contrarily to the increase of these progenitors in *HOXA4* cultures. Since GEMM-CFCs are representative for the presence of multi-potent primitive hematopoietic cells, the self-renewal potential of these progenitors was evaluated by serial re-plating of GEMM colonies. Close to 100% efficiency in colony formation was observed for *HOXA4* after each re-plating, compared to 50% for control GEMMs (Supplemental Table 2). *HOXA4* GEMM colonies gave rise to secondary and tertiary GEMMs, while no GEMMs were detected among secondary colonies of controls preventing further re-plating (Figure 2D). In addition, *HOXA4* GEMM colonies generated significantly more colonies after the first plating than controls (32.5 ± 17.9 vs 2.5 ± 3.5 ; *HOXA4*: n=10; control: n=2, $p < 0.0005$), but this number decreased with each re-plating (Figure 2E). Thus enhanced growth of *HOXA4* BM cultures is supported by larger expansions of the progenitor populations, especially the most primitive. Moreover, re-generation of GEMM colonies after serial re-plating suggests self-renewal activity of *HOXA4* expressing primitive progenitors *in vitro*.

Evaluation of *HOXA4* HSC expansion *in vitro*

To examine whether *HOXA4* HSCs underwent self-renewal divisions *in vitro*, CRU assays were performed on *HOXA4* and control BM cultures at day 0 (after co-culture on retroviral producers) and at day 7 (Figure 1B). *HOXA4* and control cell mixtures used to initiate BM cultures had comparable frequencies of HSCs (1:1013 and 1:1571, respectively, Figure 3A); meaning that ~50 and ~30 HSCs were present in *HOXA4* and control cultures. After seven days of culturing the frequency of *HOXA4* HSCs was significantly higher than control HSCs (1: 28 775 and 1: 4 822 616, respectively), resulting in a 6.6-fold net increase of *HOXA4* HSCs and a 10.0-fold net loss of control HSCs (Figure 3B). The level of chimerism in the periphery of long-term repopulated recipient mice transplanted with HSC doses superior than 10 from T0 cultures is comparable between *HOXA4* and control (Supplemental Figure 2A). Interestingly, transplantation of less than 10 HSCs resulted in higher progeny contribution in repopulation derived from *HOXA4* HSCs than from control HSCs, indicating that *HOXA4* HSCs have an increased proliferation/differentiation potential. Therefore, the mean activity of stem cell (MAS) was calculated as the engraftment per HSC in recipient mice that received less than 10 HSCs. The MAS of *HOXA4* HSCs in T0 cultures was 2.3-fold superior to control HSCs (10.37 ± 4.77 vs 4.50 ± 3.76 ; Supplemental Table 3). Expanded *HOXA4* HSCs showed reduction at high doses, but similar levels of chimerism as non-expanded HSCs for the low doses (compare dose 0.5, T0 with equivalent dose 0.3 T7 of Supplemental Figure 2B). Overall the calculated MAS value for expanded *HOXA4* HSCs at T7 was slightly, but not significantly decreased compared to *HOXA4* HSCs of T0 (Supplemental Table 3). Levels were reduced in mice that received grafts containing more than two HSCs. The measured expansion of *HOXA4* HSCs in culture is only relevant to *in vivo* HSC populations when multiple HSC clones are involved and not when it is due to proliferation of a single clone. Southern blot analysis on genomic DNA from long-term (>20 weeks) repopulated primary *HOXA4* BM chimeras transplanted at day 0 showed the presence of multiple HSC clones at initiation of the BM culture that were transplanted in different mice (Figure 3C, mice #191, 192 and 200). The contribution of the same clones to the repopulation of BM, spleen and thymus (eg. Clone a and b in mouse #191, Figure 3C) enforces their HSC origin, although progeny composition by different clones may vary per

organ (eg. Clone f, #200, is relatively more present in spleen and thymus than in the BM). Multiple HSC clones were also detected in mice that received cells from *HOXA4* BM cultures at day 7 (mice #238, 245 and 250), indicating a polyclonal expansion of *HOXA4* HSCs *in vitro*. Detection of identical clones in recipients of both T0 and T7 cultures (clone c and d, mouse #192 and 250) indicates that the HSC underwent a self-renewal division during the co-culturing on retroviral producers. These data show that constitutive *HOXA4* overexpression results in a polyclonal expansion of HSCs in culture, which retain a strong proliferation/differentiation potential.

Evaluation of *HOXA4* HSC progeny *in vivo*

FACS analysis using antibodies against surface markers specific for B cell, T cells, myeloid and erythroid cells in combination with GFP fluorescence confirmed the contribution of *HOXA4* HSCs to all lineages in hematopoietic organs of long-term repopulated recipients (>20 weeks) (Figure 3D). To test whether the constitutive overexpression of *HOXA4* introduced a bias in lineage differentiation, BM chimeras of well reconstituted mice were monitored for repopulation of lymphoid and myeloid cells in their PB. FACS analysis showed that population sizes of *HOXA4* B, T and myeloid cells were comparable to control both at short-term (4 weeks) and long-term (20 weeks) post-transplantation (Figure 4A). In addition, no significant changes in the proportions of myeloid and lymphoid cells were found in hematopoietic organs of long-term (> 20 weeks) repopulated *HOXA4* and control chimeras, although myeloid populations tend to be higher in the BM (Supplemental Table 4). The increase in myeloid cells led to a significant reduction of erythroid cells, likely through space restraints due to the rigid BM niche. To measure whether *HOXA4* overexpression affects the number of myeloid progenitors *in vivo* as observed *in vitro* CFC assays were performed on BM and spleen derived from long-term repopulated (>20 weeks) chimeras. Interestingly, myeloid progenitor population was 2.0-fold enhanced in BM and 17.9-fold in spleen derived from *HOXA4* compared to control chimeras (Figure 4B and C). Differential analysis of colonies showed that except for macrophage colonies (M-CFC) all progenitor populations were significantly enlarged in BM of *HOXA4* chimeras (Supplemental Figure 3A). Similar to results from the BM cultures the largest increase was observed for the GEMM progenitors

(20X, $P < 0.05$). Interestingly, evaluation of the B cell compartment in these chimeras by CFC assays showed that *HOXA4* BM had 10.2-fold more B cell progenitors than control (Figure 4D), and that these *HOXA4* B cell colonies were significantly larger (Supplemental Table 5). Determination of more primitive B cell progenitors in BM fractions of *HOXA4* and control chimeras by Whitlock-Witte-initiating-cell (WW-IC) cultures showed significantly higher numbers of short to medium-term B cell progenitors in the presence of *HOXA4*, but no difference in long-term WW-IC numbers (Supplemental Figure 3B). Thus the presence of more primitive WW-IC B cell progenitors at normal frequencies together with an augmentation of clonogenic B cell progenitors suggest that only B cells in specific differentiation stages, likely those associated with proliferation, are permissive to *HOXA4* induced expansion. Importantly, despite the bias in myeloid versus lymphoid progenitor's expansion, *HOXA4* HSCs repopulate recipients with normal distribution of mature hematopoietic cells, indicating that interactions of *HOXA4* BM cells with their environment are intact.

Expression of cluster and paralog family Hox genes in *HOXA4* hematopoietic cells

Cross- and auto-regulation is very common for *Hox* genes [32-34]. To determine whether the observed phenotype in *HOXA4* BM chimeras was due to *HOXA4* and not mediated through indirectly activation of other Hox genes we measured the expression of neighbouring *Hoxa* genes and paralog group 4 genes in GFP⁺ cells derived from total BM of *HOXA4* and control chimeras. Q-RT-PCR showed a tendency for *Hoxa* genes in direct vicinity (*Hoxa2*, *-a3*, *-a5*, *-a6*) as well as for *Hoxb4* to be higher expressed, but did not reach significance (Supplemental Table 6). Thus the enhancement of B cell and myeloid progenitors as well as the *in vivo* expansion of HSCs is likely to be a direct effect of *HOXA4* overexpression.

Discussion

Results presented in this paper demonstrate for the first time that the overexpression of *HOXA4* increases the self-renewal activity of HSCs and myeloid progenitors *in vitro*. These in culture expanded *HOXA4* HSCs remained functionally intact as individual clones and contributed to the generation of terminal differentiated lymphoid and myeloid cells upon adoptive transfer into recipient mice. *HOXA4* HSCs generated balanced myeloid and lymphoid populations in chimeras supporting the ability of *ex vivo* *HOXA4* transduced HSCs to respond normally to physiological signals upon return in their natural microenvironment. Our data also show that the *HOXA4* induced expansion is highest in primitive multi-potent myeloid progenitors and decreases with maturation of progenitors. These findings indicate not only that multi-potent myeloid progenitor with highest proliferation/differentiation potential, naturally expressing higher *Hox* genes levels than uni-potent progenitors [3, 22], are more permissive to elevated *HOXA4* gene levels, but also that *HOXA4* does not interfere with normal regulatory mechanisms restricting the response to *HOXA4* in mature cells. Interestingly, in contrast to the myeloid lineage, more mature clonogenic B cell progenitors responded with larger expansion to *HOXA4* than their precursors, the WW-ICs.

Furthermore, chimerism level evaluation in PB showed that proliferation/differentiation potential of single *HOXA4* HSCs is superior to control HSCs (Supplemental Figure 1), and is maintained after *ex vivo* expansion. The capacity of *HOXA4* HSCs to expand *in vivo* following transplantation in myeloablated mice, contrary to control HSCs (data not shown) is likely to contribute to higher chimerism levels at low doses of transplanted HSCs. Although the level of engraftment of single *HOXA4* HSCs to the periphery remained to be intact after *in vitro* expansion it is not clear why engraftment levels by higher doses of expanded HSCs appeared to be reduced compared to equivalent doses of *HOXA4* HSCs from T0. Others have previously claimed that engraftment by *HOXB4* HSCs decreases with prolongation of the culture time, but these studies did not take in account the decrease in frequency of HSCs due to stronger growth of total BM cultures [35].

The presence of several HSC clones contributing to recipients of T7 cultures showed a polyclonal expansion of HSCs without selective advantage that could cause a risk for leukemia development. In that respect, only few *HOXA4* positive leukemias of either T -cell or

myeloid phenotype have been observed (5 out of 69 mice) that developed only after a long latency (5-6 months, data not shown), suggesting that *HOXA4* might have some weak oncogenic activity or could function as oncogenic collaborator. In line with these results some oncogenic activity has been attributed to *HOXB4* in a large animal model [36] and mouse studies reported collaboration of *HOXB4* with *Meis1* and *E2A-PBX1* in myeloid and lymphoid leukemia [37, 38], respectively. Thus it would not be surprising that *HOXA4* has similar properties. However, we cannot exclude that leukemias were caused by retroviral integrations near oncogenes and its subsequent activation.

The amplitude of HSC expansion by *HOXA4* during 7 days of culturing appeared to be in the same range as found for *HOXB4* [11], indicating that these genes are likely to activate a similar pathway leading to self-renewal of HSCs. Minor increase in expression levels of some *Hoxa* genes and *Hoxb4* confirmed that the expansion of HSCs and progenitors overexpressing *HOXA4* was not mediated through *Hoxb4* or other *Hoxa* genes.

The specific expansion of IL-7 responsive pro-B cell clonogenic progenitors by *HOXA4 in vivo* is unique for *Hox* genes, so far. *HOXB4* chimeras are known to have increased myeloid and B cell clonogenic progenitors as well [5], but similar magnitude of expansion for both cell types suggests that this expansion is the result of increased numbers of common myeloid/lymphoid precursors and not through its direct effect on B cell progenitors. Similarly, studies with human *HOXB4* transduced CD34⁺ stem cells and progenitors showed that CD19/CD10 B cells did not respond to constitutive *HOXB4* expression, but enhanced B cell progeny could be obtained from lympho/myeloid CD34⁺ cultures [39]. In addition, modulation of other *Hox* genes in BM cells in knock-out and retroviral overexpression mouse is often associated with B cell deficiencies rather than with an increase in B cell populations [6, 40]. In this respect *Hoxa9* expression has been shown to be inversely related with early B cell factor, a gene crucial for B cell development [41]. Thus our results show for the first time a *Hox* gene specifically acting on IL-7 responsive B cell progenitors. Since re-generation of the B cell compartment in patients with lymphomas, who underwent BM transplantation, is very slow [42, 43], a B cell complementation therapy might dramatically reduce infection related post-transplantation complications. Thus re-generation of B cells using *HOXA4* could have an important impact on infectious complications in the clinic.

Based on the clear expansion of HSC *in vitro* with *HOXA4* we predict that human CD34⁺ hematopoietic cells are likely to expand as well when overexpressing *HOXA4*, as has been reported for *HOXB* [12, 44]. However, regarding the observed differences between human SRC and mouse HSCs in response to *HOXB4* overexpression [5, 12] it is of interest to further investigate the capacity of *HOXA4* to expand human HSCs as well as B cell progenitors. In conclusion, our results put forward *HOXA4* as a new promising candidate for therapeutic expansion of HSCs and B cell progenitors.

Acknowledgments

We want to thank Martine Dupuis and Nathalie Henley from the HMR flow cytometry platform for cell sorting and assistance in FACS analysis. Felix Jules is thanked for generating the Western blot. We also thank the staff of the animal care facility for taking care of the animals.

Disclosure of potential conflict of interest

The authors indicate no potential conflict of interest.

Reference list

1. McGonigle GJ, TR Lappin and A Thompson. (2008). Grappling with the HOX network in hematopoiesis and leukemia. *Front Biosci* 13:4297-4308.
2. Argiropoulos B, RK Humphries. (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 2647:6766-6776.
3. Sauvageau G, PM Lansdorp, CJ Eaves, DE Hogge, WH Dragowska, DS Reid, C Largman, HJ Lawrence and RK Humphries. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9125:12223-12227.
4. Pineault N, CD Helgason, HJ Lawrence and RK Humphries. (2002). Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol* 301:49-57.
5. Sauvageau G, U Thorsteinsdottir, CJ Eaves, HJ Lawrence, C Largman, PM Lansdorp and RK Humphries. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 914:1753-1765.
6. Sauvageau G, U Thorsteinsdottir, MR Hough, P Hugo, HJ Lawrence, C Largman and RK Humphries. (1997). Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* 61:13-22.
7. Thorsteinsdottir U, A Mamo, E Kroon, L Jerome, J Bijl, HJ Lawrence, K Humphries and G Sauvageau. (2002). Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 991:121-129.
8. Thorsteinsdottir U, G Sauvageau, MR Hough, W Dragowska, PM Lansdorp, HJ Lawrence, C Largman and RK Humphries. (1997). Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 171:495-505.

9. Magnusson M, AC Brun, N Miyake, J Larsson, M Ehinger, JM Bjornsson, A Wutz, M Sigvardsson and S Karlsson. (2007). HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood* 109:3687-3696.
10. Fischbach NA, S Rozenfeld, W Shen, S Fong, D Chrobak, D Ginzinger, SC Kogan, A Radhakrishnan, MM Le Beau, C Largman and HJ 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* 105:1456-1466.
11. Antonchuk J, G Sauvageau and RK Humphries. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 109:39-45.
12. Buske C, M Feuring-Buske, C Abramovich, K Spiekermann, CJ Eaves, L Coulombel, G Sauvageau, DE Hogge and RK Humphries. (2002). Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood* 100:862-868.
13. Krosl J, P Austin, N Beslu, E Kroon, RK Humphries and G Sauvageau. (2003). In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med* 9:1428-1432.
14. Krosl J, N Beslu, N Mayotte, RK 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* 18:561-571.
15. Bijl J, A Thompson, R Ramirez-Solis, J Krosl, DG Grier, HJ Lawrence and G Sauvageau. (2006). Analysis of HSC activity and compensatory Hox gene expression profile in Hoxb cluster mutant fetal liver cells. *Blood* 108:116-122.
16. Brun AC, JM 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* 103:4126-4133.

17. Horan GS, R Ramirez-Solis, MS Featherstone, DJ Wolgemuth, A Bradley and RR 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* 913:1667-1677.
18. Condie BG, MR Capecchi. (1994). Mice with targeted disruptions in the paralogous genes *hoxa-3* and *hoxd-3* reveal synergistic interactions. *Nature* 3706487:304-307.
19. Ivanova NB, JT Dimos, C Schaniel, JA Hackney, KA Moore and IR Lemischka. (2002). A stem cell molecular signature. *Science* 2985593:601-604.
20. 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* 1012:383-389.
21. Mikkola HK, SH Orkin. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 13319:3733-3744.
22. Lebert-Ghali CE, M Fournier, GJ Dickson, A Thompson, G Sauvageau and JJ Bijl. (2010). *HoxA* cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* 3811:1074-1086.
23. Greer JM, J Puetz, KR Thomas and MR Capecchi. (2000). Maintenance of functional equivalence during paralogous *Hox* gene evolution. *Nature* 4036770:661-665.
24. Holland PW, J Garcia-Fernandez. (1996). *Hox* genes and chordate evolution. *Dev Biol* 1732:382-395.
25. 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* 185:783-792.

26. Stratthdee G, A Sim, A Parker, D Oscier and R Brown. (2006). Promoter hypermethylation silences expression of the HoxA4 gene and correlates with IgVh mutational status in CLL. *Leukemia* 207:1326-1329.
27. Zangenberg M, L Grubach, A Aggerholm, T Silkjaer, C Juhl-Christensen, CG Nyvold, E Kjeldsen, HB Ommen and P Hokland. (2009). The combined expression of HOXA4 and MEIS1 is an independent prognostic factor in patients with AML. *Eur J Haematol* 835:439-448.
28. Markowitz D, C Hesdorffer, M Ward, S Goff and A Bank. (1990). Retroviral gene transfer using safe and efficient packaging cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 612:407-414.
29. Humphries RK, AC Eaves and CJ Eaves. (1981). Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 786:3629-3633.
30. Szilvassy SJ, RK Humphries, PM Lansdorp, AC Eaves and CJ Eaves. (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 8722:8736-8740.
31. Thompson A, MF Quinn, D Grimwade, CM O'Neill, MR Ahmed, S Grimes, MF McMullin, F Cotter and TR Lappin. (2003). Global down-regulation of HOX gene expression in PML-RARalpha + acute promyelocytic leukemia identified by small-array real-time PCR. *Blood* 1014:1558-1565.
32. Sharpe J, S Nonchev, A Gould, J Whiting and R Krumlauf. (1998). Selectivity, sharing and competitive interactions in the regulation of Hoxb genes. *EMBO J* 176:1788-1798.
33. Gould A, A Morrison, G Sproat, RA White and R Krumlauf. (1997). Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes Dev* 117:900-913.
34. Packer AI, DA Crotty, VA Elwell and DJ Wolgemuth. (1998). Expression of the murine Hoxa4 gene requires both autoregulation and a conserved retinoic acid response element. *Development* 12511:1991-1998.

35. Schmittwolf C, M Porsch, A Greiner, A Avots and AM Muller. (2005). HOXB4 confers a constant rate of in vitro proliferation to transduced bone marrow cells. *Oncogene* 244:561-572.
36. Zhang XB, BC Beard, GD Trobridge, BL Wood, GE Sale, R Sud, RK Humphries and HP Kiem. (2008). High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector. *J Clin Invest* 1184:1502-1510.
37. Pineault N, C Abramovich, H Ohta and RK Humphries. (2004). Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol* 245:1907-1917.
38. Bijl J, J Kros, CE Lebert-Ghali, J Vacher, N Mayotte and G Sauvageau. (2008). Evidence for Hox and E2A-PBX1 collaboration in mouse T-cell leukemia. *Oncogene* .
39. Haddad R, F Pflumio, I Vigon, G Visentin, C Auvray, S Fichelson and S Amsellem. (2008). The HOXB4 homeoprotein differentially promotes ex vivo expansion of early human lymphoid progenitors. *Stem Cells* 262:312-322.
40. Lawrence HJ, CD Helgason, G Sauvageau, S Fong, DJ Izon, RK Humphries and C Largman. (1997). Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* 896:1922-1930.
41. Gwin K, E Frank, A Bossou and KL Medina. (2010). Hoxa9 regulates Flt3 in lymphohematopoietic progenitors. *J Immunol* 18511:6572-6583.
42. Buser A, M Stern, C Arber, M Medinger, J Halter, A Rovo, G Favre, A Lohri, A Tichelli and A Gratwohl. (2008). Impaired B-cell reconstitution in lymphoma patients undergoing allogeneic HSCT: an effect of pretreatment with rituximab? *Bone Marrow Transplant* 427:483-487.
43. Arber C, A Buser, D Heim, M Weisser, A Tyndall, A Tichelli, J Passweg and A Gratwohl. (2007). Septic polyarthritis with *Ureaplasma urealyticum* in a patient with prolonged

agammaglobulinemia and B-cell aplasia after allogeneic HSCT and rituximab pretreatment. *Bone Marrow Transplant* 406:597-598.

44. Amsellem S, F Pflumio, D Bardin, B Izac, P Charneau, PH 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* 911:1423-1427.

Figures and legends to the figures

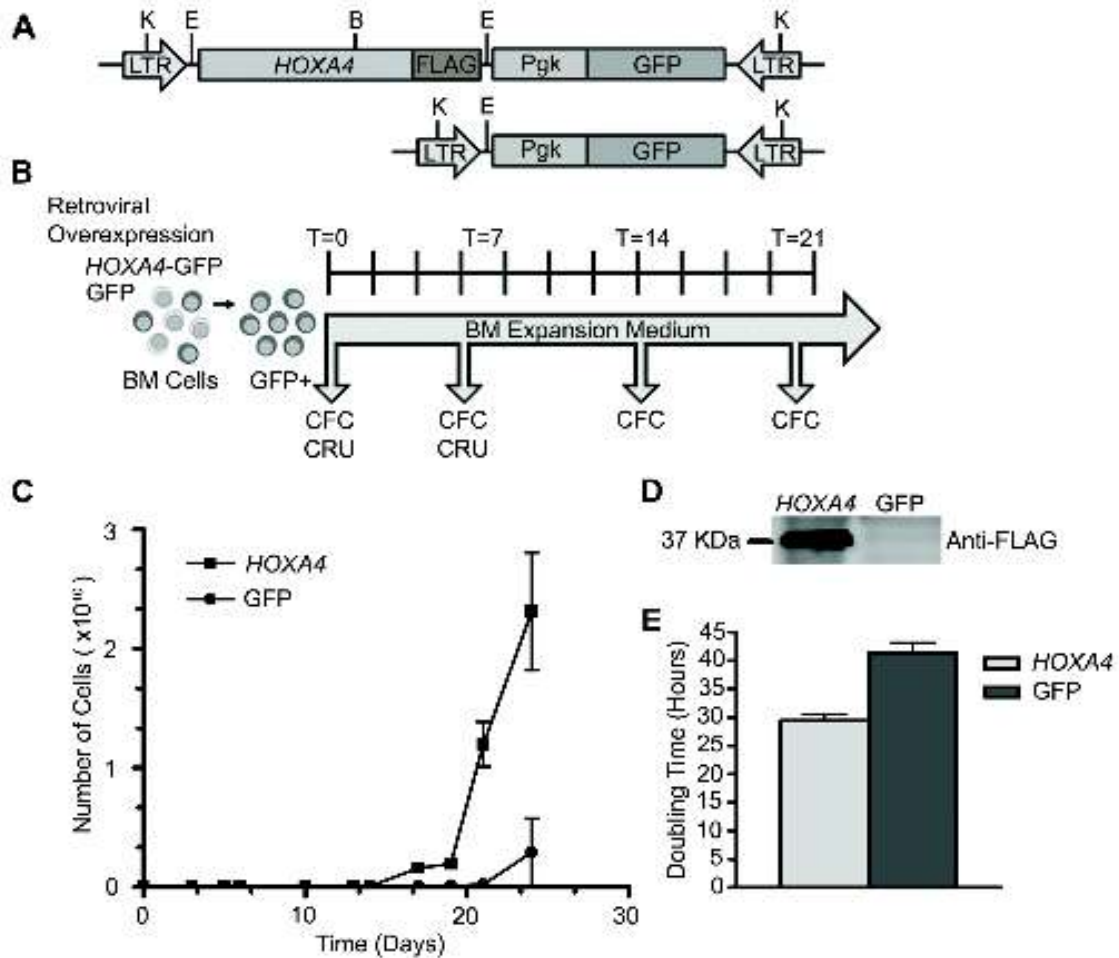


Figure 1
Janet Bijl

Figure 1 Growth analysis of *HOXA4* and control BM cultures (A) Representation of *HOXA4* and Mock GFP retroviral vectors. Restriction sites relevant for this study are indicated; K=KpnI, B=BglII, E=EcoRI. (B) Overview of the experimental strategy used in this study. Culture time is indicated in days. (C) Representative growth curves of total BM cells transduced with *HOXA4* or control (n=5). (D) Western blot analysis for retroviral *HOXA4*-FLAG expression in BM cells transduced with either *HOXA4* or control vectors. (E) Average doubling time for *HOXA4* and control BM cultures (n=5).

CFC: Colony Forming Cell; CRU: Competitive Repopulation Unit; BM: Bone Marrow

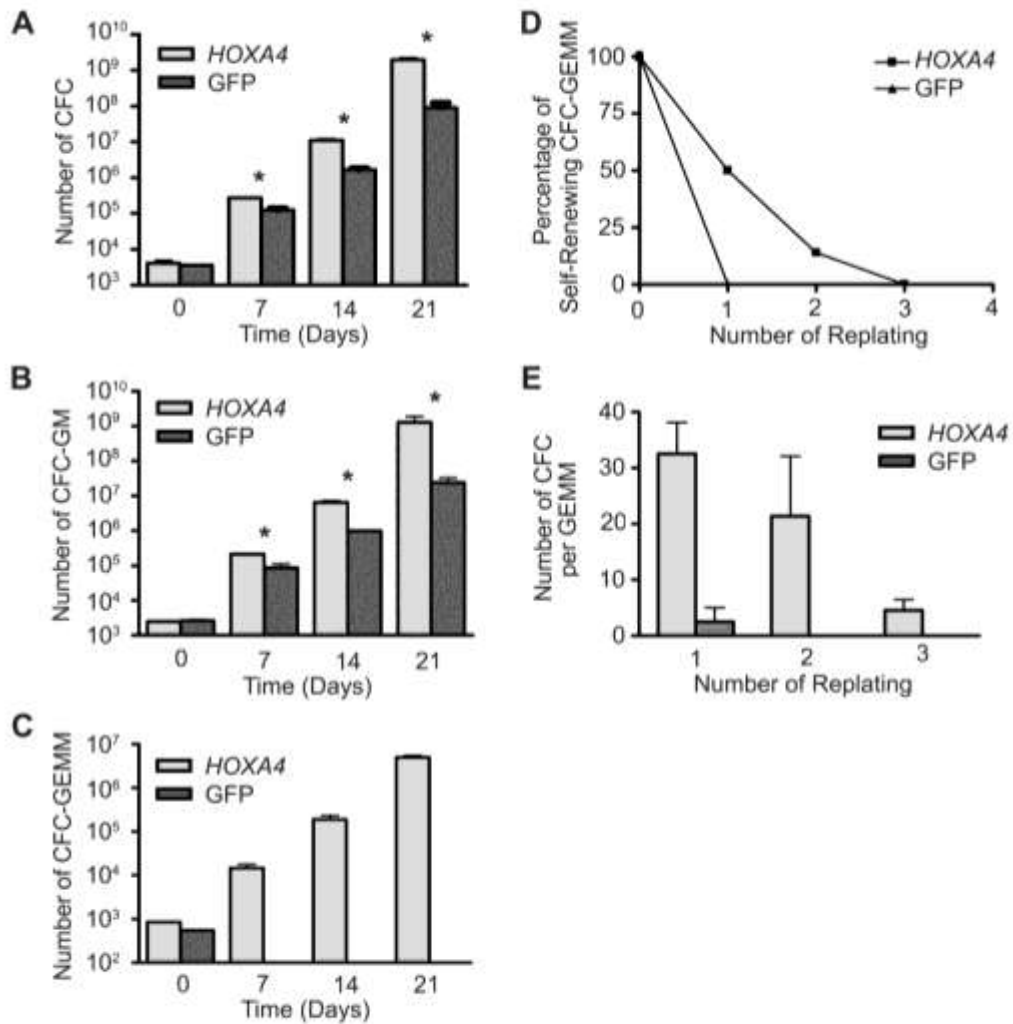


Figure 2
Janet Bijl

Figure 2 Progenitor analysis of transduced BM cultures. Increase of (A) total myeloid progenitors (B) GM and (C) primitive GEMM progenitors in BM cultures transduced with *HOXA4* or control at indicated times and measured by CFC assay. Representative graphs of three to four independent experiments are shown. (D) Percentage of GEMM colonies which are able to initiate secondary GEMM colonies after each serial re-plating. (E) Average number of total CFC produced by a single GEMM colony in consecutive re-platings. Note that after one re-plating no GEMMs were re-initiated from control GEMMs.

GM: granulocytic/monocytic; GEMM: granulocytic/erythroid/megakaryocyte/monocytic; CFC: Colony Forming Cell. * $P \leq 0.05$, 1-tailed Student t test

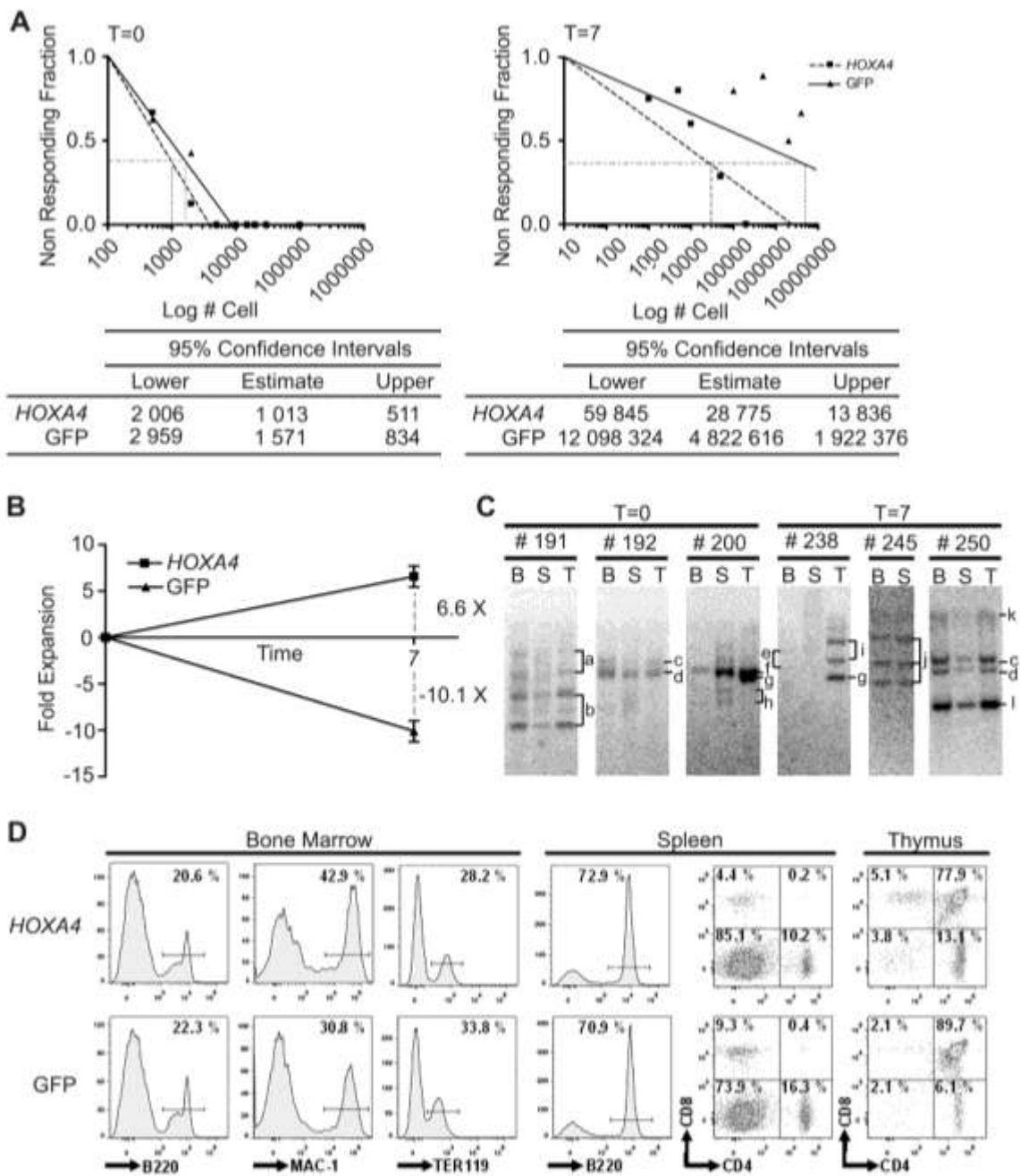


Figure 3
Janet Bijl

Figure 3 Evaluation of HSC expansion *in vitro*. (A) Evaluation of CRU frequency by limiting dilution analysis in mice transplanted with *HOXA4* or control BM cells. Frequency is calculated using Poisson statistics according to Szilvassy et al. [29]. (B) Fold change of HSCs

(CRU) numbers over the input value for *HOXA4* or control BM cultures after 7 days of growth. **(C)** Clonal analysis to detect the expansion of multiple HSC clones *in vitro* by Southern blot analysis on genomic DNA from *HOXA4* BM chimeras, transplanted at day 0 and day 7 post-transfection. Bands with identical intensity represent a single clone (several are indicated by a letter). Note that of the 25 HSC clones present at initiation of culture at least ten were detected in four mice receiving transplants of T7 cultures (eight are shown in three mice; ie mouse 238: e, i and g, mouse 245: j, Mouse 250: c, d, k and l), indicating a polyclonal expansion of HSC clones in culture. **(D)** Representative FACS profiles for BM, spleen and thymus of long-term repopulated recipients of *HOXA4* or control BM cells showing contribution of HSCs to B-cell (B220), T-cell (CD4/CD8), myeloid (MAC-1) and erythroid (TER119).

B: Bone Marrow; S: Spleen; T: Thymus

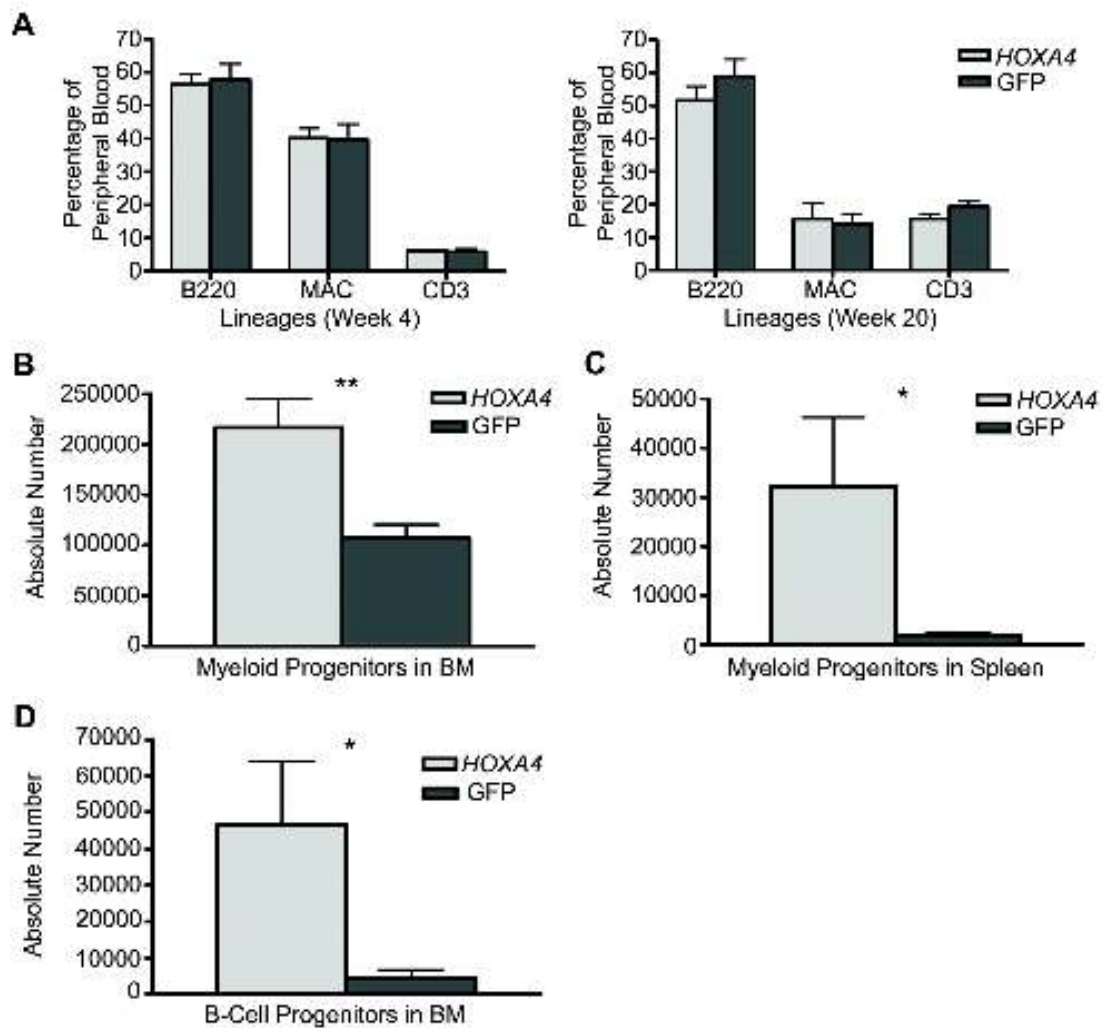


Figure 4
Janet Bijl

Figure 4 Analysis of long-term reconstituted BM chimeras (A) PB analysis of *HOXA4* (n=6) and control (n=6) chimeras for myeloid and lymphoid lineage contribution in short term (4 weeks, left panel) and long-term (20 weeks, right panel) reconstituted mice, assessed by FACS. B cells and T cells were detected using antibodies against B220 and CD3 surface markers, respectively. Antibody for MAC-1 was used to detect myeloid cells. **(B)** Average numbers of myeloid progenitors in BM (two femurs and two tibias) of *HOXA4* (n=9) or control (n=7) chimeras. **(C)** Average numbers of myeloid progenitors in spleen of *HOXA4* (n=5) and control (n=2) chimeras. **(D)** Average numbers of B cell progenitors in BM (two femurs and two tibias) of *HOXA4* (n=9) or control (n=4) chimeras.

BM: Bone Marrow; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$ 1-tailed Student t test

Supplemental tables

Table S1 Number of divisions *HOXA4* or control BM cells underwent during 3 weeks of culturing in independent experiments

Experiment	<i>HOXA4</i>*	GFP*	Difference
1	20.73 ± 1.33	14.12 ± 0.51	6.61
2	18.80 ± 0.31	15.35 ± 1.75	3.45
3	23.10 ± 0.31	17.70 ± 1.97	5.41

*P ≤ 0.05, 2-tailed Student t test; BM: Bone Marrow; Total number of division was calculated using the following formula: Number of divisions=LOG₂ (N_{t2}) - LOG₂(N_{t1}); n=number of cells and t1 and t2 represent time points in the exponential phase of the cultures.

Table S2 Efficiency of *HOXA4* and control GEMM to re-initiate colonies (CFC and GEMM) after serial re-plating

Serial re-plating	<i>HOXA4</i>		GFP	
	GEMM→CFC*	GEMM→GEMM	GEMM→CFC*	GEMM→GEMM
1	10/10	4/10	1/2	0/2
2	8/10	1/10	nd	nd
3	4/4	0/4	nd	nd

* $P \leq 0.05$, 2-way ANOVA test; nd=not determined;

GEMM= Granulocytic/Erythroid/Megakaryocyte/Monocytic; CFC=Colony Forming Cell;
 Note that after one re-plating no GEMMS were re-initiated from control-GFP GEMMs preventing further analysis.

Table S3 Mean activity of stem cells (MAS) for *HOXA4* and control HSCs in BM cultures at T0 and T7

Time (Days)	n	Mean Activity of Stem Cells		
		<i>HOXA4</i>	n	GFP
0	11	10.37* ± 4.77	14	4.50* ± 3.76
7	8	8.01 ± 9.60	1	1.63

The mean activity of stem cells is given as percentage of long-term repopulation per HSC in the periphery of BM chimeras.

* $P \leq 0.05$, 2-tailed Student t test

Table S4 Distribution of GFP+ hematopoietic populations in long-term (>20 weeks) reconstituted *HOXA4* or control chimeras

	<i>HOXA4</i> (%)			GFP (%)		
	BM (n=7)	Spleen (n=7)	Thymus (n=7)	BM (n=3)	Spleen (n=4)	Thymus (n=3)
B Cells						
B220+	19.83 ± 6.26	64.80 ± 14.60	nd	24.92 ± 8.13	60.13 ± 9.04	nd
T Cells						
CD4+CD8-	nd	17.29 ± 10.62	10.31 ± 3.94	nd	23.18 ± 6.37	8.64 ± 3.83
CD4-CD8+	nd	9.36 ± 5.22	2.73 ± 1.62	nd	12.28 ± 3.23	1.67 ± 0.41
CD4+CD8+	nd	nd	83.45 ± 6.34	nd	nd	87.67 ± 3.62
Myeloid Cells						
MAC+Gr1+	40.34 ± 13.72	3.61 ± 1.33	nd	25.11 ± 2.76	2.37 ± 0.64	nd
MAC+Gr1-	13.84 ± 6.91	4.70 ± 1.86	nd	5.29 ± 1.97	5.45 ± 1.24	nd
MAC-Gr1+	nd	6.32 ± 1.29	nd	nd	5.17 ± 0.78	nd
Erythroid Cells						
TER119+	18.92 ± 9.30*	7.16 ± 4.01	nd	37.75 ± 9.79*	7.59 ± 1.56	nd

* $P \leq 0.05$, 2-tailed Student t test; nd=not determined; BM=Bone Marrow. Note that no difference in BM and spleen cellularity was found in *HOXA4* and control chimeras, and thus changes in population size reflect those of absolute numbers.

Table S5 Number of large and small *HOXA4* or GFP transduced B cell colonies per 3×10^5 total GFP⁺ BM cells in chimeras >20 weeks post-transplantation

Time (Days)	<i>HOXA4</i> (n=6)			GFP (n=4)		
	Small (<300 μm)	Large (>300 μm)	Total	Small (<300 μm)	Large (>300 μm)	Total
7	60.7 ± 21.4*	5.0 ± 1.1**	65.8 ± 21.2*	5.0 ± 4.0*	0**	5.0 ± 4.0*
14	92.3 ± 21.0**	44.0 ± 4.0**	136.5 ± 23.4**	7.8 ± 7.3**	4.0 ± 1.4**	11.8 ± 8.7**

* P ≤ 0.001, ** P ≤ 0.0001, 1-tailed Student t test; n corresponds to the number of counted dish.

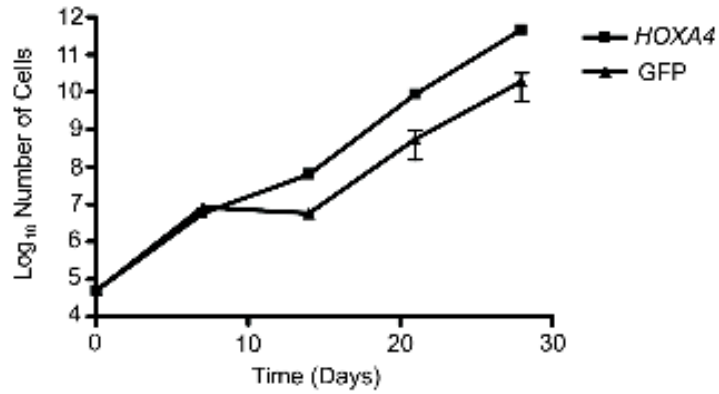
Table S6 Real Time Quantitative PCR analysis for genes of *Hoxa* cluster and of paralog group 4 in GFP sorted BM cells

<i>Hox</i> gene	Average C _t		Standard Deviation	
	<i>HOXA4</i>	GFP	<i>HOXA4</i>	GFP
<i>a1</i>	32.41	33.28	0.41	2.18
<i>a2</i>	33.08	34.65	0.85	1.14
<i>a3</i>	30.65	31.98	0.55	1.22
<i>a4</i>	30.91	31.01	0.75	0.13
<i>a5</i>	30.16	30.98	0.62	0.39
<i>a6</i>	32.37	33.16	0.73	0.37
<i>a7</i>	28.16	28.41	0.28	0.43
<i>a9</i>	29.59	30.09	0.49	0.89
<i>a10</i>	34.00	34.77	2.24	0.51
<i>a11</i>	>35.00	>35.00	2.02	1.27
<i>a13</i>	>35.00	>35.00	0.84	0.37
<i>b4</i>	28.46	30.39	1.58	0.18
<i>d4</i>	>35.00	>35.00	1.99	1.94

Corrected Cycle Threshold (CT) values are based on 25 ng RNA equivalents (*GAPDH*=19).

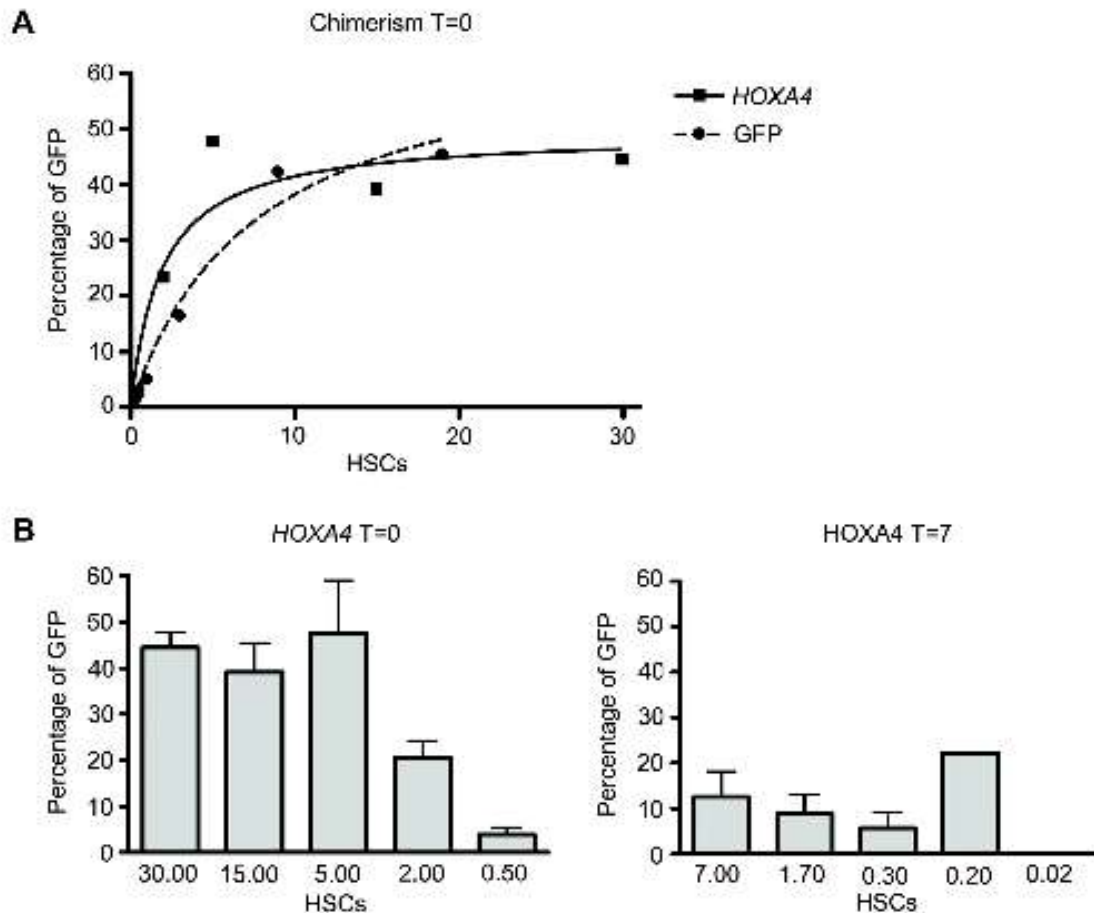
Primers used for *Hoxa4* detect only endogenous expression.

Supplemental figures and legend to the supplemental figures



Supplemental Figure 1
Janet Bijl

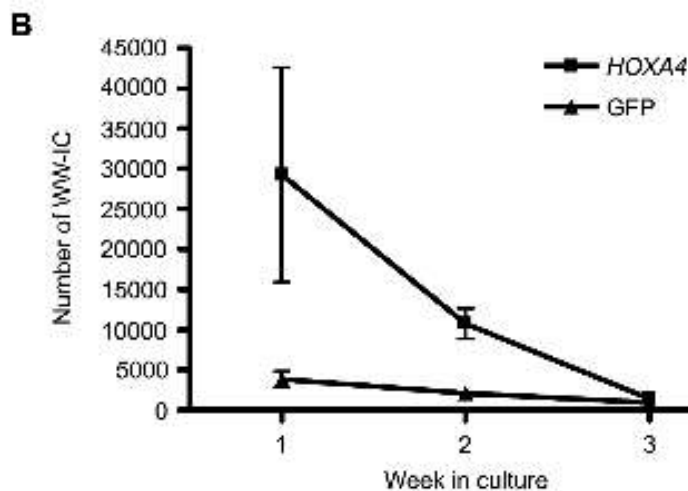
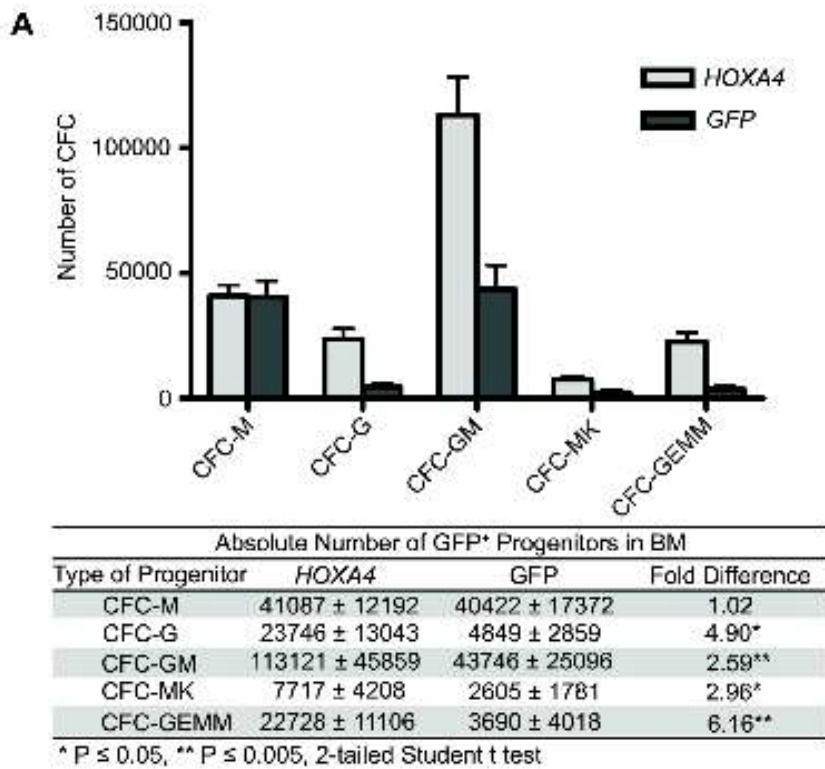
Figure S1 Growth analysis of *HOXA4* and control BM cultures Representative growth curves of total BM cells transduced with *HOXA4* or control in Log scale.



Supplemental Figure 2
Janet Bijl

Figure S2 Long-term engraftment of transduced HSC (A) Engraftment (in % GFP) of *HOXA4* and control HSCs from T0 BM cultures in the periphery of recipient mice 20 weeks post-transplantation plotted against various doses of HSCs received. The curve was generated using a non-linear fit, resulting in the equation for one phase exponential association: $Y=Y_{max}*(1-\exp(-K*X))$. HSC doses were calculated based on CRU frequencies. (B) Engraftment of *HOXA4* HSCs collected at T0 and T7 in periphery of long-term repopulated mice for grafts containing different doses of HSCs.

HSCs: Hematopoietic Stem Cells.



Supplemental Figure 3
Janet Bijl

Figure S3 Analysis of myeloid and lymphoid progenitors (A) Average numbers of M, G, GM, MK and GEMM progenitors in BM (two femurs and two tibias) of *HOXA4* (n=9) or control (n=7) chimeras. Fold differences are indicated in corresponding table. **(B)** Average numbers of short to long-term B cell progenitors in BM (two femurs and two tibias) of

HOXA4 (n=3) or control (n=3) measured weekly in WW-IC cultures. Note that no difference is observed in long-term WW-ICs after 3 weeks of culturing.

CFC: Colony Forming Cell; M: Monocytic; G: Granulocytic; GM: Granulocytic/Monocytic;

MK: Megakaryocytic; GEMM: Granulocytic/Erythroid/Megakaryocyte/Monocytic;

WW-IC: Whitlock-Witte-Initiating-Cell.

Chapitre 3 : Article 2

***HOXA4* versus *HOXB4*: enhanced short-term repopulation by *HOXA4* and common modulation of Notch signaling genes**

L'article présenté dans ce chapitre fait suite à celui du chapitre 2 et compare directement l'effet de la surexpression des gènes *HOXA4* et *HOXB4* dans les cellules hématopoïétiques incluant les CSH. Il présente aussi des résultats d'expression de gènes cibles potentiels afin d'identifier des mécanismes impliqués dans l'effet de *HOXA4* et *HOXB4*. J'ai effectué les expériences menant à la réalisation de cet article et effectué la majeure partie de sa rédaction.

En préparation, publication prévue en 2014

***HOXA4* versus *HOXB4*: enhanced short-term repopulation by *HOXA4* and common modulation of Notch signaling genes**

Marilaine Fournier¹, Charles-Étienne Lebert-Ghali¹ and Janetta J Bijl^{1,2}

¹Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, QC, Canada;

²Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada;

*Correspondence:

Dr. Janet Bijl, PhD.

Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont

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

Abstract

Genes of the *HOX4* paralog group have been shown to expand hematopoietic stem cells (HSC). Both *HOXA4* and *HOXB4* are endogenously expressed in primitive hematopoietic cells of fetal and adult origin. There is 10-fold higher expression of *Hoxa4* as compared with *Hoxb4* in embryonic primitive hematopoietic cells undergoing self-renewal suggesting a more potent capacity of *HOXA4* to expand HSC. Here we provide evidence by direct competitive bone marrow cultures that *HOXA4* and *HOXB4* induce self-renewal of primitive hematopoietic cells with identical kinetics. Interestingly, transplantation assays show that short-term repopulation by *HOXA4* overexpressing multilineage progenitors was significantly greater than *HOXB4* overexpressing progenitors *in vivo*, indicating differences in the sensitivity of the cells to external signals. Expression analysis showed an increase in multiple Notch and Wnt signaling associated genes, including receptors and ligands, as well as pluripotency genes, for both *HOXA4* and *HOXB4* overexpressing cells, suggesting that both proteins may assert their effects through intrinsic and extrinsic pathways to induce self-renewal of primitive hematopoietic cells. Thus, *HOXA4* and *HOXB4* have the potential to promote self-renewal that involves Notch signaling, and *HOXA4* appears to play a dominant role over *HOXB4* in short-term repopulation.

Introduction

Homeobox (*HOX*) transcription factors are key regulators of hematopoiesis (Reviewed in [1]). *HOXB4* was the first *HOX* gene shown to play a role in the expansion of human and mouse hematopoietic stem cells (HSC) by promoting self-renewal divisions, when overexpressed [2, 3]. Importantly, *HOXB4* overexpressing HSC remained susceptible to external signals, as their numbers did not increase beyond those normally found in mice, and they retained their full differentiation potential. The finding that exposure to HOXB4 recombinant protein also enhanced HSC numbers made HOXB4 an attractive candidate for clinical *ex vivo* expansion of HSC [4, 5].

Our group recently demonstrated that overexpression of *HOXA4*, which is highly homologous to *HOXB4*, also led to a net expansion of functional mouse HSC *in vitro* [6]. This was accompanied with expansion of total bone marrow (BM) cultures by *HOXA4* that were up to 100-fold more important than control after three weeks of culture [6], comparable to earlier observations with *HOXB4* overexpressing progenitor cells [7]. Further, all paralog 4 members appear to have the potential to induce proliferation of primitive hematopoietic cells as evidenced by expansion in an embryonic stem cell overexpression model [8]. Moreover, co-culture of human CD34⁺ cells on stromal cells producing either HOXB4 or HOXC4 protein was shown to expand the primitive cells at similar levels [9]. These observations suggest that functional redundancy within the *HOX* network not only occurs in developmental programs [10, 11], but also in hematopoiesis.

BM transplantation is dependent on the presence of long-term (LT) HSC, which can sustain the production of diverse blood cell types for extended periods (>20 weeks) in myeloablated mice [12]. The repopulation capacity of immediate descendants of LT-HSC, such as short-term (ST) HSC and early committed progenitors is limited in time (<20 weeks) and becomes more restricted with differentiation due to decreasing self-renewal potential. The expression of *HOX* genes, predominantly the A and B clusters, also decreases with maturation [13-16], suggesting a role for *HOX* genes in the self-renewal potential of hematopoietic cells. Interestingly, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (Q-RT-PCR) analysis showed 10-fold higher expression of *Hoxa4* than *Hoxb4* in E14 fetal liver populations

enriched for HSC [13]. The fact that fetal liver HSC are undergoing intensive self-renewal at that time of development in order to establish the HSC reservoir suggests that *Hoxa4* may also be an important determinant of HSC self-renewal under physiological conditions. These observations indicate that *HOXA4* may be a more potent candidate for *ex vivo* expansion of HSC than *HOXB4* in a clinical context.

In this study, using retroviral overexpression, we have directly compared the effect of *HOXA4* and *HOXB4* in BM cells *in vitro* and *in vivo*. We showed no difference in total BM cell or myeloid progenitor expansion following overexpression of *HOXA4*, *HOXB4* or both *in vitro*. However, upon transplantation into irradiated recipients, *HOXA4* overexpressing BM cells confer a short-term engraftment advantage over *HOXB4* overexpressing cells while no difference in reconstitution was detected at later time points. Q-RT-PCR analysis of highly purified *HOXA4* and *HOXB4* overexpressing HSC identified several target genes implicated in the enhanced self-renewal observed. Among them, we showed a common modulation of multiple Notch signaling pathway or related genes by *HOXA4* and, to a lesser extent, *HOXB4*. These data suggest a role for Notch signaling in *HOXA4* and *HOXB4* induced self-renewal of primitive hematopoietic cells, improving not only long-term, but also short-term repopulation, which may have important clinical relevance.

Methods

Retroviral construction and transduction

B6SJL mice were intravenously injected with 150 mg/kg of 5-fluorouracil (5-FU; Mayne Pharma (Canada) Inc., Montréal, QC, Canada) to recruit HSC into cell cycle, as previously reported [6]. After 4 days, BM cells were isolated from these mice and co-cultured for 2 days on confluent layers of the GP+E-86 packaging cell line stably producing MSCV-*HOXA4*-GFP, MSCV-*HOXB4*-GFP, MSCV-*HOXA4*-YFP or MSCV-GFP retrovirus [17] in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wisent Inc., St Bruno, QC, Canada) supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; PAA Laboratories Inc. Etobicoke, ON), 6 ng/ml interleukin (IL)-3, 10 ng/ml IL-6, 100 ng/ml stem cell factor (SCF), 10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ), 50 ng/ml gentamycin

(Wisent Inc.), 10 ng/ml ciprofloxacin (Wisent Inc.) and 6 ng/ml polybrene (Tekniscience Inc., Terrebonne, QC).

Animals and transplantation assays

For transplantation assays, congenic C57BL/6 (CD45.2) and B6SJL (CD45.1) mice (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) were used. Mice were bred and maintained in a specific pathogen-free animal facility of the HMR Research Center. Transduced (*HOXA4*, *HOXB4*, *HOXA4/B4* or control GFP) BM cells from B6SJL mice treated or not with 5-FU were intravenously injected into sub-lethally irradiated (800 cGy) C57Bl/6 mice. For individual chimeras, 2×10^5 fresh BM helper cells from healthy congenic C57Bl/6 mice were co transplanted to ensure reconstitution post-irradiation. No BM helper cells were co transplanted in competitive chimeras. Peripheral blood (PB) repopulation was monitored every 2 weeks by flow cytometry for the presence of fluorescent cells. After twenty or more weeks post transplantation, mice were sacrificed. All mouse experiments protocols were approved by the Animal Care Committee of the HMR Research Center.

In vitro cultures

Transduced BM cells were sorted on a fluorescence activated cell sorting (FACS) Aria III with DiVa software (BD Bioscience, Mississauga, ON) and seeded at different doses in duplicate in BM expansion medium (DMEM, 15% FBS, 6 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 100 ng/ml SCF, 10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 50 ng/ml gentamycin and 10 ng/ml ciprofloxacin). Doubling times were calculated using the Doubling Time website [18].

Flow cytometry analysis

BM cells from *in vitro* cultures were stained once a week for primitive hematopoietic population markers using the following conjugated antibodies: B220-biotin (bio), Gr1-bio, CD11b (MAC1)-bio, CD3-bio, TER119-bio, CD48-bio, c-Kit-APC and Sca1-PE/Cy7. PB repopulation of the chimeras was monitored every 2 weeks by flow cytometry for the presence of GFP⁺ and/or YFP⁺ cells, and their contribution to the myeloid, B cell and T cell lineages was determined using the following conjugated antibodies: B220-APC, CD11b (MAC1)-A700 and CD3-bio. More than twenty weeks post-transplantation, mice were sacrificed and

analyzed by flow cytometry for the contribution of GFP⁺ and/or YFP⁺ cells to the myeloid, lymphoid and erythroid lineages using the following conjugated antibodies: CD11b (MAC1)-Pacific Blue, Gr1-bio, B220-APC/Cy7, TER119-APC, CD4-APC/Cy7 and CD8 α -APC. Biotinylated antibodies were stained with PerCP/Cy5.5 conjugated streptavidin. (All conjugated antibodies and streptavidin were purchased at BioLegend, San Diego, CA or BioPharmingen, Mississauga, ON, Canada)

Clonogenic progenitor assays

Clonogenic progenitor assays for myeloid progenitors were performed by plating cells from *HOXA4*, *HOXB4* or both (*HOXA4/B4*) overexpressing BM cultures or from long-term repopulated *HOXA4*, *HOXB4*, *HOXA4/B4* or GFP overexpressing BM chimeras in DMEM containing 1% Methocel MC (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS, 5.7% bovine serum albumin (Tekniscience Inc.) 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol, 5 U/ml erythropoietin, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 50 ng/ml SCF, 2 mM glutamine (Life Technologies, Burlington, ON, Canada), and 200 mg/ml transferrin (Wisent). Colonies were scored as previously described [19].

Western blot analysis

Cells were lysed in cell lysis buffer (50 mM Tris-HCL pH8.0, 100 mM NaCl, 1% Triton X 100, 5 mM EDTA (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, USA) with protease inhibitor cocktail (BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada). Proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were incubated with a monoclonal anti HOXB4 antibody (1:1000 dilution; Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA) followed by a secondary polyclonal anti-rat antibody coupled with horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, CA, USA) or a monoclonal anti-Flag antibody (1:1000 dilution; Sigma-Aldrich) followed by a secondary polyclonal anti-rabbit antibody coupled with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Westgrove, PA). For Actin detection, membranes were incubated with a monoclonal anti-Actin antibody (1:1000 dilution, Millipore, Temecula, CA, USA) followed by a secondary polyclonal

anti-mouse antibody coupled with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.).

HSC purification and transduction

For HSC purification, BM cells from wild-type (C57BL/6 and/or B6SJL) mice were harvested and lineage (LIN) negative cells were purified using the mouse hematopoietic progenitor cell enrichment kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). LIN⁻ cells were stained using conjugated antibody c-Kit-APC, Sca1-PerCPCy5.5 and CD150-PECy7 (Biolegend) and c-Kit⁺Sca1⁺CD150⁺ HSC were sorted on a FACS Aria III with DiVa software (BD Bioscience). After overnight culture in pre-stimulation media (DMEM, 15% FBS, 6 ng/ml IL-3, 40 ng/ml IL-6, 100 ng/ml SCF, 10⁻⁵M 2-mercaptoethanol, 50 ng/ml gentamycin and 10 ng/ml ciprofloxacin), HSC were subjected to 2 rounds of retroviral infection by spinoculation at 2250 rpm for 90 minutes using MSCV-*HOXA4*-GFP, MSCV-*HOXB4*-GFP, or MSCV-GFP retrovirus. Two days after the last round of infection (4 days after purification), GFP⁺ cells were sorted on a FACS AriaIII.

RNA isolation and amplification

Total RNA was isolated from *HOXA4*⁺, *HOXB4*⁺ or control transduced HSC using Trizol reagent (Life Technologies), treated with DNase-I (Life Technologies) and purified using the RNeasy Min Elute Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada). RNA was amplified using the MessageAmpII aRNA Amplification Kit (Life Technologies). cDNA was prepared from 500 ng of amplified RNA or 1 µg of total RNA using MMLV-RT (Life Technologies) and random primers (Life Technologies) according to the manufacturer's protocols.

Quantitative RT-PCR

Primers for human and mouse *HOX* genes were used according to previously validated sequences [20, 21]. Potential candidate target genes were selected based on previous screens with *HOXB4* and/or *HOXC4* and based on their reported role in HSC biology, self-renewal or cancer biology [9, 22, 23]. Primers were selected using the PrimerBank [24]. Q-RT-PCR was performed on an ABI 7500 thermal cycler (Applied Biosystems, Streetville, ON, Canada) using SYBR Green (Applied Biosystems). Triplicates were accepted in a 0.5 CT range. Relative quantification was achieved using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Results

HOXA4 and HOXB4 BM cells have equally strong proliferation potential

To compare the effect of *HOXA4* or *HOXB4* overexpression on the growth of primitive hematopoietic cells, cultures were initiated with primary BM cells overexpressing *HOXA4*-IRES-YFP, *HOXB4*-IRES-GFP or both (Figure 1A). Q-RT-PCR analysis confirmed the overexpression of *HOXA4* and/or *HOXB4*, which were up to 1000-fold higher compared to the endogenous levels (Figure 1B). All BM cultures underwent massive proliferation resulting in average expansions of 5×10^6 -fold over the initial numbers after 4 weeks for all three conditions (Figure 1C), indicating that both genes confer similar growth advantage to BM cells *in vitro*. Moreover, co-overexpression of *HOXA4* and *HOXB4* did not lead to a synergistic effect on proliferation. The numbers of myeloid progenitor cells, assessed by colony forming cell (CFC) assays, were also comparable with few significant transitory differences (Figure 1D and E), resulting in a net expansion up to 15×10^6 fold. Importantly, the number of granulocytic-erythroid-megakaryocytic-monocytic(GEMM)-CFC was equally increased by *HOXA4* and *HOXB4* (Figure 1E), indicating that both genes promote self-renewal of primitive hematopoietic cells *in vitro*. Consistently, flow cytometry analysis showed an increase of LIN⁻CD48⁻c-Kit⁺Sca1⁺ primitive cells (data not shown). In competition cultures, the proportions of *HOXA4* and *HOXB4* cells fluctuated around 50% and also contained comparable numbers of progenitors, indicating that both *HOXA4* and *HOXB4* have an equally strong proliferative potential to expand early hematopoietic cells *in vitro* (Figure 1F H and data not shown).

HOXA4 promotes better short-term hematopoietic repopulation than HOXB4

To assess the potential of *HOXA4* and *HOXB4* HSC to repopulate sublethally irradiated recipients, freshly *HOXA4* or *HOXB4* transduced BM cells were transplanted at low doses (10,000-30,000 BM cells, corresponding to 5-15 HSC) along with 200,000 total BM cells (Figure 2A). All mice that received *HOXA4* or *HOXB4* transduced BM cells were repopulated at higher levels in the periphery than control chimeras (Figure 2B). Interestingly, compared to *HOXB4* the short-term repopulation was significantly superior for *HOXA4* BM cells, but at later time points, engraftment levels were similar (Figure 2B). There was also significantly higher reconstitution of the B lymphoid compartment in *HOXA4* transduced BM

recipients in the short-term as compared to *HOXB4* and control transduced BM chimeras (8 weeks, Figure 2C left panel), while significantly more *HOXA4* overexpressing myeloid cells were found at later time points as compared to control (20 weeks, Figure 2C right panel). Interestingly, a transient higher myeloid and lower T cell reconstitution was observed in *HOXB4* transduced BM chimeras, suggesting a stronger affect of *HOXB4* on myeloid differentiation (Figure 2C, left panel). In addition, significantly higher levels of repopulation by *HOXA4* and *HOXB4* transduced BM cells were also observed in hematopoietic organs 24 weeks post-transplantation (Figure 2D). This increase of mature cells was sustained by a 2-fold higher frequency of myeloid progenitors in the BM for both *HOXA4* and *HOXB4* (Supplemental Figure 1).

Competitive transplantation assays also demonstrated a transient, but significantly higher reconstitution by *HOXA4* over *HOXB4* transduced BM cells in the periphery (Figure 3A). The long term engraftment of *HOXA4* and *HOXB4* overexpressing cells (16 to 24 weeks) were similar indicating a comparable contribution of *HOXA4* and *HOXB4* HSC to the hematopoietic reconstitution. In contrast to single *HOX* chimeras, no significant differences were observed between *HOXA4* and *HOXB4* in the peripheral reconstitution of the myeloid and lymphoid lineages (B220⁺, CD3⁺ and MAC1⁺) at both short- and long-term time points (Figure 3B). Interestingly, at 24 weeks, *HOXB4* transduced cells contributed significantly more to the BM reconstitution than *HOXA4* transduced cells. However, repopulation in the spleen and thymus was not significantly different (Figure 3C). Concurrently, more *HOXB4* positive B, myeloid and erythroid cells were observed in the BM, but not in other organs (Figure 3D and data not shown). Additionally, although CFC assays demonstrated no difference in the frequency of *HOXA4* and *HOXB4* overexpressing myeloid progenitors, a significantly higher percentage of *HOXB4* transduced progenitors were found in the BM (Figure 3E).

Increased expression of Notch related genes by *HOXA4* and *HOXB4*

To gain insight into the molecular mechanisms by which *HOXA4* and *HOXB4* mediate the expansion of primitive hematopoietic cells, the expression levels of a panel of candidate genes (Supplemental Table 1) were measured in *HOX* and control transduced CD150⁺LIN⁻c-

Kit⁺Sca1⁺ (LKS) cells by Q-RT-PCR (Figure 4A). Ectopic expression levels for *HOXA4* and *HOXB4* were similar and about 100-fold above endogenous levels (Figure 4B and C). *HOXA4* and *HOXB4* modulated the expression of 51 of the 87 candidates tested (Supplemental Table 2). Among them, 23 were ≥ 2 -fold upregulated by both *HOXA4* and *HOXB4*, whereas 17 and 11 were ≥ 2 -fold upregulated by either *HOXA4* or *HOXB4* only, respectively (Figure 4D and Table 1). Differentially expressed genes were involved in processes such as regulation of transcription, cell adhesion, stem cell maintenance/differentiation, pluripotency, cell cycle and proliferation (Supplemental Table 1). Also, the expression of several genes of the Wnt and Notch signalling pathways were affected, more notably by *HOXA4*. Among 30 Notch related genes tested, the levels of 24 were at least 1.5-fold changed by the overexpression of either *HOXA4* and/or *HOXB4* (Figure 4E and F and Table 2). These included Notch receptors (*Notch1* and *Notch2*) and Notch ligands (*Dll1*, *Dll3* and *Jag1*). The expression level of *Notch2* was higher than *Notch1* in primitive hematopoietic cells (data not shown), which corresponds with previous reports using reporter mice [25]. The increased activation of the canonical Notch signalling pathway was confirmed by the upregulation of Notch target genes such as *Hey1* and *Runx1*, but not *Hes1*. The B cell specification gene *Pax5* was 1.5-fold higher expressed in *HOXA4* transduced CD150⁺LKS cells, which might be responsible for the larger B cell population found in *HOXA4* transduced BM chimeras. Together these data suggest that the Notch signalling pathway plays a role in *HOX4* mediated self-renewal of HSC.

Discussion

In this study, we demonstrate that *HOXA4* and *HOXB4* promote significant expansion of BM cells *in vitro* through the maintenance and expansion of the progenitor pool. The magnitude of expansion induced by *HOXA4* and *HOXB4* was similar *in vitro*; however, when transplanted into mice, *HOXA4* transduced cells clearly provided better short-term repopulation of BM than *HOXB4*. This was associated with a higher contribution of lymphoid cells compared to *HOXB4* transduced cells, indicating that *HOXA4* is particularly important in restoring the B cell compartment, congruent with our previous observations [6]. In agreement with our data, other studies also have shown that other *HOX4* paralog genes confer similar potential expansion advantages to mouse or human primitive hematopoietic cells *in vitro*, when overexpressed [8] or cultured on engineered stromal cells (*HOXB4* or *HOXC4*)

[9]. Thus, in the absence of cues from the hematopoietic niche and its possible physical restraints, the proliferative potential of hematopoietic stem and progenitor cells is equally enhanced by *HOXA4* and *HOXB4*. Moreover, the comparable expansion of progenitor cells indicates that *HOXA4* and *HOXB4* have a similar capacity to promote self-renewal. It is not clear from our data whether the enhanced short-term repopulation in *HOXA4* BM recipients derives from a higher sensitivity of committed early progenitors, in particular those of the B cell lineage, to *HOXA4* or from a stronger response of HSC subsets. For example, another group identified a HSC subset, defined as the “upper” LKS side population that had a greater proliferative short-term phenotype and better B cell reconstitution potential [26].

Competitive transplantation assays confirmed the advantage of *HOXA4* in short-term repopulation, but the dominant lymphoid reconstitution of *HOXA4* was absent in the presence of *HOXB4* transduced cells. These data suggest a direct or indirect paracrine effect between *HOXA4* and *HOXB4* transduced cells. Indeed, it has been previously reported that *HOXB4* activation not only resulted in a cell autonomous effect, but also had a paracrine effect on hematopoietic cell differentiation through formation of the hematopoietic niche by modulating the expression of genes associated with paraxial mesoderm [27].

Q-RT-PCR data on a panel of candidate genes demonstrated modulation of the Notch pathway, predominantly by *HOXA4*, in primitive hematopoietic cells. The Notch signaling pathway is known to play a critical role in HSC self-renewal [28-31] and some synergism between *HOXB4* and *Dll1* in the expansion of primate $CD34^+$ cord blood cells has been reported [32, 33]. Although cross-talk between the Notch and *HOX* pathway have been reported [34, 35], we show for the first time that Notch genes are common downstream targets of *HOXA4* and *HOXB4* in primitive hematopoietic cells, indicating that *HOX4* induced self-renewal involves Notch signaling. The Notch related target genes included those coding for receptors, ligands and co-factors, indicating that *HOXA4* and *HOXB4* may regulate the responsiveness of hematopoietic cells to Notch ligands, and amplify the signal response through enhanced ligand production. However, the enhanced lymphoid repopulation by *HOXA4* BM cells could not be explained solely by higher *Notch1* expression, which is important for lymphoid differentiation [25, 36, 37], as equal levels were found in *HOXB4*

cells. This might suggest that the small increase in the B cell gene *Pax5*, a Notch target, could be directly activated by HOXA4 and lead to higher numbers of B cells.

In addition to the Notch pathway, the expression levels of Wnt related genes were also increased by HOXA4 and HOXB4. Notch and Wnt are major pathways in HSC self-renewal and embryonic studies demonstrated that *HOX* genes integrate their signals to establish segment identity [34, 38]. Cross-talk between these signaling cascades have also been demonstrated in HSC [39] and modulation of genes in both pathways may be essential for the prolonged self-renewal of HSC induced by *HOXA4* or *HOXB4*. Furthermore, the observation that activation of the Wnt signaling pathway by Wnt3a promotes short-term multilineage reconstitution of LIN⁻c-Kit⁺Sca1⁺BM cells *in vivo* [40], indicate that Wnt signaling might contribute to the enhanced *HOXA4* induced short-term repopulation, as *HOXA4* overexpression induced higher expression of Wnt associated genes.

Q-RT-PCR data also showed the increase in expression of several self-renewal and pluripotency genes, which indicate that HOXA4 and HOXB4 may activate intrinsic self-renewal pathways. Among these genes are *Lin28b*, a microRNA-binding protein that, when overexpressed, increases self-renewal activity of adult HSC [41], and the transcription factors *Sox2* and *Pou5f1* (*Oct4*), also known for their critical role in pluripotency. The co-overexpression of the latter has also been shown to enhance the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells [42]. Thus, up regulation of those genes by HOXA4 and HOXB4 likely contributes to the induction of HSC self-renewal.

In conclusion, our results show that HOXA4 and HOXB4 activate both intrinsic and extrinsic pathways to enhance self-renewal with a dominant role for the Notch pathway in association with Wnt signaling. Moreover, in the absence of niche-derived signals delivered, HSC overexpressing *HOX4* genes have the same potency in culture, but show paralog specific differences *in vivo*. Together, based on our results, manipulation of the Notch pathway in conjunction with *HOX4* merits further exploration for the expansion of primitive hematopoietic cells for cell therapeutic strategies.

Author disclosure statement

The authors declare that no potential conflicts of interest exist.

Acknowledgment

The authors thank Martine Dupuis from the HMR flow cytometry platform for cell sorting and FACS analysis. The authors also thank the staff of the animal care facility for taking care of the animals. We are also grateful for the excellent comments and suggestions on the manuscript by Drs. Alex Thompson and Heather Melichar.

References

1. Alharbi RA, Pettengell R, Pandha HS et al. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*. 2013;27:1000-1008.
2. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes & development*. 1995;9:1753-1765.
3. Schiedlmeier B, Klump H, Will E et al. High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. *Blood*. 2003;101:1759-1768.
4. Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nature medicine*. 2003;9:1423-1427.
5. Kros J, Austin P, Beslu N et al. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nature medicine*. 2003;9:1428-1432.
6. Fournier M, Lebert-Ghali CE, Kros G et al. HOXA4 induces expansion of hematopoietic stem cells in vitro and confers enhancement of pro-B-cells in vivo. *Stem cells and development*. 2012;21:133-142.
7. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*. 2002;109:39-45.
8. Iacovino M, Hernandez C, Xu Z et al. A conserved role for Hox paralog group 4 in regulation of hematopoietic progenitors. *Stem cells and development*. 2009;18:783-792.
9. Auvray C, Delahaye A, Pflumio F et al. HOXC4 homeoprotein efficiently expands human hematopoietic stem cells and triggers similar molecular alterations as HOXB4. *Haematologica*. 2012;97:168-178.
10. Greer JM, Puetz J, Thomas KR et al. Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature*. 2000;403:661-665.
11. Horan GS, Ramirez-Solis R, Featherstone MS et al. 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 & development*. 1995;9:1667-1677.

12. Jordan CT, Lemischka IR. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes & development*. 1990;4:220-232.
13. Bijl J, Thompson A, Ramirez-Solis R et al. Analysis of HSC activity and compensatory Hox gene expression profile in Hoxb cluster mutant fetal liver cells. *Blood*. 2006;108:116-122.
14. Lebert-Ghali CE, Fournier M, Dickson GJ et al. HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells. *Experimental hematology*. 2010;38:1074-1086 e1071-1075.
15. Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ et al. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Experimental hematology*. 2002;30:49-57.
16. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91:12223-12227.
17. Markowitz D, Hesdorffer C, Ward M et al. Retroviral gene transfer using safe and efficient packaging cell lines. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990;612:407-414.
18. Roth V. Doubling Time. Available at:<http://www.doubling-time.com/compute.php>. 2006.
19. Humphries RK, Eaves AC, Eaves CJ. Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78:3629-3633.
20. Dickson GJ, Lappin TR, Thompson A. Complete array of HOX gene expression by RQ-PCR. *Methods in molecular biology*. 2009;538:369-393.
21. Thompson A, Quinn MF, Grimwade D et al. Global down-regulation of HOX gene expression in PML-RARalpha + acute promyelocytic leukemia identified by small-array real-time PCR. *Blood*. 2003;101:1558-1565.
22. Deneault E, Wilhelm BT, Bergeron A et al. Identification of non-cell-autonomous networks from engineered feeder cells that enhance murine hematopoietic stem cell activity. *Experimental hematology*. 2013;41:470-478 e474.

23. Oshima M, Endoh M, Endo TA et al. Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood*. 2011;117:e142-150.
24. Xiaowei Wang, Athanasia Spandidos, Huajun Wang et al. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucl. Acids Res*. 2012;40:44-9.
25. Oh P, Lobry C, Gao J et al. In vivo mapping of notch pathway activity in normal and stress hematopoiesis. *Cell stem cell*. 2013;13:190-204.
26. Challen GA, Boles NC, Chambers SM et al. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell stem cell*. 2010;6:265-278.
27. Jackson M, Axton RA, Taylor AH et al. HOXB4 can enhance the differentiation of embryonic stem cells by modulating the hematopoietic niche. *Stem cells*. 2012;30:150-160.
28. Guiu J, Shimizu R, D'Altri T et al. Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210:71-84.
29. Stier S, Cheng T, Dombkowski D et al. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*. 2002;99:2369-2378.
30. Varnum-Finney B, Brashem-Stein C, Bernstein ID. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood*. 2003;101:1784-1789.
31. Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M et al. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood*. 1998;91:4084-4091.
32. Watts KL, Delaney C, Humphries RK et al. Combination of HOXB4 and Delta-1 ligand improves expansion of cord blood cells. *Blood*. 2010;116:5859-5866.
33. Watts KL, Delaney C, Nelson V et al. CD34(+) expansion with Delta-1 and HOXB4 promotes rapid engraftment and transfusion independence in a *Macaca nemestrina* cord blood transplant model. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21:1270-1278.

34. Cordes R, Schuster-Gossler K, Serth K et al. Specification of vertebral identity is coupled to Notch signalling and the segmentation clock. *Development*. 2004;131:1221-1233.
35. Sengupta A, Banerjee D, Chandra S et al. Dereglulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia*. 2007;21:949-955.
36. Tanigaki K, Han H, Yamamoto N et al. Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nature immunology*. 2002;3:443-450.
37. Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC. Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nature immunology*. 2005;6:881-888.
38. Deschamps J, van Nes J. Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development*. 2005;132:2931-2942.
39. Clements WK, Kim AD, Ong KG et al. A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. *Nature*. 2011;474:220-224.
40. Trowbridge JJ, Guezguez B, Moon RT et al. Wnt3a activates dormant c-Kit(-) bone marrow-derived cells with short-term multilineage hematopoietic reconstitution capacity. *Stem cells*. 2010;28:1379-1389.
41. Copley MR, Babovic S, Benz C et al. The Lin28b-let-7-Hmga2 axis determines the higher self-renewal potential of fetal haematopoietic stem cells. *Nature cell biology*. 2013;15:916-925.
42. Han SM, Han SH, Coh YR et al. Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Experimental & molecular medicine*. 2014;46:e101.

Tables

Table1 Relative expression of ≥ 2 -fold up- or down-regulated gene following *HOXA4* or *HOXB4* overexpression in primary HSC (n = 2-3)

Gene	Name	Log2 Fold Change	
		HOXA4	HOXB4
≥ 2-fold upregulated genes by both HOXA4 and HOXB4			
<i>Dll1</i>	delta-like 1 (Drosophila)	3.13	3.18
<i>Zeb2</i>	zinc finger E-box binding homeobox 2	2.33	2.22
<i>Pou5f1</i>	POU class 5 homeobox 1	2.30	1.95
<i>Egr1</i>	early growth response 1	2.20	1.93
<i>Zic1</i>	Zic family member 1	2.19	1.42
<i>Sox2</i>	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2	2.12	1.67
<i>Egr2</i>	early growth response 2	2.03	2.28
<i>Dach1</i>	dachshund homolog 1 (Drosophila)	1.81	1.04
<i>Coll1a1</i>	collagen. type I. alpha 1	1.70	1.50
<i>Zfpml1</i>	zinc finger protein FOG family member 1	1.69	1.02
<i>Cxcr1</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 1	1.66	2.24
<i>Dlx1</i>	distal-less homeobox 1	1.65	1.21
<i>Nr2f2</i>	nuclear receptor subfamily 2 group F member 2	1.61	1.90
<i>Cd38</i>	CD38 molecule	1.54	2.24
<i>Pax1</i>	paired box 1	1.53	2.19
<i>Notch1</i>	notch 1	1.50	1.55
<i>Lmx1b</i>	LIM homeobox transcription factor 1 beta	1.48	3.57
<i>Itga2</i>	integrin. alpha 2 (CD49B alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	1.44	1.78
<i>Gpx8</i>	glutathione peroxidase 8 (putative)	1.44	2.47
<i>Lin28b</i>	lin-28 homolog B (C. elegans)	1.34	1.29
<i>Dlx2</i>	distal-less homeobox 2	1.33	1.64
<i>Thbs1</i>	thrombospondin 1	1.18	1.66
<i>Fzd1</i>	frizzled family receptor 1	1.03	2.20
≥ 2-fold upregulated genes by HOXB4 only			
<i>Cdx2</i>	caudal type homeobox 2	0.78	3.80
<i>Ccl3</i>	Chemokine (C-C Motif) Ligand 3	0.38	2.03
<i>Klf4</i>	Kruppel-like factor 4 (gut)	-0.17	1.97
<i>Slamf1</i>	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	0.96	1.91
<i>Timp3</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	-0.23	1.53
<i>Zbtb16</i>	zinc finger and BTB domain containing 16	-0.46	1.50
<i>Ebf1</i>	Early B-Cell Factor 1	-0.28	1.49
<i>EP300</i>	E1A binding protein p300	-0.75	1.46
<i>Pbx1</i>	pre-B-cell leukemia homeobox 1	0.75	1.25
<i>Dll3</i>	delta-like 3 (Drosophila)	0.49	1.15
<i>Hnf4a</i>	Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha	0.75	1.12
≥ 2-fold upregulated genes by HOXA4 only			
<i>Fzd4</i>	frizzled family receptor 4	3.06	0.94
<i>Jag1</i>	jagged 1	2.91	0.23
<i>Nr4a2</i>	nuclear receptor subfamily 4. group A. member 2	1.93	0.52
<i>Cdkn1a</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21. Cip1)	1.87	0.25

<i>Cxcr4</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	1.77	-0.33
<i>Hey1</i>	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	1.73	0.79
<i>Emcn</i>	endomucin	1.69	0.96
<i>Mef2c</i>	myocyte enhancer factor 2C	1.48	0.70
<i>Tgm2</i>	transglutaminase 2	1.43	-0.23
<i>Cited2</i>	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2	1.39	0.22
<i>Dtx1</i>	deltex homolog 1 (Drosophila)	1.38	0.61
<i>Nfyb</i>	nuclear transcription factor Y beta	1.38	-0.37
<i>Ikaros</i>	IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)	1.16	0.15
<i>Trim28</i>	tripartite motif containing 28	1.15	0.76
<i>Nsd1</i>	nuclear receptor binding SET domain protein 1	1.14	0.91
<i>Dnmt1</i>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	1.08	0.70
<i>Notch2</i>	notch 2	1.00	0.52

Inverse regulation by HOXA4 and HOXB4

<i>Sox4</i>	SRY (sex determining region Y)-box 4	1.11	-1.54
-------------	--------------------------------------	------	-------

Red and blue numbers indicate a ≥ 2 -fold up or down regulation respectively

Table 2 Relative expression of genes implicated in the Notch signaling pathway in HSC overexpressing *HOXA4* of *HOXB4* (n= 2-3)

Gene	Name	Log2 Fold Change	
		HOXA4	HOXB4
Notch receptors			
<i>Notch1</i>	notch 1	1.50	1.55
<i>Notch2</i>	notch 2	1.00	0.52
Notch ligands			
<i>Dll1</i>	delta-like 1 (Drosophila)	3.13	3.18
<i>Dll3</i>	delta-like 3 (Drosophila)	0.49	1.15
<i>Jag1</i>	jagged 1	2.91	0.23
Regulators			
<i>Dtx1</i>	deltex homolog 1 (Drosophila)	1.38	0.61
<i>Dtx2</i>	deltex homolog 2 (Drosophila)	0.88	0.09
<i>Dtx4</i>	deltex homolog 4 (Drosophila)	0.39	0.58
<i>Dlx1</i>	distal-less homeobox 1	1.65	1.21
<i>Dlx2</i>	distal-less homeobox 2	1.33	1.64
<i>Numb</i>	numb homolog (Drosophila)	-0.03	-0.09
Co-factors			
<i>Hdac1</i>	histone deacetylase 1	0.43	-0.59
<i>Hdac2</i>	histone deacetylase 2	0.46	-0.32
<i>EP300</i>	E1A binding protein p300	-0.75	1.46
Targets			
<i>Hes1</i>	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	0.39	-0.23
<i>Hey1</i>	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	1.73	0.79
<i>Runx1</i>	runt-related transcription factor 1	0.83	0.22
<i>Zfpml</i>	zinc finger protein FOG family member 1	1.69	1.02
<i>Kat2a</i>	K(lysine) acetyltransferase 2A	0.21	-0.43
<i>Ccnd1</i>	cyclin D1	0.75	-0.39
<i>Cdkn1a</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1.87	0.25
<i>Cd44</i>	CD44 molecule (Indian blood group)	0.95	0.59
<i>Nr4a2</i>	nuclear receptor subfamily 4 group A member 2	1.93	0.52
<i>Pax5</i>	paired box 5	0.59	-0.06
Genes related to the Wnt pathway who crosstalk with Notch			
<i>Fzd1</i>	frizzled family receptor 1	1.03	2.20
<i>Fzd4</i>	frizzled family receptor 4	3.06	0.94
<i>Egr1</i>	early growth response 1	2.20	1.93
<i>Sox2</i>	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2	2.12	1.67
<i>Sox4</i>	SRY (sex determining region Y)-box 4	1.11	-1.54
<i>Dvl1</i>	dishevelled segment polarity protein 1	0.50	-0.35

Red and blue numbers indicate a ≥ 2 -fold up or down regulation respectively

Figures and legend of the figures

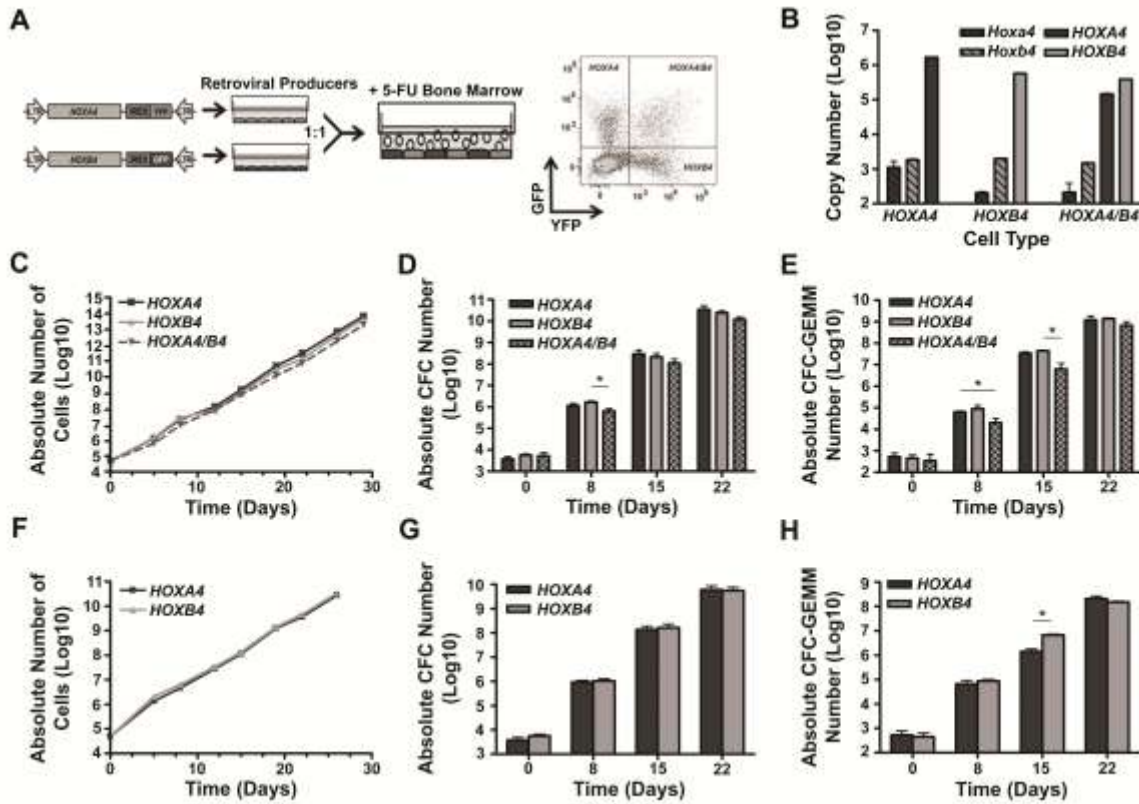


Figure 1

Figure 1 *In vitro* BM cultures (A) Overview of the *in vitro* experimental strategy including a representative flow cytometry profile showing cells expressing *HOXA4*-YFP, *HOXB4*-GFP or both. (B) Q-RT-PCR analysis for endogenous and overexpressed *HOXA4* and *HOXB4* genes in total BM cells transduced with *HOXA4*-YFP, *HOXB4*-GFP or both vectors. (C) Representative growth curves of individual cultures of total BM cells transduced with *HOXA4*-YFP, *HOXB4*-GFP or both (n=3). Number of (D) total myeloid progenitors and (E) primitive GEMM progenitors in individual BM cultures transduced with *HOXA4*-YFP, *HOXB4*-GFP or both vectors. (n=2) (F) Representative growth curve of *HOXA4*-YFP and *HOXB4*-GFP BM cells in co-cultures (n=3). Number of (G) total myeloid progenitors and (H) primitive GEMM progenitors in *HOXA4*-YFP and *HOXB4*-GFP in co-culture (n=2).

CFC: colony forming cell; GEMM: granulocytic/erythroid/megakaryocyte/monocyte.

* $P \leq 0.05$ 2-tailed Student t test; Data presented as mean \pm SD.

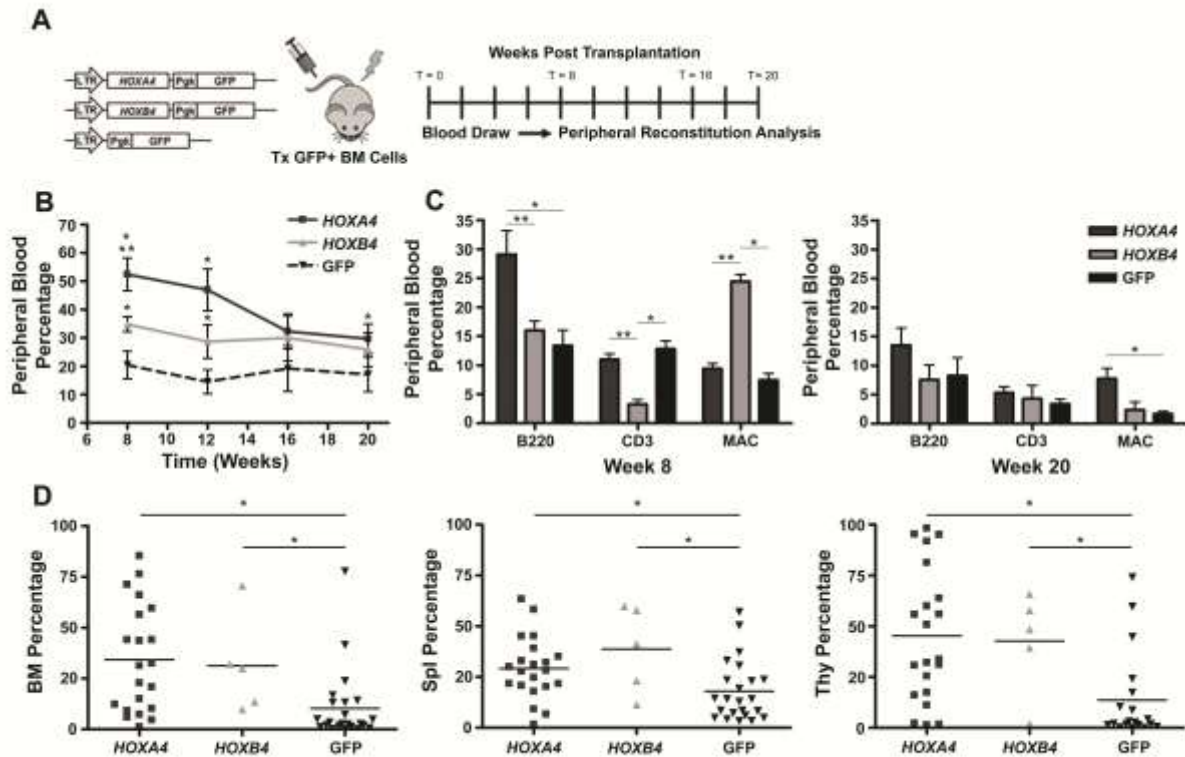


Figure 2

Figure 2 Hematopoietic reconstitution *in vivo* (A) Overview of the *in vivo* experimental strategy used in this study. (B) Engraftment (in %GFP) of *HOXA4* (n=15), *HOXB4* (n=5) and control chimeras (n=13) in the periphery over time. (C) Peripheral blood analysis of *HOXA4*, *HOXB4* and control transduced BM chimeras for myeloid and lymphoid lineage contribution at 8 weeks (left panel) and (20 weeks (right panel) reconstituted mice assessed by flow cytometry. B cells and T cells were detected using antibodies against B220 and CD3 surface markers, respectively. Antibody for MAC1 was used to detect myeloid cells. (D) Hematopoietic organ repopulation (in % GFP) of long-term (>20 weeks) *HOXA4*, *HOXB4* and control GFP chimeras by flow cytometry analysis.

BM: bone marrow; Spl: spleen; Thy: thymus; PB: peripheral blood

* $P \leq 0.05$ (over control); ** $P \leq 0.05$ (*HOXA4* vs *HOXB4*) 1-tailed (B) and 2-tailed (C and D) Student t test; Data presented as mean \pm SD.

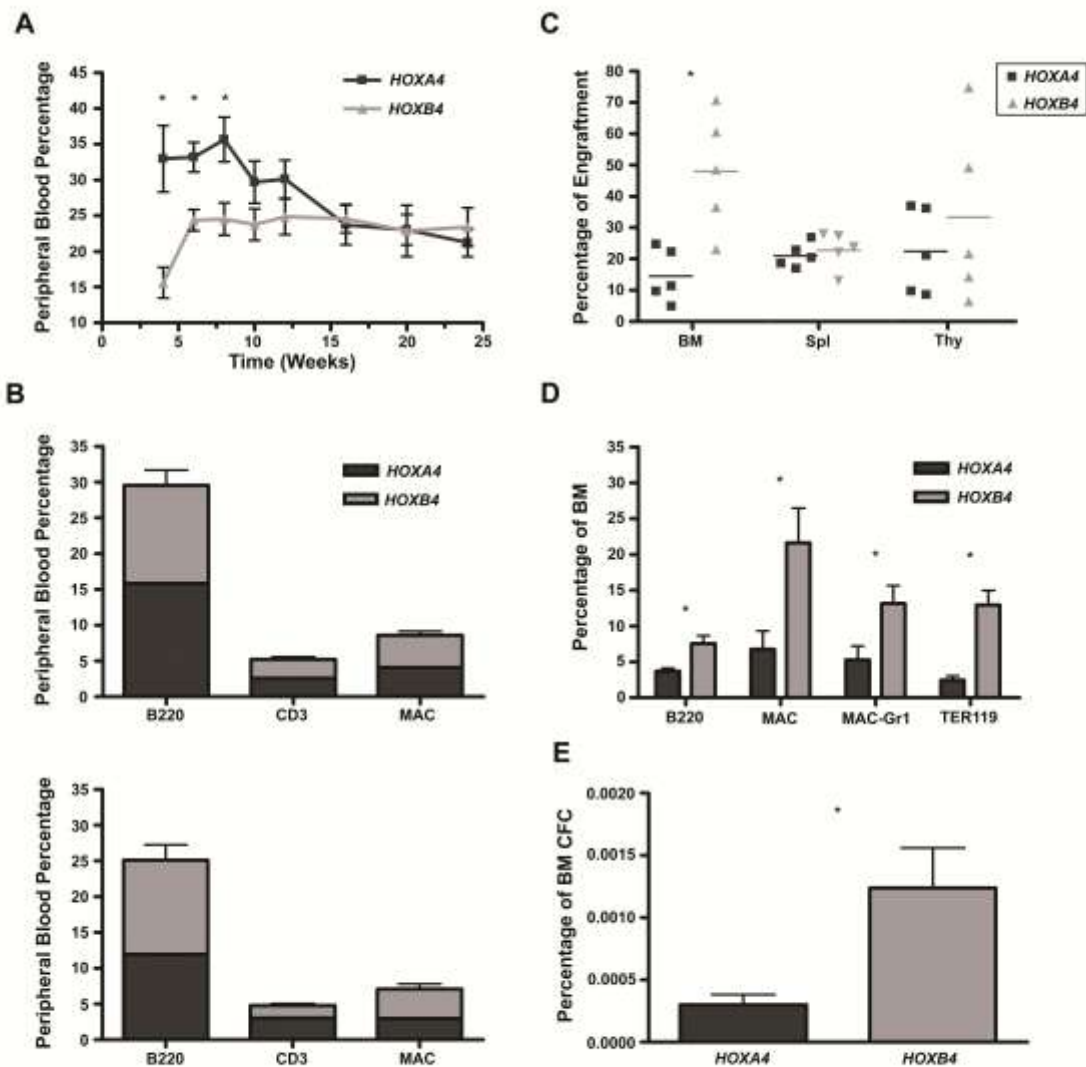


Figure 3

Figure 3 *HOXA4* and *HOXB4* in vivo competition (A) Engraftment of *HOXA4* (% YFP) and *HOXB4* (% GFP) in competitive chimeras (n=5) in the periphery over time. (B) Peripheral blood analysis of *HOXA4*, *HOXB4* and control chimeras for myeloid and lymphoid lineage contribution in short-term (8 weeks, top panel) and long-term (20 week, lower panel) reconstituted mice assessed by flow cytometry. B cells and T cells were detected using antibodies against B220 and CD3 surface markers, respectively. Antibody for MAC1 was used to detect myeloid cells. (C) Hematopoietic organ repopulation (in % GFP and YFP) of long-term (>20 weeks) competitive chimeras by flow cytometry analysis. (D) Flow cytometry analysis of lineage repopulation in BM of long-term (< 20 weeks) competitive chimeras using

antibodies against B220, MAC1, Gr1 and TER119 surface marker. **(E)** Frequency of *HOXA4* and *HOXB4* myeloid progenitor in BM of long-term (>20 weeks) competitive chimeras.

BM: bone marrow; Spl: spleen; Thy: thymus; PB: peripheral blood; CFC: colony forming cell

* $P \leq 0.05$ 2-tailed Student t test; Data presented as mean \pm SD.

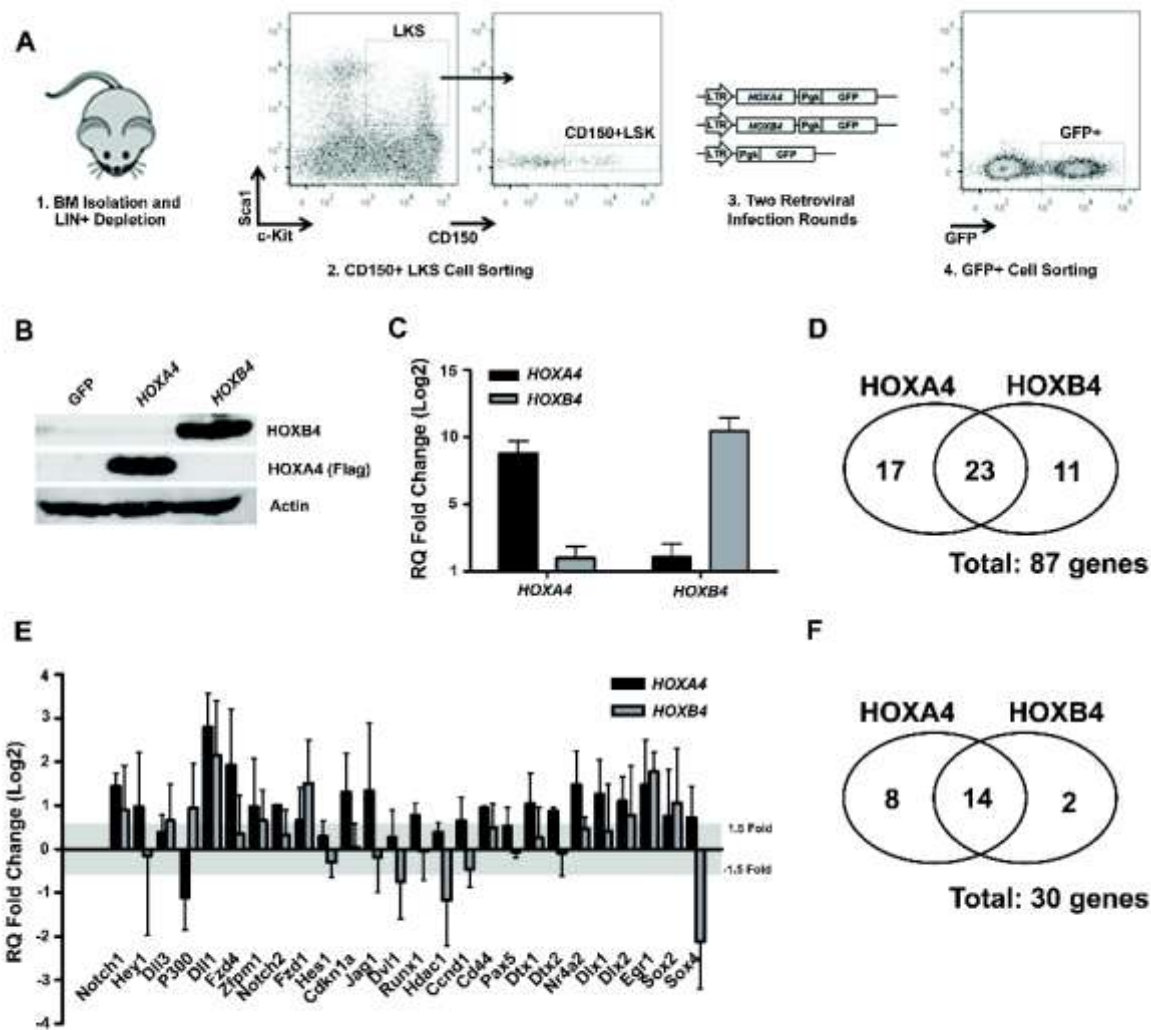


Figure 4

Figure 4 Candidate gene expression in primary HSC (n=2-3) (A) Overview of the experimental strategy used in this study and representation of *HOXA4*-GFP, *HOXB4*-GFP and control GFP retroviral vectors. (B) Western blot analysis for retroviral *HOXA4* or *HOXB4* expression in NIH-3t3 cells transduced with *HOXA4*, *HOXB4* or control vectors. (C) Log2 Fold change for *HOXA4* and *HOXB4* genes in sorted HSC (LIN⁻c-Kit⁺Sca1⁺CD150⁺) transduced with *HOXA4*, *HOXB4* compared to control vector. (D) Venn diagram showing the total number of genes that are ≥ 2 -fold up-regulated by *HOXA4* and/or *HOXB4* in HSC. (E) Log2 Fold change of candidate genes from the Notch signaling pathway in HSC overexpressing *HOXA4* or *HOXB4* compared to control HSC. Dark region corresponds to 1.5-

fold change value. **(F)** Venn diagram showing the total number of the Notch signaling Pathway genes that are ≥ 1.5 -fold up-regulated by HOXA4 and/or HOXB4 in HSC.

BM: bone marrow; LIN: lineage; RQ: relative quantification

Data presented as mean \pm SD.

Supplemental tables

Supplemental Table 1 Gene ontology of the selected candidate target genes

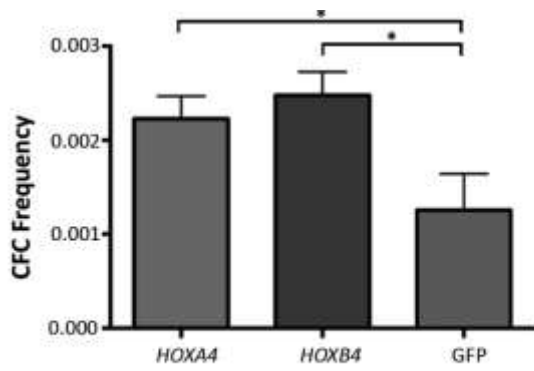
Notch signaling pathway
<i>Dll1, Dll2, Dlx1, Dlx2, Dtx1, Dtx2, Dtx4, Hes1, Hey1, Jag1, Notch1, Notch2, Numb, Sox2</i>
Cell cycle
<i>Ccnd1, Cdkn1a, Notch2, EP300, Pbx1, Rb1</i>
Regulation of transcription
<i>Ccna2, Cd38, Cited2, Coll1a1, Dach1, Dlx1, Dlx2, Dnmt1, Dvl1, Ebf1, Egr1, Egr2, Egr4, Foxa2, Fzd1, Fzd4, Hdac1, Hdac2, Hes1, Hey1, Hnf4a, Ikaros, Jag1, Klf4, Lin28b, Lmx1b, Mef2c, Meis1, Nfyb, Notch1, Notch2, Nr2f2, Nr4a2, Nsd1, EP300, Pax1, Pax5, Pbx1, Pou5fl, Rb1, Runx1, Smad7, Sox2, Sox4, Trim27, Trim28, Zbtb16, Zfpml</i>
Wnt signaling pathway
<i>Ccnd1, Cd44, Cdc42, Dvl1, Egr1, Fzd4, Hdac1, Hdac2, Sox2, Sox4, Zeb2</i>
Cell adhesion
<i>Cd34, Cd44, Cited2, Dpp4, Emcn, HES1, Itga2, Smad7, Thbs1</i>
Hematopoiesis
<i>Ccl3, Cd34, Cd38, cdkn1a, Cited2, Cxcr4, Dpp4, Dtx1, Egr1, Hes1, Ikaros, Jag1, Mef2c, Pax1, Runx1, Sox4, Zfpml</i>
Stem cell maintenance/differentiation
<i>Cdx2, Dll1, Hes1, Jag1, Klf4, Pou5fl, Sox2</i>
Cell fate
<i>Dll3, Hes1, Mef2c, Notch1, Pou5fl, Sox2</i>

Supplemental Table 2 Relative expression of selected candidates following *HOXA4* or *HOXB4* overexpression in primary HSC (n=2-3)

Gene	Log2 Fold Change		Gene	Log2 Fold Change	
	HOXA4	HOXB4		HOXA4	HOXB4
<i>Ccl3</i>	0.38	2.03	<i>Itga2</i>	1.44	1.78
<i>Ccna2</i>	0.47	0.21	<i>Jag1</i>	2.91	0.23
<i>Cend1</i>	0.75	-0.39	<i>Kat2a</i>	0.21	-0.43
<i>Cd34</i>	0.18	-0.44	<i>Klf4</i>	-0.17	1.97
<i>Cd38</i>	1.54	2.24	<i>Lin28b</i>	1.34	1.29
<i>Cd44</i>	0.95	0.59	<i>Lmx1b</i>	1.48	3.57
<i>Cdc42</i>	0.56	0.04	<i>Mef2c</i>	1.48	0.70
<i>Cdkn1a</i>	1.87	0.25	<i>Meis1</i>	0.53	0.63
<i>Cdx2</i>	0.78	3.80	<i>Nfyb</i>	1.38	-0.37
<i>Cited2</i>	1.39	0.22	<i>Notch1</i>	1.50	1.55
<i>Coll1a1</i>	1.70	1.50	<i>Notch2</i>	1.00	0.52
<i>Col4a1</i>	-0.32	-0.24	<i>Npm</i>	-0.04	-0.37
<i>Cxcr1</i>	1.66	2.24	<i>Nr2f2</i>	1.61	1.90
<i>Cxcr4</i>	1.77	-0.33	<i>Nr4a2</i>	1.93	0.52
<i>Dach1</i>	1.81	1.04	<i>Nsd1</i>	1.14	0.91
<i>Dll1</i>	3.13	3.18	<i>Numb</i>	-0.03	-0.09
<i>Dll3</i>	0.49	1.15	<i>P300</i>	-0.75	1.46
<i>Dlx1</i>	1.65	1.21	<i>Pax1</i>	1.53	2.19
<i>Dlx2</i>	1.33	1.64	<i>Pax5</i>	0.59	-0.06
<i>Dnmt1</i>	1.08	0.70	<i>Pbx1</i>	0.75	1.25
<i>Dpp4</i>	-0.09	-0.66	<i>Pdgfrb</i>	0.46	-0.98
<i>Dtx1</i>	1.38	0.61	<i>Pou5f1</i>	2.30	1.95
<i>Dtx2</i>	0.88	0.09	<i>Rb1</i>	0.63	0.69
<i>Dtx4</i>	0.39	0.58	<i>Runx1</i>	0.83	0.22
<i>Dvl1</i>	0.50	-0.35	<i>Slamf1</i>	0.96	1.91
<i>Ebf1</i>	-0.28	1.49	<i>Smad7</i>	0.00	-0.29
<i>Egr1</i>	2.20	1.93	<i>Sox2</i>	2.12	1.67
<i>Egr2</i>	2.03	2.28	<i>Sox4</i>	1.11	-1.54
<i>Egr4</i>	0.52	-0.09	<i>Tert1</i>	0.33	-0.33
<i>Emcn</i>	1.69	0.96	<i>Tgm2</i>	1.43	-0.23
<i>Fhl1</i>	0.34	0.88	<i>Thbs1</i>	1.18	1.66
<i>Foxa2</i>	0.87	0.02	<i>Timp3</i>	-0.23	1.53
<i>Fzd1</i>	1.03	2.20	<i>Tox</i>	0.74	-0.34
<i>Fzd4</i>	3.06	0.94	<i>Trim27</i>	0.55	0.05
<i>Gpx8</i>	1.44	2.47	<i>Trim28</i>	1.15	0.76
<i>Hdac1</i>	0.43	-0.59	<i>Vldlr</i>	0.63	0.17
<i>Hdac2</i>	0.46	-0.32	<i>Zbtb16</i>	-0.46	1.50
<i>Hes1</i>	0.39	-0.23	<i>Zeb2</i>	2.33	2.22
<i>Hey1</i>	1.73	0.79	<i>Zfpml</i>	1.69	1.02
<i>Hnf4a</i>	0.75	1.12	<i>Zic1</i>	2.19	1.42
<i>Ikaros</i>	1.16	0.15			

Log2 Fold-change relative to GFP transduced HSC

Supplemental figure



Supplemental Figure 1

Supplemental Figure 1 Frequency of myeloid progenitors in the BM of *HOXA4*, *HOXB4* or GFP transduced BM chimeras.

* $P \leq 0.05$ 1-tailed Student t test; Data presented as mean \pm SD.

Chapitre 4 : Article 3

Inability of *HOXB4* to enhance self-renewal of malignant B cells: favourable profile for the expansion of autologous hematopoietic stem cells

L'article présenté dans ce chapitre a été réalisé en collaboration avec le laboratoire du Dr. Denis Claude Roy. J'ai effectué plusieurs des expériences qui s'y retrouvent, notamment les essais de dilutions limites et de culture de cellules pro-B. J'ai aussi participé à la rédaction, à la mise en forme et à la correction de cet article.

Publié en janvier 2014 dans « Experimental Hematology »

Inability of *HOXB4* to enhance self-renewal of malignant B cells: favourable profile for the expansion of autologous hematopoietic stem cells

Marilaine Fournier,¹ Isabelle Savoie-Rondeau,¹ Fannie Larochelle,¹ Mona Hassawi,¹ Elena A. Shestakova,¹ Denis Claude Roy,^{1,2} and Janet J. Bijl^{1,2}

¹Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, QC, Canada;

²Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada;

MF and ISR contributed equally to this manuscript.

*Correspondence:

Dr. Janet J. Bijl, PhD,

Centre de Recherche l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont

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

Abstract

Leukemic stem cells share self-renewal properties and slow proliferation with hematopoietic stem cells. Based on expression signatures it has been suggested that these cells use the same molecular pathways for these processes. However, it is not clear whether leukemic stem cells also respond to factors known to enhance the self-renewal activity of hematopoietic stem cells. The transcription factor HOXB4 is known to induce expansion of mouse hematopoietic stem cells. The recombinant TAT-HOXB4 protein also expands human CD34⁺ cells. In this study we investigated whether overexpression of *HOXB4* could increase leukemic initiating cell numbers, an issue that is crucial to its clinical usage.

A transgenic mouse model for *E2A-PBX1* induced pre-B ALL was used in combination with *HOXB4* transgenic mice to test oncogenic interactions between *HOXB4* and *E2A-PBX1*. The frequency of leukemic initiating cells retrovirally overexpressing *HOXB4* was measured by transplantation at limiting dilution and evaluation of leukemia development in recipient mice. Moreover, human B cell lines were evaluated for their colony forming cell potential upon exposure to TAT-HOXB4 protein.

Our data with the mouse models show that *HOXB4* neither accelerates the generation of *E2A-PBX1* B cell leukemia nor expands the number of leukemia initiating cells. Additionally, the growth or colony forming cell proportions of human B cell lines was not changed by HOXB4, suggesting that human B leukemic initiating cells are not affected by HOXB4.

Key words: hematopoietic stem cells, *HOXB4*, *HOX*, leukemic stem cells, mouse B cell leukemia, bone marrow transplantation

Introduction

Bone marrow (BM) transplantation is used to treat leukemia and lymphoma or other hematological diseases. The full long-term regeneration of blood components is dependent on the presence of sufficient numbers of hematopoietic stem cells (HSC) in the graft. HSCs are a rare population of cells residing in the BM that can differentiate into specialized blood cells or self-renew to prevent exhaustion. Currently, most transplantations are performed using peripheral blood stem cells either autologous or from allogeneic compatible donors. However, the potential exploitation of mobilized autologous and cord blood stem cells is often limited by the low number of available stem cells to transplant. Therefore, in the last decade lots of efforts have been made to expand HSCs *ex vivo* to produce clinical meaningful doses of HSCs (reviewed in [1]). Initial investigations on panels of cytokines did not translate into improved engraftment in clinical trials. A second wave of studies explored the intrinsic molecular pathways relevant for self-renewal. Indeed, modulation of the Wnt and Notch signalling pathway have shown positive results for *ex vivo* expansion [2-4]. In addition, overexpression of developmental genes, such as *HOXB4* and more recently *SALL4* resulted in substantial expansions of HSCs *in vitro* [5-6]. The increase in HSCs following activation of Wnt signalling using Wnt3a is associated with elevated levels of *HOXB4* [2] expression suggesting that self-renewal induced by Wnt is mediated by *HOXB4*. Interestingly, a combination of *HOXB4* and Delta-1 ligand generated even higher numbers of repopulating human CD34⁺ cord blood cells than either of these factors alone [7]. So far, *HOXB4* has been most widely studied and it appears to be a critical factor in HSC self-renewal with a high clinical potential either alone or in combination with other factors.

HOXB4 is a member of the class I homeobox (*HOX*) gene family that are master control transcription factors in developmental programs including hematopoiesis [8, 9]. Multiple *HOX* genes, including *HOXB4*, are highly expressed in the HSC compartment [10-12]. Mice transplanted with *HOXB4* transduced HSCs showed a very competitive and robust engraftment without leukemia development, resultant from the expansion of HSCs [13]. Initial reports documented that BM chimeras for *HOXB4* had 50-fold higher numbers of HSCs able to regenerate the hematopoietic compartment after transplantation [14]. *HOXB4* HSCs continue to expand following transfer to secondary and tertiary recipients, resulting in

cumulative expansions of 900-fold [1, 14, 15]. Importantly, HSC numbers did not expand beyond the levels normally found in mice, indicating that *HOXB4* mediated expansion did not affect the function of HSCs to respond to external signals. Of relevance for therapeutic application, mouse HSCs overexpressing *HOXB4* could expand up to 40-fold during a 12-days period of culture with preservation of their regenerative function [5]. In addition, human HSCs also have been shown to expand *in vitro* with *HOXB4*, although levels of expansion were more modest than those observed in mice [7, 16, 17]. *In vivo* studies using a large animal model confirmed that repopulation of *HOXB4* overexpressing cells was superior to competitive control cells, resulting in a faster recovery of all hematopoietic lineages including platelets and neutrophils, which are normally lagging behind [17, 18]. A shorter delay in establishment of hematopoietic cell numbers to normal levels might dramatically improve the success of BM transplantations; because patients remain in particular vulnerable to infections during this period. Importantly for its future use in clinical settings, *HOXB4* protein has also been shown to enhance mouse and human HSC numbers *in vitro* [16, 19, 20]. Our group has shown that recombinant TAT-*HOXB4* protein could expand human HSCs, and exerted its effect through preservation of symmetrical divisions while the global number of divisions was decreased [21].

Ex vivo expansion of HSCs using recombinant *HOXB4* could be used in multiple clinical settings. This is critical considering that patients exposed to intensive chemotherapy or radiation therapy cannot mobilize sufficient numbers of HSCs to allow them to undergo autologous transplantation. Stem cell expansion could increase successful transplantation of such patients. However, there is also a risk that the expansion process would not only increase healthy, but also malignant stem cells. Indeed, while radio- and chemotherapy eradicates most leukemic cells *in vivo*, malignant relapse is the most frequent complication, indicating that leukemia initiating cells (L-IC), also referred to as leukemic stem cells, can escape these treatments. Both normal and malignant stem cells have the ability to self-renew to prevent their exhaustion. In fact, it has been hypothesized that L-ICs and normal HSCs might use similar molecular pathways [22]. It is thus critical to test whether *HOXB4* could expand malignant cells, in particular L-ICs. We previously demonstrated that *HOXB4* has some activity as collaborator to oncogene *E2A-PBX1* in the induction of T cell leukemia in

mice [23]. PBX proteins form a complex with HOX proteins and are known to enhance their DNA binding specificity [24]. The motif enabling interaction with HOX proteins is retained in the E2A-PBX1 fusion [25] and deregulation of the HOX-PBX pathway is thought to contribute to human *E2A-PBX1* B cell leukemia. Thus it is likely that *E2A-PBX1* positive malignant B cells might be in particular susceptible to HOXB4. Therefore, we evaluated the effect of *HOXB4* overexpression on the L-IC frequency of mouse B cell leukemias induced by *E2A-PBX1* [26]. Our results demonstrate that *HOXB4* overexpression does not increase the numbers of L-ICs nor accelerate the initiation of *E2A-PBX1* B cell leukemia. Additionally, *HOXB4* overexpression or exposure to TAT-HOXB4 protein did not influence the proliferation of human leukemic B cell lines independent of their endogenous *HOXB4* levels. Thus the inability of *HOXB4* to expand B lineage malignant stem cells corroborates the low incidence of *HOXB4* positive human leukemias and supports its role as merely weak oncogenic collaborator. These findings identify HOXB4 as a very promising factor for the expansion of human healthy HSCs and are crucial to its clinical usage in the context of B cell malignancies.

Material and methods

Mice

C57Bl/6 inbred wild type mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Transgenic mice for the E2A-PBX1 fusion protein and HOXB4 were generated using the pLIT3 vector, containing TCR β promoter and μ enhancer elements driving the expression of the transgene in lymphoid cells as previously described [23, 26]. *E2A-PBX1* transgenic mice were kept on a *CD3 ϵ ^{-/-}* background to prevent development of T cell leukemia [26]. Mice were bred and maintained in a specific pathogen free animal facility of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center. All animal protocols were approved by the local Animal Care Committee.

Human B cell lines

Human pre-B cell line 697, naturally harboring the t(1;19) translocation, was kindly given by Dr Cees Murre (University of California, San Francisco, CA, USA) and cultured in

Optimem (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) in the presence of 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) and 10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, USA). Non-Hodgkin lymphoma B cell lines Raji, DHL-16 and Namalwa were obtained from the ATCC cell bank and were cultured in RPMI-1640 (Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada) medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 ug/ml streptomycin (both Wisent Inc.). Medium for Raji cells contained additionally: Sodium Pyruvate 1 mM, Hepes 10 mM, glucose 4.5 g/L and sodium bicarbonate 1.5 g/L (all from Life Technologies). Cultures with or without 40 nM recombinant TAT-HOXB4 protein (produced as described before [19]) were performed in bags (American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD, USA), which has been adapted from previously described methods [27]. Bags were placed on an orbital shaker in a standard incubator. TAT-HOXB4 or the carrier were kept at 4°C and automatically injected every 4 hours during the entire culturing period [19]. Cultures were initiated at 2 or 4×10^5 cells/ml, counted and re-started at initial concentration every two days. For clonogenic progenitor assays, between 150 and 600 cells were plated in complete methylcellulose medium (Methocult, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) and evaluated at day 15.

Immunofluorescence

TAT-HOXB4 internalization was measured by immunofluorescence using a monoclonal antibody directed against HOXB4 (Abcam Inc., Toronto, ON, Canada) and revealed using a secondary anti-rabbit AlexaFluor594 coupled antibody and Dapi (Life Technologies) to color nuclei. Fluorescence was detected on a Zeiss FluoView confocal microscope.

Western Blot Analysis

Cells were lysed in cell lysis buffer [50 mM Tris-HCL pH8.0, 100 mM NaCL, 1% Triton X 100, 5 mM EDTA (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, UsA)] with Protease inhibitor Cocktail (BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada). Proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Membranes were

incubated with a monoclonal anti-HOXB4 antibody (1:1000 dilution; Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA) followed by a secondary polyclonal anti-rat antibody coupled with horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, CA, USA). For Actin detection, membranes were incubated with a monoclonal anti-Actin (1:1000 dilution, Millipore, Temecula, CA, USA) followed by a secondary polyclonal anti-mouse antibody coupled with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Westgrove, PA, USA)

Flow Cytometry and Cell Sorting

Phenotypic characterizations of primary mouse B cell cultures were performed using the following conjugated antibodies: CD45R/B220-APCCy7, CD43-APC, IgM-biotin, CD11b-PE (BioLegend, San Diego, CA, USA or BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada). Biotinylated antibodies were detected with PerCP5.5 conjugated streptavidin (BioLegend). Mortality levels were determined using Dapi (Life Technologies). FACS analyses were performed on a FACS LSR II using FACSDiva software (BD Bioscience) or FACS Calibur (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). Data were further analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). All cell sortings have been performed on a FACS Aria II with FACSDiva software.

B cell cultures and retroviral infections

Non-leukemic and leukemic B cells derived from *E2A-PBX1* transgenic mice were pre-stimulated overnight either in the presence of Interleukine (IL)-7 (Life Technologies) or a cocktail of IL-7, Flt3 (Orf Genetics, Reykjavik, Iceland) and Steel factor (all at 10 ng/ml), respectively, followed by retroviral gene transfer during three days co-culture on packaging cell line GP+E-86 [28] engineered to stably express MSCV-*HOXB4*-GFP or control MSCV-GFP retroviruses. Non-leukemic cells were then cultured in OptiMem media supplemented with IL-7 (10 ng/ml), 10% B cell tested FBS (Stem Cell Technologies), 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol, 1X Penicillin-Streptomycin and 50 µg/ml Gentamycin. Doubling times were calculated according to Roth V. 2006 <http://www.doubling->

time.com/compute.php. Clonogenic progenitor assays were performed as previously described [1-, 29] by plating 10^3 and 10^4 cells from *HOXB4* or control B cell cultures in IMDM (Life Technologies) containing 1% Methocel MC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 30% FBS selected for B cells, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 2 mM glutamine and 10 ng/ml IL-7.

Limiting Dilution Assay

Transfected *E2A-PBX1* leukemic B cells were sorted for GFP and transplanted at limiting dilution in sublethally irradiated (600 cGy) C57Bl/6 recipient mice. Mice received one of the following doses: 1000, 500, 100, 50, 20, 10 or 5 cells. For each dose three or four mice were transplanted. The frequency of L-IC was calculated using the extreme limiting dilution analysis (ELDA) method for stem cells <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/index.html>, which is based on Poisson statistics [30, 31].

Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from human B cell lines using Trizol reagent (Life Technologies) and treated with DNase-I (Life Technologies). cDNA was prepared from total RNA using MMLV-Reverse Transcriptase and random primers (both from Life Technologies) according to the manufacturer's protocols. Quantitative Reverse Transcriptase (Q-RT)-PCR was performed on an ABI 7500 thermal cycler (Applied Biosystems, Streetville, ON, Canada) using SYBR Green (Applied Biosystems). Oligonucleotides for all *Hox* genes were used according to previously validated sequences [32]. Triplicates were accepted in a 0.5 CT range. Copy numbers are calculated according to the following formula $2^{(38-\Delta\Delta CT)}$.

Statistics

Comparisons of survival curves were performed with a logrank test. Difference in L-IC frequencies was determined using a Chi-square test. All other statistical analyses are performed using a Student T-test with unequal variance (1-tail, unless indicated otherwise).

Results

HOXB4 transduced non-malignant E2A-PBX1 B cell cultures

To fully assess the effect of *HOXB4* on the growth of pre-leukemic and leukemic B cells we used a transgenic mouse model for pre-B cell leukemia induced by the fusion protein E2A-PBX1 in a *CD3ε^{-/-}* background, which has been previously described by us [26]. These *E2A-PBX1* transgenic mice produce T cell leukemias in a T cell competent background and we have demonstrated before that *HOXB4* collaborates with *E2A-PBX1* in the development of such T cell leukemias [23]. Thus we reasoned that if *HOXB4* has any potential to accelerate B cell leukemogenesis this should be revealed in the context of the oncogene *E2A-PBX1*. To test whether *HOXB4* could enhance the growth in response to IL-7 of non-leukemic *E2A-PBX1* B cells in culture, B220⁺ B cells were sorted from BM of healthy three months old *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* mice and co-cultured on retroviral producers to stably express *HOXB4*-GFP or GFP (Figure 1A). For both conditions high transfection efficiencies were obtained ($70.35 \pm 15.91\%$ for *HOXB4* and $81.30 \pm 6.79\%$ for GFP). Cells were seeded at $0.5\text{-}1.0 \times 10^6$ cells/ml and grown for three weeks in pro-B cell medium. Enforced overexpression of *HOXB4* resulted in an up to 2000-fold net expansion of *E2A-PBX1* pro-B cells in 20 days, while only a maximum of 100-fold expansion over the initial numbers were observed for GFP cultures (Figure 1B). The higher growth rate of *HOXB4/E2A-PBX1* pro-B cells resulted in a significantly shorter doubling time ($P=0.023$; Figure 1C). The enhanced growth of the *HOXB4/E2A-PBX1* pro-B cultures was supported by a higher number of IL-7 responding clonogenic B cell progenitors compared to control cultures. These primitive B cells represent less than 1% of the *HOXB4* or GFP cultures. Even after 3 weeks the progenitors expanded in the presence of *HOXB4* in contrast to a decrease of progenitors in control cultures (Figure 1D). Transplantation of 1 or 4×10^6 cells of *HOXB4/E2A-PBX1* or GFP/ *E2A-PBX1* day 16 pro-B cell cultures into sublethally irradiated recipient mice did not result in leukemia development for over three months. At seven weeks few transplanted GFP⁺ cells were detected in the periphery (Supplemental Table 1), and no leukemia was detected during the monitoring period (data not shown). Thus *HOXB4* confers an enormous proliferative potential to non-leukemic *E2A-PBX1* B cells *in vitro* through expansion of clonogenic B cell progenitors, but does not transform *E2A-PBX1* transgenic B cells.

In vivo evaluation of HOXB4 interactions with E2A-PBX1 in B cell leukemia induction

To investigate a potential collaboration between *HOXB4* and *E2A-PBX1* in the development of B cell leukemia *HOXB4* transgenic mice were crossed with two different lines of *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* transgenic mice (line 19 and 23) to obtain compound *HOXB4/E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* mice co-overexpressing *HOXB4* and *E2A-PBX1* in lymphoid cells. Cohorts of single *E2A-PBX1* and compound *HOXB4/E2A-PBX1* transgenic mice were monitored for the development of leukemia. Mice of both *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* transgenic lines developed B cell leukemia with an average latency time of 293 ± 151 and 410 ± 159 days for lines 19 and 23, respectively (Figure 2A and B). The penetrance of the leukemia in line 19 was complete, while a few mice of line 23 died of non-hematological causes at an old age, which corresponds to our earlier observations [26] (Figure 2C). As expected from prior studies, single *HOXB4/CD3ε^{-/-}* transgenic mice did not develop leukemia ([23] and data not shown). Interestingly, the age at which compound *E2A-PBX1/HOXB4/CD3ε^{-/-}* mice succumbed to B cell leukemia was not significantly different from the age single *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* transgenic mice displayed disease (P=0.858 line 19 and P=0.909 for line 23). This was not the result of activation of endogenous *Hoxb4* expression in *E2A-PBX1* B cell leukemias, which were rather low to medium (Supplemental Figure 1). On the contrary, leukemia penetrance tended to be decreased when *HOXB4* was co-overexpressed with *E2A-PBX1* in B cells. These data indicate that *HOXB4* does not collaborate with *E2A-PBX1* in the induction of B cell leukemia.

The effect of HOXB4 on B cell leukemia initiating cells

L-ICs are thought to cycle slowly and self-renew as do HSCs. It has been postulated that the same molecular pathways for self-renewal are active in L-ICs as in normal HSCs. Frequently observed relapse of leukemia following current treatments indicates that L-ICs could escape elimination, likely as result of their low proliferation activity. Such leukemia cell persistence and *HOXB4* mediated expansion of residual L-ICs could enhance leukemia relapse. Assessment of changes in the size of the L-IC population induced by *HOXB4* is therefore critical prior to the use of *HOXB4* in the clinic. To determine whether *HOXB4* could expand L-ICs, the *E2A-PBX1* induced B-ALL mouse model was further exploited. Leukemic

cells derived from BM of a moribund *E2A-PBX1* mouse were transduced with *HOXB4*-GFP or GFP retroviral vectors (Supplemental Figure 2A and B). GFP⁺ cells were sorted and cell doses at limiting dilution were transplanted in sublethally irradiated wild type mice to determine the frequency of L-ICs in *HOXB4* and GFP transduced *E2A-PBX1* leukemias (Figure 3A). Mice that received a graft containing L-ICs became lethally ill between 20 and 60 days. The lowest cell dose that could re-initiate the leukemia in recipient mice and thus contained at least one L-IC was 50 cells for both *HOXB4*-GFP and GFP (Figure 3B). Two out of seven mice that received 50 GFP transduced leukemic cells succumbed of leukemia, while only one out of seven mice that received *HOXB4*-GFP leukemic cells became sick. Interestingly, L-IC frequencies in *HOXB4*-GFP leukemic cells were significant lower (1 in 5005) than in GFP transduced leukemic cells (1 in 1111; P=0.038; Chi-square test; Figure 3C). FACS analysis showed that all leukemias expressed the surface markers CD19, B220, CD43, and were negative for IgM (Figure 3D). However, re-transplantation of *HOXB4*-GFP and GFP *E2A-PBX1* B cell leukemia at limiting dilution showed a higher frequency of L-IC in *HOXB4/E2A-PBX1* leukemia (Supplemental Figure 3). Thus although overexpression of *HOXB4* in mouse B cell leukemic cells did not enhance L-IC frequency *in vitro*, higher numbers of L-ICs were obtained *in vivo* following leukemia re-initiation.

Evaluation of *HOXB4* overexpression and *HOXB4* protein exposure on human B cell lines

The effect of *HOXB4* overexpression was further investigated on human malignant B cell lines to determine whether these correspond to the murine findings. First, the endogenous expression of *HOXB4* mRNA was measured in four human B cell lines derived from pre-B cell leukemia 697, which naturally harbours the translocation encoding for E2A-PBX1, and non-Hodgkin lymphomas (NHL) (Namalwa, Raji and DHL-16). Q-RT-PCR showed that *HOXB4* was expressed in all four cell lines (Figure 4A and B). Cell lines DHL-16 and 697 expressed low to medium levels of *HOXB4* (CT values 30 and 33, corresponding to 150 and 32 copies per 50 ng total RNA, respectively), while both Raji and Namalwa expressed very high levels of endogenous *HOXB4* transcripts (CT values <25, corresponding to >10000 copies per 50 ng RNA). Protein levels for *HOXB4* correlated with the mRNA expression (Figure 4B). The low expressing *HOXB4* pre-B cell leukemia line 697 was selected to evaluate whether overexpression of *HOXB4* could enhance its proliferation kinetics.

Retrovirally mediated expression of *HOXB4*-GFP in 697 cells resulted in a 200-fold increase in *HOXB4* RNA levels over non-infected cells, resulting in comparable levels of *HOXB4* as measured in Raji cells (Figure 4A-C). *HOXB4*-GFP or GFP retroviral transduced 697 cells were seeded in duplicate at a concentration of 10^6 cells/ml and growth was measured for three weeks. In two independent experiments no differences were observed in the growth rate or doubling times of *HOXB4* and GFP cultures (Figure 4D and E). It is now well recognized that cell lines cultures are not completely uniform, showing some degree of differentiation. Hematopoietic progenitors have the potential to induce colonies, and primary BM cultures are normally supported by the presence of these cells. The ability of cell lines to induce colonies might thus be attributed to more primitive cells on which the maintenance of the cell line depends. Indeed only a proportion of the 697 cells (30%) were able to induce colonies in semi-solid medium. We took advantage of this property to evaluate the effect of *HOXB4* on the colony forming cell (CFC) potential of 697 cells. Frequencies of CFCs for both GFP and *HOXB4*-GFP transduced 697 cells were not significantly different (Figure 4F). Interestingly, a fraction of both GFP and *HOXB4* colonies were clearly larger in size, indicating an increased proliferation potential per cell. The proportion of these large colonies tend to be increased in *HOXB4* cultures ($3.9 \pm 3.7\%$ for *HOXB4* vs $1.7 \pm 1.0\%$ for GFP), but did not reach significance (Figure 4F, $P=0.15$). Moreover, the number of cells produced in large colonies of both *HOXB4*-GFP and GFP colonies was equal (data not shown). Thus enforced overexpression of *HOXB4* in human pre-B leukemia cell line did not affect the proliferation rate or the colony forming potential of these cells.

There are still safety issues regarding the use of retroviral vectors in the clinic. Therefore, we have previously generated a recombinant HOXB4 protein to which the TAT sequence of HIV virus was attached allowing the rapid entry of HOXB4 into the cell. The TAT-HOXB4 recombinant protein conserved the potential to expand mouse [19] as well as human HSCs [27, 33]. To test whether HOXB4 expands human malignant B cells we exposed B cell lines Raji and DHL-16 to TAT-HOXB4 protein, because these lines express different levels of endogenous *HOXB4* (Figure 4A-C). First, using immunofluorescence, we validated the intracellular localisation of TAT-HOXB4 in Raji cells. As soon as 15 minutes after the addition of the protein to the medium TAT-HOXB4 was detected in the cytoplasm and in the nucleus. After 30 minutes the localisation of TAT-HOXB4 was predominantly in the nucleus

(Figure 4G). Three independent experiments showed that the growth rate of both B cell lines was not changed in the presence of TAT-HOXB4 during eight days of culture (the period determined necessary for clinical expansion of HSCs) (Figure 4H). Doubling times calculated for these cell lines in the presence and absence of HOXB4 were not significantly different (Figure 4I). Furthermore, the frequency of CFCs was not altered in the presence of TAT-HOXB4 at the end of the culturing period (Figure 4J). These data show that human malignant B cell lines with different intrinsic levels of *HOXB4* expression do not respond to exogenous administered TAT-HOXB4 with increased proliferation or CFC numbers, suggesting that human L-ICs or progenitors from patients with NHL or B cell leukemia will not be enhanced following HSC expansion with HOXB4 protein.

Discussion

BM transplantation is often the best treatment option for patients with relapsed NHL or other hematopoietic neoplasias. The success of BM transplantation is dependent on the number of HSCs in the graft. In particular, patients with NHL are excellent candidates for transplantation, because they still have healthy HSCs. The major advantage of such autologous BM transplantation is the absence of graft-vs-host disease, a lethal disease in many cases. However, numbers of HSCs obtained from peripheral blood after mobilization are limited and need to be enhanced to provide sufficient numbers to sustain long-term repopulation in adult patients. HOXB4 is a prominent candidate to clinically expand HSCs and in this study we evaluated whether the properties of HOXB4 to augment the HSCs would also apply to L-ICs, thus jeopardizing its use for autologous HSC expansion. Using a transgenic mouse model for *E2A-PBX1* induced B cell leukemia, we first showed that *HOXB4* does not collaborate with *E2A-PBX1* in the development of B cell leukemia indicating that activation of the *HOXB4* pathway in B cells does not complement *E2A-PBX1* in the generation of L-ICs. This is quite interesting as *HOXB4* has shown oncogenic interactions with *E2A-PBX1* in the development of *E2A-PBX1* induced T cell leukemias [23]. Moreover, we recently demonstrated that another member of the *HOX* gene family, *HOXA9*, does collaborate with *E2A-PBX1* in B cell leukemogenesis [34], but in contrast to *HOXB4*, this gene was not able to accelerate *E2A-PBX1* induced T cell leukemias [23]. Also cooperative oncogenic activity has been demonstrated for *HOXA9* and *E2A-PBX1* in myeloid leukemia [35], but this is not clear for

HOXB4. The oncogenic activity of *HOXB4* is very weak in myeloid leukemia and is only apparent in concert with activation of a limited set of oncogenes, such as *Meis1* [36], *LMO2* and *prdm16* [37]. The fact that occasional myeloid leukemias developed in mice that received BM cells co-infected with *HOXB4* and antisense *PBX1* [38] might argue against a cooperative role for *HOXB4* and *E2A-PBX1* in myeloid leukemia. These data indicate that the potential oncogenic activities of *HOXB4* are dependent on the presence of specific oncogenes and in a permissive cellular context.

In addition, our *in vitro* data with non-malignant *E2A-PBX1* B cells also demonstrated that pro-B cells overexpressing *HOXB4* did not acquire leukemic properties despite enhanced growth as result of an increase in IL-7 responding progenitor cells. This is the first time that *HOXB4* is shown to have a direct impact on B cell progenitor numbers. Previously, human CD34⁺ cultures were shown to have increased B cell production in the context of *HOXB4* overexpression as result of the expansion of primitive CD34⁺ lympho-myelo progenitor cells, while late lymphoid progenitors were unaffected by *HOXB4* [39]. Importantly, retroviral mediated overexpression of *HOXB4* in established *E2A-PBX1* B cell leukemias did not increase the frequency of L-IC nor did *HOXB4* overexpression result in an accelerated re-initiation of the disease. On the contrary, the frequency of L-IC was significantly lower in leukemic cells following transduction with *HOXB4* compared to those transduced with GFP retroviral vectors. However, a significant increase of *HOXB4* L-ICs was observed following re-transplantation of *HOXB4* leukemic cells at limiting dilution (Supplemental Figure 3), indicating that the microenvironment might play a critical role in *HOXB4* expansion of L-ICs. Furthermore, exposure or overexpression of *HOXB4* in human B cell lines did not affect the overall growth or the capacity of primitive cells to induce colonies in semi-solid medium. Thus, although L-ICs are thought to use the same self-renewal pathways as HSCs, our data clearly demonstrate that mouse L-ICs do not respond to *HOXB4* with expansion as observed in normal HSCs. Moreover, the inability of *HOXB4* to modulate the proportion of the primitive cell fraction in human malignant B cell lines strongly indicate that these results can be extrapolated to human primary B L-ICs as well. The absence of promotion of leukemia also confirms the safety of HSC expansion using *HOXB4*.

The lack of response to *HOXB4* seem to be independent of the activation status of *HOXB4* as B cell lines expressing either high or medium/low levels of endogenous *HOXB4*

behaved similarly. Of note is that *E2A-PBX1* oncogenic collaborator *HOXA9* was expressed at lower levels than *HOXB4* in these tested cell lines (Supplemental Figure 4). Based on observations from several studies evaluating oncogenic and proliferating properties in different cell types it now becomes clear that *HOX* genes function requires a permissive cellular milieu. Moreover, the biological function of *HOXB4* is not the same in different cell types. For example, the expansion of HSCs by *HOXB4* is not simply a result of increased proliferation as seen in fibroblasts, but are more likely the consequence of the promotion of self-renewal divisions, because primitive *HOXB4*⁺ hematopoietic cells proliferate slower than their controls [38]. Support for a difference in the molecular context of L-ICs and HSCs came from a study in which gene expression signatures of HSCs and L-ICs were directly compared [22]. This group reported that numerous genes involved in basic cellular and stem cell functions were aberrantly expressed in L-ICs, which may account for their different response to *HOXB4*. In addition, it has been recently reported that Notch signalling has a divergent effect on HSCs and L-ICs. Using a retroviral BM transplantation model of *Notch*-induced T cell leukemia causes an initial expansion of HSC and loss of stem cell quiescence, which was followed by a progressive loss of LT-HSCs. A simultaneous increase in T cell progenitors suggest that high Notch signalling promotes T cell development at the expense of other lineages as well as stem cell self-renewal. On the other hand Notch induced the generation and maintenance of L-IC in T-ALL indicating that the requirements for Notch in self-renewal of HSCs and L-ICs are different, which may involve the absence or presence of c-Myc [40].

In conclusion we show that L-ICs of B cell origin are not permissive to *HOXB4* expansion, which paves the way to clinically expand autologous HSCs from patients suffering B cell malignancies with TAT-*HOXB4*. However, it still remains to be determined whether leukemic stem cells from other hematopoietic lineages could respond to *HOXB4*.

Support and financial disclosure declaration

This work was supported by funds from the Canadian Cancer Society (grant #020399), the Leukemia & Lymphoma Society of Canada, the Thé Cell Network and the Fonds de Recherche du Québec-Santé. MF is a recipient of an award from the Cole Foundation and the

Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal. Conflict of interest disclosure: the authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank Martine Dupuis for sorting and assistance in flow cytometry. We are also grateful to the staff of the animal facility to manage and take care of the mice. Caroline Carrier is thanked for irradiation of the animals. Dr. Guy Sauvageau is thanked for providing the *Hoxb4* and *E2A-PBX1* transgenic mice and Marc Lussier for his efforts to assure high quality supplies of TAT-HOXB4 protein.

Reference list

1. Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* 2004;23: 7223-32.
2. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423: 409-14.
3. Mayani H. Notch signaling: from stem cell expansion to improving cord blood transplantation. *Expert Rev Hematol* 2010;3: 401-4.
4. Liu J, Sato C, Cerletti M, Wagers A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol* 2010;92: 367-409.
4. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 2002;109: 39-45.
6. Aguila JR, Liao W, Yang J, Avila C, Hagag N, Senzel L, et al. SALL4 is a robust stimulator for the expansion of hematopoietic stem cells. *Blood* 2011;118: 576-85.
7. Watts KL, Delaney C, Humphries RK, Bernstein ID, Kiem HP. Combination of HOXB4 and Delta-1 ligand improves expansion of cord blood cells. *Blood* 2010;116: 5859-66.
8. Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 2007;26: 6766-76.
9. Krumlauf R. Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes. *Bioessays* 1992;14: 245-52.
10. 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.

11. Bijl J, Thompson A, Ramirez-Solis R, Krosl 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.
12. 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.
13. Krosl JK, Faubert A, Sauvageau G. Molecular basis for stem-cell self-renewal. *Hematol J* 2004;5 Suppl 3: S118-S121.
14. 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.
15. Krosl 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;18: 561-71.
16. Amsellem S, Pflumio F, Bardin 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;9: 1423-7.
17. Zhang XB, Schwartz JL, Humphries RK, Kiem HP. Effects of HOXB4 overexpression on ex vivo expansion and immortalization of hematopoietic cells from different species. *Stem Cells* 2007;25: 2074-81.
18. Watts KL, Nelson V, Wood BL, Trobridge GD, Beard BC, Humphries RK, et al. Hematopoietic stem cell expansion facilitates multilineage engraftment in a nonhuman primate cord blood transplantation model. *Exp Hematol* 2012;40: 187-96.
19. Krosl J, Austin P, Beslu N, Kroon E, Humphries RK, Sauvageau G. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med* 2003;9: 1428-32.

20. Tang Y, Chen J, Young NS. Expansion of haematopoietic stem cells from normal donors and bone marrow failure patients by recombinant hoxb4. *Br J Haematol* 2009;144: 603-12.
21. Krosl J, Austin P, Beslu N, Kroon E, Humphries RK, Sauvageau G. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med* 2003;9: 1428-32.
22. Majeti R, Becker MW, Tian Q, Lee TL, Yan X, Liu R, et al. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106: 3396-401.
23. Bijl J, Krosl J, Lebert-Ghali CE, Vacher J, Mayotte N, Sauvageau G. Evidence for Hox and E2A-PBX1 collaboration in mouse T-cell leukemia. *Oncogene* 2008.
24. Chang CP, Brocchieri L, Shen WF, Largman C, Cleary ML. Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Mol Cell Biol* 1996;16: 1734-45.
25. Kamps MP. E2A-Pbx1 induces growth, blocks differentiation, and interacts with other homeodomain proteins regulating normal differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997;220: 25-43.
26. Bijl J, Sauvageau M, Thompson A, Sauvageau G. High incidence of proviral integrations in the Hoxa locus in a new model of E2a-PBX1-induced B-cell leukemia. *Genes Dev* 2005;19: 224-33.
27. Csaszar E, Gavigan G, Ungrin M, Therien C, Dube P, Fethiere J, et al. An automated system for delivery of an unstable transcription factor to hematopoietic stem cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 2009;103: 402-12.
28. Markowitz D, Hesdorffer C, Ward M, Goff S, Bank A. Retroviral gene transfer using safe and efficient packaging cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 1990;612: 407-14.

29. Fournier M, Lebert-Ghali CE, Krosi 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.
30. Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorf PM, Eaves AC, Eaves CJ. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87: 8736-40.
31. Hu Y, Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods* 2009;347: 70-8.
32. 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;101: 1558-65.
33. Huang CH, Chen PM, Lu TC, Kung WM, Chiou TJ, Yang MH, et al. Purified recombinant TAT-homeobox B4 expands CD34(+) umbilical cord blood and peripheral blood progenitor cells ex vivo. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16: 487-96.
34. 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.
35. Thorsteinsdottir U, Krosi J, Kroon E, Haman A, Hoang T, Sauvageau G. The oncoprotein E2A-Pbx1a collaborates with Hoxa9 to acutely transform primary bone marrow cells. *Mol Cell Biol* 1999;19: 6355-66.
36. Pineault N, Abramovich C, Ohta H, Humphries RK. Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol* 2004;24: 1907-17.
37. Zhang XB, Beard BC, Trobridge GD, Wood BL, Sale GE, Sud R, et al. High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector. *J Clin Invest* 2008;118: 1502-10.

38. Cellot S, Krosl J, Chagraoui J, Meloche S, Humphries RK, Sauvageau G. Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in Hoxb4hiPbx1(10) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2007;35: 802-16.
39. Haddad R, Pflumio F, Vigon I, Visentin G, Auvray C, Fichelson S, et al. The HOXB4 homeoprotein differentially promotes ex vivo expansion of early human lymphoid progenitors. *Stem Cells* 2008;26: 312-22.
40. Chiang MY, Shestova O, Xu L, Aster JC, Pear WS. Divergent effects of supraphysiological Notch signals on leukemia stem cells and hematopoietic stem cells. *Blood* 2012.

Figures and legends to the figures

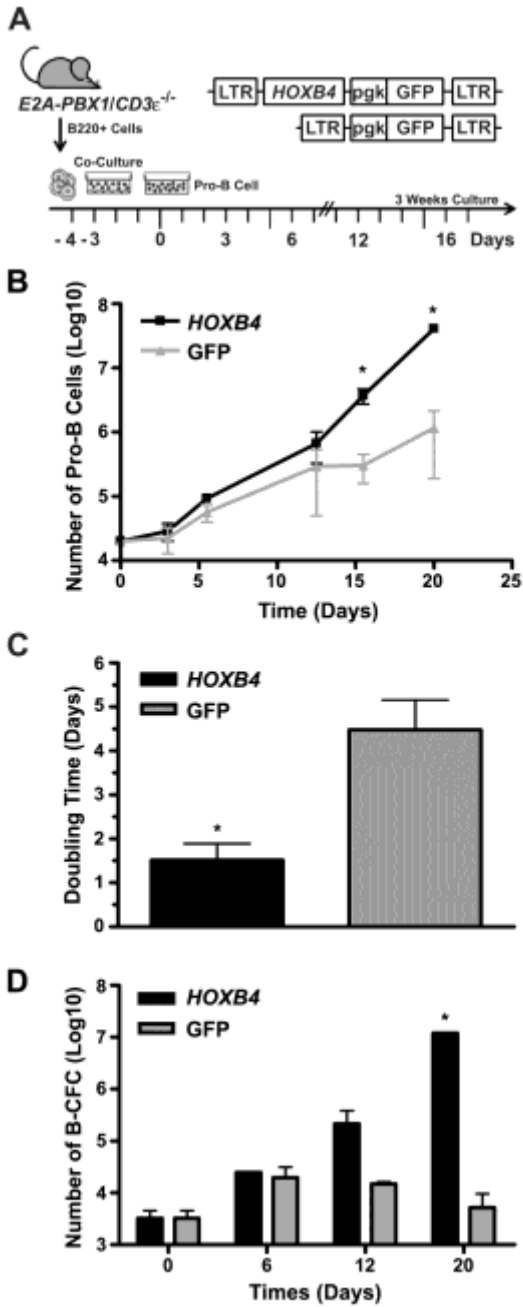


Figure 1

Figure 1 *In vitro* expansion of *HOXB4* and GFP transduced *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* B cells.

(A) Schematic overview of the experimental design and the retroviral vectors. (B) Growth curves for *E2A-PBX1* pro-B cell cultures transduced with *HOXB4*-GFP and GFP retroviral vectors (at T=15, P=0.04; T=20, P=0.0007) Numbers were corrected for the fraction of GFP

positive cells (> 70% for both *HOXB4* and GFP cultures) **(C)** Doubling times for *HOXB4*-GFP and GFP positive *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* pro-B cell cultures (P=0.023). **(D)** Bar graph depicting the average of B cell progenitors in *HOXB4*-GFP and GFP transduced *E2A-PBX1* pro-B cell cultures (at T=20, P=0.0005). Note that only GFP positive colonies were counted. Data presented in Figure 1 are based on two independent experiments. In total three independent experiments were performed.

* P<0.05

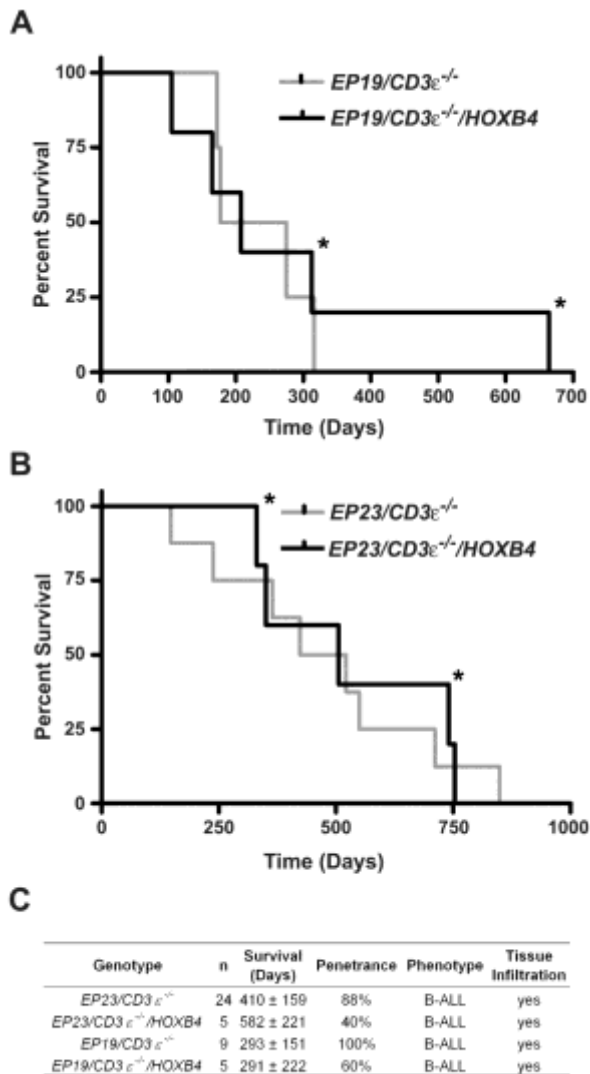


Figure 2

Figure 2 Survival curves for compound *E2A-PBX1/HOXB4* transgenic mice.

Kaplan-Meyer plots for single *E2A-PBX1* and compound *E2A-PBX1/HOXB4* transgenic mice generated using (A) *E2A-PBX1/CD3 $\epsilon^{-/-}$* transgenic line 19 and (B) transgenic line 23. Single and compound transgenic mice cohorts included in the survival curves were littermates. *E2A-PBX1* transgenics (n = 4; line 19) and (n = 8; line 23); *E2A-PBX1/HOXB4* transgenics (n = 5; line 19) and (n = 5; line 23) (C) Details on leukemia for mice cohorts with indicated genotype. Data for the single *E2A-PBX1* transgenic mice from a previously published cohort [26] were additionally incorporated.

EP = *E2A-PBX1*. * Mice that were sacrificed for non-hematological reasons.

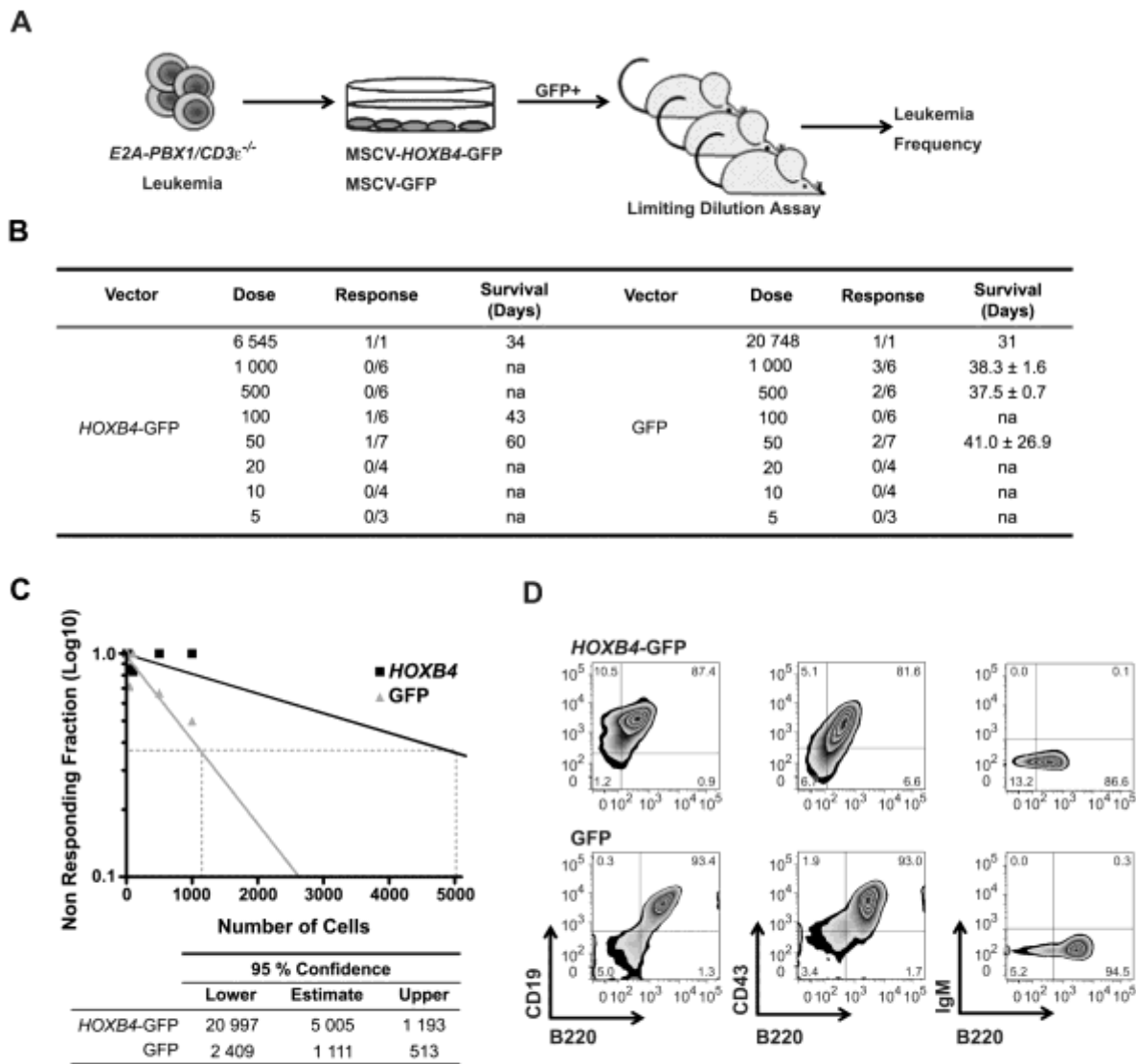


Figure 3

Figure 3 Limiting dilution analyses for *HOXB4*-GFP and GFP *E2A-PBX1/CD3ε*^{-/-} leukemic cells. (A) Overview of the experimental strategy used to determine frequency of L-ICs. (B) Table showing the fraction of mice that developed leukemia and the average survival time for each dose transplanted with *HOXB4*-GFP (left panel; n=21 total) or GFP (right panel; n=21 total) transduced *E2A-PBX1/CD3ε*^{-/-} leukemic cells. (C) Evaluation of L-IC frequency by limiting dilution analysis for *HOXB4*-GFP or GFP *E2A-PBX1/CD3ε*^{-/-} leukemic cells, using Poisson statistics. L-IC is defined as the cell dose that gives 37% of negative mice [where the horizontal dotted line (37%) crosses the curve]. Note that the highest dose for each

group was used as control for leukemia re-initiation and was excluded for frequency calculations. **(D)** Representative FACS profiles showing the B cell phenotype of *HOXB4* and control leukemia.

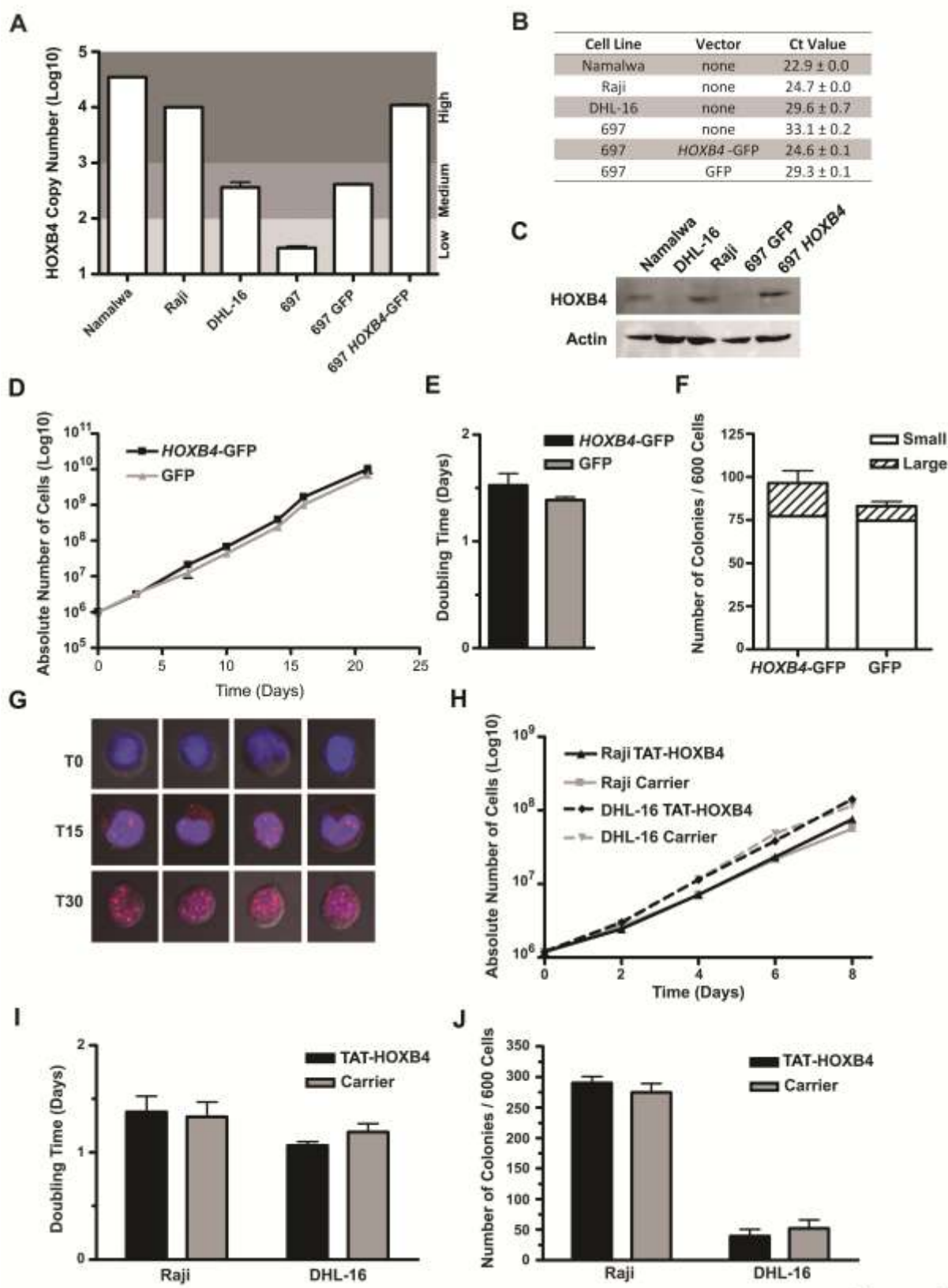


Figure 4

Figure 4 Evaluation of *HOXB4* overexpression or exposure to TAT-*HOXB4* on growth of human B cell lines. RNA expression of *HOXB4* in cell lines Namalwa, Raji, DHL16, 697 and 697 transduced with either *HOXB4*-GFP or GFP presented as **(A)** copy numbers or **(B)** Ct values, normalized for GAPDH (Ct=17). **(C)** Western blotting for *HOXB4*. **(D)** Representative growth curves for *HOXB4*-GFP and GFP transduced B cell line 697. **(E)** Average doubling time of *HOXB4*-GFP and GFP 697 B cells (n=3). **(F)** Average number of CFCs in *HOXB4*-GFP (100 ± 25) and GFP (85 ± 17) transduced B cell line 697 per 600 cells (n=6; P=0.23). **(G)** Internalization of TAT-*HOXB4* protein by Raji cells at 0 (T0), 15 (T15) and 30 minutes (T30) following administration. **(H)** Representative growth curves showing absolute number of Raji (n=4) and DHL-16 (n=2) cells treated for 8 days with TAT-*HOXB4* protein or carrier as control. **(I)** Average doubling time of Raji (n=4) and DHL-16 (n=2) cells treated with TAT-*HOXB4* protein or carrier. **(J)** Number of CFCs per 600 plated Raji (n=16) and DHL16 (n=8) cells treated with TAT-*HOXB4* protein or carrier.

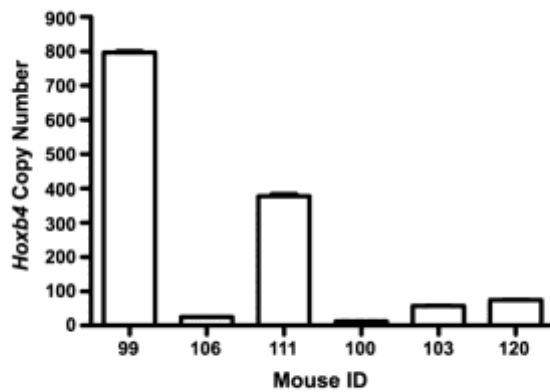
Supplemental table

Supplemental Table 1: Monitoring of Transplanted *HOXB4* and GFP *E2A-PBX1* Pro-B Cells in Peripheral Blood

Cell Type	Vector	Dose	n	Survival	GFP Percentage	
					Week 3	Week 7
Day 16 Pro-B Cells	MSCV- <i>HOXB4</i> -GFP	1.0 x 10 ⁶	3	100%	0.29 ± 0.27	0.10 ± 0.04
	MSCV- <i>HOXB4</i> -GFP	4.0 x 10 ⁶	2	50%*	0.18 ± 0.26	0.16
	MSCV-GFP	1.0 x 10 ⁶	2	100%	0.81 ± 0.86	0.38 ± 0.25
	MSCV-GFP	0.8 x 10 ⁶	1	100%	0.46	0.13

*No GFP+ cells detected in hematopoietic organs

Supplemental figures and legends to the supplemental figures

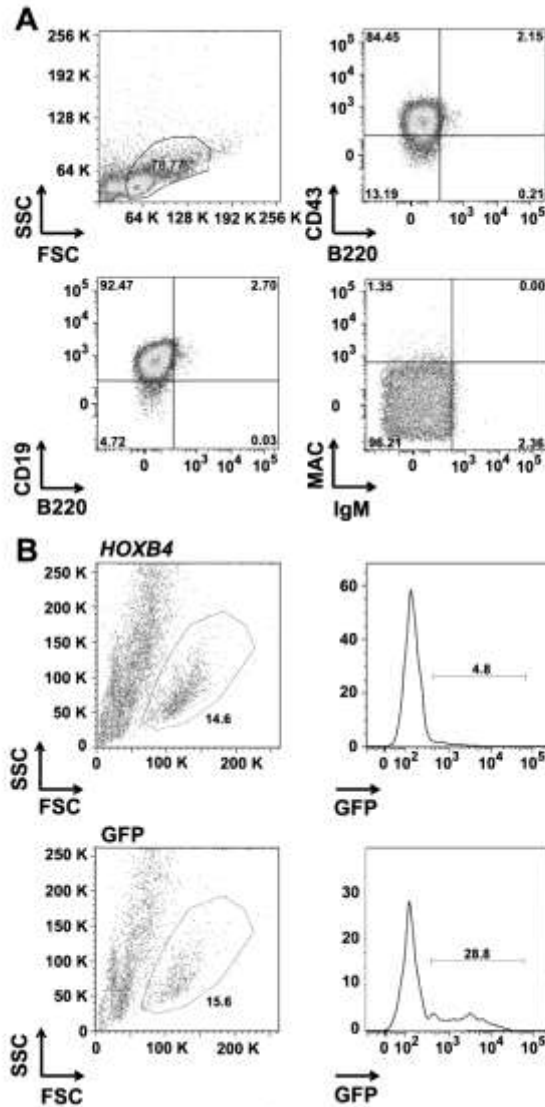


Supplemental Figure 1

Supplemental Figure 1 Endogenous levels of *Hoxb4* expression in *E2A-PBX1* B cell leukemia.

mRNA expression levels of endogenous *Hoxb4* given in copy numbers for 6 individual *E2A-PBX1* B cell leukemia, normalized for Gapdh (Ct=19).

ID= Identity



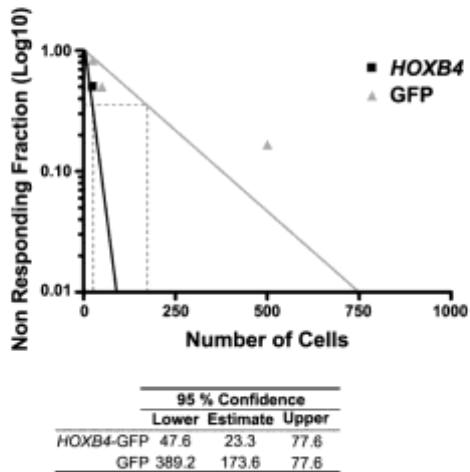
Supplemental Figure 2

Supplemental Figure 2 Phenotype and transduction efficiency of primary *E2A-PBX1* B cell leukemia.

(A) FACS profiles showing the B cell phenotype of the primary *E2A-PBX1* leukemia used in *HOXB4*-GFP and GFP limiting dilution assays. (B) Sorting plots showing the *HOXB4*-GFP (upper panel) and GFP (lower panel) transduction efficiency of *E2A-PBX1* leukemia.

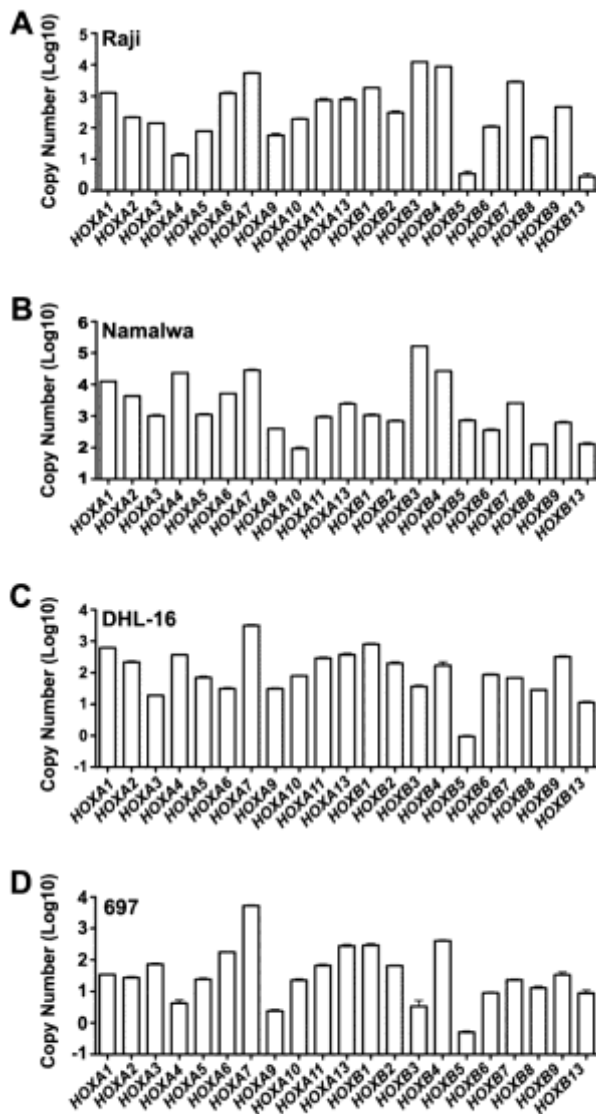
A

Vector	Dose	Response	Survival (Days)	Vector	Dose	Response	Survival (Days)
<i>HOXB4</i>	1 000	6/6	23.7 ± 1.8	GFP	1 000	6/6	19.0 ± 0.0
	500	6/6	25.2 ± 3.8		500	5/6	18.8 ± 0.4
	50	6/6	32.7 ± 7.5		50	3/6	20.7 ± 2.9
	25	3/6	41.0 ± 5.3		25	1/6	35.0

B**Supplemental Figure 3**

Supplemental Figure 3 Limiting dilution analysis for *HOXB4*-GFP and GFP *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* secondary leukemia.

(A) Table showing the fraction of mice that developed leukemia and the average survival time for each dose of *HOXB4*-GFP (left panel; n=24) and GFP (right panel; n=24) secondary leukemia. (B) Evaluation of L-IC frequency by limiting dilution analysis for *HOXB4*-GFP and GFP secondary *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* leukemic cells, using Poisson statistics. L-IC is defined as the cell dose that gives 37% of negative mice [where the horizontal dotted line (37%) crosses the curve]. (P=0.00027)



Supplemental Figure 4

Supplemental Figure 4 Endogenous levels of *HOXA* and *HOXB* genes expression in human B cell lines.

HOXA and *HOXB* mRNA expression in copy number in cell lines (A) Raji, (B) Namalwa, (C) DHL-16 and (D) 697, normalized for GAPDH (Ct=17).

Chapitre 5 : Discussion et conclusion

La nécessité de développer des moyens sûrs et efficaces pour expandre les CSH *in vitro* pour les traitements de transplantation est bien établie en milieu clinique, considérant l'augmentation de l'incidence des leucémies et lymphomes. Les résultats présentés dans les chapitres 2 à 4 font des gènes *HOXA4* et *HOXB4* de bons candidats pour développer de telles thérapies. Ils permettent aussi d'identifier des mécanismes permettant à ces gènes d'atteindre cet objectif via l'identification de leurs gènes cibles. Ces mécanismes peuvent également être étudiés pour leur potentiel à expandre directement les CSH. Cette thèse permet ainsi d'établir plus profondément le rôle des gènes *HOX* du paralogue 4 sur l'autorenouvellement des CSH.

5.1 Expansion des cellules souches hématopoïétiques par les gènes *HOX* du paralogue 4

Les gènes du *HOX* du paralogue 4, *HOXC4*, et plus particulièrement *HOXB4*, sont connus dans la littérature pour leur capacité à expandre efficacement les CSH *in vivo* et *in vitro*. (Voir sections 1.6.3 et 1.6.2 respectivement) Les résultats de l'article présenté au chapitre 2 démontrent pour la première fois l'augmentation de l'autorenouvellement des CSH suite à la surexpression rétrovirale d'un gène du même paralogue, *HOXA4*.

5.1.1 Expansion des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques par *HOXA4*

Les études d'expression des gènes *HOX* dans les cellules hématopoïétiques primitives en expansion et le fait que le gène *Hoxa4* soit important pour la capacité de reconstitution des CSH de foie fœtal dans des essais de transplantation en situation de compétition, en faisaient un candidat potentiel intéressant pour l'expansion *in vitro* des CSH. Pour valider cette hypothèse, la surexpression de *HOXA4* a été effectuée dans des cellules de moelle osseuse murines. Nous avons ainsi montré que *HOXA4* permet d'expandre 6,6 fois les CSH *in vitro* sur une période de culture d'une semaine. La surexpression de *HOXA4* induit aussi une forte expansion des progéniteurs myéloïdes, en particulier les plus primitifs. Les CSH obtenues suite à cette expansion étaient parfaitement fonctionnelles et permettaient une reconstitution polyclonale et non biaisée du système hématopoïétique des receveurs irradiés. Ceci est intéressant puisque la surexpression de *HOXB4* dans des chimères murines mène à une

reconstitution du sang périphérique disproportionnée vers la lignées myéloïde avec 2,8 fois plus de cellules myéloïdes MAC-1⁺ comparativement à 1,6 et 1,8 fois moins de cellules lymphoïdes B220⁺ et CD3⁺ respectivement (Beauchemin, 2008). Des résultats comparables ont aussi été observés dans la moelle osseuse de ces chimères. La surexpression de *HOXC4* dans les cellules CD34⁺ humaines mène aussi à un débalancement des colonies érythroïdes versus les CFC-GM comparativement au contrôle (Daga et al., 2000). *HOXA4* pourrait donc permettre une reconstitution du système hématopoïétique plus normale suite à une transplantation, particularité qui présente un avantage certain pour son utilisation dans un contexte thérapeutique.

Nous avons aussi démontré que *HOXA4* permettait d'expandre les progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes et lymphoïdes dans différents contextes. En effet, nous avons observé une forte expansion de CFC *HOXA4*⁺ en culture comparativement au CFC contrôles. De plus l'effet de *HOXA4* était plus important pour les progéniteurs les plus primitifs, les CFC-GEMM, qui étaient en mesure d'effectuer des divisions d'autorenouvellement et de se différencier pour former des colonies mixtes, ce qui indique que la surexpression de *HOXA4* n'interfère pas avec les programmes de différenciation de ces progéniteurs. Nous avons également observé une expansion des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes *in vivo*. Il est intéressant de noter qu'alors qu'une expansion des progéniteurs myéloïdes les plus primitifs était observée *in vitro*, la surexpression de *HOXA4* menait à une expansion des progéniteurs de cellules B sensibles à l'IL-7 (CFC-B), alors qu'elle n'avait aucun effet sur le progéniteur de cellules B plus primitif, le *Withlock-Witte*. L'effet de *HOXA4* sur ces progéniteurs, particulièrement les CFC-B, n'était pas connu et diffère de l'effet de *HOXB4*. En effet, il est reconnu que les chimères *HOXB4*⁺ ont plus de progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes, mais ce phénotype est causé par une augmentation du nombre de progéniteurs multipotents qui sont à leur origine (Haddad et al., 2008; Sauvageau et al., 1995). Finalement, il a été montré que de hauts niveaux d'expression de *HOXB4* dans les cellules CD34⁺ de sang de cordon affectaient la différenciation myéloérythroïde en plus de réduire le rendement de la reconstitution des cellules B (Schiedlmeier et al., 2003). Ces résultats qui pourraient soulever une limite importante pour l'utilisation clinique de *HOXB4* ont toutefois été obtenus par surexpression rétrovirale qui entraîne des niveaux d'expression élevés et soutenus, ce qui ne serait pas le cas

avec une autre méthode d'administration, telle que l'administration de la protéine recombinante TAT-HOXB4.

5.1.2 Étude comparative de la surexpression de *HOXA4* par rapport à *HOXB4* sur les cellules souches hématopoïétiques

Les conditions expérimentales affectent beaucoup les résultats obtenus, particulièrement dans les essais hématopoïétiques, d'où l'importance de comparer un résultat donné à un contrôle ayant été effectué dans les mêmes conditions. Suite aux résultats de l'article présenté au chapitre 2 montrant que tout comme *HOXB4*, *HOXA4* menait à une meilleure expansion *in vitro* que le contrôle et ce, dans un ordre comparable à ce qui avait précédemment été démontré avec *HOXB4*, nous avons mis en place un essai permettant la comparaison directe de la surexpression de *HOXA4* et *HOXB4*. Ainsi, les résultats de l'article présenté au chapitre 3 ne montrent aucune différence dans l'expansion des cellules de moelle osseuse surexprimant *HOXA4* ou *HOXB4* en culture, ni dans l'expansion des progéniteurs myéloïdes présents dans ces dernières. Ceci peut s'expliquer par la très forte homologie de séquence qui existe entre *HOXA4* et *HOXB4* et les autres gènes du paralogue 4, particulièrement au niveau de l'homéodomaine, de la séquence de liaison à PBX et de la séquence N-terminale (Iacovino et al., 2009). Des comparaisons directes entre *HOXB4* et ses paralogues ont aussi été effectuées dans différentes études. Un modèle de cellules ES surexprimant les gènes du paralogue 4 a montré une prolifération comparable de cellules hématopoïétiques associée à une expansion similaire des CFC-GEMM (Iacovino et al., 2009). La surexpression du gène *HOXC4* permet également une expansion aussi efficace des cellules humaines CD34⁺ que la surexpression de *HOXB4* (Auvray et al., 2012). Ces résultats indiquent qu'*in vitro*, en l'absence de signaux extrinsèques provenant du microenvironnement des CSH *in vivo*, le potentiel intrinsèque de prolifération et de différenciation des CSH est comparable au sein des gènes *HOX* du paralogue 4.

À l'inverse, la comparaison de la surexpression de *HOXA4* et *HOXB4* *in vivo* a permis d'identifier des différences notables dans la reconstitution hématopoïétique. En effet, les CSH *HOXA4*⁺ ont montré une meilleure reconstitution périphérique à court terme associée à une meilleure contribution à la reconstitution lymphoïde B comparativement à *HOXB4*. Étant

donné l'hétérogénéité du bassin de CSH, il est possible que *HOXA4* n'agisse pas sur le même type de CSH que *HOXB4*. Il a par exemple été montré que la population SP pouvait être séparée en deux sous-populations; l'une enrichie en CSH-LT et plus prône à la différenciation myéloïde et l'autre davantage proliférative et permettant une meilleure reconstitution lymphoïde B (Challen et al., 2010). *HOXB4* pourrait ainsi agir plus spécifiquement sur la première et *HOXA4* sur la seconde. Une autre possibilité qui pourrait expliquer la meilleure reconstitution à court terme serait qu'*HOXA4* permet l'expansion de progéniteurs très primitifs tels que les CSH-ST ou les MPP.

Il est à noter que dans l'article du chapitre 2, aucune différence dans la reconstitution périphérique n'avait été observée entre les CSH *HOXA4*⁺ et contrôles. Une explication possible est la quantité de cellules souche transplantées qui est trop élevée dans notre première étude pour permettre la distinction des différents sous-types de CSH. En effet, pour identifier des différences dans la différenciation des CSH, un nombre minimal allant jusqu'à une seule CSH doit être transplanté. En transplantant entre 5 et 15 CSH dans la seconde étude, il nous a ainsi été possible d'identifier des différences passées inaperçues dans l'étude initiale. Des différences dans la reconstitution hématopoïétique de la moelle osseuse et dans la périphérie ont aussi été observées entre les différentes conditions expérimentales (chimères individuelles vs chimères compétitives) de l'article du chapitre 3. Étant donné que seule la transplantation ou non de cellules de moelle de soutien diffère entre ces deux modèles, il est possible qu'un certain biais entre ces expériences ait mené à ces différences.

5.1.3 Comparaison de l'expansion des cellules souches hématopoïétiques par les gènes *HOX* du paralogue 4 et les autres méthodes d'expansion

Il est extrêmement difficile de comparer les résultats de différentes études relativement à l'expansion de CSH. En effet, il existe plusieurs façons de caractériser les CSH et progéniteurs, et les différences, même mineures aux conditions expérimentales de culture *in vitro*, affectent beaucoup les résultats obtenus. La composition en cytokines et en facteurs de croissance des milieux de culture utilisés par exemple, est une source de variation importante. Le type de cellules à l'origine des cultures, la période durant laquelle elles sont cultivées et les manipulations effectuées avant l'ensemencement des cultures constituent

Tableau 2 : Niveaux d'expansion des cellules souches hématopoïétiques *in vitro* obtenues par différentes méthodes

Gène / Molécule	Espèce	Méthode d'administration	Cellules d'origine	Méthode d'évaluation	Expansion	Référence
<i>HOXB4</i>	Souris	Surexpression rétrovirale	Moelle osseuse	CRU	8 fois en 6 jours	(Antonchuk et al., 2002)
TAT- <i>HOXB4</i>	Souris	Protéine recombinante	Moelle osseuse	CRU	5 à 6 fois en 4 jours	(J. Krosl et al., 2003a)
<i>HOXB4</i>	Humain	Cellules stromales MS-5	CD34 ⁺ CD38 ^{lo}	SRC	2,5 fois en 14 jours	(Amsellem et al., 2003)
TAT- <i>HOXB4</i>	Humain	Protéine recombinante	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ^{lo}	SRC	2 fois en 4 jours	(G. Krosl et al., 2004)
<i>IGF-2</i>	Souris	Protéine recombinante	SP CD45 ⁺ Sca-1 ⁺	CRU	7,8 fois en 10 jours	(C. C. Zhang & Lodish, 2004)
<i>Angptl2/3</i>	Souris	Protéine purifiée	SP CD45 ⁺ Sca-1 ⁺	CRU	24/30 fois en 10 jours	(C. C. Zhang et al., 2006)
NR-101	Humain	Molécule	CD34 ⁺	SRC	2,9 fois en 7 jours	(Nishino et al., 2009)
SR1	Humain	Molécule	CD34 ⁺	SRC	17 fois en 21 jours	(Boitano et al., 2010)
Pléiotrophine	Souris	Protéine	LKS CD34 ⁻	CRU	4 fois en 7 jours	(Himburg et al., 2010)
	Humain		Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ^{lo}	SRC	3 fois en 7 jours	
<i>SALL4</i>	Humain	Surexpression lentivirale	CD34 ⁺	LTC-IC	9,3 fois en 30 jours	(Aguila et al., 2011)
TAT- <i>SALL4</i>		Protéine recombinante		Immunophénotype	8 fois en 4 jours	
<i>HOXA4</i>	Souris	Surexpression rétrovirale	Moelle osseuse	CRU	6,6 fois en 7 jours	(Fournier et al., 2012)
<i>AML1a</i>	Souris	Surexpression rétrovirale	Moelle osseuse	LTC-IC	13 fois en 4 jours	(Tsuzuki & Seto, 2012)
				CRU	11,5 fois en 4 jours	
<i>HOXC4</i>	Humain	Cellules stromales MS-5	CD34 ⁺	LTC-IC	20 fois en 21 jours	(Auvray et al., 2012)

CRU = unité de repopulation compétitive; SRC = cellule repopulatrice de souris NOD-SCID; LTC-IC = cellule initiatrice de culture à long terme

également des variables non négligeables pour l'aboutissement des expériences. Néanmoins, une certaine comparaison de la capacité d'expansion des gènes *HOX* du paralogue 4 avec les autres méthodes utilisées dans la littérature est possible en tenant compte de ce contexte.

Le Tableau 2 répertorie les résultats d'expansion de CSH murines et humaines obtenues par différents gènes ou petites molécules. Les valeurs d'expansion sont déterminées en calculant l'expansion obtenue par rapport au début de la période de culture, et non selon la différence par rapport au contrôle, de façon à pouvoir comparer les résultats. Chez la souris, la méthode d'administration, protéine ou surexpression rétrovirale, n'affecte pas beaucoup l'effet d'expansion obtenu. Ainsi, les molécules les plus efficaces seraient l'angptl3 qui mène à une expansion de 3 fois par jour, et AML1a qui permet une expansion de 2,9 fois par jour. *HOXB4* arrive en troisième position avec des expansions effectuées par surexpression rétrovirale et par la protéine recombinante de 1,3 et 1,5 fois par jour respectivement. Il est suivi par *HOXA4* qui permet une expansion de 0,9 fois par jour. Finalement, IGF-2 et la pléiotrophine sont les méthodes les moins efficaces parmi les molécules répertoriées avec des expansions de 0,8 et 0,6 fois par jour respectivement. Toutes ces molécules permettent toutefois une expansion nette des CSH *in vitro* et utilisent la meilleure méthode d'évaluation du nombre de CSH, le CRU. La période de culture est aussi un paramètre important à considérer pour une expansion clinique des CSH. Les niveaux d'expansion obtenus dans une période de culture inférieure à une semaine sont donc particulièrement intéressants pour le développement de thérapies. En tenant compte de ce facteur, AML1a et TAT-HOXB4 seraient les candidats les plus intéressants chez la souris avec des expansions nettes de 11,5 et 6,0 fois en 4 jours.

Chez l'humain, la méthode d'administration privilégiée n'utilise pas la surexpression rétrovirale, mais plutôt la délivrance de protéines recombinantes ou de petites molécules. Ceci s'explique par l'impossibilité d'utiliser une méthode nécessitant l'intégration aléatoire de provirus au génome des cellules pour une thérapie chez l'humain puisque cette technique augmente de façon importante les risques de mutations dans des gènes importants pour la fonction des CSH, ou menant au développement de maladies hématologiques. De façon générale, les niveaux d'expansion obtenus chez les cellules humaines sont beaucoup plus modestes. Les meilleures expansions obtenues impliquent SALL4 et HOXC4 avec des augmentations de 2,0 et 1,0 fois par jour respectivement. Par contre, les méthodes d'évaluation

du nombre de CSH utilisées dans ces études sont exclusivement *in vitro*, soit la caractérisation par cytométrie en flux et la méthode de cellules initiatrices de culture à long terme (LTC-IC), qui ne sont pas aussi efficaces que la méthode de SRC pour évaluer la fréquence des CSH humaines. Ainsi, dans les différentes études qui utilisent la SRC présentées dans le Tableau 2, de très faibles niveaux d'expansion sont obtenus lorsqu'on prend en compte la période de culture. Parmi ceux-ci, la protéine TAT-HOXB4 permet toutefois une expansion respectable de 2 fois en 4 jours de culture. Néanmoins, les meilleures expansions nettes observées sont de 17 et 20 fois en 21 jours de culture par SR1 et HOXC4 respectivement. En tenant compte de la nécessité de minimiser la période de culture, la protéine TAT-SALL4 est toutefois le candidat le plus intéressant pour l'expansion *in vitro* des CSH humaines.

Étant donné les différentes conditions expérimentales permettant l'expansion de CSH utilisées dans ces études, il est intéressant de noter que chez la souris, les niveaux d'expansion obtenus avec les gènes *HOX* du paralogue 4 sont du même ordre que ceux obtenus avec les autres molécules. Chez l'humain par contre, HOXC4 et TAT-HOXB4 se retrouvent dans le même ordre d'expansion par jour que SR1 et SALL4. Le niveau d'expansion nette de TAT-HOXB4 est cependant inférieur aux autres en tenant compte de la période de culture plus courte utilisée dans cette étude.

5.1.4 Différences dans le potentiel d'expansion de *HOXB4* sur les cellules souches hématopoïétiques humaines et murines

HOXB4 est sans aucun doute un facteur très efficace pour l'expansion des CSH de souris *in vitro* tant lorsqu'il est surexprimé de façon rétrovirale (Antonchuk et al., 2002) que lorsque les CSH sont mises en présence de la protéine recombinante TAT-HOXB4 (J. Krosli et al., 2003a). De plus, les deux méthodes entraînent des niveaux d'expansion comparables chez la souris, niveaux qui se comparent aussi à ce qui est observé avec *HOXA4*. Chez l'humain, il a été montré par SRC que la surexpression rétrovirale de *HOXB4* permettait une expansion 4 fois plus élevée par rapport au contrôle après 24 heures de culture (Buske et al., 2002). Par contre, l'expansion nette obtenue n'a pas été déterminée, ce qui rend la comparaison de la surexpression rétrovirale avec l'administration de la protéine difficile. Les études utilisant la protéine HOXB4, soit via la lignée de cellules stromale MS-5 ou par l'utilisation de la protéine

recombinante TAT-HOXB4 ont permis des expansions de CSH de 2,5 fois en 14 jours (Amsellem et al., 2003) et de 2 fois en 4 jours respectivement (G. Krosl et al., 2004). La protéine TAT-HOXB4 permet ainsi une expansion 3 fois plus importante chez les CSH de souris que chez les CSH humaines durant la même période de culture, ce qui indique que les hauts niveaux d'expansion obtenus avec HOXB4 chez la souris pourraient ne pas être récapitulés chez l'homme.

Plusieurs études ont également comparé l'effet de *HOXB4* chez d'autres espèces que l'humain ou la souris. Chez le macaque, la surexpression rétrovirale de *HOXB4* mène à une forte expansion et une augmentation importante de la reconstitution hématopoïétique, particulièrement à court terme. À long terme, *HOXB4* mène ainsi à une reconstitution du sang périphérique 5 fois plus élevée que chez les contrôles (X. B. Zhang et al., 2006). Une autre étude a directement comparé l'effet de la surexpression rétrovirale de *HOXB4* chez l'humain, le babouin et le chien. Ils ont ainsi montré que *HOXB4* a un effet plus important chez les cellules CD34 de chien *in vitro* par rapport aux mêmes cellules humaines ou de babouin. Au niveau des CFC, ils ont aussi obtenu la meilleure expansion chez le chien avec 28 fois plus de CFC *HOXB4*⁺ par rapport au contrôle en 10 jours, comparativement à une expansion de 5 fois en 25 jours chez le babouin et de 4 fois en 17 jours chez les cellules de sang de cordon humain (X. B. Zhang et al., 2007).

Pour conclure, les gènes *HOX* du paralogue 4 constituent de bons candidats pour l'expansion clinique des CSH *ex vivo*. Il est toutefois primordial de considérer les différences d'efficacité observées chez les grands animaux et d'optimiser les conditions de culture pour obtenir des niveaux acceptables pour le développement de traitements. La comparaison de l'efficacité des gènes *HOX* du paralogue 4 avec d'autres candidats potentiels montre que des niveaux d'expansion comparables peuvent être obtenus entre ces molécules. Il serait ainsi très intéressant de comparer directement leur efficacité dans des conditions expérimentales identiques pour identifier plus précisément le meilleur candidat pour l'expansion des CSH humaine *in vitro*.

5.2 Potentiel oncogénique des gènes *HOX* du paralogue 4 : implications pour leur utilisation dans un but thérapeutique

Les gènes *HOX* sont d'importants régulateurs de l'hématopoïèse normale et maligne. La surexpression de plusieurs des gènes *HOX* mène d'ailleurs au développement de leucémies (Section 1.3.5). Les gènes *HOX* du paralogue 4 constituent cependant une exception à cette règle puisque la surexpression de *HOXA4*, *HOXB4* ou *HOXC4* n'entraîne généralement pas de leucémie même si elle permet une augmentation de l'autorenouvellement des CSH. Cette propriété à elle seule n'est donc pas suffisante pour induire la leucémie.

5.2.1 Potentiel oncogénique des gènes *HOX* du paralogue 4

Dans le cadre de nos recherches, nous avons généré un grand nombre de chimères avec des CSH surexprimant *HOXA4* ou *HOXB4*. Une très petite fraction des chimères *HOXA4*⁺ (5 sur >70) ont développé des leucémies, soit de phénotype myéloïde ou de cellules T. Quelques leucémies ont également été observées chez des chimères *HOXB4*⁺ (données non publiées). Ces cas de leucémies ont cependant été observés après une très longue période de latence, ce qui indique que d'autres événements génétiques sont nécessaires au développement de la maladie et que *HOXA4* pourrait fonctionner en tant que faible collaborateur oncogénique. De plus, les sites d'intégrations provirales n'ont pas été déterminés dans ces cas de leucémies étant donné la faible incidence de la maladie dans nos cohortes. Il n'est donc pas exclu que l'intégration du provirus soit à l'origine de certains cas observés.

D'autres études ont également identifié une faible activité oncogénique de *HOXB4* dans des cas de leucémie myéloïde lorsque certains oncogènes sont aussi activés. En effet, alors que la surexpression de *HOXB4* seule ne permet pas le développement de leucémie dans des receveurs irradiés, sa co-expression avec *MEIS1* mène au développement de la maladie (Pineault et al., 2004). Une collaboration génétique entre *HOXB4* et l'oncogène *E2A-PBX1* a aussi été identifiée dans le développement des leucémies de cellules T (Bijl et al., 2008).

Récemment, le groupe de Robert Slany a publié une étude montrant que tous les gènes *HOX* du groupe A, à l'exception de *HOXA2* et *HOXA5*, causaient un blocage ou un délai dans la différenciation hématopoïétique. Ils ont ainsi montré que *HOXA4* était en mesure de coopérer avec *MEIS1* et de générer une lignée cellulaire stable qui, une fois transplantée dans

des receveurs irradiés, menait au développement de leucémie (Bach et al., 2010). Les résultats présentés dans cet article vont à l'encontre de nos résultats. En effet, les lignées cellulaires générées par la surexpression de *HOXA4* l'ont été par le repiquage en série de CFC. Ils ont en effet observé qu'alors que les CFC des cellules normales se différenciaient et arrêtaient de proliférer après un repiquage, les CFC *HOXA4*⁺ induisaient constamment la formation d'autres CFC durant les 3 repiquages effectués. Nos résultats quant à eux ont montré que le potentiel de repiquage des CFC-GEMM *HOXA4*⁺ était limité et qu'après 3 repiquages, les CFC-GEMM n'étaient plus en mesure de s'autorenouveler pour produire d'autres CFC-GEMM. Des disparités dans les protocoles d'infection peuvent être à l'origine de ces différences. Des mutations causées par le stress réplicatif entraîné par le repiquage des colonies pourraient aussi expliquer l'immortalisation des cellules observée par le groupe de Slany. Finalement, étant donné que les cas de leucémies ont été obtenus à la suite de la transplantation de ces lignées cellulaires, cultivées durant de longues périodes, il est difficile de comparer leur effet à celui de cellules primaires fraîchement infectées.

Plusieurs études ont évalué l'effet de la surexpression de *HOXB4* sur la reconstitution hématopoïétique des grands mammifères. Par contre, une haute fréquence de développement de leucémie a été observée chez ces animaux. En effet, une étude a montré que 2 chiens sur 2 et 1 macaque sur 2 avaient développé une leucémie myéloïde 2 ans après la transplantation de cellules CD34⁺ exprimant *HOXB4* suite à une surexpression rétrovirale. Ces leucémies étaient dépendantes de l'expression de *HOXB4* puisque sa dérégulation rétablissait le potentiel de différenciation des cellules leucémique (X. B. Zhang et al., 2008). Ces résultats posent des questions importantes sur le potentiel oncogénique de *HOXB4*, particulièrement chez les primates. Cependant, étant donné l'expression constitutive et rétrovirale utilisée dans ce modèle expérimental, et la longue période de latence observée avant le développement des leucémies, il est peu probable que de tels développements de leucémies soient observés dans un contexte clinique d'administration transitoire de la protéine HOXB4. De plus, une étude récente utilisant le même modèle de surexpression de *HOXB4* sur des cellules de sang de cordon chez le macaque n'a observé aucune anomalie hématologique jusqu'à 3 ans après la transplantation (Watts et al., 2014).

Les gènes *HOX* du paralogue 4 semblent donc posséder un faible potentiel de collaborateur oncogénique. Ce potentiel est toutefois nettement inférieur à celui des gènes *HOX* des autres paralogues, notamment le gène *HOXA9*.

5.2.2 Incapacité de *HOXB4* à expandre ou transformer les cellules B malignes

HOXB4 possède un grand potentiel pour une expansion clinique des CSH humaines. Des études cliniques utilisant TAT-*HOXB4* sont d'ailleurs sur le point d'être initiées. Il existe toutefois un risque d'expansion des CSL qui auraient pu échapper aux traitements de radio ou de chimiothérapie. Les CSL ont en effet la capacité de s'autorenouveler et possèdent un phénotype semblable aux CSH à certains égards. Les CSL myéloïdes sont d'ailleurs retrouvées dans la fraction $CD34^+CD38^-$ des cellules leucémiques (Lapidot et al., 1994). Les CSL possèdent ainsi plusieurs propriétés fondamentales des CSH telles que la quiescence, l'autorenouvellement et l'interaction avec la niche de la moelle osseuse (Sands et al., 2013). Il importe donc de vérifier que *HOXB4* ne permet pas d'expandre les CSL avant d'aller de l'avant avec des protocoles cliniques afin d'éviter d'augmenter les risques de rechute par une augmentation des CSL transplantées au patient.

Nous avons donc tenté d'évaluer l'effet de *HOXB4* sur les cellules lymphoïdes leucémiques avec des modèles d'ALL et de lymphomes non-hodgkiniens. Nos résultats ont ainsi permis de montrer qu'il n'y avait pas de collaboration génétique entre *HOXB4* et l'oncogène *E2A-PBX1* dans l'induction de leucémie des cellules B. Ceci est intéressant puisqu'une telle collaboration existe entre ces deux gènes dans le développement des leucémies de cellules T (Bijl et al., 2008). Une autre étude effectuée au laboratoire a aussi montré une collaboration entre *E2A-PBX1* et *Hoxa9* dans le même modèle de leucémie de cellules B (Hassawi et al., 2014). La collaboration de *HOXB4* avec l'oncogène *E2A-PBX1* dans le développement de leucémie est donc dépendante du contexte cellulaire.

Nous avons aussi montré que la surexpression de *HOXB4* permettait l'expansion des cellules pro-B et des progéniteurs de cellules B *E2A-PBX1*⁺ *in vitro* sans toutefois permettre leur transformation en cellules capables d'initier des leucémies. Cette expansion en présence d'*E2A-PBX1* est intéressante puisque *HOXB4* seul n'est pas en mesure d'agir directement sur les progéniteurs de cellules B (Haddad et al., 2008).

L'évaluation de la fréquence des CSL dans des leucémies surexprimant *HOXB4* a également permis de montrer que *HOXB4* ne menait pas à l'expansion *in vitro* des CSL, puisque les leucémies contrôles avait environ 5 fois plus de CSH que les leucémies *HOXB4*⁺. Les fréquences obtenues dans les 2 cas sont considérées comme étant élevées (1 dans 1000 et 1 dans 5000) et correspondent aux fréquences de cellule propagatrice de ALL évaluées dans un modèle de xénogreffe dans plusieurs échantillons de cellules blastiques humaines (Rehe et al., 2013). À l'inverse, une plus grande fréquence de CSL a été observée en présence de *HOXB4* dans des leucémies secondaires, suggérant une expansion *in vivo* des CSL *HOXB4*⁺. Ces résultats indiquent que le microenvironnement joue un rôle important pour l'expansion des CSL par *HOXB4*. Il a d'ailleurs été montré que les cellules stromales de la moelle osseuse offrent un environnement protecteur contre certains agents cytotoxiques dans les cas de ALL (Iwamoto et al., 2007). La niche hématopoïétique joue également un rôle crucial pour les CSL dans les cas de CML positives pour le chromosome de Philadelphie (Seke Etet et al., 2012).

Finalement, nous avons démontré que *HOXB4* n'était pas en mesure d'expandre des lignées cellulaires humaines d'ALL et de lymphomes non-hodgkiniens. Des études complémentaires effectuées sur des échantillons d'ALL humaines ont également montré l'incapacité de TAT-*HOXB4* à expandre ces cellules primaires *in vitro* (données non publiées).

En conclusion, nos résultats démontrent clairement l'incapacité de *HOXB4* à expandre les CSL dans les cas des leucémies de cellules B. Les différents modèles utilisés permettent en effet de confirmer que les cellules B leucémiques humaines et murines ne sont pas affectées par *HOXB4* dans différents contextes. *HOXB4* pourrait donc être utilisé de façon sécuritaire pour l'expansion clinique de CSH autologues dans les cas de leucémies de cellules B.

5.3 Identification des mécanismes d'action des gènes *HOXA4* et *HOXB4*

La capacité de *HOXB4*, et maintenant de *HOXA4*, à expandre efficacement les CSH est bien établie. Même si de nombreuses avancées ont permis de préciser les moyens utilisés par ces facteurs de transcription, notamment par l'identification de certains de leurs gènes cibles, les mécanismes précis régulant leur action ne sont pas encore parfaitement compris.

5.3.1 Évaluation de l'expression des gènes cibles de HOXA4 et HOXB4

Dans l'article présenté au chapitre 3, nous avons évalué l'expression d'une sélection de gènes cibles potentiels de HOXA4 et HOXB4 dans des cellules hématopoïétiques très primitives. Parmi ceux-ci, plusieurs étaient déjà connus dans la littérature pour être régulés par HOXB4 (Auvray et al., 2012; Lee et al., 2010; Oshima et al., 2011; Schiedlmeier et al., 2007). Par contre, dans la majorité des cas, nos résultats d'expression ne correspondaient pas à ce qui était précédemment connu pour HOXB4. En effet, une régulation inverse était observée dans plusieurs cas par rapports aux résultats obtenus pas d'autres groupes. Il est d'ailleurs connu que les gènes *HOX* peuvent agir comme activateurs et répresseurs transcriptionnels dépendamment du contexte et de la disponibilité de leurs cofacteurs tels que MEIS1 et PBX1. Une explication possible de ces différences est le type cellulaire dans lequel les études ont été effectuées. En effet, alors que dans les études énumérées ci-haut, l'expression a été évaluée dans des cellules CD34⁺ humaines, dans des lignées hématopoïétiques ou des cellules dérivées de cellules ES, nous avons utilisé des cellules primaires hautement enrichies en CSH. Nous avons également confirmé que la période d'infection *in vitro* n'affectait pas de façon importante la population de CSH, en mesurant la fréquence de CFC-GEMM suite à l'infection qui était encore à près d'une cellule dans cinq (données non publiées).

Nos résultats nous ont donc permis d'identifier 51 gènes, parmi les 87 testés, dont l'expression était modulée par HOXA4 et/ou HOXB4. Près de la moitié de ceux-ci était modulés de la même façon par HOXA4 et HOXB4, ce qui indique que ces deux facteurs de transcription pourraient partager certains mécanismes d'actions tout en montrant des différences à d'autres niveaux.

5.3.2 Implications des gènes cibles de HOXA4 et HOXB4 dans l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques

Plusieurs gènes régulés par HOXA4 et/ou HOXB4 identifiés dans notre étude jouent un rôle crucial pour les CSH ce qui pourrait expliquer en partie l'effet d'expansion observé suite à la surexpression de ces gènes dans les cellules hématopoïétiques.

La voie de signalisation Wnt est importante, entre autres pour l'autorenouvellement des CSH. Nous avons observé que certains membres de cette voie étaient régulés, généralement de

façon positive, par HOXA4 et HOXB4. Notamment, *Fzd4* a montré une régulation positive par HOXA4 seulement et le gène *Sox2* était régulé positivement par HOXA4 et négativement par HOXB4. La voie Wnt pourrait expliquer en partie le phénotype observé au niveau de la reconstitution à court terme par les CSH surexprimant *HOXA4*. En effet, il a été montré que *Wnt3a* active la reconstitutions hématopoïétique à court terme de la population LIN^c-Kit^cSca1⁺, qui ne possède normalement pas cette propriété (Trowbridge et al., 2010).

De nombreux gènes impliqués dans une autre voie de signalisation importante pour les CSH, la voie Notch, ont également été identifiés comme étant régulés au moins de 1,5 fois par HOXA4 et/ou HOXB4. En fait, alors que la majorité (14) des gènes sont des cibles de HOXA4 et HOXB4, plusieurs ne sont régulés que par HOXA4. Il est aussi intéressant de noter que des essais d'immunoprécipitation de la chromatine ont révélé que HOXB4 était capable de se lier aux promoteurs de *Notch2*, *Hdac1*, *Hey1* et *Sox4* (Oshima et al., 2011), ce qui supporte les résultats que nous avons obtenus. La voie de signalisation Notch joue un rôle critique dans l'autorenouvellement des CSH et pourrait constituer un mécanisme d'action majeure des gènes *HOX* du paralogue 4 (Guiu et al., 2013; Stier et al., 2002; Varnum-Finney et al., 2003; Varnum-Finney et al., 1998). Le gène *Dll1* est particulièrement exprimé suite à la surexpression de *HOXA4* ou *HOXB4*. Ceci est intéressant puisqu'il a été montré que HOXB4 et *Dll1* agissent en synergie afin d'augmenter l'expansion des cellules CD34⁺ de sang de cordon en plus d'améliorer la capacité de reconstitution hématopoïétique chez l'humain et le macaque (Watts et al., 2010; Watts et al., 2013). Plusieurs gènes de la voie Notch; *Dll1*, *Dll3*, *Jag2*, *Psen1*, *Mib1*, *Nrarp*, *Skp2*, *Hey2* et *Dach1* ont aussi été identifiés comme étant importants pour l'expansion des CSH par HOXB4 (Schiedlmeier et al., 2007). La voie de signalisation Notch semble donc faire partie intégrante de l'expansion des CSH observée lors de la surexpression des gènes *HOX* du paralogue 4.

Parmi les autres gènes identifiés dans notre étude, le récepteur *Cxcr1*, qui est régulé positivement par HOXA4 et HOXB4, pourraient être impliqué dans un mécanisme menant à l'expansion des CSH observée. L'inhibition de CXCR1 entraîne en effet une réduction de la capacité d'expansion de la population CD133⁺ de sang de cordon, qui est enrichie en CSH (Adeli et al., 2011).

La protéine de liaison aux micro-ARN, encodée par le gène *Lin28b*, permet une activité d'autorenouvellement des CSH accentuée lorsqu'elle est surexprimée (Copley et al., 2013). *Lin28b* est régulée positivement par HOXA4 et HOXB4 et pourrait jouer un rôle dans l'expansion des CSH via la traduction de *IGF-2*. En effet, *IGF-2* est exprimé dans le foie fœtal et est impliqué dans l'expansion des CSH à ce stade de l'embryogénèse, en plus d'élargir les CSH adultes *in vitro* (C. C. Zhang & Lodish, 2004).

La régulation de facteurs de transcription essentiels pour la pluripotence et l'autorenouvellement des cellules souches peut aussi constituer un mécanisme d'action des gènes *HOX* du paralogue 4. Deux de ces gènes, *Sox2* et *Pou5f1*, aussi connus sous le nom d'*Oct4*, étaient régulés positivement par HOXA4 et HOXB4. Il est connu que la surexpression combinée de ces gènes permet d'augmenter la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines. (Han et al., 2014) Comme ces gènes sont particulièrement importants pour le maintien des cellules souches, ils pourraient être impliqués dans l'expansion des CSH par les gènes *HOXA4* et *HOXB4*.

Parmi les gènes régulés seulement par HOXB4 dans notre étude figure le cofacteur des gènes *HOX Pbx1*. Ce résultat est particulier puisqu'il pourrait indiquer une boucle de régulation de HOXB4 pour augmenter sa spécificité. Par contre, il est intéressant de noter que *Pbx1* est connu pour limiter le potentiel d'expansion des CSH (J. Krosl et al., 2003b).

Nous avons observé que la surexpression de *HOXA4* modulait positivement l'expression de *Cited2*, un modulateur transcriptionnel qui est requis pour l'hématopoïèse normale murine dans le foie fœtal (Chen et al., 2007). Ce gène a aussi été identifié dans une étude de profilage génique comme étant associé à l'activité des CSH-LT chez l'adulte (J. F. Zhong et al., 2005). La délétion de *Cited2* mène également à une augmentation de l'apoptose et une diminution de la quiescence des CSH, entraînant des défauts importants au niveau de leur capacité de reconstitution (Du et al., 2012; Kranc et al., 2009). Le rôle essentiel de *Cited2* dans le maintien des CSH pourrait ainsi participer à l'expansion observée suite à la surexpression de *HOXA4*. Un des gènes cible de *Cited2*, *Egr1*, est aussi régulé positivement par HOXA4 et HOXB4 et pourrait contribuer à l'expansion des CSH. En effet, il a été montré qu'*Egr1* influence entre autres la prolifération des CSH et leur localisation dans la niche hématopoïétique (Min et al., 2008). *Cited2* pourrait ainsi participer à l'autorenouvellement des

CSH suite à la surexpression des gènes *HOX* du paraglogue 4, soit directement ou via la transcription de son gène cible *Egr1*.

Pour conclure, plusieurs gènes cibles de HOXA4 et HOXB4 peuvent expliquer et être impliqués dans l'autorenouveaulement des CSH. Nos résultats indiquent que la voie de signalisation Notch pourrait être particulièrement importante étant donné le grand nombre de gènes de cette voie régulés par HOXA4 et HOXB4.

5.3.3 Mécanismes d'action possibles des gènes *HOX* du paraglogue 4

L'identification de gènes cibles des protéines HOX du paraglogue 4 nous permet de proposer des mécanismes d'action qui pourraient être impliqués dans l'augmentation de l'autorenouveaulement des CSH (Figure 5).

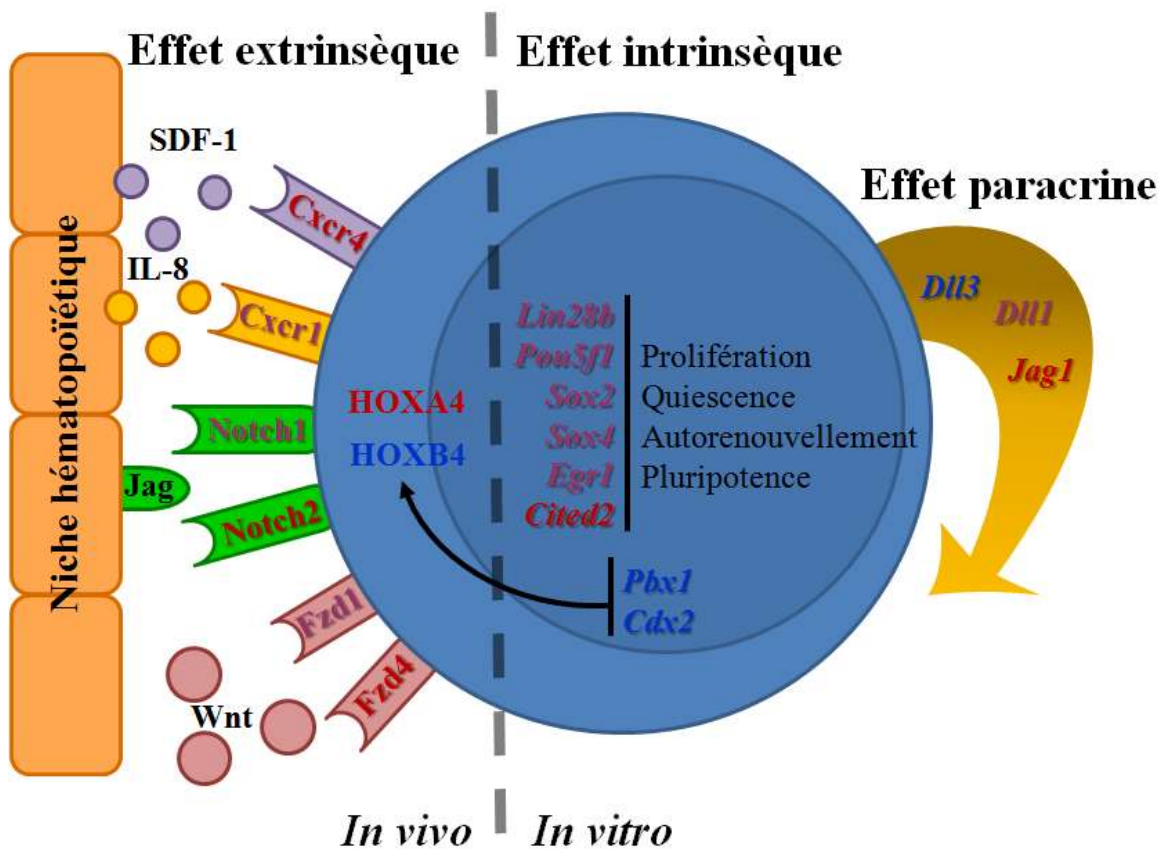


Figure 5 : Mécanismes d'action possibles des gènes *Hox* du paraglogue 4

Nous avons ainsi identifié plusieurs récepteurs impliqués dans la communication entre les CSH et la niche hématopoïétique qui sont régulés positivement suite à la surexpression de *HOXA4* et/ou *HOXB4*, notamment *Cxcr4*, *Cxcr1*, *Notch1*, *Notch2*, *Fzd1* et *Fzd4*. L'amélioration des signaux extrinsèques fournis par les cellules stromales de la moelle osseuse, qui sont importants pour la fonction des CSH, pourrait contribuer à l'expansion par les gènes *HOX* du paragraphe 4 observée *in vivo*.

Comme les gènes *HOX* encodent des facteurs de transcription, nous avons identifié plusieurs cibles qui jouent un rôle important pour la fonction des CSH. En modulant l'expression de ces facteurs, les gènes *HOX* du paragraphe 4 peuvent ainsi influencer l'autorenouvellement des CSH ou augmenter leur prolifération tout en maintenant leur propriété de pluripotence. Certains gènes modulés par *HOXB4* sont également connus pour influencer l'expression des gènes *HOX* indiquant une possible boucle de régulation au sein de la CSH. Ces effets intrinsèques aux CSH font donc des gènes *HOX* du paragraphe 4 des régulateurs importants de plusieurs aspects de la fonction des CSH.

Enfin, il est possible qu'un certain effet paracrine des gènes *HOX* du paragraphe 4 permette l'expression de gènes capables d'influencer les autres CSH présentes dans le milieu. Il a d'ailleurs déjà été montré que l'activation de *HOXB4* permettait la génération d'un tel effet paracrine sur la différenciation en plus de son effet autocrine (Jackson et al., 2012). Les ligands de Notch et la voie Wnt font partie des facteurs identifiés dans cette étude et ont aussi été identifiés dans la nôtre.

Les gènes *HOX* du paragraphe 4 n'influencent donc pas directement l'autorenouvellement des CSH, mais participent à de multiples mécanismes, particulièrement en régulant la transcription de régulateurs clés des CSH.

5.4 Conclusions et perspectives

Les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de ce projet de recherche permettent de confirmer le rôle commun des gènes *HOX* du paragraphe 4 dans l'autorenouvellement des CSH. En effet, tout comme *HOXB4* et *HOXC4*, le gène *HOXA4* permet l'expansion de CSH fonctionnelles *in vitro*. Même si plusieurs signes indiquent que *HOXA4* pourrait jouer un rôle plus important que *HOXB4* ou *HOXC4* dans l'expansion des CSH au niveau physiologique,

nos résultats ne nous permettent pas de conclure que *HOXA4* serait un meilleur candidat que *HOXB4* pour une expansion clinique des CSH. Par contre, une complication majeure à l'utilisation de *HOXB4* dans un but thérapeutique est la mauvaise stabilité de la protéine recombinante. En effet, il a été montré que la demi-vie intracellulaire de la protéine recombinante TAT-*HOXB4* était d'environ 1h30, ce qui fait en sorte qu'une administration continue est nécessaire pour assurer une concentration adéquate de la protéine durant toute la période de culture (Csaszar et al., 2009). Différents mutants de *HOXA4* (Iacovino et al., 2009) et *HOXB4* (Beslu et al., 2004; Tang et al., 2009) ont été en mesure d'expandre à différents niveaux des cellules hématopoïétiques. Il serait donc intéressant d'évaluer la stabilité de la protéine recombinante *HOXA4* et de la comparer à celle de *HOXB4* et des différents mutants permettant d'expandre les CSH afin d'identifier la molécule qui offre le meilleur ratio efficacité/stabilité.

Aussi, notre groupe a récemment montré que la délétion complète des gènes *HOX* du groupe A affectait grandement la capacité d'autorenouvellement des CSH. La surexpression du gène *HOXA9* permet de corriger ce phénotype alors que le gène *HOXA4* en est incapable (Lebert-Ghali et al., En préparation). Par contre, nous avons observé que la reconstitution par les CSH *HOXA*^{-/-} surexprimant *HOXA9* n'était pas normale, le nombre de cellules B étant fortement diminué. La surexpression de *HOXA9* menait aussi au développement de leucémie myéloïde. Étant donné l'effet de *HOXA4* observé sur les progéniteurs de cellules B, il serait donc intéressant de vérifier si sa surexpression en combinaison avec un autre gène *HOX* du groupe A pourrait restaurer une hématopoïèse normale suite à la délétion de tout le groupe.

Nous avons identifié plusieurs gènes cibles potentiels des gènes *HOXA4* et *HOXB4* dans l'article du chapitre 3. Par contre, la quantification des transcrits de ces gènes ne confirme pas leur implication dans la fonction de *HOXA4* et *HOXB4*. Il sera donc important de valider que l'expression des protéines codées par ces gènes correspond à ce que nous avons observé et de confirmer leur action au niveau physiologique.

Il est aussi important de prendre en considération le faible potentiel oncogénique des gènes *HOX* du paragraphe 4 avant de mettre en place des protocoles d'expansion cliniques. Alors que nos résultats ont montré que *HOXB4* n'était pas en mesure d'expandre les CSL dans les cas de leucémies de cellules B, il reste encore à évaluer cette possibilité pour *HOXA4*. Il

serait aussi important de montrer que ces gènes n'influencent pas les CSL dans les autres types de leucémies où un traitement utilisant une expansion par *HOXA4* ou *HOXB4* pourrait être utilisé.

Il faut également s'interroger sur le principe d'utiliser des oncogènes pour l'expansion des CSH *ex vivo*. Est-ce qu'une telle utilisation serait acceptée par la communauté? Plusieurs gènes *HOX* sont connus pour permettre une expansion des CSH, mais aussi pour mener au développement de leucémie. C'est le cas du gène *HOXA9* qui permet une expansion de CSH de 15 fois *in vivo* avant le développement de leucémie myéloïde (Thorsteinsdottir et al., 2002). Il serait intéressant d'évaluer si l'expression transitoire du gène permettrait une expansion des CSH sans mener à leur transformation. *HOXA9* est aussi un candidat intéressant puisque notre groupe a montré qu'il est en mesure de corriger le phénotype associé à la délétion complète des gènes *HOX* (Lebert-Ghali et al., En préparation). D'autres gènes *HOX* peuvent expandre les CSH de façon très importante *in vitro* en tant que partenaire de fusion de la NUP98. En effet, la surexpression de la protéine de fusion NUP98-HOXA10 mène à une expansion de plus de 100 fois après seulement 6 jours de culture (Ohta et al., 2007). Il est donc important de considérer les oncogènes notables comme candidats potentiels pour l'expansion des CSH puisqu'une expression transitoire pourrait permettre une utilisation sécuritaire et efficace des ces protéines.

De nombreuses équipes de recherches travaillent présentement à identifier de petites molécules permettant l'expansion des CSH. Ces molécules présentent un avantage certain par rapport à l'utilisation de facteurs de transcription tels que les gènes *HOX*. En effet, ils sont plus facilement synthétisables et leur petite taille leur procure un avantage au niveau de la stabilité. Par contre, jusqu'ici les résultats obtenus avec de telles molécules ne sont pas compétitifs au niveau de l'efficacité. La molécule SR1, par exemple, a besoin d'une très longue période de culture pour arriver à un bon niveau d'expansion, ce qui va à l'encontre des stratégies d'expansion préconisées en clinique. Il importe donc de poursuivre les études sur les mécanismes impliqués dans l'expansion des CSH physiologiques qui peuvent mener à l'identification de nouvelles molécules pouvant être utilisées dans un protocole thérapeutique.

En conclusion, les gènes *HOX* du paralogue 4 demeurent de bons candidats pour l'expansion des CSH *in vitro*. En agissant à titre de régulateurs majeurs de la transcription de

régulateurs de l'autorenouveaulement des CSH, ils mettent en place les meilleures conditions intrinsèques et extrinsèques pour permettre une expansion efficace des CSH. L'étude de l'effet des gènes cibles de HOXA4 et HOXB4 identifiés dans ce projet et plusieurs autres permettra aussi de comprendre les mécanismes impliqués dans l'expansion des CSH et de mettre à contribution ces connaissances pour optimiser les conditions expérimentales menant à une expansion efficace et sécuritaire des CSH. La compréhension de la biologie des cellules souches permettra ainsi d'améliorer la mise en place de nouvelles thérapies cellulaires dans un futur rapproché.

Bibliographie

- Abkowitz, J. L., Robinson, A. E., Kale, S., Long, M. W., & Chen, J. (2003). Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood*, *102*(4), 1249-1253. doi: 10.1182/blood-2003-01-0318
- Abramovich, C., Pineault, N., Ohta, H., & Humphries, R. K. (2005). Hox genes: from leukemia to hematopoietic stem cell expansion. *Ann N Y Acad Sci*, *1044*, 109-116. doi: 10.1196/annals.1349.014
- Adeli, E. K., Abolghasemi, H., Ebtekar, M., Pourpak, Z., & Kheirandish, M. (2011). Effects of CXCR1 and CXCR2 inhibition on expansion and differentiation of umbilical cord blood CD133(+) cells into megakaryocyte progenitor cells. *Cytokine*, *55*(2), 181-187. doi: 10.1016/j.cyto.2011.04.015
- Aguila, J. R., Liao, W., Yang, J., Avila, C., Hagag, N., Senzel, L., & Ma, Y. (2011). SALL4 is a robust stimulator for the expansion of hematopoietic stem cells. *Blood*, *118*(3), 576-585. doi: 10.1182/blood-2011-01-333641
- Akala, O. O., & Clarke, M. F. (2006). Hematopoietic stem cell self-renewal. *Curr Opin Genet Dev*, *16*(5), 496-501. doi: 10.1016/j.gde.2006.08.011
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, *404*(6774), 193-197. doi: 10.1038/35004599
- Akhter, S., Rahman, M. M., Lee, H. S., Kim, H. J., & Hong, S. T. (2013). Dynamic roles of angiopoietin-like proteins 1, 2, 3, 4, 6 and 7 in the survival and enhancement of ex vivo expansion of bone-marrow hematopoietic stem cells. *Protein Cell*, *4*(3), 220-230. doi: 10.1007/s13238-013-2066-5
- Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J. P., Pagan, A., Well, D., . . . Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol*, *4*(2), 168-174. doi: 10.1038/ni878
- Amali, A. A., Sie, L., Winkler, C., & Featherstone, M. (2013). Zebrafish *hoxd4a* acts upstream of *meis1.1* to direct vasculogenesis, angiogenesis and hematopoiesis. *PLoS One*, *8*(3), e58857. doi: 10.1371/journal.pone.0058857
- Amsellem, S., Pflumio, F., Bardin, D., Izac, B., Charneau, P., Romeo, P. H., . . . Fichelson, S. (2003). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med*, *9*(11), 1423-1427. doi: 10.1038/nm953
- Anderson, G., Pongracz, J., Parnell, S., & Jenkinson, E. J. (2001). Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *Eur J Immunol*, *31*(11), 3349-3354. doi: 10.1002/1521-4141(200111)31:11<3349::AID-IMMU3349>3.0.CO;2-S
- Andreeff, M., Ruvolo, V., Gadgil, S., Zeng, C., Coombes, K., Chen, W., . . . Drabkin, H. A. (2008). HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML. *Leukemia*, *22*(11), 2041-2047. doi: 10.1038/leu.2008.198
- Antonchuk, J., Sauvageau, G., & Humphries, R. K. (2001). HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp Hematol*, *29*(9), 1125-1134.

- Antonchuk, J., Sauvageau, G., & Humphries, R. K. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*, *109*(1), 39-45.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., . . . Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, *118*(2), 149-161. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.004
- Arai, F., Hosokawa, K., Toyama, H., Matsumoto, Y., & Suda, T. (2012). Role of N-cadherin in the regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci*, *1266*, 72-77. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06576.x
- Arrighi, J. F., Hauser, C., Chapuis, B., Zubler, R. H., & Kindler, V. (1999). Long-term culture of human CD34(+) progenitors with FLT3-ligand, thrombopoietin, and stem cell factor induces extensive amplification of a CD34(-)CD14(-) and a CD34(-)CD14(+) dendritic cell precursor. *Blood*, *93*(7), 2244-2252.
- Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K. L., & Tzukerman, M. (2001). Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*, *50*(8), 1691-1697.
- Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B., & Herrmann, B. G. (2003). Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev Cell*, *4*(3), 395-406.
- Auvray, C., Delahaye, A., Pflumio, F., Haddad, R., Amsellem, S., Miri-Nezhad, A., . . . Vigon, I. (2012). HOXC4 homeoprotein efficiently expands human hematopoietic stem cells and triggers similar molecular alterations as HOXB4. *Haematologica*, *97*(2), 168-178. doi: 10.3324/haematol.2011.051235
- Bach, C., Buhl, S., Mueller, D., Garcia-Cuellar, M. P., Maethner, E., & Slany, R. K. (2010). Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood*, *115*(14), 2910-2918. doi: 10.1182/blood-2009-04-216606
- Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., . . . et al. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell*, *79*(5), 885-892.
- Beauchemin, S. (2008). *Impact d'une mutation ponctuelle stratégique de la protéine HOXB4 sur son pouvoir de régulation, de prolifération et de différenciation des CSH et des progéniteurs murins*. (Maîtrise), Université de Montréal, Montréal.
- Beckmann, J., Scheitza, S., Wernet, P., Fischer, J. C., & Giebel, B. (2007). Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood*, *109*(12), 5494-5501. doi: 10.1182/blood-2006-11-055921
- Beerman, I., Bock, C., Garrison, B. S., Smith, Z. D., Gu, H., Meissner, A., & Rossi, D. J. (2013). Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell*, *12*(4), 413-425. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.017
- Bel-Vialar, S., Itasaki, N., & Krumlauf, R. (2002). Initiating Hox gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development*, *129*(22), 5103-5115.
- Berkahn, L., & Keating, A. (2004). Hematopoiesis in the elderly. *Hematology*, *9*(3), 159-163. doi: 10.1080/10245330410001701468

- Beslu, N., Krosch, J., Laurin, M., Mayotte, N., Humphries, K. R., & Sauvageau, G. (2004). Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood*, *104*(8), 2307-2314. doi: 10.1182/blood-2004-04-1653
- Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D. P., Williams, K. P., Chadwick, K., . . . Bhatia, M. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*, *2*(2), 172-180. doi: 10.1038/84282
- Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., Murdoch, B., Wrana, J., Gallacher, L., & Dick, J. E. (1999). Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, *189*(7), 1139-1148.
- Bijl, J., Krosch, J., Lebert-Ghali, C. E., Vacher, J., Mayotte, N., & Sauvageau, G. (2008). Evidence for Hox and E2A-PBX1 collaboration in mouse T-cell leukemia. *Oncogene*, *27*(49), 6356-6364. doi: 10.1038/onc.2008.233
- Bijl, J., Sauvageau, M., Thompson, A., & Sauvageau, G. (2005). High incidence of proviral integrations in the Hoxa locus in a new model of E2a-PBX1-induced B-cell leukemia. *Genes Dev*, *19*(2), 224-233. doi: 10.1101/gad.1268505
- Bijl, J., Thompson, A., Ramirez-Solis, R., Krosch, J., Grier, D. G., Lawrence, H. J., & Sauvageau, G. (2006). Analysis of HSC activity and compensatory Hox gene expression profile in Hoxb cluster mutant fetal liver cells. *Blood*, *108*(1), 116-122. doi: 10.1182/blood-2005-06-2245
- Bittencourt, H., Rocha, V., Chevret, S., Socie, G., Esperou, H., Devergie, A., . . . Gluckman, E. (2002). Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*, *99*(8), 2726-2733.
- Boitano, A. E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L. C., Parker, A. E., Sutton, S. E., . . . Cooke, M. P. (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science*, *329*(5997), 1345-1348. doi: 10.1126/science.1191536
- Bottcher, R. T., & Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev*, *26*(1), 63-77. doi: 10.1210/er.2003-0040
- Bowie, M. B., Kent, D. G., Copley, M. R., & Eaves, C. J. (2007). Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells. *Blood*, *109*(11), 5043-5048. doi: 10.1182/blood-2006-08-037770
- Bowie, M. B., McKnight, K. D., Kent, D. G., McCaffrey, L., Hoodless, P. A., & Eaves, C. J. (2006). Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J Clin Invest*, *116*(10), 2808-2816. doi: 10.1172/JCI28310
- Brun, A. C., Bjornsson, J. M., Magnusson, M., Larsson, N., Leveen, P., Ehinger, M., . . . Karlsson, S. (2004). Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood*, *103*(11), 4126-4133. doi: 10.1182/blood-2003-10-3557
- Brun, A. C., Fan, X., Bjornsson, J. M., Humphries, R. K., & Karlsson, S. (2003). Enforced adenoviral vector-mediated expression of HOXB4 in human umbilical cord blood CD34+ cells promotes myeloid differentiation but not proliferation. *Mol Ther*, *8*(4), 618-628.

- Brunstein, C. G., & Wagner, J. E. (2006). Cord blood transplantation for adults. *Vox Sang*, *91*(3), 195-205. doi: 10.1111/j.1423-0410.2006.00823.x
- Bryder, D., & Jacobsen, S. E. (2000). Interleukin-3 supports expansion of long-term multilineage repopulating activity after multiple stem cell divisions in vitro. *Blood*, *96*(5), 1748-1755.
- Buckley, S. M., Ulloa-Montoya, F., Abts, D., Oostendorp, R. A., Dzierzak, E., Ekker, S. C., & Verfaillie, C. M. (2011). Maintenance of HSC by Wnt5a secreting AGM-derived stromal cell line. *Exp Hematol*, *39*(1), 114-123 e111-115. doi: 10.1016/j.exphem.2010.09.010
- Buske, C., Feuring-Buske, M., Abramovich, C., Spiekermann, K., Eaves, C. J., Coulombel, L., . . . Humphries, R. K. (2002). Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood*, *100*(3), 862-868. doi: 10.1182/blood-2002-01-0220
- Buske, C., Feuring-Buske, M., Antonchuk, J., Rosten, P., Hogge, D. E., Eaves, C. J., & Humphries, R. K. (2001). Overexpression of HOXA10 perturbs human lymphomyelopoiesis in vitro and in vivo. *Blood*, *97*(8), 2286-2292.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., . . . Scadden, D. T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, *425*(6960), 841-846. doi: 10.1038/nature02040
- Camargo, F. D., Chambers, S. M., Drew, E., McNagny, K. M., & Goodell, M. A. (2006). Hematopoietic stem cells do not engraft with absolute efficiencies. *Blood*, *107*(2), 501-507. doi: 10.1182/blood-2005-02-0655
- Carroll, A. J., Crist, W. M., Parmley, R. T., Roper, M., Cooper, M. D., & Finley, W. H. (1984). Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. *Blood*, *63*(3), 721-724.
- Cellot, S., Kros, J., Chagraoui, J., Meloche, S., Humphries, R. K., & Sauvageau, G. (2007). Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in Hoxb4hiPbx1(10) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, *35*(5), 802-816.
- Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., & Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*, *102*(3), 906-915. doi: 10.1182/blood-2003-03-0832
- Challen, G. A., Boles, N. C., Chambers, S. M., & Goodell, M. A. (2010). Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell*, *6*(3), 265-278. doi: 10.1016/j.stem.2010.02.002
- Challen, G. A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J. S., . . . Goodell, M. A. (2012). Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*, *44*(1), 23-31. doi: 10.1038/ng.1009
- Chang, C. P., Shen, W. F., Rozenfeld, S., Lawrence, H. J., Largman, C., & Cleary, M. L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev*, *9*(6), 663-674.
- Chen, Y., Haviernik, P., Bunting, K. D., & Yang, Y. C. (2007). Cited2 is required for normal hematopoiesis in the murine fetal liver. *Blood*, *110*(8), 2889-2898. doi: 10.1182/blood-2007-01-066316

- Choe, S. K., Lu, P., Nakamura, M., Lee, J., & Sagerstrom, C. G. (2009). Meis cofactors control HDAC and CBP accessibility at Hox-regulated promoters during zebrafish embryogenesis. *Dev Cell*, *17*(4), 561-567. doi: 10.1016/j.devcel.2009.08.007
- Choi, K. D., Vodyanik, M. A., & Slukvin, II. (2009). Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors. *J Clin Invest*, *119*(9), 2818-2829. doi: 10.1172/JCI38591
- Christensen, J. L., & Weissman, I. L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(25), 14541-14546. doi: 10.1073/pnas.261562798
- Conboy, M. J., Karasov, A. O., & Rando, T. A. (2007). High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny. *PLoS Biol*, *5*(5), e102. doi: 10.1371/journal.pbio.0050102
- Copley, M. R., Babovic, S., Benz, C., Knapp, D. J., Beer, P. A., Kent, D. G., . . . Eaves, C. J. (2013). The Lin28b-let-7-Hmga2 axis determines the higher self-renewal potential of fetal haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*, *15*(8), 916-925. doi: 10.1038/ncb2783
- Copp, A. J. (1995). Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet*, *11*(3), 87-93. doi: 10.1016/S0168-9525(00)89008-3
- Cotta, C. V., Zhang, Z., Kim, H. G., & Klug, C. A. (2003). Pax5 determines B- versus T-cell fate and does not block early myeloid-lineage development. *Blood*, *101*(11), 4342-4346. doi: 10.1182/blood-2002-10-3139
- Crooks, G. M., Fuller, J., Petersen, D., Izadi, P., Malik, P., Pattengale, P. K., . . . Gasson, J. C. (1999). Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood*, *94*(2), 519-528.
- Csaszar, E., Gavigan, G., Ungrin, M., Therien, C., Dube, P., Fethiere, J., . . . Zandstra, P. W. (2009). An automated system for delivery of an unstable transcription factor to hematopoietic stem cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, *103*(2), 402-412. doi: 10.1002/bit.22297
- Cutler, C., & Antin, J. H. (2001). Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. *Stem Cells*, *19*(2), 108-117. doi: 10.1634/stemcells.19-2-108
- Daga, A., Podesta, M., Capra, M. C., Piaggio, G., Frassoni, F., & Corte, G. (2000). The retroviral transduction of HOXC4 into human CD34(+) cells induces an in vitro expansion of clonogenic and early progenitors. *Exp Hematol*, *28*(5), 569-574.
- Deschamps, J., & van Nes, J. (2005). Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development*, *132*(13), 2931-2942. doi: 10.1242/dev.01897
- Devetten, M., & Armitage, J. O. (2007). Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. *Ann Oncol*, *18*(9), 1450-1456. doi: 10.1093/annonc/mdm064
- Dik, W. A., Brahim, W., Braun, C., Asnafi, V., Dastugue, N., Bernard, O. A., . . . Delabesse, E. (2005). CALM-AF10+ T-ALL expression profiles are characterized by overexpression of HOXA and BMI1 oncogenes. *Leukemia*, *19*(11), 1948-1957. doi: 10.1038/sj.leu.2403891
- DiMartino, J. F., Selleri, L., Traver, D., Firpo, M. T., Rhee, J., Warnke, R., . . . Cleary, M. L. (2001). The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver. *Blood*, *98*(3), 618-626.

- Ding, L., & Morrison, S. J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, *495*(7440), 231-235. doi: 10.1038/nature11885
- Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., & Morrison, S. J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, *481*(7382), 457-462. doi: 10.1038/nature10783
- Domen, J., Cheshier, S. H., & Weissman, I. L. (2000). The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential. *J Exp Med*, *191*(2), 253-264.
- Dorshkind, K., Montecino-Rodriguez, E., & Signer, R. A. (2009). The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol*, *9*(1), 57-62. doi: 10.1038/nri2471
- Doulatov, S., Vo, L. T., Chou, S. S., Kim, P. G., Arora, N., Li, H., . . . Daley, G. Q. (2013). Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors. *Cell Stem Cell*, *13*(4), 459-470. doi: 10.1016/j.stem.2013.09.002
- Drabkin, H. A., Parsy, C., Ferguson, K., Guilhot, F., Lacotte, L., Roy, L., . . . Roche, J. (2002). Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, *16*(2), 186-195. doi: 10.1038/sj.leu.2402354
- Du, J., Chen, Y., Li, Q., Han, X., Cheng, C., Wang, Z., . . . Yang, Y. C. (2012). HIF-1alpha deletion partially rescues defects of hematopoietic stem cell quiescence caused by Cited2 deficiency. *Blood*, *119*(12), 2789-2798. doi: 10.1182/blood-2011-10-387902
- Duboule, D., & Morata, G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet*, *10*(10), 358-364.
- Dubrulle, J., McGrew, M. J., & Pourquie, O. (2001). FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell*, *106*(2), 219-232.
- Duncan, A. W., Rattis, F. M., DiMascio, L. N., Congdon, K. L., Pazianos, G., Zhao, C., . . . Reya, T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*, *6*(3), 314-322. doi: 10.1038/ni1164
- Dykstra, B., Kent, D., Bowie, M., McCaffrey, L., Hamilton, M., Lyons, K., . . . Eaves, C. (2007). Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell*, *1*(2), 218-229. doi: 10.1016/j.stem.2007.05.015
- Elias, M. H., Baba, A. A., Husin, A., Sulong, S., Hassan, R., Sim, G. A., . . . Ankathil, R. (2013). HOXA4 gene promoter hypermethylation as an epigenetic mechanism mediating resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Biomed Res Int*, *2013*, 129715. doi: 10.1155/2013/129715
- Fan, R., Bonde, S., Gao, P., Sotomayor, B., Chen, C., Mouw, T., . . . Tan, K. (2012). Dynamic HoxB4-regulatory network during embryonic stem cell differentiation to hematopoietic cells. *Blood*, *119*(19), e139-147. doi: 10.1182/blood-2011-12-396754
- Ferrando, A. A., Armstrong, S. A., Neuberg, D. S., Sallan, S. E., Silverman, L. B., Korsmeyer, S. J., & Look, A. T. (2003). Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood*, *102*(1), 262-268. doi: 10.1182/blood-2002-10-3221

- Ficara, F., Crisafulli, L., Lin, C., Iwasaki, M., Smith, K. S., Zammataro, L., & Cleary, M. L. (2013). Pbx1 restrains myeloid maturation while preserving lymphoid potential in hematopoietic progenitors. *J Cell Sci*, *126*(Pt 14), 3181-3191. doi: 10.1242/jcs.125435
- Fischbach, N. A., Rozenfeld, S., Shen, W., Fong, S., Chrobak, D., Ginzinger, D., . . . Lawrence, H. J. (2005). HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood*, *105*(4), 1456-1466. doi: 10.1182/blood-2004-04-1583
- Fleming, H. E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K. M., Kronenberg, H. M., & Scadden, D. T. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell*, *2*(3), 274-283. doi: 10.1016/j.stem.2008.01.003
- Florian, M. C., Dorr, K., Niebel, A., Daria, D., Schrezenmeier, H., Rojewski, M., . . . Geiger, H. (2012). Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell*, *10*(5), 520-530. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.007
- Forlani, S., Lawson, K. A., & Deschamps, J. (2003). Acquisition of Hox codes during gastrulation and axial elongation in the mouse embryo. *Development*, *130*(16), 3807-3819.
- Forrester, L. M., & Jackson, M. (2012). Mechanism of action of HOXB4 on the hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells*, *30*(3), 379-385. doi: 10.1002/stem.1036
- Forsberg, E. C., Prohaska, S. S., Katzman, S., Heffner, G. C., Stuart, J. M., & Weissman, I. L. (2005). Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet*, *1*(3), e28. doi: 10.1371/journal.pgen.0010028
- Fournier, M., Lebert-Ghali, C. E., Krosch, G., & Bijl, J. J. (2012). HOXA4 induces expansion of hematopoietic stem cells in vitro and confers enhancement of pro-B-cells in vivo. *Stem Cells Dev*, *21*(1), 133-142. doi: 10.1089/scd.2011.0259
- Gao, H., Wu, X., Sun, Y., Zhou, S., Silberstein, L. E., & Zhu, Z. (2012). Suppression of homeobox transcription factor VentX promotes expansion of human hematopoietic stem/multipotent progenitor cells. *J Biol Chem*, *287*(35), 29979-29987. doi: 10.1074/jbc.M112.383018
- Gavalas, A., Studer, M., Lumsden, A., Rijli, F. M., Krumlauf, R., & Chambon, P. (1998). Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development*, *125*(6), 1123-1136.
- Gehring, W. J., & Hiromi, Y. (1986). Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet*, *20*, 147-173. doi: 10.1146/annurev.ge.20.120186.001051
- Gekas, C., Dieterlen-Lievre, F., Orkin, S. H., & Mikkola, H. K. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell*, *8*(3), 365-375. doi: 10.1016/j.devcel.2004.12.016
- Gekas, C., & Graf, T. (2013). CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood*, *121*(22), 4463-4472. doi: 10.1182/blood-2012-09-457929
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., & Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell*, *79*(1), 143-156.

- Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., . . . Lander, E. S. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, *286*(5439), 531-537.
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., & Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, *183*(4), 1797-1806.
- Grier, D. G., Thompson, A., Kwasniewska, A., McGonigle, G. J., Halliday, H. L., & Lappin, T. R. (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol*, *205*(2), 154-171. doi: 10.1002/path.1710
- Guiu, J., Shimizu, R., D'Altri, T., Fraser, S. T., Hatakeyama, J., Bresnick, E. H., . . . Bigas, A. (2013). Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling. *J Exp Med*, *210*(1), 71-84. doi: 10.1084/jem.20120993
- Guo, S., Lu, J., Schlanger, R., Zhang, H., Wang, J. Y., Fox, M. C., . . . Scadden, D. T. (2010). MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(32), 14229-14234. doi: 10.1073/pnas.0913574107
- Haddad, R., Pflumio, F., Vigon, I., Visentin, G., Auvray, C., Fichelson, S., & Amsellem, S. (2008). The HOXB4 homeoprotein differentially promotes ex vivo expansion of early human lymphoid progenitors. *Stem Cells*, *26*(2), 312-322. doi: 10.1634/stemcells.2007-0721
- Han, S. M., Han, S. H., Coh, Y. R., Jang, G., Chan Ra, J., Kang, S. K., . . . Youn, H. Y. (2014). Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med*, *46*, e101. doi: 10.1038/emm.2014.28
- Hassawi, M., Shestakova, E. A., Fournier, M., Lebert-Ghali, C. E., Vaisson, G., Frison, H., . . . Bijl, J. J. (2014). Hoxa9 collaborates with E2A-PBX1 in mouse B cell leukemia in association with Flt3 activation and decrease of B cell gene expression. *Dev Dyn*, *243*(1), 145-158. doi: 10.1002/dvdy.24056
- He, H., Hua, X., & Yan, J. (2011). Epigenetic regulations in hematopoietic Hox code. *Oncogene*, *30*(4), 379-388. doi: 10.1038/onc.2010.484
- Helgason, C. D., Sauvageau, G., Lawrence, H. J., Largman, C., & Humphries, R. K. (1996). Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro. *Blood*, *87*(7), 2740-2749.
- Hill, R. E., Jones, P. F., Rees, A. R., Sime, C. M., Justice, M. J., Copeland, N. G., . . . Davidson, D. R. (1989). A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. *Genes Dev*, *3*(1), 26-37.
- Himburg, H. A., Muramoto, G. G., Daher, P., Meadows, S. K., Russell, J. L., Doan, P., . . . Chute, J. P. (2010). Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, *16*(4), 475-482. doi: 10.1038/nm.2119
- Hogan, B. L., Thaller, C., & Eichele, G. (1992). Evidence that Hensen's node is a site of retinoic acid synthesis. *Nature*, *359*(6392), 237-241. doi: 10.1038/359237a0
- Hoggatt, J., & Pelus, L. M. (2011). Mobilization of hematopoietic stem cells from the bone marrow niche to the blood compartment. *Stem Cell Res Ther*, *2*(2), 13. doi: 10.1186/scrt54

- Horan, G. S., Ramirez-Solis, R., Featherstone, M. S., Wolgemuth, D. J., Bradley, A., & Behringer, R. R. (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), 1667-1677.
- Hudry, B., Remacle, S., Delfini, M. C., Rezsöházy, R., Graba, Y., & Merabet, S. (2012). Hox proteins display a common and ancestral ability to diversify their interaction mode with the PBC class cofactors. *PLoS Biol*, *10*(6), e1001351. doi: 10.1371/journal.pbio.1001351
- Huynh, H., Iizuka, S., Kaba, M., Kirak, O., Zheng, J., Lodish, H. F., & Zhang, C. C. (2008). Insulin-like growth factor-binding protein 2 secreted by a tumorigenic cell line supports ex vivo expansion of mouse hematopoietic stem cells. *Stem Cells*, *26*(6), 1628-1635. doi: 10.1634/stemcells.2008-0064
- Huynh, H., Zheng, J., Umikawa, M., Zhang, C., Silvano, R., Iizuka, S., . . . Zhang, C. C. (2011). IGF binding protein 2 supports the survival and cycling of hematopoietic stem cells. *Blood*, *118*(12), 3236-3243. doi: 10.1182/blood-2011-01-331876
- Hwang, W. Y., Samuel, M., Tan, D., Koh, L. P., Lim, W., & Linn, Y. C. (2007). A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, *13*(4), 444-453. doi: 10.1016/j.bbmt.2006.11.005
- Iacovino, M., Hernandez, C., Xu, Z., Bajwa, G., Prather, M., & Kyba, M. (2009). A conserved role for Hox paralog group 4 in regulation of hematopoietic progenitors. *Stem Cells Dev*, *18*(5), 783-792. doi: 10.1089/scd.2008.0227
- Iscoe, N. N., & Nawa, K. (1997). Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion. *Curr Biol*, *7*(10), 805-808.
- Iwama, A., Oguro, H., Negishi, M., Kato, Y., Morita, Y., Tsukui, H., . . . Nakauchi, H. (2004). Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity*, *21*(6), 843-851. doi: 10.1016/j.immuni.2004.11.004
- Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J. R., Pui, C. H., & Campana, D. (2007). Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest*, *117*(4), 1049-1057. doi: 10.1172/JCI30235
- Izpisua-Belmonte, J. C., Falkenstein, H., Dolle, P., Renucci, A., & Duboule, D. (1991). Murine genes related to the Drosophila *AbdB* homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J*, *10*(8), 2279-2289.
- Jackson, M., Axton, R. A., Taylor, A. H., Wilson, J. A., Gordon-Keylock, S. A., Kokkaliaris, K. D., . . . Forrester, L. M. (2012). HOXB4 can enhance the differentiation of embryonic stem cells by modulating the hematopoietic niche. *Stem Cells*, *30*(2), 150-160. doi: 10.1002/stem.782
- Jacobs, Y., Schnabel, C. A., & Cleary, M. L. (1999). Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity. *Mol Cell Biol*, *19*(7), 5134-5142.
- Jiang, J., Yu, H., Shou, Y., Neale, G., Zhou, S., Lu, T., & Sorrentino, B. P. (2010). Hemgn is a direct transcriptional target of HOXB4 and induces expansion of murine myeloid progenitor cells. *Blood*, *116*(5), 711-719. doi: 10.1182/blood-2009-07-235341

- Kamps, M. P., & Baltimore, D. (1993). E2A-Pbx1, the t(1;19) translocation protein of human pre-B-cell acute lymphocytic leukemia, causes acute myeloid leukemia in mice. *Mol Cell Biol*, 13(1), 351-357.
- Kamps, M. P., Look, A. T., & Baltimore, D. (1991). The human t(1;19) translocation in pre-B ALL produces multiple nuclear E2A-Pbx1 fusion proteins with differing transforming potentials. *Genes Dev*, 5(3), 358-368.
- 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), 111-118.
- Karanu, F. N., Murdoch, B., Miyabayashi, T., Ohno, M., Koremoto, M., Gallacher, L., . . . Bhatia, M. (2001). Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood*, 97(7), 1960-1967.
- Karsunky, H., Inlay, M. A., Serwold, T., Bhattacharya, D., & Weissman, I. L. (2008). Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood*, 111(12), 5562-5570. doi: 10.1182/blood-2007-11-126219
- Kato, Y., Iwama, A., Tadokoro, Y., Shimoda, K., Minoguchi, M., Akira, S., . . . Nakauchi, H. (2005). Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J Exp Med*, 202(1), 169-179. doi: 10.1084/jem.20042541
- Kawagoe, H., Humphries, R. K., Blair, A., Sutherland, H. J., & Hogge, D. E. (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), 687-698.
- Kent, D. G., Dykstra, B. J., Cheyne, J., Ma, E., & Eaves, C. J. (2008). Steel factor coordinately regulates the molecular signature and biologic function of hematopoietic stem cells. *Blood*, 112(3), 560-567. doi: 10.1182/blood-2007-10-117820
- Kessel, M., & Gruss, P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell*, 67(1), 89-104.
- Kiel, M. J., Acar, M., Radice, G. L., & Morrison, S. J. (2009). Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell*, 4(2), 170-179. doi: 10.1016/j.stem.2008.10.005
- Kingsley, P. D., Malik, J., Fantauzzo, K. A., & Palis, J. (2004). Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood*, 104(1), 19-25. doi: 10.1182/blood-2003-12-4162
- Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B. T., Jacobsen, S. E., & Nerlov, C. (2006). Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol*, 7(10), 1048-1056. doi: 10.1038/ni1381
- Klausen, C., Leung, P. C., & Auersperg, N. (2009). Cell motility and spreading are suppressed by HOXA4 in ovarian cancer cells: possible involvement of beta1 integrin. *Mol Cancer Res*, 7(9), 1425-1437. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0466
- Klump, H., Schiedlmeier, B., & Baum, C. (2005). Control of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: HOXB4 on the threshold. *Ann N Y Acad Sci*, 1044, 6-15. doi: 10.1196/annals.1349.002
- Ko, K. H., Holmes, T., Palladinetti, P., Song, E., Nordon, R., O'Brien, T. A., & Dolnikov, A. (2011). GSK-3beta inhibition promotes engraftment of ex vivo-expanded

- hematopoietic stem cells and modulates gene expression. *Stem Cells*, 29(1), 108-118. doi: 10.1002/stem.551
- Ko, K. H., Lam, Q. L., Zhang, M., Wong, C. K., Lo, C. K., Kahmeyer-Gabbe, M., . . . Lu, L. (2007). Hoxb3 deficiency impairs B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Exp Hematol*, 35(3), 465-475. doi: 10.1016/j.exphem.2006.10.014
- Kojika, S., & Griffin, J. D. (2001). Notch receptors and hematopoiesis. *Exp Hematol*, 29(9), 1041-1052.
- Kollman, C., Howe, C. W., Anasetti, C., Antin, J. H., Davies, S. M., Filipovich, A. H., . . . Confer, D. L. (2001). Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*, 98(7), 2043-2051.
- Kondo, M., Weissman, I. L., & Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91(5), 661-672.
- Kopp, H. G., Avezilla, S. T., Hooper, A. T., & Rafii, S. (2005). The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*, 20, 349-356. doi: 10.1152/physiol.00025.2005
- Korbling, M., Huh, Y. O., Durett, A., Mirza, N., Miller, P., Engel, H., . . . Champlin, R. E. (1995). Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease. *Blood*, 86(7), 2842-2848.
- Korngold, R., & Sprent, J. (1978). Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp Med*, 148(6), 1687-1698.
- Korsmeyer, S. J. (1992). Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol*, 10, 785-807. doi: 10.1146/annurev.iy.10.040192.004033
- Kozar, K., Ciemerych, M. A., Rebel, V. I., Shigematsu, H., Zagodzón, A., Sicinska, E., . . . Sicinski, P. (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell*, 118(4), 477-491. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.025
- Kranc, K. R., Schepers, H., Rodrigues, N. P., Bamforth, S., Villadsen, E., Ferry, H., . . . Enver, T. (2009). Cited2 is an essential regulator of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 5(6), 659-665. doi: 10.1016/j.stem.2009.11.001
- Krasnow, M. A., Saffman, E. E., Kornfeld, K., & Hogness, D. S. (1989). Transcriptional activation and repression by Ultrabithorax proteins in cultured Drosophila cells. *Cell*, 57(6), 1031-1043.
- Krosl, G., Giard, M.-P., Krosl, J., Humphries, K., Sauvageau, G., & Roy, D. C. (2004). Recombinant TAT-HOXB4 Protein Promotes *Ex Vivo* Expansion of Primitive Human Hematopoietic Cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2004(104), Abstract 2855.
- Krosl, J., Austin, P., Beslu, N., Kroon, E., Humphries, R. K., & Sauvageau, G. (2003a). In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med*, 9(11), 1428-1432. doi: 10.1038/nm951
- Krosl, J., Beslu, N., Mayotte, N., Humphries, R. K., & Sauvageau, G. (2003b). 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), 561-571.
- Kulesa, H., Frampton, J., & Graf, T. (1995). GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev*, 9(10), 1250-1262.
- Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A. M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., . . . Medvinsky, A. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development*, 129(21), 4891-4899.
- Kunisato, A., Chiba, S., Nakagami-Yamaguchi, E., Kumano, K., Saito, T., Masuda, S., . . . Hirai, H. (2003). HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood*, 101(5), 1777-1783. doi: 10.1182/blood-2002-07-2051
- Kyba, M., Perlingeiro, R. C., & Daley, G. Q. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*, 109(1), 29-37.
- Ladam, F., & Sagerstrom, C. G. (2014). Hox regulation of transcription: more complex(es). *Dev Dyn*, 243(1), 4-15. doi: 10.1002/dvdy.23997
- Lai, A. Y., & Kondo, M. (2007). Identification of a bone marrow precursor of the earliest thymocytes in adult mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(15), 6311-6316. doi: 10.1073/pnas.0609608104
- Lapidot, T., & Kollet, O. (2002). The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia*, 16(10), 1992-2003. doi: 10.1038/sj.leu.2402684
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., . . . Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645-648. doi: 10.1038/367645a0
- Lawrence, H. J., Helgason, C. D., Sauvageau, G., Fong, S., Izon, D. J., Humphries, R. K., & Largman, C. (1997). Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood*, 89(6), 1922-1930.
- Lebert-Ghali, C. E., Fournier, M., Dickson, G. J., Thompson, A., Sauvageau, G., & Bijl, J. J. (2010). HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol*, 38(11), 1074-1086 e1071-1075. doi: 10.1016/j.exphem.2010.07.006
- Lebert-Ghali, C. E., Fournier, M., Thompson, A., Sauvageau, G., & Bijl, J. (En préparation). Hoxa genes are critical for maintenance of hematopoietic stem cells and regulate their interaction with the niche.
- Lechman, E. R., Gentner, B., van Galen, P., Giustacchini, A., Saini, M., Boccalatte, F. E., . . . Naldini, L. (2012). Attenuation of miR-126 activity expands HSC in vivo without exhaustion. *Cell Stem Cell*, 11(6), 799-811. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.001
- Lee, H. M., Zhang, H., Schulz, V., Tuck, D. P., & Forget, B. G. (2010). Downstream targets of HOXB4 in a cell line model of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 116(5), 720-730. doi: 10.1182/blood-2009-11-253872

- Lerou, P. H., & Daley, G. Q. (2005). Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev*, 19(6), 321-331. doi: 10.1016/j.blre.2005.01.005
- Levine, M., & Hoey, T. (1988). Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell*, 55(4), 537-540.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R. R., & Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet*, 22(4), 361-365. doi: 10.1038/11932
- Ljungman, P., Urbano-Ispizua, A., Cavazzana-Calvo, M., Demirer, T., Dini, G., Einsele, H., . . . Marrow. (2006). Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant*, 37(5), 439-449. doi: 10.1038/sj.bmt.1705265
- Luis, T. C., Weerkamp, F., Naber, B. A., Baert, M. R., de Haas, E. F., Nikolic, T., . . . Staal, F. J. (2009). Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood*, 113(3), 546-554. doi: 10.1182/blood-2008-06-163774
- Magli, M. C., Largman, C., & Lawrence, H. J. (1997). Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J Cell Physiol*, 173(2), 168-177. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:2<168::AID-JCP16>3.0.CO;2-C
- Magnusson, M., Brun, A. C., Lawrence, H. J., & Karlsson, S. (2007a). Hoxa9/hoxb3/hoxb4 compound null mice display severe hematopoietic defects. *Exp Hematol*, 35(9), 1421-1428. doi: 10.1016/j.exphem.2007.05.011
- Magnusson, M., Brun, A. C., Miyake, N., Larsson, J., Ehinger, M., Bjornsson, J. M., . . . Karlsson, S. (2007b). HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood*, 109(9), 3687-3696. doi: 10.1182/blood-2006-10-054676
- Manley, N. R., Selleri, L., Brendolan, A., Gordon, J., & Cleary, M. L. (2004). Abnormalities of caudal pharyngeal pouch development in Pbx1 knockout mice mimic loss of Hox3 paralogs. *Dev Biol*, 276(2), 301-312. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.08.030
- Mann, R. S., & Chan, S. K. (1996). Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet*, 12(7), 258-262.
- Marr, K. A. (2012). Delayed opportunistic infections in hematopoietic stem cell transplantation patients: a surmountable challenge. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 265-270. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.265
- McCulloch, E. A., Siminovitch, L., Till, J. E., Russell, E. S., & Bernstein, S. E. (1965). The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype Sl-Sld. *Blood*, 26(4), 399-410.
- McGinnis, W., & Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, 68(2), 283-302.
- McGrath, K. E., & Palis, J. (2005). Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematol*, 33(9), 1021-1028. doi: 10.1016/j.exphem.2005.06.012
- McKenzie, J. L., Takenaka, K., Gan, O. I., Doedens, M., & Dick, J. E. (2007). Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. *Blood*, 109(2), 543-545. doi: 10.1182/blood-2006-06-030270

- Meazza, R., Faiella, A., Corsetti, M. T., Airoidi, I., Ferrini, S., Boncinelli, E., & Corte, G. (1995). Expression of HOXC4 homeoprotein in the nucleus of activated human lymphocytes. *Blood*, *85*(8), 2084-2090.
- Milner, L. A., Kopan, R., Martin, D. I., & Bernstein, I. D. (1994). A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood*, *83*(8), 2057-2062.
- Min, I. M., Pietramaggiore, G., Kim, F. S., Passegue, E., Stevenson, K. E., & Wagers, A. J. (2008). The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, *2*(4), 380-391. doi: 10.1016/j.stem.2008.01.015
- Miyake, N., Brun, A. C., Magnusson, M., Miyake, K., Scadden, D. T., & Karlsson, S. (2006). HOXB4-induced self-renewal of hematopoietic stem cells is significantly enhanced by p21 deficiency. *Stem Cells*, *24*(3), 653-661. doi: 10.1634/stemcells.2005-0328
- Moreno, T. A., & Kintner, C. (2004). Regulation of segmental patterning by retinoic acid signaling during Xenopus somitogenesis. *Dev Cell*, *6*(2), 205-218.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *13*, 261-291. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.261
- Morrison, S. J., Hemmati, H. D., Wandycz, A. M., & Weissman, I. L. (1995). The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(22), 10302-10306.
- Morrison, S. J., & Scadden, D. T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, *505*(7483), 327-334. doi: 10.1038/nature12984
- Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Akashi, K., Globerson, A., & Weissman, I. L. (1996). The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, *2*(9), 1011-1016.
- Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Hemmati, H. D., Wright, D. E., & Weissman, I. L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*, *124*(10), 1929-1939.
- Morrison, S. J., & Weissman, I. L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, *1*(8), 661-673.
- Moskow, J. J., Bullrich, F., Huebner, K., Daar, I. O., & Buchberg, A. M. (1995). Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol Cell Biol*, *15*(10), 5434-5443.
- Muller-Sieburg, C. E., Cho, R. H., Thoman, M., Adkins, B., & Sieburg, H. B. (2002). Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood*, *100*(4), 1302-1309.
- Muller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., & Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*, *1*(4), 291-301.
- Muller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., . . . Simon, J. A. (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell*, *111*(2), 197-208.
- Mullighan, C. G., Kennedy, A., Zhou, X., Radtke, I., Phillips, L. A., Shurtleff, S. A., & Downing, J. R. (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), 2000-2009. doi: 10.1038/sj.leu.2404808
- Mullor, J. L., Sanchez, P., & Ruiz i Altaba, A. (2002). Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends Cell Biol*, 12(12), 562-569.
- Nakada, D., Oguro, H., Levi, B. P., Ryan, N., Kitano, A., Saitoh, Y., . . . Morrison, S. J. (2014). Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. *Nature*, 505(7484), 555-558. doi: 10.1038/nature12932
- Nakamura, T., Largaespada, D. A., Lee, M. P., Johnson, L. A., Ohyashiki, K., Toyama, K., . . . Shaughnessy, J. D., Jr. (1996). Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet*, 12(2), 154-158. doi: 10.1038/ng0296-154
- Nie, Y., Han, Y. C., & Zou, Y. R. (2008). CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med*, 205(4), 777-783. doi: 10.1084/jem.20072513
- Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., . . . Cornall, R. J. (2007). DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature*, 447(7145), 686-690. doi: 10.1038/nature05875
- Nilsson, S. K., Johnston, H. M., Whitty, G. A., Williams, B., Webb, R. J., Denhardt, D. T., . . . Haylock, D. N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 106(4), 1232-1239. doi: 10.1182/blood-2004-11-4422
- Nishino, T., Miyaji, K., Ishiwata, N., Arai, K., Yui, M., Asai, Y., . . . Iwama, A. (2009). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by a small-molecule agonist of c-MPL. *Exp Hematol*, 37(11), 1364-1377 e1364. doi: 10.1016/j.exphem.2009.09.001
- Nottke, A., Colaiacovo, M. P., & Shi, Y. (2009). Developmental roles of the histone lysine demethylases. *Development*, 136(6), 879-889. doi: 10.1242/dev.020966
- Nteliopoulos, G., & Gordon, M. Y. (2012). Protein segregation between dividing hematopoietic progenitor cells in the determination of the symmetry/asymmetry of cell division. *Stem Cells Dev*, 21(14), 2565-2580. doi: 10.1089/scd.2011.0467
- Nutt, S. L., & Kee, B. L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*, 26(6), 715-725. doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.010
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 81(11), 2844-2853.
- Oguro, H., Ding, L., & Morrison, S. J. (2013). SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell*, 13(1), 102-116. doi: 10.1016/j.stem.2013.05.014
- Ohno, S. (1999). Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Semin Cell Dev Biol*, 10(5), 517-522. doi: 10.1006/scdb.1999.0332
- Ohta, H., Sekulovic, S., Bakovic, S., Eaves, C. J., Pineault, N., Gasparetto, M., . . . Humphries, R. K. (2007). Near-maximal expansions of hematopoietic stem cells in culture using NUP98-HOX fusions. *Exp Hematol*, 35(5), 817-830.
- Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Miura, Y., & Suda, T. (1992). In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood*, 80(12), 3044-3050.

- Oosterveen, T., Niederreither, K., Dolle, P., Chambon, P., Meijlink, F., & Deschamps, J. (2003a). Retinoids regulate the anterior expression boundaries of 5' Hoxb genes in posterior hindbrain. *EMBO J*, 22(2), 262-269. doi: 10.1093/emboj/cdg029
- Oosterveen, T., van Vliet, P., Deschamps, J., & Meijlink, F. (2003b). The direct context of a hox retinoic acid response element is crucial for its activity. *J Biol Chem*, 278(26), 24103-24107. doi: 10.1074/jbc.M300774200
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., & Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273(5272), 242-245.
- Oshima, M., Endoh, M., Endo, T. A., Toyoda, T., Nakajima-Takagi, Y., Sugiyama, F., . . . Osawa, M. (2011). Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood*, 117(15), e142-150. doi: 10.1182/blood-2010-12-323212
- Ota, T., Klausen, C., Salamanca, M. C., Woo, H. L., Leung, P. C., & Auersperg, N. (2009). Expression and function of HOXA genes in normal and neoplastic ovarian epithelial cells. *Differentiation*, 77(2), 162-171. doi: 10.1016/j.diff.2008.09.018
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., & Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, 126(22), 5073-5084.
- Pang, W. W., Price, E. A., Sahoo, D., Beerman, I., Maloney, W. J., Rossi, D. J., . . . Weissman, I. L. (2011). Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(50), 20012-20017. doi: 10.1073/pnas.1116110108
- Parekh, C., & Crooks, G. M. (2013). Critical differences in hematopoiesis and lymphoid development between humans and mice. *J Clin Immunol*, 33(4), 711-715. doi: 10.1007/s10875-012-9844-3
- Park, I. K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., . . . Clarke, M. F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, 423(6937), 302-305. doi: 10.1038/nature01587
- Park, S. R., Zan, H., Pal, Z., Zhang, J., Al-Qahtani, A., Pone, E. J., . . . Casali, P. (2009). HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat Immunol*, 10(5), 540-550. doi: 10.1038/ni.1725
- Passegue, E., Wagers, A. J., Giuriato, S., Anderson, W. C., & Weissman, I. L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med*, 202(11), 1599-1611. doi: 10.1084/jem.20050967
- Pawliuk, R., Eaves, C., & Humphries, R. K. (1996). Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood*, 88(8), 2852-2858.
- Pearson, J. C., Lemons, D., & McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet*, 6(12), 893-904. doi: 10.1038/nrg1726
- Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., . . . Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation

- in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*, 349(6306), 257-260. doi: 10.1038/349257a0
- Pineault, N., Abramovich, C., Ohta, H., & Humphries, R. K. (2004). Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol*, 24(5), 1907-1917.
- Pineault, N., Buske, C., Feuring-Buske, M., Abramovich, C., Rosten, P., Hogge, D. E., . . . Humphries, R. K. (2003). Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1. *Blood*, 101(11), 4529-4538. doi: 10.1182/blood-2002-08-2484
- Pineault, N., Helgason, C. D., Lawrence, H. J., & Humphries, R. K. (2002). Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol*, 30(1), 49-57.
- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., . . . Pear, W. S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*, 11(3), 299-308.
- Purton, L. E., Bernstein, I. D., & Collins, S. J. (2000). All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. *Blood*, 95(2), 470-477.
- Quentmeier, H., Dirks, W. G., Macleod, R. A., Reinhardt, J., Zaborski, M., & Drexler, H. G. (2004). Expression of HOX genes in acute leukemia cell lines with and without MLL translocations. *Leuk Lymphoma*, 45(3), 567-574.
- Rafeah, N. T., & Fadilah, S. A. (2009). The A-B-C of haematopoietic stem cell transplantation. *Med J Malaysia*, 64(1), 94-100; quiz 101.
- Rehe, K., Wilson, K., Bomken, S., Williamson, D., Irving, J., den Boer, M. L., . . . Vormoor, J. (2013). Acute B lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. *EMBO Mol Med*, 5(1), 38-51. doi: 10.1002/emmm.201201703
- Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T., & Skoultschi, A. I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev*, 13(11), 1398-1411.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., . . . Weissman, I. L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423(6938), 409-414. doi: 10.1038/nature01593
- Rhinn, M., & Dolle, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development*, 139(5), 843-858. doi: 10.1242/dev.065938
- Riddell, J., Gazit, R., Garrison, B. S., Guo, G., Saadatpour, A., Mandal, P. K., . . . Rossi, D. J. (2014). Reprogramming committed murine blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors. *Cell*, 157(3), 549-564. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.006
- Romeo, F., Costanzo, F., & Agostini, M. (2012). Embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells: two faces of the same coin? *Aging (Albany NY)*, 4(12), 878-886.
- Rossi, D. J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., & Weissman, I. L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 447(7145), 725-729. doi: 10.1038/nature05862

- Rossi, D. J., Bryder, D., Zahn, J. M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A. J., & Weissman, I. L. (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(26), 9194-9199. doi: 10.1073/pnas.0503280102
- Roy, S., Tripathy, M., Mathur, N., Jain, A., & Mukhopadhyay, A. (2012). Hypoxia improves expansion potential of human cord blood-derived hematopoietic stem cells and marrow repopulation efficiency. *Eur J Haematol*, *88*(5), 396-405. doi: 10.1111/j.1600-0609.2012.01759.x
- Rozovskaia, T., Feinstein, E., Mor, O., Foa, R., Blechman, J., Nakamura, T., . . . Canaani, E. (2001). Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4 : 11) abnormality. *Oncogene*, *20*(7), 874-878. doi: 10.1038/sj.onc.1204174
- Rudolf, M., Winkler, B., Aherrahou, Z., Doehring, L. C., Kaczmarek, P., & Schmidt-Erfurth, U. (2005). Increased expression of vascular endothelial growth factor associated with accumulation of lipids in Bruch's membrane of LDL receptor knockout mice. *Br J Ophthalmol*, *89*(12), 1627-1630. doi: 10.1136/bjo.2005.071183
- Rumfelt, L. L., Zhou, Y., Rowley, B. M., Shinton, S. A., & Hardy, R. R. (2006). Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J Exp Med*, *203*(3), 675-687. doi: 10.1084/jem.20052444
- Saleh, M., Rambaldi, I., Yang, X. J., & Featherstone, M. S. (2000). Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Mol Cell Biol*, *20*(22), 8623-8633.
- Samper, E., Fernandez, P., Eguia, R., Martin-Rivera, L., Bernad, A., Blasco, M. A., & Aracil, M. (2002). Long-term repopulating ability of telomerase-deficient murine hematopoietic stem cells. *Blood*, *99*(8), 2767-2775.
- Sands, W. A., Copland, M., & Wheadon, H. (2013). Targeting self-renewal pathways in myeloid malignancies. *Cell Commun Signal*, *11*(1), 33. doi: 10.1186/1478-811X-11-33
- Sauvageau, G., Lansdorp, P. M., Eaves, C. J., Hogge, D. E., Dragowska, W. H., Reid, D. S., . . . Humphries, R. K. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(25), 12223-12227.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C. J., Lawrence, H. J., Largman, C., Lansdorp, P. M., & Humphries, R. K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev*, *9*(14), 1753-1765.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Hough, M. R., Hugo, P., Lawrence, H. J., Largman, C., & Humphries, R. K. (1997). Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity*, *6*(1), 13-22.
- Scheller, M., Huelsken, J., Rosenbauer, F., Taketo, M. M., Birchmeier, W., Tenen, D. G., & Leutz, A. (2006). Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol*, *7*(10), 1037-1047. doi: 10.1038/ni1387
- Schiedlmeier, B., Klump, H., Will, E., Arman-Kalcek, G., Li, Z., Wang, Z., . . . Ostertag, W. (2003). High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. *Blood*, *101*(5), 1759-1768. doi: 10.1182/blood-2002-03-0767

- Schiedlmeier, B., Santos, A. C., Ribeiro, A., Moncaut, N., Lesinski, D., Auer, H., . . . Klump, H. (2007). HOXB4's road map to stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(43), 16952-16957. doi: 10.1073/pnas.0703082104
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, *4*(1-2), 7-25.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., & Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, *128*(4), 735-745. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.009
- Schuldiner, M., Eiges, R., Eden, A., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Goldstein, R. S., & Benvenisty, N. (2001). Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res*, *913*(2), 201-205.
- Schweisguth, F. (2004). Regulation of notch signaling activity. *Curr Biol*, *14*(3), R129-138.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., & Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, *265*(5178), 1573-1577.
- Seke Etet, P. F., Vecchio, L., & Nwabo Kamdje, A. H. (2012). Signaling pathways in chronic myeloid leukemia and leukemic stem cell maintenance: key role of stromal microenvironment. *Cell Signal*, *24*(9), 1883-1888. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.05.015
- Shah, A. J., Smogorzewska, E. M., Hannum, C., & Crooks, G. M. (1996). Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood*, *87*(9), 3563-3570.
- Shanmugam, K., Green, N. C., Rambaldi, I., Saragovi, H. U., & Featherstone, M. S. (1999). PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Mol Cell Biol*, *19*(11), 7577-7588.
- Shen, W. F., Montgomery, J. C., Rozenfeld, S., Moskow, J. J., Lawrence, H. J., Buchberg, A. M., & Largman, C. (1997a). AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol*, *17*(11), 6448-6458.
- Shen, W. F., Rozenfeld, S., Lawrence, H. J., & Largman, C. (1997b). The Abd-B-like Hox homeodomain proteins can be subdivided by the ability to form complexes with Pbx1a on a novel DNA target. *J Biol Chem*, *272*(13), 8198-8206.
- Shlomchik, W. D. (2007). Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*, *7*(5), 340-352. doi: 10.1038/nri2000
- Sieburg, H. B., Cho, R. H., Dykstra, B., Uchida, N., Eaves, C. J., & Muller-Sieburg, C. E. (2006). The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood*, *107*(6), 2311-2316. doi: 10.1182/blood-2005-07-2970
- Signer, R. A., & Morrison, S. J. (2013). Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell Stem Cell*, *12*(2), 152-165. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.001
- Simon, J. A., & Kingston, R. E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(10), 697-708. doi: 10.1038/nrm2763
- Singhal, S., Powles, R., Henslee-Downey, P. J., Chiang, K. Y., Treleaven, J., Godder, K., . . . Mehta, J. (2002). Allogeneic transplantation from HLA-matched sibling or partially HLA-mismatched related donors for primary refractory acute leukemia. *Bone Marrow Transplant*, *29*(4), 291-295. doi: 10.1038/sj.bmt.1703373

- Sirin, O., Lukov, G. L., Mao, R., Conneely, O. M., & Goodell, M. A. (2010). The orphan nuclear receptor Nurr1 restricts the proliferation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*, 12(12), 1213-1219. doi: 10.1038/ncb2125
- Slany, R. K. (2009). The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica*, 94(7), 984-993. doi: 10.3324/haematol.2008.002436
- Slape, C., & Aplan, P. D. (2004). The role of NUP98 gene fusions in hematologic malignancy. *Leuk Lymphoma*, 45(7), 1341-1350.
- Soderberg, S. S., Karlsson, G., & Karlsson, S. (2009). Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1176, 55-69. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04569.x
- Soshnikova, N. (2014). Hox genes regulation in vertebrates. *Dev Dyn*, 243(1), 49-58. doi: 10.1002/dvdy.24014
- Soshnikova, N., & Duboule, D. (2009). Epigenetic regulation of vertebrate Hox genes: a dynamic equilibrium. *Epigenetics*, 4(8), 537-540.
- Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J. M., Regnault, A., Garcia-Peydro, M., Dombret, H., . . . Sigaux, F. (2005). HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood*, 106(1), 274-286. doi: 10.1182/blood-2004-10-3900
- Staal, F. J., & Luis, T. C. (2010). Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J Cell Biochem*, 109(5), 844-849. doi: 10.1002/jcb.22467
- Staber, P. B., Zhang, P., Ye, M., Welner, R. S., Nombela-Arrieta, C., Bach, C., . . . Tenen, D. G. (2013). Sustained PU.1 levels balance cell-cycle regulators to prevent exhaustion of adult hematopoietic stem cells. *Mol Cell*, 49(5), 934-946. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.007
- Steelman, S., Moskow, J. J., Muzynski, K., North, C., Druck, T., Montgomery, J. C., . . . Buchberg, A. M. (1997). Identification of a conserved family of Meis1-related homeobox genes. *Genome Res*, 7(2), 142-156.
- Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N., & Scadden, D. T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*, 99(7), 2369-2378.
- Stock, J. K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., . . . Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol*, 9(12), 1428-1435. doi: 10.1038/ncb1663
- Strathdee, G., Holyoake, T. L., Sim, A., Parker, A., Oscier, D. G., Melo, J. V., . . . Brown, R. (2007). Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res*, 13(17), 5048-5055. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0919
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6), 977-988. doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016

- Sykes, D. B., & Kamps, M. P. (2004). E2a/Pbx1 induces the rapid proliferation of stem cell factor-dependent murine pro-T cells that cause acute T-lymphoid or myeloid leukemias in mice. *Mol Cell Biol*, *24*(3), 1256-1269.
- Szilvassy, S. J., Humphries, R. K., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C., & Eaves, C. J. (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(22), 8736-8740.
- Taichman, R. S., & Emerson, S. G. (1998). The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells*, *16*(1), 7-15. doi: 10.1002/stem.160007
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*(5), 861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takeshita, K., Bollekens, J. A., Hijiyama, N., Ratajczak, M., Ruddle, F. H., & Gewirtz, A. M. (1993). A homeobox gene of the Antennapedia class is required for human adult erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(8), 3535-3538.
- Tang, Y., Chen, J., & Young, N. S. (2009). Expansion of haematopoietic stem cells from normal donors and bone marrow failure patients by recombinant hoxb4. *Br J Haematol*, *144*(4), 603-612. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07509.x
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145-1147.
- Thoren, L. A., Liuba, K., Bryder, D., Nygren, J. M., Jensen, C. T., Qian, H., . . . Jacobsen, S. E. (2008). Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol*, *180*(4), 2045-2053.
- Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H. J., . . . Sauvageau, G. (2002). Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood*, *99*(1), 121-129.
- Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., & Humphries, R. K. (1999). Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood*, *94*(8), 2605-2612.
- Tian, D. M., Liang, L., Zhao, X. C., Zheng, M. H., Cao, X. L., Qin, H. Y., . . . Han, H. (2013). Endothelium-targeted Delta-like 1 promotes hematopoietic stem cell expansion ex vivo and engraftment in hematopoietic tissues in vivo. *Stem Cell Res*, *11*(2), 693-706. doi: 10.1016/j.scr.2013.04.008
- Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P., & Leiden, J. M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature*, *384*(6608), 474-478. doi: 10.1038/384474a0
- Trowbridge, J. J., Guezguez, B., Moon, R. T., & Bhatia, M. (2010). Wnt3a activates dormant c-Kit(-) bone marrow-derived cells with short-term multilineage hematopoietic reconstitution capacity. *Stem Cells*, *28*(8), 1379-1389. doi: 10.1002/stem.457
- Tsuzuki, S., & Seto, M. (2012). Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood*, *119*(3), 727-735. doi: 10.1182/blood-2011-06-362277

- Ueno, H., Sakita-Ishikawa, M., Morikawa, Y., Nakano, T., Kitamura, T., & Saito, M. (2003). A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, *4*(5), 457-463. doi: 10.1038/ni916
- Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F., & Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell*, *79*(5), 901-912.
- Varnum-Finney, B., Brashem-Stein, C., & Bernstein, I. D. (2003). Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood*, *101*(5), 1784-1789. doi: 10.1182/blood-2002-06-1862
- Varnum-Finney, B., Purton, L. E., Yu, M., Brashem-Stein, C., Flowers, D., Staats, S., . . . Bernstein, I. D. (1998). The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood*, *91*(11), 4084-4091.
- Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., . . . Bernstein, I. D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*, *6*(11), 1278-1281. doi: 10.1038/81390
- Wagner, J. E., Barker, J. N., DeFor, T. E., Baker, K. S., Blazar, B. R., Eide, C., . . . Davies, S. M. (2002). Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*, *100*(5), 1611-1618. doi: 10.1182/blood-2002-01-0294
- Walasek, M. A., van Os, R., & de Haan, G. (2012). Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Ann N Y Acad Sci*, *1266*, 138-150. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06549.x
- Waskiewicz, A. J., Rikhof, H. A., Hernandez, R. E., & Moens, C. B. (2001). Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Development*, *128*(21), 4139-4151.
- Watts, K. L., Beard, B. C., Wood, B. L., Trobridge, G. D., Humphries, R. K., Adams, A. B., . . . Kiem, H. P. (2014). No evidence of clonal dominance after transplant of HOXB4-expanded cord blood cells in a nonhuman primate model. *Exp Hematol*. doi: 10.1016/j.exphem.2014.03.007
- Watts, K. L., Delaney, C., Humphries, R. K., Bernstein, I. D., & Kiem, H. P. (2010). Combination of HOXB4 and Delta-1 ligand improves expansion of cord blood cells. *Blood*, *116*(26), 5859-5866. doi: 10.1182/blood-2010-05-286062
- Watts, K. L., Delaney, C., Nelson, V., Trobridge, G. D., Beard, B. C., Humphries, R. K., & Kiem, H. P. (2013). CD34(+) expansion with Delta-1 and HOXB4 promotes rapid engraftment and transfusion independence in a *Macaca nemestrina* cord blood transplant model. *Mol Ther*, *21*(6), 1270-1278. doi: 10.1038/mt.2013.40
- Weksberg, D. C., Chambers, S. M., Boles, N. C., & Goodell, M. A. (2008). CD150- side population cells represent a functionally distinct population of long-term hematopoietic stem cells. *Blood*, *111*(4), 2444-2451. doi: 10.1182/blood-2007-09-115006
- Williams, D. L., Look, A. T., Melvin, S. L., Roberson, P. K., Dahl, G., Flake, T., & Stass, S. (1984). New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell*, *36*(1), 101-109.

- Williams, T. M., Williams, M. E., Heaton, J. H., Gelehrter, T. D., & Innis, J. W. (2005). Group 13 HOX proteins interact with the MH2 domain of R-Smads and modulate Smad transcriptional activation functions independent of HOX DNA-binding capability. *Nucleic Acids Res*, *33*(14), 4475-4484. doi: 10.1093/nar/gki761
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R. C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., . . . Trumpp, A. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, *135*(6), 1118-1129. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.048
- Wilson, A., MacDonald, H. R., & Radtke, F. (2001). Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med*, *194*(7), 1003-1012.
- Wilson, A., Murphy, M. J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M. D., Oser, G. M., . . . Trumpp, A. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*, *18*(22), 2747-2763. doi: 10.1101/gad.313104
- Wilson, A., & Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, *6*(2), 93-106. doi: 10.1038/nri1779
- Wright, D. E., Bowman, E. P., Wagers, A. J., Butcher, E. C., & Weissman, I. L. (2002). Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med*, *195*(9), 1145-1154.
- Xu, M. J., Matsuoka, S., Yang, F. C., Ebihara, Y., Manabe, A., Tanaka, R., . . . Tsuji, K. (2001). Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood*, *97*(7), 2016-2022.
- Yahata, T., Takahashi, T., Muguruma, Y., Ibrahim, A. A., Matsuzawa, H., Uno, T., . . . Ando, K. (2011). Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood*, *118*(11), 2941-2950. doi: 10.1182/blood-2011-01-330050
- Yamada, T., Abe, M., Higashi, T., Yamamoto, H., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T., . . . Oikawa, T. (2001). Lineage switch induced by overexpression of Ets family transcription factor PU.1 in murine erythroleukemia cells. *Blood*, *97*(8), 2300-2307.
- Yamazaki, S., Iwama, A., Takayanagi, S., Eto, K., Ema, H., & Nakauchi, H. (2009). TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood*, *113*(6), 1250-1256. doi: 10.1182/blood-2008-04-146480
- Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Ohno, Y., Saeki, K., Kurogi, T., Tanaka-Okamoto, M., . . . Takihara, Y. (2013). Scmh1 has E3 ubiquitin ligase activity for geminin and histone H2A and regulates geminin stability directly or indirectly via transcriptional repression of Hoxa9 and Hoxb4. *Mol Cell Biol*, *33*(4), 644-660. doi: 10.1128/MCB.00974-12
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., . . . Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, *318*(5858), 1917-1920. doi: 10.1126/science.1151526
- Zangenberg, M., Grubach, L., Aggerholm, A., Silkjaer, T., Juhl-Christensen, C., Nyvold, C. G., . . . Hokland, P. (2009). The combined expression of HOXA4 and MEIS1 is an independent prognostic factor in patients with AML. *Eur J Haematol*, *83*(5), 439-448. doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01309.x
- Zangrando, A., Dell'orto, M. C., Te Kronnie, G., & Basso, G. (2009). MLL rearrangements in pediatric acute lymphoblastic and myeloblastic leukemias: MLL specific and lineage specific signatures. *BMC Med Genomics*, *2*, 36. doi: 10.1186/1755-8794-2-36

- Zeng, H., Yucel, R., Kosan, C., Klein-Hitpass, L., & Moroy, T. (2004). Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J*, 23(20), 4116-4125. doi: 10.1038/sj.emboj.7600419
- Zhang, C. C., Kaba, M., Ge, G., Xie, K., Tong, W., Hug, C., & Lodish, H. F. (2006). Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 12(2), 240-245. doi: 10.1038/nm1342
- Zhang, C. C., Kaba, M., Iizuka, S., Huynh, H., & Lodish, H. F. (2008). Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood*, 111(7), 3415-3423. doi: 10.1182/blood-2007-11-122119
- Zhang, C. C., & Lodish, H. F. (2004). Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells. *Blood*, 103(7), 2513-2521. doi: 10.1182/blood-2003-08-2955
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., . . . Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960), 836-841. doi: 10.1038/nature02041
- Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radomska, H. S., . . . Sun, Z. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(15), 8705-8710.
- Zhang, X. B., Beard, B. C., Beebe, K., Storer, B., Humphries, R. K., & Kiem, H. P. (2006). Differential effects of HOXB4 on nonhuman primate short- and long-term repopulating cells. *PLoS Med*, 3(5), e173. doi: 10.1371/journal.pmed.0030173
- Zhang, X. B., Beard, B. C., Trobridge, G. D., Wood, B. L., Sale, G. E., Sud, R., . . . Kiem, H. P. (2008). High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector. *J Clin Invest*, 118(4), 1502-1510. doi: 10.1172/JCI34371
- Zhang, X. B., Schwartz, J. L., Humphries, R. K., & Kiem, H. P. (2007). Effects of HOXB4 overexpression on ex vivo expansion and immortalization of hematopoietic cells from different species. *Stem Cells*, 25(8), 2074-2081. doi: 10.1634/stemcells.2006-0742
- Zhong, J. F., Zhao, Y., Sutton, S., Su, A., Zhan, Y., Zhu, L., . . . Cooke, M. P. (2005). Gene expression profile of murine long-term reconstituting vs. short-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(7), 2448-2453. doi: 10.1073/pnas.0409459102
- Zhong, Y., Sullenbarger, B., & Lasky, L. C. (2010). Effect of increased HoxB4 on human megakaryocytic development. *Biochem Biophys Res Commun*, 398(3), 377-382. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.075
- Zhu, J., Zhang, Y., Joe, G. J., Pompetti, R., & Emerson, S. G. (2005). NF- κ B activates multiple hematopoietic stem cell (HSC) regulatory genes and promotes HSC self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(33), 11728-11733. doi: 10.1073/pnas.0503405102
- Zimdahl, B., Ito, T., Blevins, A., Bajaj, J., Konuma, T., Weeks, J., . . . Reya, T. (2014). Lis1 regulates asymmetric division in hematopoietic stem cells and in leukemia. *Nat Genet*, 46(3), 245-252. doi: 10.1038/ng.2889
- Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., . . . Suda, T. (2011). p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell

quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell*, 9(3), 247-261. doi:
10.1016/j.stem.2011.07.003

Annexe 1: Liste des publications

Fournier M, Lebert-Ghali CE, Bijl JJ. *HOXA4* versus *HOXB4*: enhanced short-term repopulation by *HOXA4* and common modulation of Notch signaling genes. En préparation.

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.

Fournier M, Savoie-Rondeau I, Larochelle F, Hassawi M, Shestakova EA, Roy DC, Bijl JJ. Inability of *HOXB4* to enhance self-renewal of malignant B cells: Favourable profile for the expansion of autologous hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 2014 Jul;42(7):526-535.

Frison H, Giono GE, Thébault P, **Fournier M**, Labrecque N, Bijl JJ. Hoxb4 Overexpression in CD4 Memory Phenotype T Cells Increases the Central Memory Population upon Homeostatic Proliferation. *PLoS One*. 2013 Dec 6;8(12):e81573.

Hassawi M, Shestakova EA, **Fournier M**, Lebert-Ghali CE, Vaisson G, Frison H, Sinnott D, Vidal R, 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.

Fournier M, Lebert-Ghali CE, Krosi 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 (Novembre 2010) HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells. *Experimental Hematology* 2010 Nov;38(11):1074-1086

