



HAL
open science

Etude du rôle du facteur de transcription Helios dans les cellules souches hématopoïétiques

Rose-Marie Vesin

► **To cite this version:**

Rose-Marie Vesin. Etude du rôle du facteur de transcription Helios dans les cellules souches hématopoïétiques. Hématologie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ117 . tel-01680906v1

HAL Id: tel-01680906

<https://theses.hal.science/tel-01680906v1>

Submitted on 11 Jan 2018 (v1), last revised 11 Jan 2018 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de Strasbourg

Ecole Doctorale des sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée par

Rose-Marie VESIN

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Sciences du Vivant - Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Etude du rôle du facteur de transcription Helios dans les cellules
souches hématopoïétiques**

Soutenue publiquement le 3 octobre 2014 devant le jury composé de :

Rapporteur interne / Président du jury : Dr. Valérie SCHREIBER

Rapporteur externe : Dr. Valérie KOUSKOFF

Rapporteur externe : Dr Laurent DELVA

Examineur externe : Dr Bernard LOPEZ

Directeur de thèse : Dr Philippe KASTNER

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mes superviseurs Philippe et Susan qui m'ont accueillie au sein de leur laboratoire et m'ont permis de travailler sur ce projet passionnant. Je les remercie pour m'avoir aidée dans mes démarches scientifiques, et pour les discussions intéressantes que nous avons eues.

Je remercie toute l'équipe pour la bonne ambiance qui a résidé au labo tout au long de ma thèse, et notamment Jérôme, Deepikouz, KiKatKate, et Peggy ! Merci à vous pour les fous-rires que nous avons partagés ! Travailler à vos côtés a été un véritable plaisir. Je tiens à remercier Cai QI qui m'a fait partager son projet et m'a appris beaucoup d'expériences avec les souris (manipulation, transplantation, prélèvement de sang, injections). Je remercie particulièrement Attila, the « ChIP master » pour avoir réalisé les expériences de ChIP, et les avoir analyser. Je le remercie aussi pour les précieux conseils qu'il m'a donnés, notamment pour les Western Blot, pour sa disponibilité sans faille et pour son humour particulier ! Je remercie également Peggy d'être un élément clé de la bonne humeur du box 3075, et pour ne jamais hésiter à faire partager ses expériences, et à discuter. Je remercie aussi beaucoup Peggy pour avoir pris le temps de relire mon manuscrit de thèse. Je remercie également Patricia, notre technicienne en or, qui ne refuse jamais de nous aider, pour sa bonne humeur et son optimisme sans faille qui s'est montré parfois très réconfortant.

Je remercie Christian de l'équipe de Valérie Schreiber et Françoise Danzer pour m'avoir montré les expériences de COMET assay, et donné de bons conseils. Je veux remercier aussi Shankar pour ses conseils précieux concernant l'étude de la sénescence, ainsi que pour m'avoir donné quelques cellules MEF sénescents pour contrôle positif de mes expériences.

Je voudrais remercier les membres de l'équipe de Mei Li et de Bernardo Reina-San-Martin pour les discussions partagées pendant les « journal clubs » et « lab meetings ». Je remercie particulièrement Anne-Sophie, Léa, Isabelle, et Ebe pour leur bonne humeur, leur gentillesse, et pour m'avoir prêté pendant 4 ans le fameux aimant MACS pour déléter les cellules !

Je remercie spécialement Claudine, la reine du FACS et la maitresse de cette machine un peu capricieuse qu'est le trieur ARIA ! Merci pour son aide et ses dépannages lorsque la machine ne voulait rien entendre ! Elle a sauvé plus d'une manip' !

Je remercie aussi Claudine et Patricia pour leurs desserts alsaciens délicieux, et Beate pour ses gâteaux apportés à chaque occasion !

Je remercie les membres des plateformes de l'IGBMC (animalerie, Biopuces et séquençage et microscopie) pour leur travail et leur bonne humeur. Je tiens particulièrement à remercier Pascal pour son travail, la patience dont il a fait preuve, et son humour incroyable. Je remercie aussi Michaël et Sylvie de prendre soin de mes souris, et Alex et Will pour leur bonne humeur et leur aide dans les prélèvements rétro-orbitaux.

Je remercie aussi Sophie, Marie-Pierre et Ujjwal, étudiants que j'ai encadrés, pour l'expérience qu'ils m'ont apportée en tant qu'encadrante, rôle qui n'a pas toujours été facile.

Je remercie également les amis que j'ai rencontré à l'IGBMC et avec qui j'ai partagé beaucoup de déjeuners, et ce, toujours dans le rire. Je remercie Thomas, Jérôme, Salim, Ismail, Anne-Sophie, Thibaut, Sara, David, Léa, Stéphanie, Adrien pour les fous rires et les grandes discussions que nous avons eu au RU !

Je remercie ma famille et mes amis pour croire en moi, et pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ma thèse. Je tiens particulièrement à remercier mon Ghissounet, qui croit en moi, et m'a apporté un énorme soutien et beaucoup de réconforts dans les moments difficiles. Je le remercie aussi d'avoir fait l'effort de lire l'introduction de mon manuscrit d'autant plus qu'il n'est pas dans le sujet ! Je remercie aussi Hurry, le chat un peu spécial hérité de Cai QI, pour ses câlins donnés, notamment pendant la rédaction du manuscrit !

Enfin, je remercie spécialement Valérie Schreiber, Valérie Kouskoff, Laurent Delva, et Bernard Lopez d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Sommaire

Résumé de thèse

Introduction

I. <u>Helios est un facteur de transcription de la famille Ikaros</u>	p1
A. <u>Structure des protéines de la famille Ikaros et découverte de Helios</u>	p1
B. <u>Isoformes de Helios</u>	p3
C. <u>Expression de Helios et de ses isoformes</u>	p4
D. <u>Rôle de Helios dans les cellules T régulatrices (ou Tregs)</u>	p6
E. <u>Rôle de Helios dans la leucémogénèse</u>	p6
F. <u>Activité transcriptionnelle de Helios</u>	p7
II. <u>Les CSH sont à l'origine du système hématopoïétique</u>	p11
A. <u>Hématopoïèse et développement des CSH</u>	p11
1. <u>Hématopoïèse</u>	p11
2. <u>Développement des CSH</u>	p13
B. <u>Fonctions des CSH</u>	p15
1. <u>Quiescence et auto-renouvellement des CSH</u>	p17
a. <u>Rôle des inhibiteurs du cycle cellulaire dans la quiescence et l'auto-renouvellement des CSH</u>	p18
b. <u>Rôle de facteurs de transcription dans la quiescence et l'auto-renouvellement des CSH</u>	p19
c. <u>Rôle de Bmi1, protéine du complexe Polycomb, dans l'auto-renouvellement des CSH</u>	p20
d. <u>Rôle de molécules anti-apoptotiques dans la quiescence des CSH</u>	p20
e. <u>Rôle de la voie Wnt dans l'auto-renouvellement des CSH</u>	p21
2. <u>Différenciation des CSH</u>	p22

3. <u>Niches des CSH</u>	p23
C. <u>Comment étudier la biologie des CSH?</u>	p28
1. <u>Tests fonctionnels des CSH in vivo</u>	p28
2. <u>Culture des CSH in vitro</u>	p30
3. <u>Isolement des CSH</u>	p31
III. <u>Réponses des CSH aux dommages de l'ADN et vieillissement des CSH</u>	p33
A. <u>Réponses des CSH aux dommages de l'ADN</u>	p33
1. <u>Détection des cassures doubles brins</u>	p33
2. <u>Voies de réparation des cassures double brins</u>	p35
3. <u>P53, régulateur essentiel des réponses cellulaires aux dommages de l'ADN</u>	p37
4. <u>Déphosphorylation de la voie de signalisation de réponses aux dommages de l'ADN</u>	p40
5. <u>Conséquences d'un défaut de réponses aux dommages de l'ADN dans les CSH</u>	p42
B. <u>Vieillissement des CSH</u>	p44
1. <u>Mécanismes impliqués dans le vieillissement des CSH</u>	p44
a. <u>Accumulation de dommages de l'ADN</u>	p44
b. <u>Accumulation de ROS</u>	p45
c. <u>Raccourcissement des télomères</u>	p46
d. <u>Accumulation de cellules sénescents</u>	p47
e. <u>Niche des CSH</u>	p47
f. <u>Rôle des suppresseurs de tumeurs p53 et p16 dans le vieillissement des CSH</u>	p48
2. <u>Conséquences du vieillissement des CSH sur leurs fonctions</u>	p49
a. <u>Homing des CSH</u>	p49
b. <u>Potentiel de reconstitution des CSH</u>	p50
c. <u>Différenciation des CSH</u>	p51

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes du manuscrit de l'article p53

Résultats

The transcription factor Helios acts in synergy with p53 to mediate DNA damage responses in hematopoietic stem cells (manuscrit de l'article) p65

Résultats complémentaires p89

Conclusion p92

Discussion

Helios régule-t-il directement l'expression de gènes cibles de p53 ? p93

Helios régule-t-il le niveau d'activation de p53 ? p96

Helios est-il impliqué dans la réparation des cassures double brins dans les CSH? p97

Les CSH He^{-/-} utilisent-elles préférentiellement une voie de réparation des DSB ? p100

Helios a-t-il un rôle de suppresseur de tumeur? P103

Par quels mécanismes Helios régule-t-il l'auto-renouvellement des CSH ? p104

Helios est-il impliqué dans la différenciation des CSH ? p105

Helios module-t-il des changements extrinsèques aux CSH pour réguler leurs fonctions? P107

Helios régule-t-il le niveau de ROS intracellulaire dans les CSH ? p108

Références p109

Abréviations

53BP1	p53 Binding protein
5-FU	5-FluoroUracil
AGM	région mésenchymo-gonado-aortique
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
ATM	Ataxia Telangiectasia-Mutated
BATF	Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BM	Bone Marrow
BMP	Bone Morphogenic Protein
BRCA1	BRest CAncer protein 1
BrdU	5-Bromo-2-deoxyUridine
CAFC	Cobblestone Area Forming Cell
Cbx	Chromobox
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CD	Cluster de Différenciation
Cdc	Cell division control protein
CFSE	5,6-CarboxyFluorescein diacetate-Succinimidyl Ester
CHK2	CHeck point Kinase 2
CK1	Casein Kinase I
CLP	progéniteurs communs lymphoïdes
CMP	progéniteurs communs myéloïdes
COMET assay	aussi appelé Single Cell Gel Electrophoresis assay
CRU	Competitive Repopulating Unit
CSH	cellules souches hématopoïétiques
CtBP	C-terminal binding protein

CXCL12	C-X-C motif chemokine 12 aussi appelé stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), ligand pour CXCR4
CXCR4	C-X-C chemokine receptor 4
DBD	DNA Binding Domain
DD	Domaine de Dimérisation
DN (isoformes)	dominantes négatives
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DSB	DNA double strand breaks
E15.5	Embryonic day E15.5, 15.5 jours après coït
Ebf1	Early B-cell factor 1
EMP	progéniteurs érythroïdes et myéloïdes
EPO	ErythroPOïétine
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
Fbw7	F-box and WD-40 domain protein 7
Flt3	FMS-like tyrosin kinase 3, aussi appelé CD135 ou Flk2
FoxO	Forkhead box O
Gadd45a	Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible protein alpha
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
Gfi1	growth factor independence-1
GMP	progéniteurs de granulocytes et macrophages
GSK3b	Glycogen Synthase Kinase 3b
Hif-1	Hypoxia-inducible fator
HoxB4	Homeoboxes 4
HPRT	Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase
IL	Interleukine
Ku70	aussi appelé XRCC6
Ku80	aussi appelé XRCC5
LAL-B	Leucémies Aiguës Lymphoblastiques de type B
LAL-T	Leucémies Aiguës Lymphoblastiques de type T

Lis1	aussi appelée PAFAH1B1 platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib
Lkb1	kinase hépatique B1
LMPP	Lymphoid-Primed Multipotent Progenitors
LSK	Lin ⁻ Sca1 ⁺ cKit ⁺
LT-CSH	cellules souches hématopoïétiques de long terme
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDC1	Mediator of DNA damage Checkpoint 1
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MEP	progéniteurs d'érythrocytes et mégacaryocytes
MMP9	Matrix MetalloProteinase
MPP	progéniteurs multipotents
MSCs	cellules souches mésenchymateuses
mTERT	mouse TElomerase Reverse Transcriptase
mTR	mouse Telomerase RNA component
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1
NHEJ	Non Homologous End Joining
NK	Natural Killer
NuRD	Nucleosome Remodelling and histone Deacetylase
Nurr1	transcriptionally inducible Nuclear receptor related 1
Pax5	Paired box protein 5
PP	Phosphoprotéines Phosphatases
pRb	protéine du Rétinoblastome
Rag	Recombination activating gene
RBP-Jκ	Recombining Binding Protein pour la region kappa J des immunoglobulines
RH	Recombinaison Homologue
RNF51	RING finger protein 51
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	Replication protein A

SA- β -gal	Senescence Associated β -galactosidase
SCF	Stem Cell Factor, aussi appelé KitL ou ligand du récepteur Kit
SLAM	Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SOD	SuperOxyde Dismutase
ST-CSH	cellules souches hématopoïétiques de court terme
TPO	TromboPOïétine
Tregs	cellules T régulatrices
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1, ligand pour VLA4
VLA4	Very Late Antigen-4
Wip1	Wild type p53 Induced phosphatase 1
WT	Wild Type
XRCC	X-ray repair cross-complementing protein

RESUME DE THESE

Résumé de thèse

Les cellules souches hématopoïétiques, ou CSH, sont les cellules qui génèrent par prolifération et différenciation l'ensemble des cellules hématopoïétiques tout au long de la vie de l'individu. Il existe deux sous-types de CSH : les CSH de long terme (LT-CSH) et les CSH de court terme (ST-CSH ; ST pour short term en anglais). Les LT-CSH sont capables de s'auto-renouveler à long terme et de se différencier pour donner les ST-CSH qui ont une fonction de reconstitution réduite à quelque mois. Les CSH ont un fort besoin de préserver l'intégrité de leur ADN, leur dysfonctionnement suite à des mutations pouvant entraîner le développement de leucémies.

Helios appartient à la famille de facteurs de transcription à doigts de Zinc Ikaros. Helios est fortement et spécifiquement exprimé dans les LT-CSH (données du laboratoire non publiées), ce qui suggère un rôle particulier de Helios dans la fonction de ces cellules. Ce rôle est jusqu'ici inconnu. Plusieurs études ont montré l'implication de Helios dans les leucémies. En effet, différentes équipes ont mis en évidence la surexpression d'isoformes dysfonctionnelles de Helios chez des patients adultes atteints de LAL-T, ainsi que chez des enfants nouvellement diagnostiqués. Par ailleurs, le groupe de Mullighan a récemment étudié la présence d'altérations géniques dans 124 cas de LAL-B hypodiploïdes, qui sont un type de LAL-B de mauvais pronostic. Ils ont montré la présence d'altérations du gène *TP53* codant pour la protéine p53 (dans 91.2% des cas) et du gène *Ikaros* codant pour le facteur de transcription Helios (dans 53% des cas). Cette étude suggère une synergie entre les pertes des protéines p53 et Helios. Il est connu que p53, premier senseur de l'intégrité du génome, est un suppresseur de tumeur dont des formes mutées sont retrouvées dans de nombreux cancers solides et non solides. Ainsi, l'ensemble de ces travaux suggèrent que Helios possède une fonction suppresseur de tumeur dont la perte favorise le développement de certaines LAL. Les mécanismes de pathogenèse des LAL ne sont pas entièrement élucidés à ce jour. L'étude du rôle de Helios dans les CSH est donc importante car elle pourrait aider à émettre de nouvelles pistes thérapeutiques dans le traitement des LAL.

Mon projet de thèse a consisté à déterminer ce rôle. Durant mon travail de thèse, j'ai pu montrer que 1). Les CSH *Helios*^{-/-} présentent un phénotype similaire à celui des CSH *p53*^{+/-}, 2). Helios régule les réponses des CSH aux dommages de l'ADN dépendantes de p53 et 3). Helios agit en synergie avec p53 pour réguler ces fonctions.

1. Les CSH déficientes pour Helios ont un phénotype similaire à celui des CSH p53^{+/-}

J'ai poursuivi les travaux initiés par Cai Qi, une étudiante précédente du laboratoire. Ensemble, nous avons montré que les CSH nulles pour Helios (He^{-/-}) possèdent un avantage sélectif par rapport aux CSH sauvages (WT) pour reconstituer le système hématopoïétique de souris irradiées, lors d'expériences de transplantations compétitives en série. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec des CSH p53^{+/-}. Les transplantations en série mimant le vieillissement des CSH, j'ai analysé le potentiel de reconstitution de CSH de souris WT et He^{-/-} vieilles de deux ans. Mes résultats montrent que les CSH He^{-/-} vieilles gardent leur capacité de reconstitution contrairement aux CSH WT. Parallèlement, des analyses transcriptomiques ont montrés que les LT-CSH He^{-/-} présentent une dérégulation de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN tels que *ercc4*, *nhej1*, *atmin*, *fen1*, ainsi que de gènes impliqués dans la voie p53 tels que *necdine*, *meg3*, *ing5*, *ndr2*. Il est connu que dans les CSH, la voie p53 est impliquée dans le maintien de la quiescence et la réponse aux dommages de l'ADN par induction de l'arrêt du cycle cellulaire et/ou de l'entrée en apoptose ou en sénescence. Une plus forte activité de p53 entraîne un vieillissement précoce des CSH. Toutes ces données suggèrent un rôle clé de Helios dans la biologie des CSH via la régulation des gènes de la voie p53 et des gènes de réparation de l'ADN.

2. Helios régule les réponses aux dommages de l'ADN et dépendantes de p53

Les CSH He^{-/-} présentent une sous expression de gènes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN. Nous nous sommes donc demandé si ces cellules présentaient un défaut dans leur capacité à répondre aux dommages de l'ADN. Pour répondre à cette question, j'ai analysé par immunofluorescence l'apparition et la disparition de foyers de dommages de l'ADN (γ H2AX) dans les CSH, respectivement, 3h et 10h après traitement des cellules avec différents agents anti-tumoraux : la néocarzinostatine (NCS), la camptothécine (CPT) et l'étoposide (ETP). Ces agents vont induire des cassures simple et double brins à l'ADN. Le nombre de foyers γ H2AX rend compte du nombre de cassures de l'ADN. Les résultats obtenus montrent que 10h après traitement, les CSH He^{-/-} possèdent encore beaucoup de foyers contrairement aux CSH WT. Parallèlement, j'ai confirmé ces résultats *in vivo* en irradiant sub-létalement des souris WT et He^{-/-}. Comme précédemment décrit, 3h et 10h après

l'irradiation, j'ai analysé la présence de foyers γ H2AX dans les CSH triées. Ces résultats montrent que les CSH He^{-/-} retiennent plus longtemps leur foyers γ H2AX *in vitro* et *in vivo*.

Par ailleurs, pour tester l'hypothèse selon laquelle Helios contrôle les réponses des CSH aux dommages de l'ADN dépendante de p53, j'ai analysé la réponse des CSH He^{-/-} et WT aux cassures double brins de l'ADN induites par le traitement avec le NCS, la CPT et l'ETP. Après dommages à l'ADN, p53 va être stabilisé et activé et va contrôler l'entrée en apoptose, l'arrêt de la prolifération et l'entrée en sénescence des cellules. J'ai analysé les trois destins possibles des CSH. Tout d'abord, l'apoptose induite par ces traitements est très fortement réduite dans les CSH He^{-/-}. De plus, les CSH He^{-/-} prolifèrent davantage après dommages de l'ADN comparées aux CSH WT. L'analyse transcriptomique de l'expression des gènes après traitement au NCS montre que les CSH He^{-/-} expriment plus faiblement des gènes induits en réponse à ce traitement, dont l'expression dépend de p53. Notamment, des analyses de RT-qPCR confirment que Puma et Noxa ; deux gènes pro-apoptotiques, et p21, gène anti-prolifératif, sont moins fortement induits dans les CSH He^{-/-} traitées. Enfin, j'ai testé si Helios est aussi impliqué dans l'entrée en sénescence des CSH. Pour ce faire, j'ai marqué des CSH avec le marqueur de prolifération CFSE, puis je les ai mises en culture. Tous les 5 jours, j'ai retrié cette population et l'ai remise en culture. Après la troisième remise en culture, j'ai pu observer via le marqueur de prolifération CFSE et un marquage de SA-Bgal qui marque spécifiquement les cellules en sénescence, que les CSH He^{-/-} présentaient un retard dans leur entrée en sénescence. Parallèlement, j'ai observé par RT-qPCR que des gènes codant des régulateurs du cycle cellulaire (comme p16 et p21), ainsi que le gène codant pour e2f7, cible directe de p53, qui sont surexprimés dans les cellules sénescents, étaient moins exprimé en l'absence de Helios. Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent que Helios régule l'entrée en apoptose, en sénescence et la prolifération des CSH après dommages à l'ADN via, au moins en partie, la régulation de l'expression de différents gènes cibles directes de p53.

3. Helios et p53 agissent en synergie pour réguler les réponses aux dommages de l'ADN.

Helios régule les réponses des CSH aux dommages de l'ADN dépendantes de p53. Nous nous sommes donc demandé si Helios pouvait agir en synergie avec p53 pour réguler les réponses des CSH aux dommages de l'ADN. Pour répondre à cette question, j'ai étudié l'interaction génétique entre p53 et Helios *in vivo*. Pour ce faire, j'ai initié le croisement d'une lignée de souris p53^{+/-} avec les souris He^{+/-}. J'ai étudié la réponse aux dommages de l'ADN

des CSH de souris $p53^{+/-}He^{+/-}$ comme précédemment. J'ai observé que les CSH de ces souris présentent des défauts dans l'entrée en apoptose, et dans l'expression de gènes cibles de p53 (puma, et p21) suite à leur traitement au NCS contrairement aux CSH $p53^{+/-}$ et aux CSH $He^{+/-}$ qui présentent une mortalité et une expression de puma similaire à celle des CSH WT. Ceci signifie donc que la perte d'un allèle de p53 et d'un allèle de Helios est suffisante pour engendrer des défauts de réponses aux dommages de l'ADN. Ainsi, Helios et p53 agissent en synergie pour réguler efficacement l'entrée en apoptose des CSH après dommages à l'ADN, ce qui est suggéré dans l'étude génétique des cas de LAL-B. Mon hypothèse est que Helios joue un rôle clé dans le maintien de l'intégrité du génome en régulant des gènes cibles communs à p53 suite à un stress génotoxique. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé des expériences de ChIPseq dans une lignée cellulaire tumorale (ILC87) surexprimant Helios. Cette expérience de ChIPseq a montré que Helios se lie dans une région proche du promoteur de p21, de puma et de noxa, gènes dont l'expression est directement contrôlée par p53. Ces données suggèrent ainsi que Helios pourrait directement réguler l'expression de ces mêmes gènes.

En conclusion, l'ensemble de mes résultats suggèrent que Helios est un régulateur de l'intégrité du génome qui agit en synergie avec p53. Helios joue donc un rôle clé dans le maintien de CSH fonctionnelles au cours du temps. Notre hypothèse est qu'en condition sauvage, le pool de CSH fonctionnelles diminue au cours du temps du fait de l'accumulation de dommages de l'ADN qui engendrent l'apoptose des cellules, leur différenciation ou leur entrée en sénescence. Ces trois mécanismes seraient des protections face aux dommages de l'ADN pour prévenir l'apparition de mutations oncogéniques dans ces cellules. En absence de Helios, les CSH répareraient moins efficacement leur ADN, échapperaient à la mort cellulaire, et à la sénescence. Ceci expliquerait pourquoi les souris $He^{-/-}$ gardent plus de CSH fonctionnelles au cours du temps. En contrepartie, elles seraient aussi plus aptes à développer des cancers.

INTRODUCTION

Introduction

Helios est un facteur de transcription appartenant à la famille de protéines Ikaros. Helios est notamment exprimé dans les cellules T et dans les cellules souches hématopoïétiques (ou CSH). Le laboratoire d'accueil a initié l'étude du rôle de Helios dans l'hématopoïèse (Cai et al., 2009), et a établi précisément le niveau d'expression des transcrits de Helios dans les CSH et les progéniteurs. Mon projet de thèse est d'étudier le rôle de Helios dans les cellules souches hématopoïétiques. J'introduirai dans une première partie la structure, l'expression, et les rôles connus de Helios dans l'hématopoïèse ainsi que son implication dans la leucémogénèse. Dans une deuxième partie, j'introduirai les caractéristiques et fonctions des CSH. Enfin, dans une troisième partie, je développerai les mécanismes de réponses des CSH aux dommages de l'ADN ainsi que les mécanismes de vieillissement des CSH. Durant mes investigations, j'ai découvert un lien entre Helios et p53. Je présenterai donc les rôles de p53 dans les CSH.

I. Helios est un facteur de transcription de la famille Ikaros

A. Structure des protéines de la famille Ikaros et découverte de Helios

Helios est un facteur de transcription à doigts de zinc appartenant à la famille de protéines Ikaros. Cette famille contient cinq membres qui sont : Ikaros, Helios, Aiolos, Eos et Pegasus, codés respectivement par : Ikzf1, Ikzf2, Ikzf3, Ikzf4 et Ikzf5. Ces cinq membres possèdent une structure commune caractérisée par deux groupes de doigts de Zinc en N-terminal et C-terminal. Ceux-ci sont bien conservés entre les protéines Ikaros, Aiolos, Helios et Eos. Notamment, les doigts de Zinc N-terminaux et C-terminaux de Ikaros et de Helios partagent respectivement 94% et 85% d'identité (Hahm et al., 1998). Un schéma de cette structure est présenté dans la **Figure 1** :

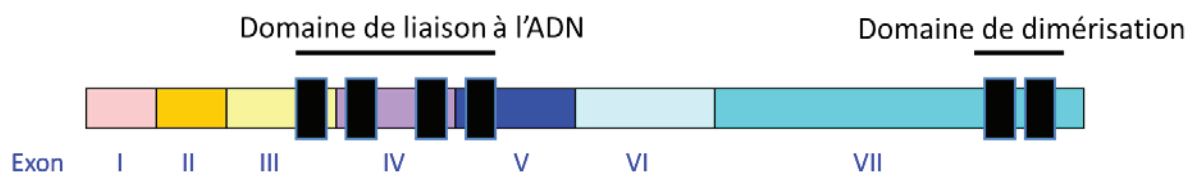


Figure 1 : Structure générale des protéines de la famille Ikaros

Dans leur partie N-terminale, tous les membres présentent quatre doigts de Zinc, à l'exception de Pegasus qui n'en possède que trois (Perdomo et al., 2000). Ces doigts de Zinc forment le site de liaison de l'ADN nommé DBD (pour DNA Binding Domain). En accord avec leur homologie d'identité, Ikaros, Helios, Aiolos et Eos sont capable de reconnaître une séquence contenant un élément consensus d'Ikaros : le motif tGGGAa. (Hahm et al., 1998, Molnar and Georgopoulos, 1994, Morgan et al., 1997). Pegasus, lui, reconnaît le motif GnnnGnnG (Perdomo et al., 2000). Dans leur partie C-terminale, ces cinq protéines présentent deux doigts de Zinc formant le domaine de dimérisation ou DD (pour Dimerization Domain), site d'homodimérisation ou d'hétérodimérisation, avec un autre membre de la famille (Hahm, et al., 1998, McCarty et al., 2003, Morgan et al., 1997, Perdomo et al., 2000, Sun et al., 1996). La dimérisation est essentielle à ces cinq protéines pour assurer leur fonction ; elle augmente fortement l'affinité des protéines sur l'ADN ainsi que leur activité transcriptionnelle (Sun et al., 1996). Des mutations dans les doigts de Zinc C-terminaux de ces protéines abolissent la capacité de dimérisation et préviennent l'interaction d'Ikaros à l'ADN et la régulation transcriptionnelle ; ce sont des mutations nulles. Au contraire, des dimères de protéines contenant un DBD muté perdent leur capacité transcriptionnelle, mais gardent leur capacité de dimérisation avec d'autres membres de la famille. Ces mutations sont dites dominantes négatives. Les phénotypes liés à ces deux types de mutations sont différents et beaucoup plus sévères dans le cas de mutations dominantes négatives. Ces dernières engendrent souvent une hématoïèse aberrante et induisent des lymphomes et leucémies chez la souris et l'Homme (Georgopoulos et al., 1994, Rebollo and Schmitt, 2003, Winandy et al., 1995, Zhang et al., 2007).

Ainsi, c'est en observant une majeure différence entre les phénotypes de souris nulle et de souris dominante négative pour Ikaros que les auteurs ont suggéré qu'Ikaros devait interagir avec d'autres protéines qui complémenteraient partiellement sa fonction. Avec des expériences d'immunoprécipitation, ils ont alors identifié une protéine de 70kDa de poids moléculaire et partageant 94% d'identité avec Ikaros au niveau du DBD et 85% au niveau du DD ; Helios (Hahm et al., 1998). Une autre étude a utilisé la méthode de RACE-PCR pour amplifier les cDNA provenant de cellules de rate nulles pour Aiolos. Ils ont alors identifié Helios qui partage globalement 73% d'identité avec Ikaros. (Kelley et al., 1998).

B. Isoformes de Helios

Il existe naturellement des isoformes d'Ikaros, d'Aiolos et de Helios qui sont générées probablement par un épissage alternatif, ou par une recombinaison aberrante médiée par l'enzyme Rag (recombination-activated genes) dans le cas d'Ikaros dans des leucémies aiguës lymphoblastiques présentant l'anomalie chromosomique BCR-ABL1 (Mullighan et al., 2008). Il n'existe à ce jour pas d'isoformes des protéines entières Eos et Pegasus. Il est possible de retrouver ces isoformes dans les cellules saines et dans les cellules malignes. (Hahm et al., 1998, Sun et al., 1999a, Sun et al., 1999b, Liipo et al., 2001, Caballero et al., 2007, Meleshko et al., 2008, Molnar and Georgopoulos, 1994, Nakase et al., 2002, Fujii et al., 2002 Tabayashi et al., 2006). Les isoformes de Helios sont présentées en **Figure 2** ci-dessous :

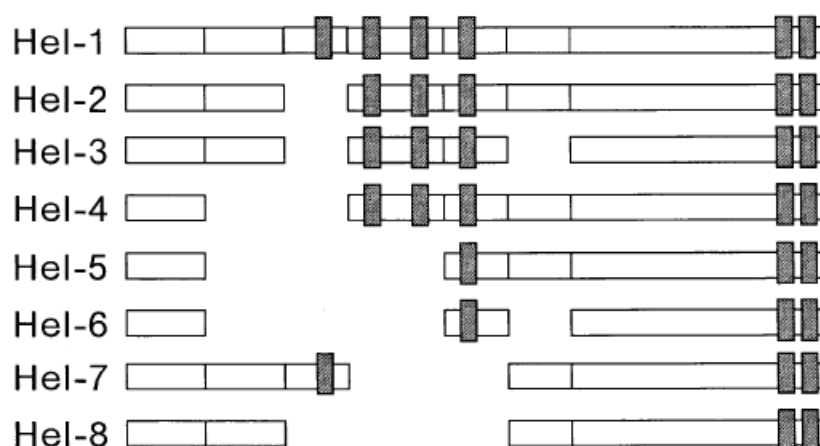


Figure 2 : Isoformes de Helios.

Isoformes humaines de Helios. Adapté de Nakase et al., 2002.

Ces isoformes peuvent être divisées en deux groupes. Le premier regroupe les isoformes qui ont un DBD fonctionnel. Elles ont au moins trois doigts de Zinc en N-terminal, et reconnaissent le motif GGGA. Cependant, leur spécificité et leur affinité de liaison à l'ADN dépendent de la séquence flanquée autour du motif de base (Molnar and Georgopoulos, 1994, Morgan et al., 1997, Hahm et al., 1998). Le deuxième regroupe les isoformes qui ont moins de trois doigts de Zinc ; la fonction de leur DBD est abolie mais leur DD reste fonctionnel. Ces isoformes peuvent donc se dimériser avec des isoformes fonctionnelles et interférer avec leur liaison à l'ADN et leur activité de régulation transcriptionnelle de manière dominante négative (Sun et al., 1996a, Tabayashi et al., 2007).

Ces isoformes dominantes négatives ou DN sont généralement localisées dans le cytoplasme alors que les isoformes fonctionnelles sont dans le noyau. La variété d'isoformes augmente la diversité d'homo et d'hétéro dimérisation des protéines de la famille Ikaros et ajoute à la complexité de leur fonction et leur modulation.

Dans les cellules saines, on peut trouver les isoformes Hel1 et Hel2 (Hahm et al., 1998, Kelley et al., 1998). Les autres isoformes peuvent être trouvées dans des cellules malignes. En effet, les cellules provenant de patients ayant une leucémie T sur-expriment les isoformes Hel5, Hel6, Hel7 et Hel8 (Fujii et al., 2003, Nakase et al., 2002).

C. Expression de Helios et de ses isoformes

Pendant le développement embryonnaire, Helios est exprimé dans le cerveau et notamment dans les tissus ectodermaux et neuro-ectodermaux, dans l'éminence ganglionique latéral (ou EGL), dans le cortex insulaire et rétrospécial, l'hippocampe et le bulbe olfactif. Helios serait impliqué dans le développement des neurones striataux. Son expression est dépendante de l'expression de Gsx2 et de Dlx1/2 dans les précurseurs neuronaux (Martín-Ibáñez R et al., 2012). Pendant le développement embryonnaire, Helios est aussi exprimé dans les tissus épithéliaux et dans les centres hématopoïétiques embryonnaires : le sac vitellin, le foie fœtal et le thymus fœtal (Kelly et al., 1998). Pendant le développement cérébral post-natal, Helios est exprimé dans les neurones de Purkinje (Kelly et al., 1998).

Chez l'adulte, l'ARNm de Helios est détecté dans les cellules LSK (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺) qui regroupent les cellules souches hématopoïétiques (ou CSH) et les progéniteurs multipotents (ou MPP) (Kelley et al., 1998). Plus précisément, le laboratoire d'accueil a montré que Helios est exprimé au niveau transcriptionnel dans les LT-CSH. Son expression diminue au fur et à mesure de la différenciation des CSH en progéniteurs (**Figure 3**). Dans la lignée de cellules B, Helios est exprimé dans les cellules immatures ProB. Son expression diminue durant la maturation de ces cellules (Kelley et al., 1998). Helios n'est cependant pas exprimé dans la plupart des cellules matures, à l'exception des lymphocytes T, et notamment des cellules Treg (Kelley et al., 1998, Sugimoto et al., 2006, Thornton et al., 2010, Cai et al., 2009). Il est l'un des gènes signatures de ces cellules (Sugimoto et al., 2006, Hill et al., 2007, Thornton et al., 2010).

Plus particulièrement, le groupe de Shevach (Thornton et al., 2010) a suggéré que Helios pourrait être un marqueur permettant de distinguer, chez l'Homme et la souris, les cellules Tregs naturelles (qui se développent dans le thymus) qui expriment toutes Helios, des cellules Treg induites (qui se différencient dans les tissus périphériques après exposition à des antigènes) qui n'expriment pas Helios. Cependant, cette étude est controversée, et l'expression de Helios dépendrait notamment des conditions de culture qui permettent la différenciation en cellules iTregs (Verhagen and Wraith., 2010, Gottschalk et al., 2012). De plus, des études de l'expression de Helios dans différents sous-types de cellules T actifs et non actifs (cellules Tregs et cellules T CD4+ et T CD8+) montrent que les cellules T négatives pour Helios sont enrichies en cellules T naïves, chez l'Homme et la souris. Helios peut être induit pendant l'activation et la prolifération des cellules T. Cette étude remet donc en cause le fait que l'expression de Helios puisse distinguer les nTregs des iTreg toutes les deux actives (Akimova et al., 2011, Himmel et al., 2013). Chez l'adulte, en dehors du système hématopoïétique, l'expression de Helios est inconnue.

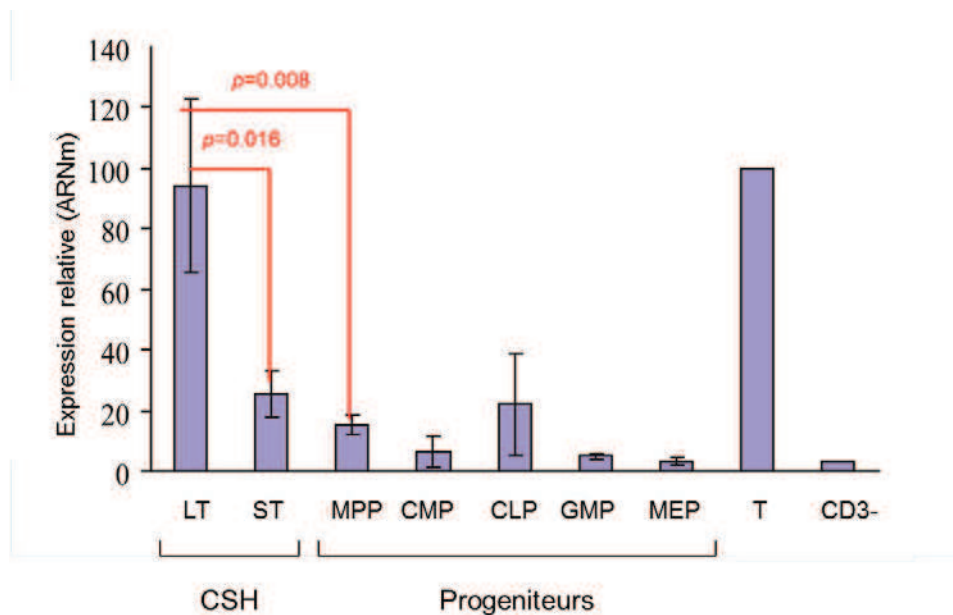


Figure 3 : Expression de Helios dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques

LT = LT-CSH ; cellules souches hématopoïétiques de long terme, ST= ST-CSH ; cellules souches hématopoïétiques de court terme, MPP ; progéniteurs multipotents, CMP ; progéniteurs myéloïdes communs, CLP ; progéniteurs lymphoïdes communs, GMP ; progéniteurs de granulocytes et macrophages, MEP ; progéniteurs d'érythrocytes et mégacaryocytes, T = thymocytes, CD3⁻ = splénocytes CD3⁻. Données du laboratoire (Cai Qi).

D. Rôle de Helios dans les cellules T régulatrices (ou Tregs)

La surexpression de Helios dans les progéniteurs hématopoïétiques engendre un blocage du développement des cellules T au stade immature DN et une baisse de la prolifération des cellules T après stimulation. Ceci suggère que Helios jouerait un rôle clé dans la différenciation et la fonction des cellules T (Zhang et al., 2007).

Des études récentes montrent un rôle clé de Helios dans la fonction des cellules Tregs. Notamment, Helios régule positivement l'expression de Foxp3, un facteur de transcription essentiel à la fonction suppressive des cellules Tregs. De plus, des expériences d'immunoprecipitation de la chromatine (ChIP) montrent que Helios se lie au promoteur de Foxp3. Le knock-down de Helios avec des oligonucleotides siRNA engendre une sous-régulation de Foxp3, ce qui atténue fortement la fonction suppressive des cellules Tregs (Getnet et al., 2010).

Helios régule la production de la cytokine IL2 par les cellules Tregs en supprimant la transcription du gène *il2*. Helios se lie au promoteur de l'*il2* et induit la désacétylation des histones à ce niveau. La perte de Helios dans les cellules Tregs par transduction de shRNA mène à la dé-répression du gène *il2* permettant aux cellules Tregs de proliférer et de produire de l'IL2 après stimulation, mais leur capacité suppressive est réduite. Inversement, une sur-expression de Helios dans les cellules Tregs mène à une perte de leur capacité à produire l'IL2. Helios promeut également la liaison de Foxp3 au promoteur de l'*il2* (Baine et al., 2013). De plus, des études fonctionnelles *in vitro* suggèrent que les cellules Tregs exprimant Helios ont leur fonction suppressive augmentée (Zabransky et al., 2012).

Cependant, le laboratoire d'accueil a montré que Helios n'est pas essentiel pour la différenciation et la fonction des cellules T. En effet, les souris Helios nulle générées au sein du laboratoire ne présentent aucun défaut apparent dans la différenciation et la fonction effectrice de leurs lymphocytes T, cellules NKT et cellules Tregs (Qi et al., 2009).

E. Rôle de Helios dans la leucémogénèse

Plusieurs études suggèrent que Helios aurait un rôle suppresseur de tumeur dans différents types de leucémies aiguës lymphoblastiques (ou LAL).

En effet, les isoformes dominantes négatives de Helios (Hel5, Hel6, Hel7 et Hel8) ont été détectées chez des patients atteints de LAL-T (Fujii et al., 2003, Nakase et al., 2002),

l'isoforme Hel3 a été trouvée dans des cellules primaires leucémiques issues de six enfants sur quinze nouvellement diagnostiqués pour une LAL-T (Sun et al., 2002, Takanashi et al., 2002), et les isoformes Hel3 et Hel4 ont été trouvées chez des patients atteints de leucémies et lymphomes T chroniques (Fujii et al., 2003). Le groupe de Klug (Zhang et al., 2007) a étudié la fonction de progéniteurs hématopoïétiques sur-exprimant la protéine entière de Helios ou l'isoforme dominante négative de Helios Hel3. Les souris transplantées avec les progéniteurs contenant Hel3 présentent un blocage du développement des cellules T, et 60% des animaux transplantés développent, 4 à 10 mois après la transplantation, un lymphome T agressif et transplantable.

De plus, Helios est exprimé dans les cellules B immatures proB, puis son expression diminue dès lors qu'elles se différencient en cellules préB (Kelley et al., 1998). Dans le but de savoir si l'arrêt de l'expression de Helios est nécessaire au bon développement des cellules B, des souris transgéniques surexprimant Helios ont été générées. Ces souris développent des lymphomes B métastatiques quand elles vieillissent (âgées de plus d'un an) (Dovat et al., 2005).

Enfin, le groupe de Mullighan a récemment étudié la présence d'altérations géniques de 124 patients atteints de LAL-B hypodiploïdes, qui sont un type de LAL-B de mauvais pronostic, développé souvent chez les personnes âgées. Ces auteurs ont trouvé des pertes monoalléliques de Helios dans 53% des patients étudiés. De manière intéressante, ils ont trouvé que ces mutations de Helios sont toujours accompagnées d'une perte d'un allèle de TP53 codant pour le suppresseur de tumeur p53. Cette étude suggère une synergie entre les pertes des protéines p53 et Helios (Holmfeldt et al., 2013).

Ainsi, l'ensemble de ces études suggèrent que Helios possède une fonction suppresseur de tumeur dont la perte, ou l'apparition d'isoformes DN de Helios favorise le développement de certaines LAL.

F. Activité transcriptionnelle de Helios

Les cinq membres de la famille Ikaros sont généralement considérés comme des répresseurs transcriptionnels. Tous les membres sont capables de réprimer la transcription de gènes rapporteurs ou de gènes endogènes (Hu et al., 2007, Koipally et al., 1999, Perdomo et al., 2000, Tabayashi et al., 2007). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer leur

activité répressive. L'un d'entre eux passe par l'interaction avec différentes protéines du remodelage de la chromatine et avec des co-répresseurs transcriptionnels. En effet, Ikaros, Aiolos, Helios et Eos peuvent, d'une part, interagir avec les protéines histones désacétylases HDAC1, HDAC2, et les protéines Sin3A, Sin3B, Mi2 α et Mi2 β . Les protéines Mi2 sont des composants clés du complexe de remodelage de la chromatine NuRD (Koipally et al., 1999, Sridharan and Smale, 2007). Les protéines Sin3 sont des co-répresseurs formant un complexe avec des HDAC. Ikaros et Helios s'associeraient préférentiellement avec le complexe NuRD (Sridharan and Smale, 2007). Les membres de la famille Ikaros pourraient donc réguler l'expression de leurs gènes cibles en recrutant des modeleurs de la chromatine de type répresseur à ces gènes, ce qui rendrait la chromatine inaccessible aux régulateurs positifs de la transcription. Il a été montré que Helios a une telle activité dans les cellules Tregs. En effet, Helios se lie au promoteur de l'il2 et induit la désacétylation des histones à ce niveau, ce qui a pour effet de réprimer il2 (Baine et al., 2012).

D'autre part, Ikaros, Helios, Aiolos et Eos peuvent lier, *in vitro*, le co-répresseur CtBP et la protéine qui interagit avec CtBP ; CtIP. Ces deux protéines forment un complexe capable de réprimer la transcription indépendamment de l'activité histone désacétylase (Koipally and Georgopoulos, 2000, Koipally and Georgopoulos 2002a, Kim et al., 1999, Hu et al., 2007, Perdomo and Crossley, 2002, Sridharan and Smale, 2007). La **Figure 4** présente les régions d'Ikaros responsables de l'interaction avec les régulateurs transcriptionnels.

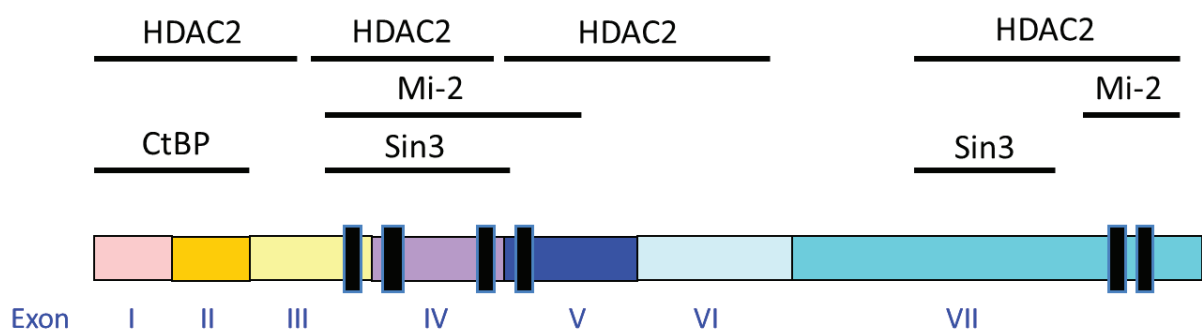


Figure 4 : Régions responsables de l'interaction entre Ikaros et des régulateurs transcriptionnels

Adapté de Koipally et Georgopoulos, 2002.

Helios peut interagir avec ces protéines mais il n'a pas été montré si ce sont les mêmes régions qui sont concernées par l'interaction.

Un autre mécanisme possible est la compétition des protéines de la famille Ikaros avec des régulateurs transcriptionnels positifs. Ikaros peut, en effet, réprimer la transcription de gènes en se fixant sur des sites ciblés par d'autres facteurs de transcription. Par exemple, Ikaros réprime l'expression de Hes1, par compétition avec le facteur de transcription RBP-Jk (Kleinmann et al., 2008). Il est probable que les autres membres de la famille puissent réprimer leurs gènes cibles par ce mécanisme puisqu'ils présentent des domaines de liaison à l'ADN similaires.

Ces protéines peuvent cependant aussi agir comme des activateurs transcriptionnels. En effet, Ikaros et Aiolos activeraient l'expression de CD8 α et de STAT4 dans les thymocytes (Harker et al., 2002, Yap et al., 2005), et cela via leur interaction avec Brg1 qui est un composant du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Kim et al., 1999, O'Neill et al., 2000), lui-même impliqué dans l'activation de l'expression des gènes (Montecino et al., 2007).

Helios peut lier HDAC1, HDAC2, Sin3, Mi-2, CtBP, et CtIP tout comme Ikaros. Il a été montré qu'il a une activité transcriptionnelle positive et négative dans les cellules Tregs, respectivement pour la régulation de la transcription de Foxp3 et IL2, (Getnet et al., 2010, Baine et al., 2012). Compte tenu de la forte homologie de séquence des DBD et DD entre Helios et Ikaros et de l'activité transcriptionnelle de Helios à des gènes rapporteurs portant à leurs promoteurs les sites consensus cibles d'Ikaros, il est possible que Helios régule l'expression de ses gènes cibles par les différents mécanismes utilisés par Ikaros : par interaction avec les complexes de remodelage de la chromatine pour modifier l'accessibilité de celle-ci aux gènes cibles, ou par compétition directe avec d'autres régulateurs transcriptionnels. Un des mécanismes décrit chez Ikaros a déjà été montré chez Helios ; l'inactivation du gène cible d'il2 par recrutement de protéines histones désacétylases (Baine et al., 2012).

Cependant, l'activité des facteurs de transcription de la famille Ikaros est elle-même modulée par différents mécanismes que sont : la phosphorylation, la SUMOylation, les modifications des histones et la méthylation de l'ADN. En effet, le gène *ikzf1* est régulé par des facteurs épigénétiques et de transcription qui ciblent ses enhancers. Des mutations dans les éléments régulateurs de *ikzf1* et leurs interactants sont susceptibles d'avoir des effets néfastes sur la lymphopoïèse et contribuer à la leucémogénèse (Zhu et al., 2007, Yoshida et

al., 2013). La stabilité et la localisation d'Ikaros aux foyers péricentromériques sont régulées par l'interaction directe d'Ikaros avec la phosphatase de protéines 1 (ou PP1) via un motif conservé RVXF dans la partie C-terminale d'Ikaros (Popescu et al., 2009). A l'inverse, la phosphorylation des doigts de zinc N-terminaux abolissent la capacité de liaison du DBD, et donc sa liaison aux foyers péricentromériques, empêchant ainsi la transition G2/M du cycle cellulaire (Dovat et al., 2002). Ikaros peut aussi être SUMOylé, ce qui empêche son association avec les complexes NuRD et Sin3 et donc son activité transcriptionnelle (Gomez-del-Arco et al., 2005).

II. Les CSH sont à l'origine du système hématopoïétique

Dans cette partie, je vais introduire différents points clés du développement des cellules souches hématopoïétiques, de leurs fonctions et de certaines méthodes d'étude de leurs fonctions que j'ai utilisées dans mes investigations. Je m'attacherai à introduire les éléments pertinents pour la compréhension de mon étude. L'hématopoïèse et les CSH sont principalement étudiées chez les modèles de souris et de zébrafish, mais aussi chez l'Homme, je ne développerai que les aspects chez la souris.

A. Hématopoïèse et développement des CSH

1. Hématopoïèse

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les cellules qui sont à l'origine de l'ensemble des cellules du système hématopoïétique. Celui-ci est constitué des cellules matures sanguines, des cellules de la moelle osseuse et des cellules lymphoïdes résidentes dans les organes lymphoïdes secondaires que sont le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques. Les CSH permettent d'entretenir continuellement ce système en proliférant et en se différenciant pour renouveler les cellules hématopoïétiques. Ce processus est appelé hématopoïèse.

Une première version de la hiérarchie des cellules hématopoïétiques a été proposée. Dans cette hiérarchie, basée sur l'isolement des cellules par cytométrie en flux, les cellules restreignent leur potentiel de différenciation progressivement, à chaque étape de différenciation (Akashi et al., 2000, Weissman 2000) (**Figure 5**). Les cellules les plus immatures sont les LT-CSH (cellules souches hématopoïétiques de long terme). Elles ont une capacité d'auto-renouvellement de long terme ; tout au long de la vie de l'individu. L'auto-renouvellement signifie que ces cellules peuvent se dupliquer après division pour donner à nouveau une cellule souche. Les LT-CSH peuvent se différencier en ST-CSH (cellules souches hématopoïétiques de court terme). Ces dernières ont une capacité d'auto-renouvellement réduite à quelques mois. Ces cellules peuvent se différencier en MPP (progéniteurs multipotents), qui sont les progéniteurs les plus immatures, et qui peuvent se différencier en CLP (progéniteurs communs lymphoïdes) ou CMP (progéniteurs communs myéloïdes) pour donner, respectivement, l'ensemble des cellules lymphoïdes (lymphocytes B, lymphocytes T, cellules NK, cellules dendritiques) ou myéloïdes (granulocytes, macrophages, cellules dendritiques et érythrocytes et mégacaryocytes par l'intermédiaire des progéniteurs

GMP et MEP). Les LT-CSH, ST-CSH et MPP peuvent être regroupées sous le terme de cellules LSK car, communément, elles expriment deux marqueurs de surface : Sca1 et cKit (ou CD117, récepteur des cellules souches) (Okada et al., 1992, Uchida and Weissman, 1992), et n'expriment pas différents marqueurs de différenciation de cellules matures nommés Lin, tels que : CD3 (pour les cellules T), B220 (pour les cellules B), CD11b (pour les cellules myéloïdes), Ter119 (pour les érythrocytes), Gr1 (pour les granulocytes) (Spangrude et al., 1988). Ces cellules sont notées Lin⁻Sca1⁺cKit⁺ ou LSK.

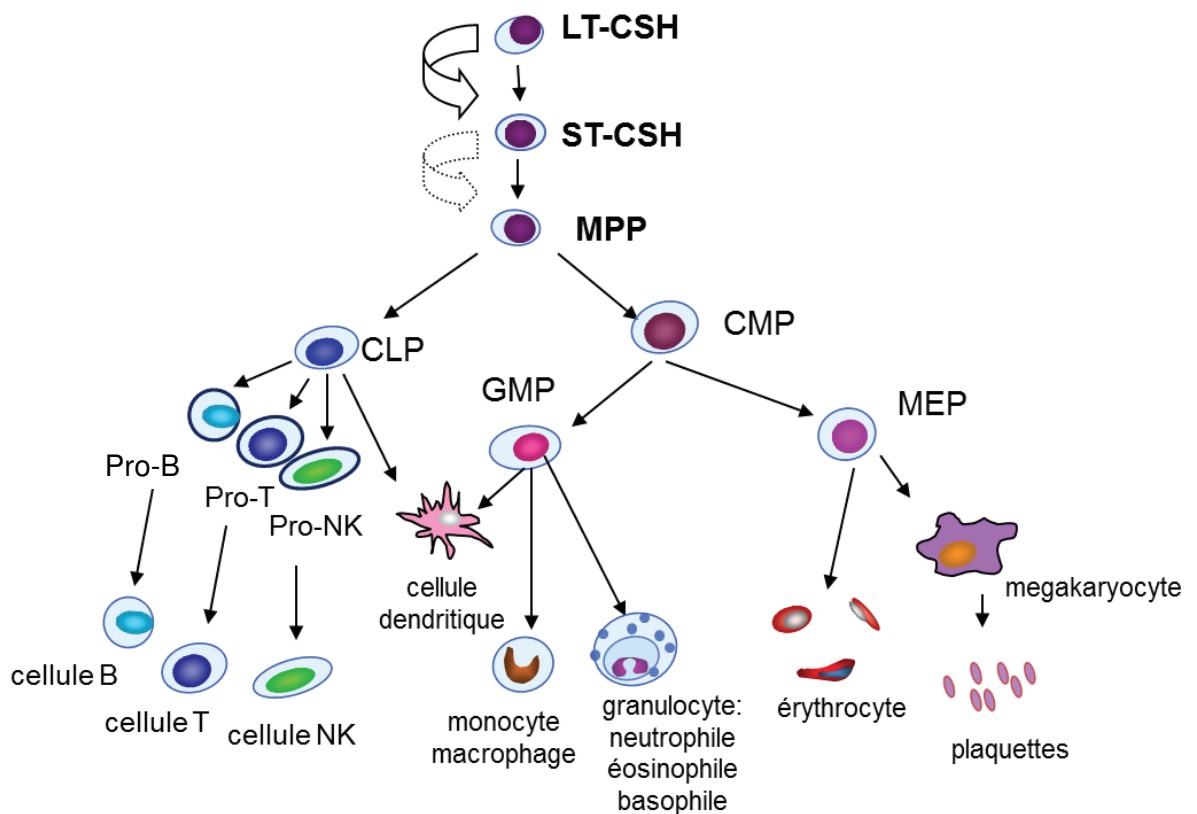


Figure 5 : Schéma de l'hématopoïèse

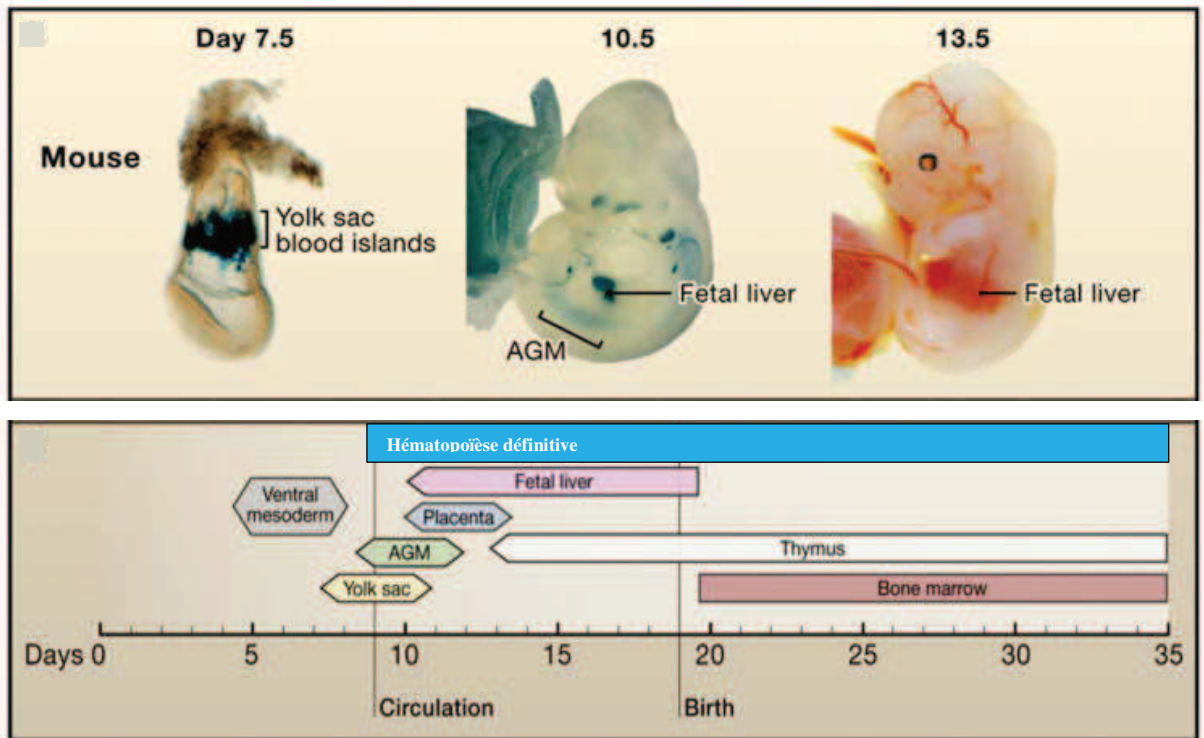
La flèche en trait plein à côté des LT-CSH indique leur capacité d'auto-renouvellement de long terme. La flèche en pointillé à côté des ST-CSH indique leur capacité d'auto-renouvellement de court terme. CLP (Lin⁻Sca1^{lo}cKit⁺Flt3⁺CD127⁺AA4.1⁺) : progéniteurs lymphoïdes communs, CMP (Lin⁻Sca1⁻cKit⁺CD16/CD32⁻CD34⁺) : progéniteurs myéloïdes communs, GMP (Lin⁻Sca1⁻cKit⁺CD16/CD32⁺CD34⁺) : progéniteurs des granulocytes et des macrophages, MEP (Lin⁻Sca1⁻cKit⁺CD16/CD32⁻CD34⁻) : progéniteurs de mégakaryocytes et érythrocytes. Adapté de Luc et al., 2008.

Cependant, cette version de l'hématopoïèse a été révisée par des études qui ont permis d'identifier le progéniteur LMPP pour lymphoid-primed MPP (Adolfsson et al., 2005, Luc et al., 2007). Dans le compartiment MPP, les auteurs ont distingué deux types de cellules : celles qui expriment Flt3, et qui ont un potentiel de différenciation lymphoïde et granulocytaire, et celles qui ne l'expriment pas. Ces dernières ont un potentiel de différenciation en mégacaryocytes et érythrocytes. Cette étude complexifie le modèle d'hématopoïèse décrit plus haut. Ce progéniteur serait impliqué dans une voie alternative de l'hématopoïèse.

2. Développement des CSH

Le développement du système hématopoïétique a lieu dès le développement embryonnaire et se fait en deux temps. Tout d'abord, une hématopoïèse dite primitive et transitoire a lieu à E7.5 (Galloway and Zon, 2003). Elle implique un progéniteur érythroïde qui se différencie en macrophages et érythrocytes, permettant ainsi l'oxygénation de l'embryon (Palis and Yoder, 2001, Orkin and Zon, 2008). Ces progéniteurs érythroïdes, appelés EMP pour progéniteurs érythroïdes et myéloïdes, proviennent de l'hémangioblaste (endothélium qui a des propriétés hémogéniques), et apparaissent dans le sac vitellin (Orkin and Zon, 2008, McGrath et al., 2011). Ils ne sont pas capables de s'auto-renouveler ; c'est pourquoi cette hématopoïèse est transitoire. Ensuite, plus tard dans le développement, l'hématopoïèse définitive se met en place et implique les CSH (Galloway and Zon, 2003). Ces CSH sont multipotentes et donnent lieu à toutes les cellules sanguines de l'organisme adulte. Ces CSH apparaissent dans la région mésonéphro-gonado-aortique ou AGM et le placenta. Elles migrent ensuite dans le foie fœtal à E10.5, puis dans la moelle osseuse dans laquelle elles résident dès la naissance (Cumano and Godin, 2007, Orkin and Zon, 2008) (**Figure 6A**). Le foie fœtal est donc le site principal des CSH et de l'hématopoïèse de la deuxième moitié de la gestation jusqu'à la naissance.

A.



B.

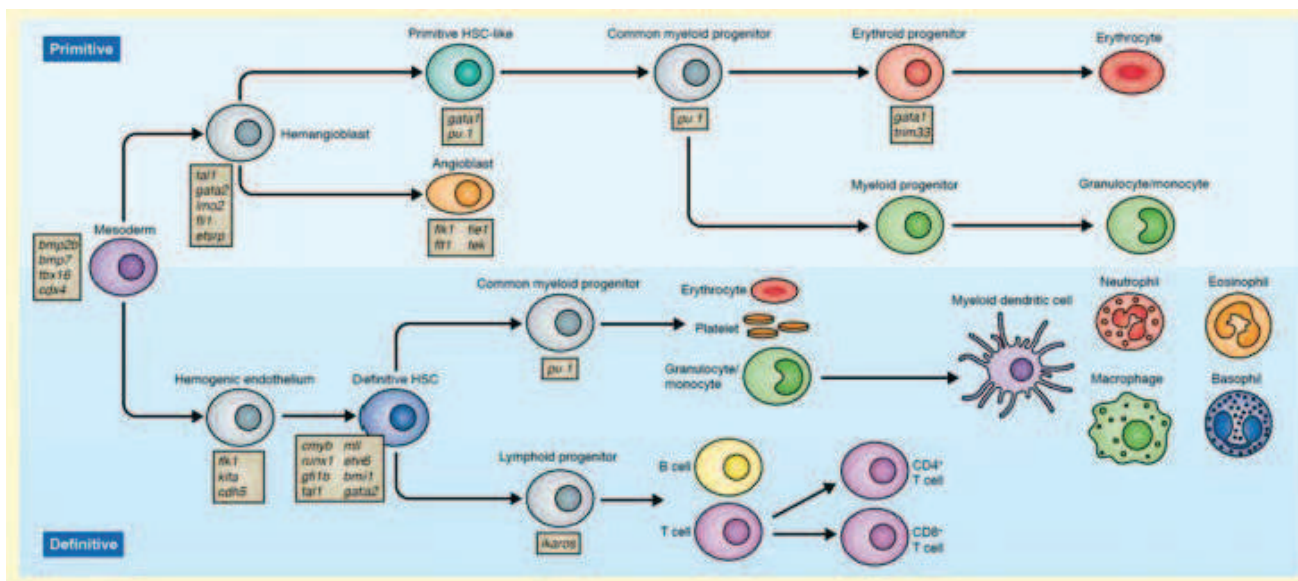


Figure 6 : Les deux vagues de l'hématopoïèse pendant le développement embryonnaire.

A. Sites de l'hématopoïèse primitive et définitive pendant le développement embryonnaire. Adapté de Orkin et Zon, 2008. B. Hématopoïèse primitive et définitive pendant le développement embryonnaire avec les principaux gènes impliqués dans ces processus. Adapté de Bogdan and Zon, 2013.

L'hématopoïèse primitive est contrôlée par deux principaux facteurs de transcription : Gata1 et PU.1 ou Sfp1 qui présentent une relation mutuellement inhibitrice pour l'engagement de la différenciation des EMP en cellules myéloïde ou érythroïde primitives. Gata1 est le régulateur principal des érythrocytes (Cantor and Orkin, 2002). En effet, les souris déficientes pour Gata1 meurent pendant la gestation. Ce phénotype est dû à un arrêt de la différenciation des proérythroblastes en érythrocytes matures. Gata1 régulerait donc l'expression des gènes spécifiques des érythrocytes. Au contraire, PU.1 est le régulateur principal de la différenciation myéloïde qui inclue les macrophages et les granulocytes (Scott et al., 1994). Il a été montré que ces deux facteurs de transcription interagissent, ce qui suggère qu'ils pourraient mutuellement s'inhiber pour permettre une différenciation des progéniteurs en l'un ou l'autre type de cellules (Cantor et al., 2002).

L'hématopoïèse définitive est régulée par différents facteurs de transcription (**Figure 6B**), et notamment par Runx1 et Myb (Wang et al., 1996, Mucenski et al., 1991). En effet, les souris déficientes pour Runx1 n'ont plus de cellules myéloïdes, lymphoïdes et érythroïdes définitives. De plus, les souris déficientes pour Myb meurent suite à un défaut de l'érythropoïèse au niveau du foie fœtal.

Les CSH fœtales et les CSH adultes diffèrent sur de nombreux critères tels que leur prolifération, leurs marqueurs de surface et leurs réponses aux cytokines. En effet, les CSH de foie fœtal expriment les marqueurs de surface AA4.1 et CD11b alors que les CSH adultes ne les expriment pas (Jordan et al., 1990, Morrison et al., 1995). Environ 30% des CSH fœtales sont prolifératives, alors que les CSH adultes sont principalement quiescentes (75% des CSH) (Morrison et al., 1995, Cheshier et al., 1999).

B. Fonctions des CSH

Les cellules souches hématopoïétiques adultes sont rares dans la moelle osseuse : leur fréquence est de 1 CSH sur 10^4 - 10^5 cellules de moelle osseuse. Ces CSH permettent de reconstituer le système hématopoïétique tout au long de la vie de l'individu. Cette fonction dépend de leur potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation dans tous les types de cellules hématopoïétiques matures. L'auto-renouvellement peut se faire par deux mécanismes : la division symétrique où les deux cellules filles deviendront des CSH, et la division asymétrique où une des cellules filles deviendra une CSH et l'autre entrera dans l'étape de différenciation supérieure. De manière similaire, les CSH peuvent se différencier

via des divisions symétriques ou asymétriques. Une des caractéristiques importantes des CSH est qu'elles sont capables de sortir du cycle cellulaire pour entrer en quiescence notée G0. De plus, les CSH peuvent entrer en apoptose ou migrer en dehors de la moelle osseuse. L'équilibre entre toutes ces décisions potentielles doit être finement régulé pour permettre un maintien de l'homéostasie ainsi que l'expansion des CSH après transplantation ou perte sanguine.

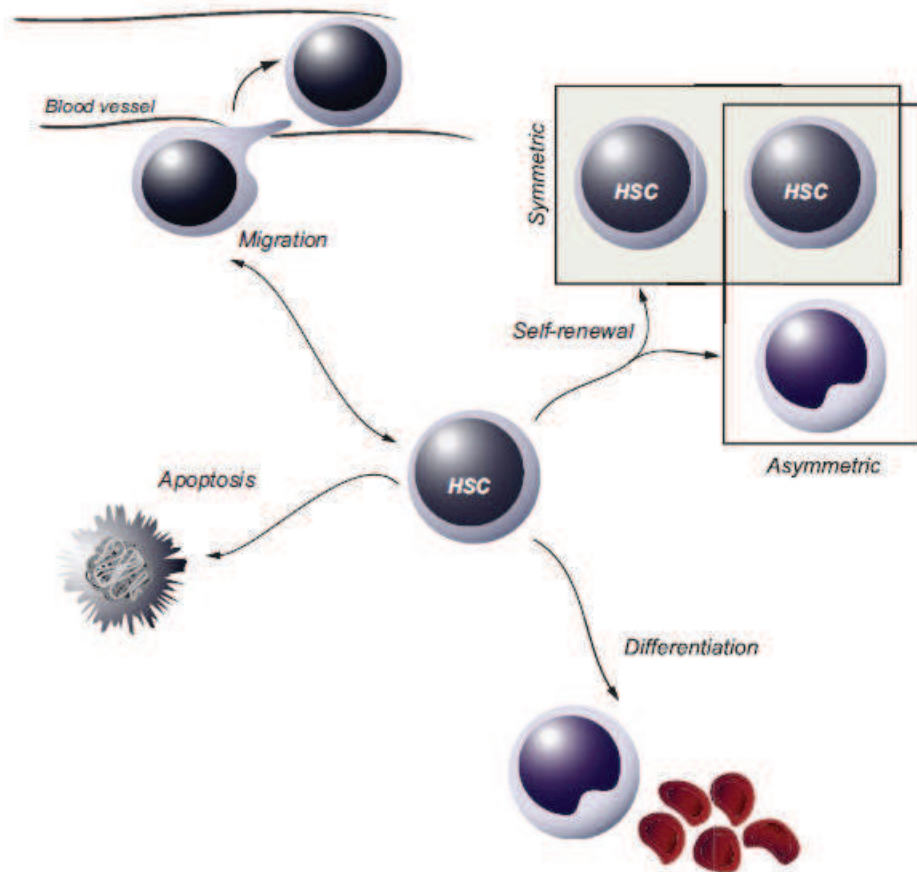


Figure 7 : Les devenir potentiels des CSH.

Adapté de Blank et al., 2008. Les CSH ont plusieurs devenir potentiels : l'auto-renouvellement par divisions symétrique ou asymétrique, ou la différenciation en progéniteurs de cellules hématopoïétiques matures, la migration, l'apoptose et la quiescence.

1. Quiescence et auto-renouvellement des CSH

Dans les conditions homéostatiques, les LT-CSH sont principalement à l'état quiescent (Cheshier et al., 1999, Passegué et al., 2005). Les LT-CSH se divisent ainsi environ 1 fois tous les 145 jours ; elles sont dites dormantes (Wilson et al., 2008). Plus elles progressent dans la différenciation, plus le taux de cellules quiescentes diminue (Wilson et al., 2008). La quiescence est un mécanisme qui permet aux cellules de limiter leur prolifération et ainsi l'épuisement de leur pool (Orford et Scadden, 2008) ainsi que l'accumulation de mutations (Rossi et al., 2008), et le raccourcissement des télomères par divisions cellulaires (Vaziri et al., 2004). En réponse à un stress hématopoïétique, les CSH entrent en cycle. Cette prolifération leur permet alors de s'auto-renouveler et de se différencier pour pouvoir régénérer les cellules hématopoïétiques matures. Des mutations dans des gènes importants pour le maintien de la quiescence sont souvent accompagnées d'une altération de leurs fonctions (Boyer et Cheng, 2008, Orford et Scadden, 2008). Le maintien de l'équilibre entre quiescence et prolifération est donc très important.

Depuis les dix dernières années, de nombreuses études ont identifié plusieurs molécules importantes pour le maintien de la quiescence des CSH. Parmi elles, des gènes suppresseurs de tumeur comme pRb, Fbw7, Lkb1 (Viatour et al., 2008, Thompson et al., 2008, Nakada et al., 2010, Gan et al., 2010), des régulateurs du cycle cellulaire comme p16, p18, p21, p27, p57, les cyclines D, ou les kinases dépendantes des cyclines (Janzen et al., 2006, Attema et al., 2009, Cheng et al., 2000a, Chen et al., 2000b, Yu et al., 2006, Van Os et al., 2007, Zou et al., 2011, Kozar et al., 2004, Malumbres et al., 2004), et de nombreux facteurs de transcription tels que Nurr1, Hif-1, p53 (Sirin et al., 2010, Takubo et al., 2010, Liu et al., 2009) ont été trouvés importants pour la quiescence et l'auto-renouvellement des CSH. En plus de ces molécules impliquées dans des mécanismes intrinsèques aux CSH, la régulation des fonctions des CSH s'effectue aussi par l'intermédiaire d'interactions ligand-récepteurs présents dans la niche des CSH telles que : Angiopoïétin-Tie2, Trombopoïétine-c-MPL, SCF-cKit et CXCL12-CXC4 (Arai et al., 2004, Qian et al., 2007, Ding and Morrison, 2013, Nie et al., 2008). Je vais prendre pour exemple quelques-uns de ces facteurs pour montrer leur importance dans la régulation de la quiescence des CSH.

a. Rôle des inhibiteurs du cycle cellulaire dans la quiescence et l'auto-renouvellement des CSH

La progression du cycle cellulaire est contrôlée par deux familles d'inhibiteurs de kinase dépendantes des cyclines (CKI) : la famille INK4 qui inclue p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d} et la famille Cip/Kip qui inclue p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}. Plusieurs études ont montré l'importance de ces régulateurs dans la fonction des CSH en contrôlant leur quiescence et prolifération.

Par exemple, p16 ne semble pas avoir un rôle important dans les CSH dans des conditions homéostatiques, mais a un rôle clé dans les fonctions des CSH dans des conditions de stress hématopoïétique et dans les souris âgées. P16 n'est pas exprimé chez les souris jeunes, mais son expression augmente après des transplantations en série et chez les souris âgées d'environ 2 ans (Janzen et al., 2006, Attema et al., 2009). Les CSH p16^{-/-} de souris jeunes présentent une fonction normale après une transplantation primaire, mais le pool de CSH est prématurément épuisé après transplantation en série (Janzen et al., 2006). Cependant, les CSH p16^{-/-} âgées ont une capacité de reconstitution supérieure à celle des CSH WT après des transplantations primaire et en série, due à une augmentation de la prolifération et une baisse de l'apoptose après transplantation (Janzen et al., 2006). Ainsi, p16 baisse l'activité des CSH de souris jeunes mais augmente leur activité chez les souris âgées en réponse à un stress hématopoïétique.

La protéine p21 régule l'activité des CSH dans des conditions de stress hématopoïétique. Mais elle a des effets différents sur l'activité des CSH selon la lignée de souris utilisée pour l'étude de ses fonctions. Dans les lignées de souris à fond génétique 129/Sv, la perte de p21 engendre une baisse de la quiescence des CSH ; elles entrent plus en cycle et ceci engendre l'épuisement prématuré du pool de CSH après traitement au 5-FU et après transplantations en série (Cheng et al., 2000). Ce phénotype peut être partiellement rétabli par la perte de p18 (Yu et al., 2006). Cependant, la perte de p21 dans la lignée de souris C57BL/6 a peu d'effets sur la fonction des CSH jeunes et âgées après des expériences de transplantations compétitives, transplantations en série, et de traitement au 5-FU (Van Os et al., 2007). Néanmoins, après irradiation des souris à faible dose (2Gy), les CSH p21^{-/-} ont un potentiel de reconstitution réduit de 4 fois par rapport aux CSH WT après transplantation compétitive (Van Os et al., 2007).

La protéine p18 limite l'auto-renouvellement des CSH. Les CSH p18^{-/-} présentent un potentiel de reconstitution supérieur à celui de CSH WT dû à une augmentation de leur auto-renouvellement (Yuan et al., 2004).

b. Rôle de facteurs de transcription dans la quiescence et l'auto-renouvellement des CSH

Le facteur de transcription HoxB4 (Homeobox B4) est essentiel dans l'auto-renouvellement des CSH. Sa surexpression permet l'expansion des CSH *in vitro* et *in vivo* de 40 fois sans compromettre leur fonction (Antonchuk et al., 2001, Antonchuk et al., 2002). Cette expansion peut alors être augmentée en l'absence de p21 (Miyake et al., 2006) ou de Pbx1, un cofacteur des gènes à homeobox (Kros1 et al., 2003).

Gata3 est requis pour le maintien d'un nombre normal de LT-CSH et pour leur entrée en cycle. Les souris Gata3^{-/-} ont un pool de CSH réduit. Elles perdent leur capacité d'auto-renouvellement après traitement des souris au 5-FU (Ku et al., 2012).

Les facteurs de transcription de la famille FoxO jouent un rôle important dans la réponse physiologique au stress oxydatif, et ainsi sont essentiels pour le maintien de la quiescence des CSH et leur survie. En effet, la délétion conditionnelle de FoxO1, FoxO3 et FoxO4 dans le système hématopoïétique adulte entraîne l'expansion des cellules myéloïdes, des anomalies dans le développement des cellules lymphoïdes et une baisse du nombre de cellules LSK. Les CSH de souris déficientes pour FoxOs ont perdu leur potentiel de reconstitution à long terme, et présentent une augmentation de leur prolifération et de l'apoptose. Les CSH FoxOs^{-/-} manifestent une forte augmentation du taux de ROS intracellulaires comparé aux CSH WT, ce qui est corrélé avec notamment une baisse de l'expression des « superoxide dismutase genes » Sod1 et Sod3 qui détruisent les ROS. Le traitement des souris déficientes pour FoxOs avec l'antioxydant N-acetyl-L-cysteine rétablit un phénotype normal des CSH (Tothova et al., 2007).

De plus, p53 est aussi un régulateur important de la quiescence des CSH. En effet, p53 contrôle directement l'expression des facteurs de transcription gfi1 et necdine qui sont impliqués dans la quiescence des CSH (Liu et al., 2009). Les souris Gfi1^{-/-} présentent un nombre plus grand de CSH que les souris WT. Ceci est dû à une augmentation de leur prolifération, via la sous-expression de p21. Leur pool de CSH s'épuise plus rapidement que

celui de souris WT ; leur capacité de reconstitution après transplantations compétitive ou en série est réduite (Hock et al., 2004). Les CSH Necdine^{-/-} sont moins quiescentes et plus prolifératives que des CSH WT. La Necdine interagit avec de nombreuses protéines promotrices de la progression du cycle cellulaire telles que le facteur de transcription E2F1 (Asai et al., 2012). P53 régule aussi l'auto-renouvellement des CSH. Les CSH p53^{-/-} ont un plus grand potentiel (2 à 4 fois plus) de reconstitution que les CSH WT dans des expériences de transplantation compétitive (TeKippe et al., 2003). Cependant, seulement 44% des souris qui ont reçu les CSH p53^{-/-} comme donneuses survivent 5 mois après la transplantation contre 92% pour celles qui ont reçu les CSH WT (TeKippe et al., 2003). Les souris p53^{-/-} présentent un pool de CSH deux à trois fois plus grand que les souris WT (TeKippe et al., 2003). Cependant, les gènes régulés par p53 impliqués dans l'auto-renouvellement des CSH sont encore inconnus.

c. Rôle de Bmi1, protéine du complexe Polycomb, dans l'auto-renouvellement des CSH

Le proto-oncogène Bmi-1 est une protéine du complexe polycomb aussi appelée polycomb group RING finger protein 4 (PCGF4) ou RING finger protein 51 (RNF51) est importante pour le maintien de la quiescence des CSH. Bmi-1 est exprimé dans les CSH fœtales et adultes de souris et dans les CSH humaines adultes (Park et al., 2003). Bmi1 est impliqué dans l'auto-renouvellement des CSH. En effet, les souris Bmi1^{-/-} ont un nombre normal de CSH pendant le développement embryonnaire, mais chez l'adulte, le nombre de CSH est réduit comparé aux CSH WT. Les CSH fœtales et adultes de souris Bmi1^{-/-} ne sont capables de reconstituer le système hématopoïétique que transitoirement. Les CSH Bmi1^{-/-} ne s'auto-renouvellent pas. L'analyse de l'expression des gènes des cellules de moelle osseuse de souris Bmi1^{-/-} montre que l'expression de gènes impliqués dans la survie et la régulation de la prolifération tels que p16 et p19 est altérée (Park et al., 2003).

d. Rôle de molécules anti-apoptotiques dans la quiescence des CSH

La protéine anti-apoptotique Bid, appartenant à la famille Bcl2 maintient la quiescence des CSH. En effet, la perte de la phosphorylation de Bid par ATM induit une

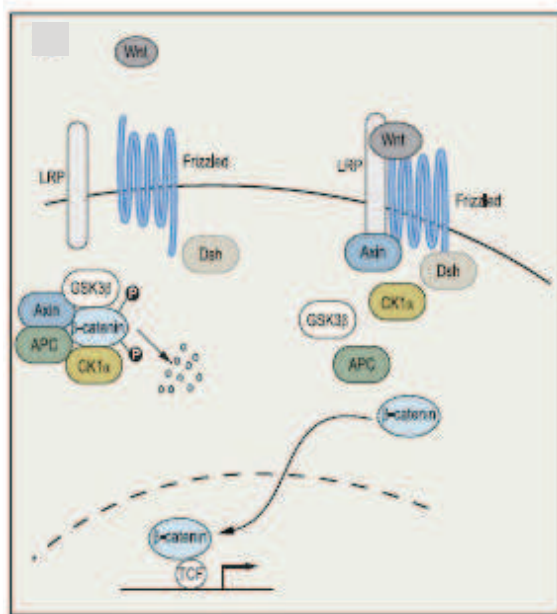
hyperprolifération des CSH, l'épuisement de leur pool, ainsi qu'une forte réduction de leur potentiel de reconstitution *in vivo* (Maryanovich et al., 2012).

Une étude récente a mis en évidence un rôle de Bcl2 dans la quiescence des CSH. Les CSH déficientes pour Ku70 (protéine impliquée dans la voie de réparation des cassures doubles brins de l'ADN nommée NHEJ pour « non homologous end-joining ») présentent une forte baisse de leurs capacités d'auto-renouvellement, de reconstitution du système hématopoïétique ainsi que de l'occupation de leur niche, ce qui engendre une déplétion rapide du pool de CSH. La surexpression de Bcl2 dans ces cellules rétablit la quiescence, l'occupation des cellules dans leurs niches ainsi que leur potentiel de reconstitution (Qing et al., 2014).

e. Rôle de la voie Wnt dans l'auto-renouvellement des CSH

Les études impliquant des molécules de la voie Wnt dans la régulation des fonctions des CSH et notamment de leur auto-renouvellement sont controversées (Willert et al., 2003, Kirstetter et al., 2006, Scheller et al., 2006, Qiang et al., 2008). Une nouvelle étude suggère que les effets contradictoires des molécules étudiées dans les études précédentes sont dus à différents niveaux de Wnt dans les conditions expérimentales utilisées (Luis et al., 2011; Luis et al., 2012).

A



B

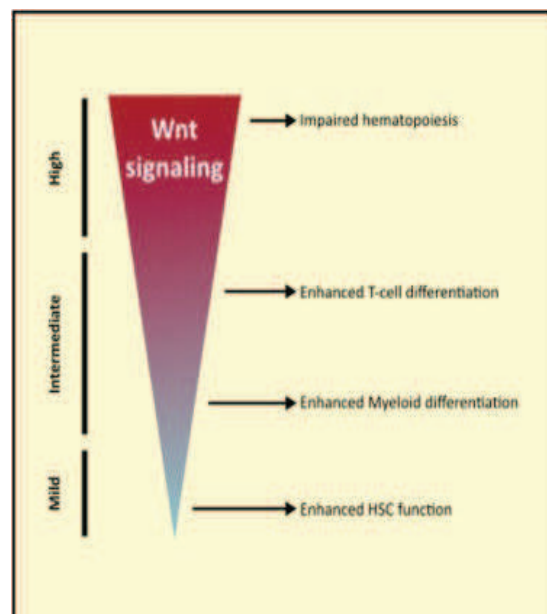


Figure 8 : La dose de la voie Wnt induit différents phénotypes hématopoïétiques

A. Voie Wnt canonique. Les protéines Wnt constituent une large famille de molécules sécrétées qui agissent en se liant aux protéines transmembranaires de la famille frizzled et aux récepteurs des lipoprotéines de faible densité : LRP5 et LRP6. La liaison des protéines Wnt aux récepteurs permet la fixation des protéines Axin et Dsh au récepteur, ce qui déstabilise le complexe composé des protéines Axin, APC (protéine adenomatosis polyposis coli), CK1 (casein kinase I), GSK3b (glycogen synthase kinase 3b). La β -caténine n'est alors pas phosphorylée par le complexe, donc pas dégradée. La β -caténine, ainsi stabilisée, transloque dans le noyau où elle active les membres de la famille de facteurs de transcription LEF-TCF. Adapté de Blank et al., 2008. **B.** Une activation normale de la voie Wnt permet d'augmenter l'auto-renouvellement des CSH et leur potentiel de reconstitution (Willert et al., 2003). Des mutations des membres de la voie Wnt permettant d'augmenter l'activation de cette voie engendrent une perte fonctionnelle des CSH via, entre autre, une augmentation de leur auto-renouvellement (Kirstetter et al., 2006, Scheller et al., 2006, Qian et al., 2008). Adapté de Luis et al., 2012.

2. Différenciation des CSH

L'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation des CSH est essentiel à l'homéostasie hématopoïétique. Le choix entre ces deux devenir potentiels des CSH est finement régulé. Par exemple, les protéines de la famille des Chromobox (Cbx) jouent un rôle très important dans ce processus. Cbx7 est exprimé spécifiquement dans les CSH, et son expression baisse à mesure qu'elles se différencient. Sa surexpression augmente l'auto-renouvellement des CSH après traitement au 5-FU, et induit des leucémies après transplantation. Au contraire, la surexpression de Cbx4, ou Cbx8 induit la différenciation des CSH et l'épuisement de leur pool. Cbx7 réprimerait des gènes de différenciation tels que *npm1* (impliqué dans la différenciation érythroïde) dans les CSH (Klauke et al., 2013).

Récemment, une étude a montré que Lis1, protéine liant la dynéine (protéine qui se lie aux microtubules et essentielle au transport vésiculaire intracellulaire et à la formation des « mitotic spindle » pendant la mitose) est importante pour les fonctions des CSH en régulant leurs divisions asymétriques. La délétion conditionnelle de Lis1 dans le système hématopoïétique entraîne la déplétion des CSH, une augmentation du pool de cellules matures, une insuffisance hématopoïétique et la mort embryonnaire. Les CSH *Lis1^{-/-}* ont

perdu leur potentiel de reconstitution, et augmentent leur taux de division asymétrique (Zimdahl et al., 2014).

Les CSH ont pour capacité après différenciation de donner lieu à potentiellement toutes les cellules hématopoïétiques de la spécification myéloïde et lymphoïde. Il est connu que les LT-CSH ont des programmes génétiques pro-myéloïdes et pro-lymphoïdes (Hu et al., 1997). La spécification se fait dès lors dans ces cellules, et une fine régulation de l'expression de ces gènes permet une différenciation correcte des CSH en cellules myéloïdes ou lymphoïdes. Plusieurs gènes ont été identifiés pour leur rôle clé dans la spécification et la différenciation des CSH. Notamment *Bmi1*, protéine appartenant au groupe des polycombs, est important pour la multipotence des CSH et des progéniteurs MPP. Les gènes de développement des cellules B, *Pax5* et *Ebf1*, sont réprimés avant la différenciation. La perte de *Bmi1* entraîne l'expression prématurée de ces deux facteurs dans les CSH et progéniteurs, l'accélération de la spécification lymphoïde, ainsi qu'une réduction des CSH et MPP (Oguro et al., 2012).

3. Niches des CSH

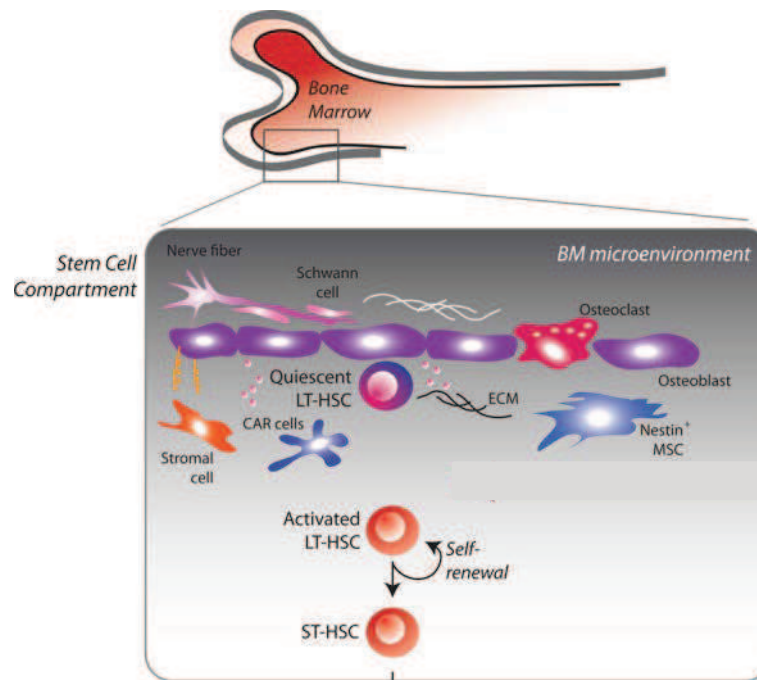
Le développement des CSH requière leur migration des anciens sites hématopoïétiques aux nouveaux sites via les vaisseaux sanguins ; par exemple du foie fœtal à la moelle osseuse. La localisation des CSH dans leur niche leur est essentielle pour remplir efficacement leurs fonctions. Les études portant sur les niches des CSH se sont focalisées principalement sur celles des CSH adultes et non des CSH fœtales. Je ne vais développer ici que les aspects des niches des CSH adultes.

Le microenvironnement des CSH, ou « niche », est essentiel pour la régulation de leur développement et de leurs fonctions. Ce microenvironnement spécialisé est créé par les cellules adjacentes qui expriment des facteurs promouvant l'auto-renouvellement et la survie des CSH, et des facteurs régulant leurs fonctions (**Figure 9**). La migration des CSH du sang à leurs niches est appelé « homing », et des niches vers le sang « mobilisation ». Deux niches ont tout d'abord été proposées pour les CSH adultes : la niche endostéale (Zhang et al., 2003) et la niche vasculaire qui se trouve à proximité de la niche endostéale (Kiel and Morrison, 2006).

Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans la structure et la fonction des niches des CSH : les cellules souches mésenchymateuses, les cellules stromales, les ostéoblastes et les cellules endothéliales. Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs), identifiées grâce à leur expression du filament intermédiaire nestine, constituent un composant essentiel des niches des CSH. En effet, les MSC nestine⁺ sont associées aux CSH et expriment fortement des gènes de maintien des CSH tels que Cxcl12, Kitl (ligand du récepteur Kit, ou SCF « stem cell factor », l'angiopoïétine, et Vcam1 (vascular cell adhesion molecule 1). La perte de ces cellules nestine⁺ réduit le nombre des CSH de la moelle osseuse, et diminue le homing des CSH à leurs niches (Méndez-Ferrer et al., 2010). Les cellules stromales de la moelle osseuse expriment le facteur de croissance SCF qui est requis pour l'homéostasie des CSH (Ding and Morrison, 2013). Les ostéoblastes sécrètent l'angiopoïétine, qui, en se liant au récepteur Tie2 exprimé par les CSH, permet le maintien de la quiescence des CSH. Les cellules endothéliales expriment notamment la chimiokine CXCL12 qui permet la migration des CSH.

Il a longtemps été peu clair si les niches péri-vasculaires et endostéales étaient distinctes ou si elles contribuaient toutes deux à une niche commune (Kiel and Morrison, 2008). Néanmoins, des délétions conditionnelles de SCF (stem cell factor) dans différents types cellulaires ont permis de mettre en évidence la constitution des niches des CSH de façon plus claire. En effet, la fréquence des CSH et leurs fonctions ne sont pas affectées lorsque le SCF est délété conditionnellement dans les cellules hématopoïétiques, dans les ostéoblastes et dans les MSC nestine⁺. Cependant, lorsque SCF est déplète des cellules endothéliales ou des cellules stromales péri-vasculaires exprimant le récepteur à la leptine (Lepr), les CSH sont déplétées de la moelle osseuse. Ainsi les CSH résident dans des niches péri-vasculaires dans lesquelles plusieurs types de cellules expriment des facteurs qui promeuvent le maintien des CSH (Ding et al., 2012). Une autre étude a défini plus précisément que les niches occupées par les CSH et les progéniteurs sont distinctes ; les CSH occupant la niche péri-vasculaire et les progéniteurs lymphoïdes occupant la niche endostéale. En effet, la délétion de CXCL12 des cellules endothéliales déplètent les CSH et non les progéniteurs. La délétion de CXCL12 des ostéoblastes déplètent les progéniteurs et non les CSH (Ding et Morrison, 2013).

A



B

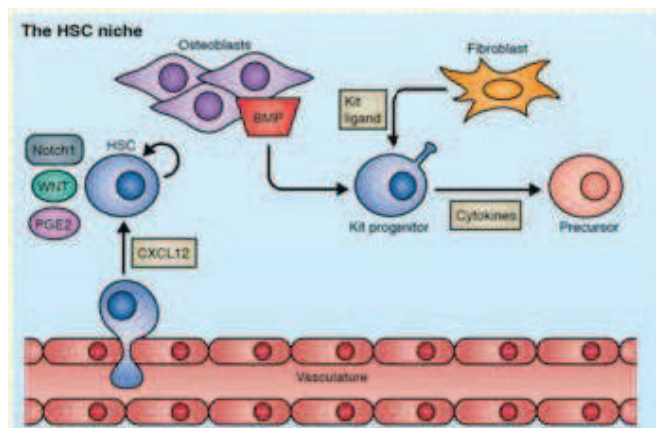


Figure 9 : Les niches des CSH

A. Les CSH résident dans les niches péri-vasculaires dans lesquelles plusieurs types cellulaires sont impliqués : les cellules souches mésenchymateuses, les cellules stromales, les ostéoblastes et les cellules endothéliales. ECM : extracellular matrix composé notamment de fibronectine, CAR : CXCL12-abundant reticular cells. Adapté de Rossi et al., 2012. B. Tous ces types cellulaires permettent la régulation des fonctions des CSH via un contact direct cellule-cellule, et notamment via la sécrétion de facteurs (SCF, BMP, CXCL12, cytokines,

incluant les interleukines, la thrombopoïétine et l'érythropoïétine). Adapté de Jagannathan-Bogdan et Zon, 2013.

Plusieurs facteurs affectent la migration des CSH, tels que VLA4, MMP9, VCAM-1, c-Myc, CXCL12. D'autres facteurs tels que BMP, Wnt, Notch et le ligand Kit sont impliqués dans le homing des CSH et régulent leurs fonctions. Je vais décrire ici la fonction de certains de ces facteurs, comme exemple, pour montrer leur importance dans le maintien des fonctions des CSH.

BMP (bone morphogenic protein), notamment, est essentiel au maintien des fonctions des CSH. Des souris mutantes pour BMP présentent une augmentation du nombre d'ostéoblastes et de CSH (Calvi et al., 2003, Zhang et al., 2003).

Les ostéoblastes stimulés *in vivo* augmentent en nombre et produisent plus de ligand Jagged1, qui va activer la voie Notch dans les CSH engendrant une augmentation de leur nombre (Calvi et al., 2003).

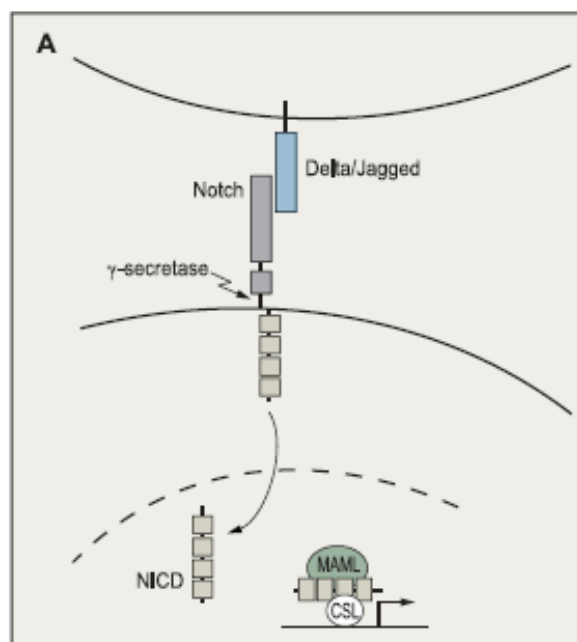


Figure 10 : Voie Notch

Les protéines Notch (Notch1-4) sont des récepteurs transmembranaires très conservés qui sont activés quand leur domaine extracellulaire s'associe avec les ligands de la famille Jagged (Jagged 1, and 2) et Delta (Delta1, 3, 4). L'interaction ligand-récepteur mène au clivage (par la métalloprotéase ADAM ou la γ -sécrétase) et au détachement du fragment intracellulaire de Notch (NICD). NICD entre alors dans le noyau, forme un complexe avec le

facteur de transcription RBP-J κ (aussi appelé CSL) et le coactivateur transcriptionnel mastermind-1 (MAML), et initie l'expression des gènes cibles. Adapté de Blank et al., 2008

La voie de signalisation Wnt permet la régulation de la quiescence des CSH. En effet, la surexpression de la forme stable de β -caténine dans les cellules stromales promeut l'auto-renouvellement des CSH de manière contact-dépendant (Kim et al., 2009b). De plus, la surexpression d'un inhibiteur de la voie Wnt dans les ostéoblastes induit la prolifération des CSH et la perte de leur capacité de reconstitution (Fleming et al., 2008). Des cellules stromales OP9 sur-exprimant Wnt3a acquièrent des propriétés ostéoblastiques avec l'expression de l'angiopoïétin 1, du ligand c-Kit, et de VCAM-1, et perdent leurs caractéristiques mésenchymateuses. Ces cellules augmentent alors la production de décorine (composant de la matrice extra-cellulaire) qui a un rôle dans le maintien de l'hématopoïèse ; le nombre de CSH augmente chez les souris déficientes pour la décorine (Ichii et al., 2012).

La molécule d'adhésion E-sélectine exprimée exclusivement par les cellules endothéliales de la niche vasculaire promeut la prolifération des CSH. En effet, la quiescence et l'auto-renouvellement des CSH sont augmentées dans les souris déficientes pour la E-sélectine (*Sele*^{-/-}), ou après administration d'un antagoniste de la E-sélectine. (Winkler et al., 2012).

Une étude a montré que la Rho GTPase Cdc42, qui permet la polymérisation de l'actine est impliquée dans le maintien en quiescence des CSH ainsi que de leur interaction avec leur niche. En effet, des CSH de souris *Cdc42*^{-/-} entrent en cycle, ce qui entraîne une augmentation du nombre et de la proportion des CSH et progéniteurs dans la moelle osseuse. La perte de *Cdc42* engendre également des pertes de l'adhésion des CSH à leur niche, de leur homing, ce qui entraîne leur migration de la moelle osseuse aux organes distaux et au sang périphérique. Ces effets sont intrinsèques aux CSH et sont associés à la dérégulation de l'expression de c-Myc, p21, β 1-intégrine, et de la N-cadhérine ainsi que des défauts dans l'organisation de l'actine (Yang et al., 2007).

Le CXCL12 aussi appelé stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) est lié aux cellules supportrices des niches des CSH. Il est impliqué dans la migration des CSH dans des conditions homéostatiques mais aussi après stress homéostatique. CXCL12 est constitutivement exprimé par les cellules des niches ostéoblastiques et vasculaires. Son expression et sa sécrétion sont induites après un stress homéostatique (Ara et al., 2003, Ponomaryov et al., 2000). Son récepteur CXCR4 est exprimé par les CSH. CXCL12 induit la migration des CSH du foie fœtal à la moelle osseuse. En effet, les CSH d'embryons *CXCL12*^{-/-} présentent des défauts dans leur homing à la moelle osseuse. Ce phénotype est rétabli après

réexpression de CXCL12 (Ara et al., 2003). La délétion de CXCR4 dans les cellules de moelle osseuse adultes engendre une réduction de la quiescence des CSH et du nombre de CSH fonctionnelles. Cependant, aucun défaut dans la migration des CSH n'a été rapporté (Sugiyama et al., 2006).

La mobilisation des CSH peut être stimulée par le traitement avec certaines drogues telles que le 5-fluorouracile (5-FU) et/ou des cytokines telles que G-CSF. Le 5-FU est un analogue des pyrimidines et tue les cellules en prolifération. Puisque la majorité des LT-CSH sont quiescentes (Cheshier et al., 1999), elles ne sont pas affectées par le traitement au 5-FU. Au contraire, elles sont alors stimulées pour migrer, proliférer et reconstituer le compartiment hématopoïétique déplété (Randall and Weissman, 1997). Le G-CSF induit l'expansion des CSH avant leur mobilisation (Morrison et al., 1997).

D'autres types de cellules hématopoïétiques tels que des macrophages sont aussi présents dans ces niches. Ces macrophages contribuent à la fonction de la niche des CSH. En effet, la déplétion conditionnelle des macrophages engendre une baisse du niveau de CXCL12 de la moelle osseuse, et la migration de progéniteurs et CSH dans le sang (Chow et al., 2011).

C. Comment étudier la biologie des CSH?

1. Tests fonctionnels des CSH *in vivo*

Les CSH sont définies par leurs capacités d'auto-renouvellement et de reconstitution du système hématopoïétique tout au long de la vie de l'individu. Elles peuvent notamment reconstituer entièrement le système hématopoïétique lorsqu'elles sont transplantées dans un hôte myéloablaté. Basées sur ces critères de définition, différentes méthodes *in vitro* et *in vivo* ont été développées pour étudier la fonction des CSH. Je ne vais développer, dans cette sous-partie, que les deux méthodes *in vivo* que j'ai utilisées dans mes investigations : la transplantation compétitive en série et la quantification de CSH par l'expérience de CRU (competitive repopulating unit).

La transplantation est la technique la plus fiable pour évaluer la fonction des CSH sur la base d'une seule cellule. Lorsque les souris sont irradiées à 9-10 Gy, ces dernières meurent d'insuffisance hématopoïétique entre 10 et 14 jours après l'irradiation, à moins qu'elles ne soient transplantées avec des cellules de moelle osseuse (Weissman et al., 1994, Lorentz et al., 1952). Ainsi, la transplantation permet de tester qualitativement le potentiel radioprotecteur

des cellules donneuses en notant la survie des souris receveuses. Pour tester la capacité des CSH donneuses à reconstituer tous les types de cellules matures hématopoïétiques, la contribution des cellules donneuses à la reconstitution du système hématopoïétique receveur est mesuré. Cette mesure est basée sur la distinction des cellules donneuses et receveuses, par l'utilisation de lignées de souris congéniques portant différents allèles du marqueur de surface CD45 (antigène commun leucocytaire) (Spangrude et al., 1988). Des anticorps reconnaissant les deux types d'allèle CD45.1 et CD45.2 ont été développés. Ainsi, les pourcentages de cellules dérivées des cellules donneuses et receveuses, (exprimant les marqueurs de surface CD45.1 ou CD45.2), peuvent être déterminés par cytométrie en flux. Le marqueur CD45 est exprimé par toutes les cellules sanguines à l'exception des érythrocytes. Il est donc impossible de mesurer la capacité de reconstitution de ces cellules. Cette lignée est généralement considérée comme reconstituée si les autres cellules matures sanguines sont reconstituées par les cellules donneuses (Purton et Scadden, 2007).

La transplantation compétitive donne des informations quantitatives sur l'activité des CSH testées (Harrison, 1980). Dans cette expérience, les cellules donneuses sont co-transplantées avec un nombre constant de cellules sauvages de moelle osseuse compétitives, qui assurent la survie des souris receveuses irradiées. Les cellules receveuses, donneuses et compétitrices, sont distinguées par leur expression de différents allèles du marqueur de surface CD45 : CD45.1+, CD45.2+, et CD45.1+CD45.2+. Les pourcentages de cellules dérivées des cellules donneuses et receveuses sont testés tous les mois, suivant la transplantation. Ces analyses s'effectuent par cytométrie en flux en suivant l'expression des marqueurs de surface CD45.1 et CD45.2, ainsi que les marqueurs de différenciation CD3 pour les cellules T, B220 pour les cellules B, CD11b pour les macrophages et Gr1 pour les granulocytes. L'unité de reconstitution (RU) rend compte de l'activité de reconstitution des cellules donneuses, et est calculée selon la formule suivante : $RU = (D \times c) / (100 - D)$ avec $D = \% \text{ cellules dérivées des cellules donneuses}$, et $c = \text{le nombre de cellules compétitrices}/10^5$ (Purton et Scadden, 2007). Il est aussi possible de calculer le pourcentage de chimérisme donné par la formule : $\% \text{ Chimérisme} = (D / (D + C)) \times 100$ où $D = \% \text{ cellules dérivées des cellules donneuses}$, et $C = \% \text{ cellules dérivées des cellules compétitrices}$ (Ema et al., 2006). Dans mes analyses, j'ai calculé le pourcentage de chimérisme. Selon les laboratoires, le dernier point d'analyse après transplantation varie entre 12 semaines, 16 semaines ou 6 mois. Généralement, au dernier point, la moelle osseuse des souris receveuses est analysée pour leur pourcentage de chimérisme ou leur RU. Cependant, 50 ST-CSH transplantées en compétition

avec 2.10^5 cellules de moelle osseuse compétitrices ont donné un pourcentage de chimérisme supérieur à 1%, 16 semaines après la transplantation (Yang et al., 2005). Ainsi, Purton et Scadden ont suggéré qu'au moins 16 semaines sont requises pour tester l'activité de long terme des CSH (Purton et Scadden, 2007). Dans mes études, j'ai analysé les souris receveuses, tous les mois, jusqu'à 6 mois après la transplantation.

La transplantation compétitive en série permet d'étudier l'activité des CSH à long terme, et mime leur vieillissement (Yahata et al., 2007). Dans cette expérience, les cellules dérivées de cellules donneuses transplantées à des souris receveuses primaires sont purifiées, et transplantées avec des cellules compétitrices fraîchement isolées, à des souris receveuses secondaires irradiées. Après reconstitution à long terme dans ces souris receveuses secondaires, les cellules dérivées des cellules donneuses sont à nouveau purifiées et transplantées avec des cellules compétitrices fraîchement isolées à des souris receveuses dites tertiaires. Cette expérience a été fréquemment utilisée pour mesurer la capacité d'auto-renouvellement des CSH (Allsopp et al., 2003a, Cheng et al., 2000a).

L'expérience de CRU (competitive repopulating unit) combine les expériences de reconstitution compétitive avec les dilutions limites. Elle quantifie la proportion de CSH donneuses fonctionnelles, c'est-à-dire la proportion de cellules capables de reconstituer le système hématopoïétique de souris irradiées (Szilvassy et al., 1990). Dans cette expérience, les cellules donneuses sont diluées en série et transplantées avec un nombre constant de cellules compétitrices. A la fin de l'expérience, les pourcentages de cellules dérivées des cellules donneuses et compétitrices sont analysés dans le sang périphérique des receveurs. Ces derniers sont marqués positivement ou négativement pour l'efficacité de transplantation à long terme des cellules donneuses qu'ils ont reçues. Généralement, la limite négative est <1% de chimérisme dans toutes les cellules matures lymphoïdes et myéloïdes décrites précédemment, et ceci 16 semaines (ou plus) après la transplantation. Ces données vont ensuite servir à calculer le CRU c'est-à-dire le nombre de CSH donneuses fonctionnelles, basé sur les lois statistiques de Poisson.

2. Culture des CSH in vitro

Plusieurs cytokines ont été utilisées pour permettre l'expansion des CSH *in vitro* dans un milieu de culture sans sérum telles que la thrombopoïétine (TPO), le facteur des cellules

souches (SCF), l'IL3, et l'IL6 (Bryder and Jacobsen, 2000, Ema et al., 2000, Miller et Eaves, 1997, Ramsfjell et al., 1999). Cependant, ces cytokines permettent aussi leur différenciation (Domen et Weissman, 2000).

3. Isolement des CSH

L'étude de la biologie des CSH requiert de pouvoir les identifier voire de les isoler des autres cellules de la moelle osseuse. Les CSH sont généralement identifiées et isolées à l'aide de marqueurs de surface en utilisant la technique de fluorescence-activated cell sorting (FACS). De nombreuses études ont cherché à déterminer des marqueurs de surface spécifiques des CSH. Il existe maintenant plusieurs cocktails de marqueurs capables d'identifier ces CSH.

Comme décrit dans la section précédente (II-A-1), les LT-CSH, ST-CSH et MPP font partie du compartiment de cellules appelé LSK ou Lin-Sca1+cKit+, basé sur leur expression ou non-expression de différents marqueurs de surface. D'autres marqueurs de surface tels que CD48, CD150 permettent d'isoler les LT-CSH des autres populations, ou encore CD34 et Flt3 permettent de distinguer les trois sous-populations.

Le marqueur CD34 a été identifié comme étant un marqueur spécifique des CSH basé sur le fait qu'une seule cellule LSKCD34⁻ était capable de reconstituer le système hématopoïétique dans des expériences de transplantation compétitive (Osawa et al., 1996). L'expression de Flt3 (aussi appelé CD135 ou Flk2) a été trouvée comme associée à une activité de reconstitution de court terme (Adolfsson et al., 2001). Ainsi, basé sur des expériences de transplantations, les marqueurs CD34 et Flt3 permettent de distinguer les trois sous-populations de LSK telles que : LT-CSH (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD34⁻Flt3⁻), ST-CSH (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD34⁺Flt3⁻), et MPP (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD34⁺Flt3⁺) (Yang et al., 2005). Cependant, ces marqueurs ne sont pas utilisables sous certaines conditions car leur expression peut varier. En effet, l'expression du marqueur Flt3 peut être altérée chez des souris mutantes. Par exemple, les MPP de souris déficientes pour Ikaros n'expriment pas Flt3 (Nichogiannopoulou et al., 1999). L'expression de CD34 diminue avec l'âge : les CSH fœtales expriment CD34 jusqu'à la naissance. Cette expression diminue pour être nulle à environ 10 semaines de vie. (Ito et al., 2000, Matsuoka et al., 2001). D'autres études montrent que les LT-CSH mises en culture, ou activées ou mobilisées par traitement au 5-FU ou au G-CSF, respectivement,

expriment CD34 (Noda et al., 2008, Sato et al., 1999, Tajima et al., 2000). Les cellules arrêtent alors d'exprimer CD34 lorsqu'elles retrouvent des conditions homéostatiques (Sato et al., 1999, Tajima et al., 2000).

D'autres marqueurs, CD150 et CD48, sont alors apparus comme étant plus stables pour l'identification des CSH dans différentes conditions : dans les fœtus (Kim et al., 2006, Papathanasiou et al., 2009), chez les sujets âgés (Yilmaz et al., 2006), ainsi que dans des population mobilisées par G-CSF (Yilmaz et al., 2006). CD150 et CD48 sont des membres de la famille de molécules de surface SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule). Ces marqueurs sont différemment exprimés chez les CSH et les MPP. Les LT-CSH sont enrichies en CD150⁺CD48⁻ (Kiel et al., 2005). Cependant, la population CD150⁺CD48⁻ n'inclut pas toutes les CSH. Une activité CSH a été observée dans la fraction CD150⁻ de souris WT (Weksberg et al., 2008) dans des expériences de transplantations compétitives et de transplantations en série.

Récemment d'autres marqueurs de surface des CSH ont été identifiés et permettent l'affinement de l'isolement des LT-CSH. En effet le marqueur CD9 permet la purification des LT-CSH. Les cellules LSKCD150⁺CD48⁻CD9^{hi} présentent une capacité de reconstitution de long terme et n'expriment pas CD34, alors que les cellules LSKCD150⁺CD48⁻CD9^{lo} ont un potentiel de reconstitution de court terme et expriment CD34 (Karlsson et al., 2013). De plus, les marqueurs de la famille SLAM CD244 et CD229 permettent de distinguer parmi les LT-CSH, les cellules qui présentent un biais dans leur différenciation myéloïde et lymphoïde. Les cellules LSKCD150⁺CD48⁻CD244⁻CD229⁺ se différencient préférentiellement en cellules lymphoïdes alors que les cellules LSKCD150⁺CD48⁻CD244⁻CD229⁻ se différencient préférentiellement en cellules myéloïdes (Oguro et al., 2013).

Ainsi, l'identification des CSH par leurs marqueurs de surface doit être réalisée avec attention sachant que le profil de marqueurs de surface des CSH et des progéniteurs peut changer pendant le développement, dans des conditions non homéostatiques, et chez certaines lignées de souris mutantes. La caractérisation des populations basée sur l'expression de leurs marqueurs de surface n'est pas suffisante. La caractérisation des CSH par leurs fonctions par des expériences *in vivo* est l'approche la plus pertinente.

III. Réponses des CSH aux dommages de l'ADN et vieillissement des CSH

A. Réponses des CSH aux dommages de l'ADN

Les cellules souches ont un système de réparation des dommages de l'ADN très efficace pour éviter l'apparition de mutations potentiellement oncogéniques qui seraient alors transférées aux cellules filles après différenciation. Les cassures simple et double brins sont les dommages de l'ADN les plus graves. Des mutations dans les gènes impliqués dans les voies de réponses aux dommages de l'ADN dans les CSH affectent fortement leurs fonctions. Dans cette partie, je vais me focaliser sur les voies de réparation des cassures doubles brins dans les CSH.

1. Détection des cassures doubles brins

Les cassures doubles brins de l'ADN (DSB) peuvent être induites par γ -irradiation, ou par des agents chimiques radiomimétiques tels que la néocarzinostatine, ou la camptothécine et l'étoposide inhibiteurs respectifs des topoisomérases I et II (Nagy et al., 2009), respectivement. Il existe deux voies de réparation des DSB : la voie RH (recombinaison homologue) et la voie NHEJ (non homologous end joining). Pour la voie RH, il a été montré que le complexe MRN (composé des protéines Mre11, Rad50, et Nbs1 (Nijmegen breakage syndrome 1) est le senseur des DSB (Popławski et Błasiak, 2006) (**Figure 11**). Une mutation des sous-unités de ce complexe entraîne des prédispositions aux cancers (particulièrement des lymphomes), immunodéficience, hyper-sensibilité aux rayons X, une instabilité chromosomique à l'origine des pathologies suivantes : Nijmegen breakage syndrome (NBS), ou (A-TLD) ataxia-telangiectasia-like (Petrini et al., 2000). La localisation du complexe MRN aux cassures de l'ADN va alors activer ATM (ataxia telangiectasia-mutated) par un mécanisme sous-jacent encore mal connu (**Figure 11**). Pour la voie NHEJ, les DSB sont reconnus par le complexe Ku70/Ku80 (Getts et Stamato, 1994, Taccioli et al., 1994). DNA-PK va se lier au complexe Ku70/Ku80, ce qui augmente son activité d'environ 10 fois, et initier la voie NHEJ (Zhou et al., 2006, Smith et al., 1999, Meek et al., 2008).

ATM et DNA-PK vont alors s'autophosphoryler et phosphoryler le variant d'histone H2AX (Rogakou et al., 1998, Stiff et al., 2004). Cette histone est alors appelée γ H2AX (Rogakou et al., 1998). Ces histones phosphorylées γ H2AX forment des foyers, au niveau des cassures de l'ADN, visibles par immunofluorescence. Ces foyers sont considérés comme un marqueur de la présence de DSB (Rogakou et al., 1999).

ATM permet la phosphorylation d'autres molécules telles que 53BP1 (p53 binding protein 1), MCD1 (mediator of DNA damage checkpoint 1), et BRCA1 (Breast cancer 1). γ H2AX est requis pour la rétention efficace de Nbs1, BRCA1, 53BP1 et MDC1 aux foyers de DSB (Paull et al., 2000, Stucki et al., 2005, Lukas et al., 2004, Celeste et al., 2003) (**Figure 11**). γ H2AX est indispensable à une réparation efficace des DSB. En effet, des souris déficientes pour H2AX présentent des défauts importants de la réparation de leur ADN ce qui entraîne une instabilité génomique (Bassing et al., 2002, Celeste et al., 2002). De plus, Nbs1 et le complexe MRN sont requis pour une activation totale de ATM (Zhou et al., 2006, Uziel et al., 2003).

DNA-PK phosphoryle d'autres protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN telles que Ku70, Ku80, XRCC4, Artemis, RPA et p53 (Lees-Miller et Meek, 2003, Appella et al., 2001).

Beaucoup des facteurs impliqués dans les voies RH et NHEJ sont distincts. Cependant, plusieurs d'entre eux font partie des deux voies. En effet, ATM phosphoryle des protéines de la réparation RH telles que Nbs1, mais aussi DNA-PK qui se lie au complexe Ku70/Ku80 au niveau des DSB (**Figure 11**). DNA-PK phosphoryle aussi ATM, ce qui suggère une régulation complexe du choix de la voie de réparation entre NHEJ, DNA-PK dépendante, et RH, Nbs1 dépendante (Chen et al., 2007, Shrivastav et al., 2009). BRCA1 au niveau des foyers des DSB coordonnerait l'utilisation des deux voies de réparation NHEJ et RH (Snouwaert et al., 1999, Wang et al., 2006). La réponse aux dommages de l'ADN semble donc être plus un réseau qu'une voie de signalisation linéaire.

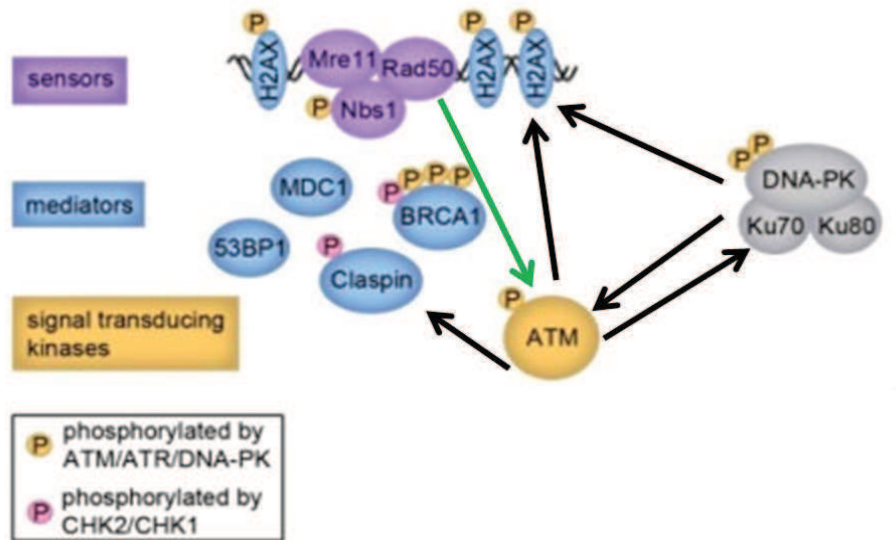


Figure 11 : ATM et DNA-PK, kinases transductrices de signaux en réponse aux dommages de l'ADN

Le complexe MRN détecte les cassures doubles brins, et se fixe à leurs niveaux, ce qui va activer ATM. ATM va alors s'autophosphoryler et phosphoryler DNA-PK. DNA-PK, lié au complexe Ku70/Ku80 au niveau des DSB, est actif et va phosphoryler H2AX et ATM. ATM va phosphoryler l'histone H2AX proche du site de cassure double brins, et d'autres facteurs tels que BRCA1, 53BP1, MDC1. Ces phosphorylations sont nécessaires pour leur localisation ainsi que celle des facteurs de réparation au niveau des foyers de γ H2AX. Les flèches noires indiquent les phosphorylations. La flèche verte indique l'activation de ATM par la liaison du complexe MRN à l'ADN. Adapté de Freeman et Monteiro, 2010.

2. Voies de réparation des cassures double brins

Il existe deux voies de réparation des cassures double brins de l'ADN : la voie de recombinaison homologue (RH) et la voie NHEJ pour non-homologous end joining (**Figure 12**).

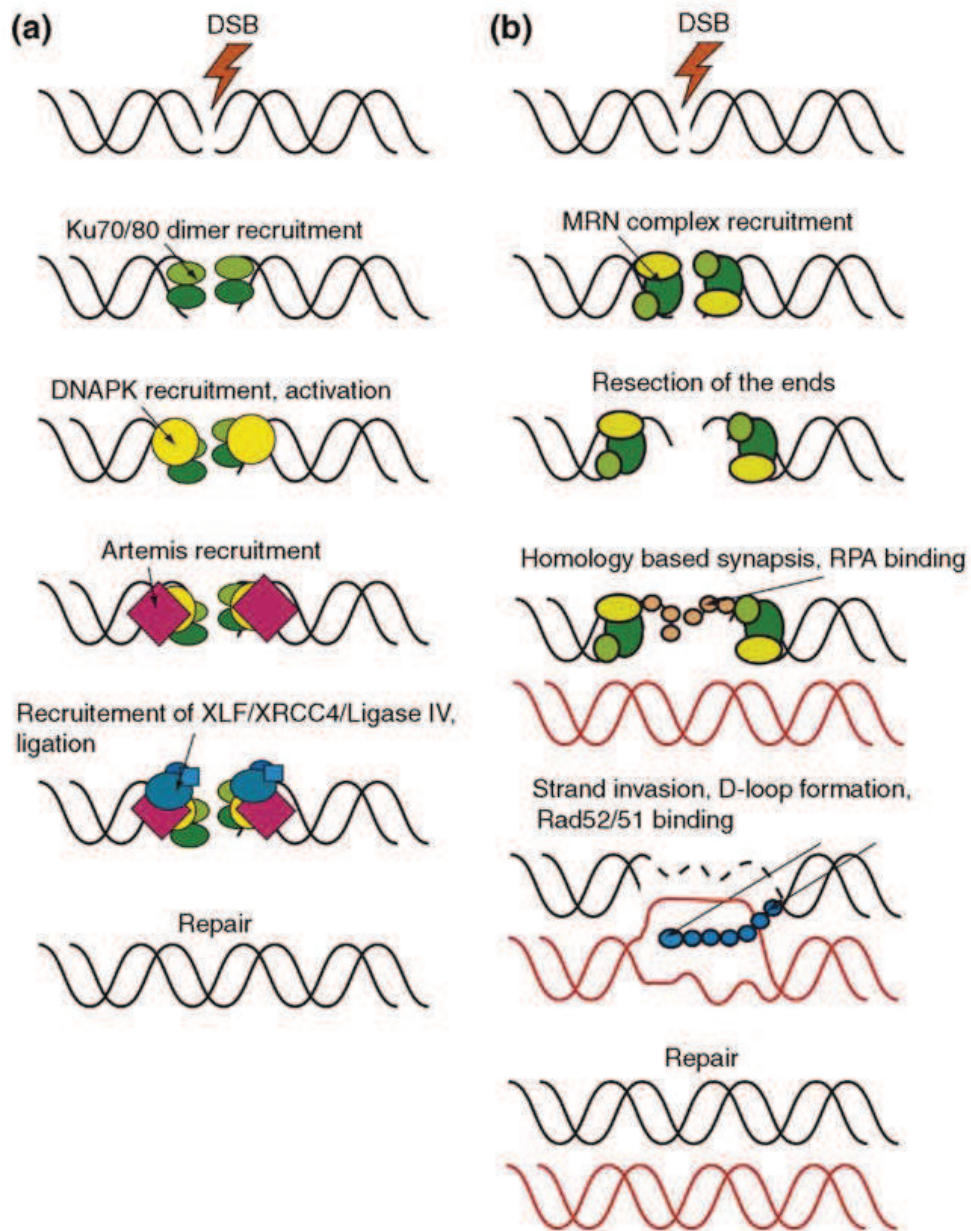


Figure 12 : Voies de réparation des cassures double brins de l'ADN

A. Voie de réparation NHEJ : tout d'abord, le dimère Ku70/Ku80 est recruté au niveau des cassures double brins, suivi du recrutement du complexe DNA-PK. L'activation et l'autophosphorylation de la sous-unité catalytique du complexe DNA-PK permet le recrutement d'Artemis et du complexe XLF/XRCC4/LigaseIV qui permet la ligature des brins. B. Voie de réparation RH : le complexe senseur MRN se lie aux cassures doubles brins et excise les brins d'ADN pour générer un ADN simple brin libre. Celui-ci, lié par les protéines RPA et Rad envahit l'ADN homologue intact qui servira de modèle pour la synthèse de l'ADN et ainsi restaurera l'intégrité de l'information génétique. Adapté de Nagy et Soutoglou, 2009.

La RH a lieu dans des cellules qui se divisent et dans les cellules qui sont en phase S, et prend avantage de l'information codée par les chromatides sœurs homologues pour éliminer la cassure double brins fidèlement. A l'inverse, la voie NHEJ religue les morceaux d'ADN sans la présence d'un modèle intact. Elle a lieu dans les cellules prolifératives et les cellules non prolifératives, et indépendamment du statut de leur cycle cellulaire (Iyama et Wilson III., 2013). Cette voie est plus mutagène que la voie RH (Weinstock et al., 2006). Une étude a montré que les voies de réparation utilisées par les CSH dépendent de leur état prolifératif. Les CSH quiescentes et prolifératives réparent efficacement leurs DSB induites par irradiation mais utilisent des mécanismes de réparation distincts. Les CSH prolifératives utilisent la voie RH alors que les CSH quiescentes utilisent la voie NHEJ. Cette voie NHEJ est associée à l'acquisition de réarrangements génomiques qui peuvent persister *in vivo* et contribuer à des anomalies hématopoïétiques pré-malignes (Mohrin et al., 2010).

3. P53, régulateur essentiel des réponses cellulaires aux dommages de l'ADN

ATM va aussi phosphoryler la kinase CHK2 (check point kinase 2) en réponse aux DSB (Matsuoka et al., 2000, Ahn et al., 2000). CHK2 va alors phosphoryler des protéines dites effectrices régulatrices du cycle cellulaire, telles que les phosphatases cdc25 qui contrôlent la progression du cycle cellulaire des phases G1 à S et G2 à M en déphosphorylant les cdk (cyclin dependent kinase) (Lammer et al., 1998, Blomberg et Hoffman, 1999). CHK2 phosphoryle aussi E2F1, ce qui le stabilise, engendrant une augmentation de la transcription et l'apoptose des cellules (Stevens et al., 2003) (**Figure 13**).

CHK2 va aussi activer, par phosphorylation, la protéine suppresseur de tumeur p53 sur sa sérine S20. P53 est un facteur de transcription qui régule l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et l'entrée en sénescence des cellules (Harris et al., 2005). Mdm2, une ubiquitine ligase E3, contrôle la stabilité de p53 en promouvant sa dégradation via le protéasome, dépendante de son ubiquitination (Haupt et al., 1997, Honda et al., 1997, Kubbutat et al., 1997). MdmX régule aussi négativement p53. MdmX se lie à Mdm2, ce qui induit la liaison Mdm2-p53 et l'ubiquitination de p53 (Linares et al., 2003, Poyurovsky et al., 2007, Uldrijan et al., 2007). ATM et DNA-PK phosphorylent également p53 sur la sérine S15. Les phosphorylations de p53 permettent de la stabiliser en prévenant sa liaison à Mdm2 (Shieh et al., 1997, Appella et al., 2001). ATM inhibe Mdm2 en le

phosphorylant sur sa sérine S395 (Maya et al., 2001), et phosphoryle MdmX sur sa sérine S403 ce qui mène à son ubiquitination et sa dégradation (Pereg et al., 2005). CHK2, lui, va phosphoryler MdmX sur les sérines S397 et S342, ce qui provoque la liaison de MdmX à la protéine 14-3-3 et sa dégradation (LeBron et al., 2006).

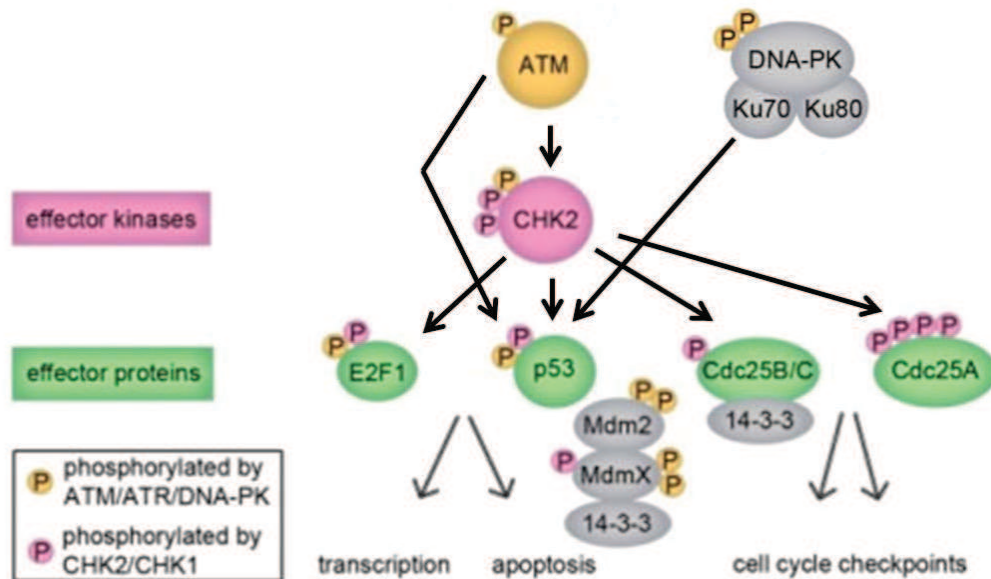


Figure 13 : p53 est activé en réponse aux dommages de l'ADN

Adapté de Freeman et Monteiro, 2010. ATM phosphoryle aussi CHK2, qui, ainsi actif, va activer à son tour par phosphorylations plusieurs protéines effectrices telles que Cdc25, E2F1 et p53. ATM et DNA-PK phosphorylent aussi directement p53 (Shieh et al., 1997, Appella et al., 2001).

Après son activation, p53 va agir sur plusieurs voies cellulaires qui sont : l'entrée en apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence (**Figure 14**).

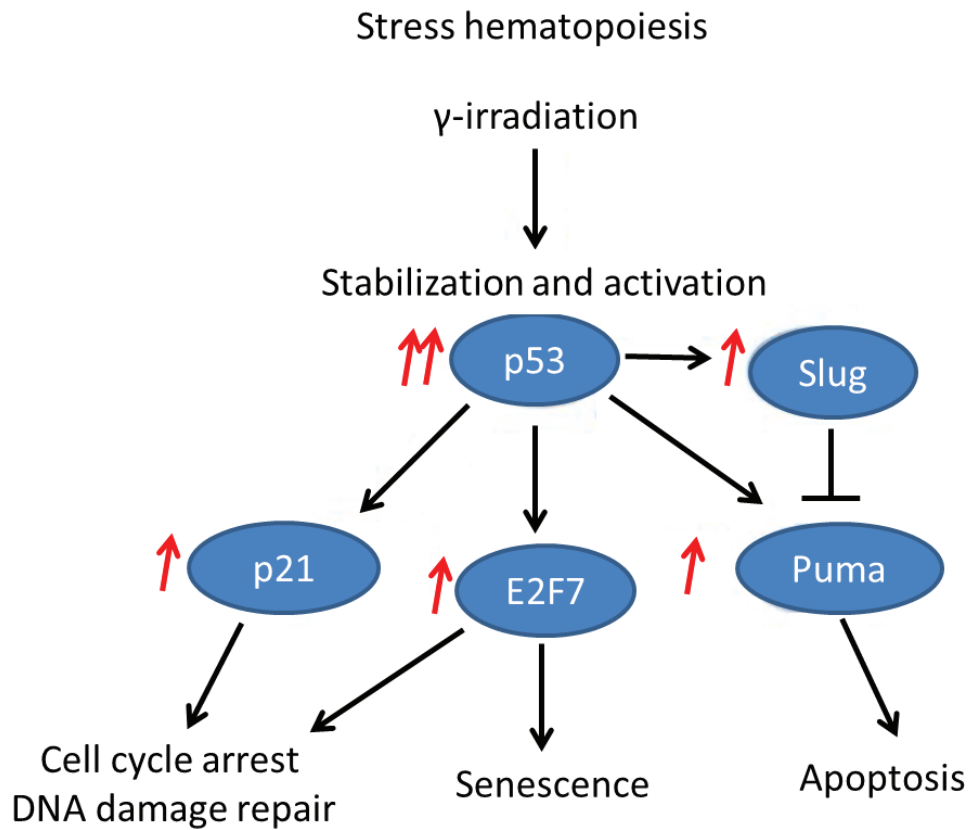


Figure 14 : p53 régule différentes voies cellulaires après un stress hématoïétique

Adapté de Liu et al., 2009. Sous l'effet d'un stress génotoxique, p53 est stabilisé et activé, et régule alors l'arrêt du cycle cellulaire, l'entrée en sénescence ou en apoptose des cellules via l'expression de ses gènes cibles, respectivement ; l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 (el-Deiry et al., 1993), le facteur de transcription E2F7 impliqué dans l'entrée en sénescence de fibroblastes humains (Carvajal et al., 2012, Aksoy et al., 2012), et les protéines pro-apoptotiques Puma (Han et al., 2001, Nakano et Vousden, 2001, Yu et al., 2001) et Noxa (Oda et al., 2000). P53 régule aussi l'expression de Slug qui inhibe celle de Puma (Wu et al., 2005).

4. Déphosphorylation de la voie de signalisation de réponses aux dommages de l'ADN

Plusieurs phosphatases sont nécessaires pour éteindre ce réseau de signalisation lorsque la réparation est terminée, et notamment celle de γ H2AX et de p53 (**Figure 15**). Ces phosphatases permettent aussi de prévenir l'activation illégitime de cette voie en absence de dommages, et d'augmenter l'efficacité de réparation.

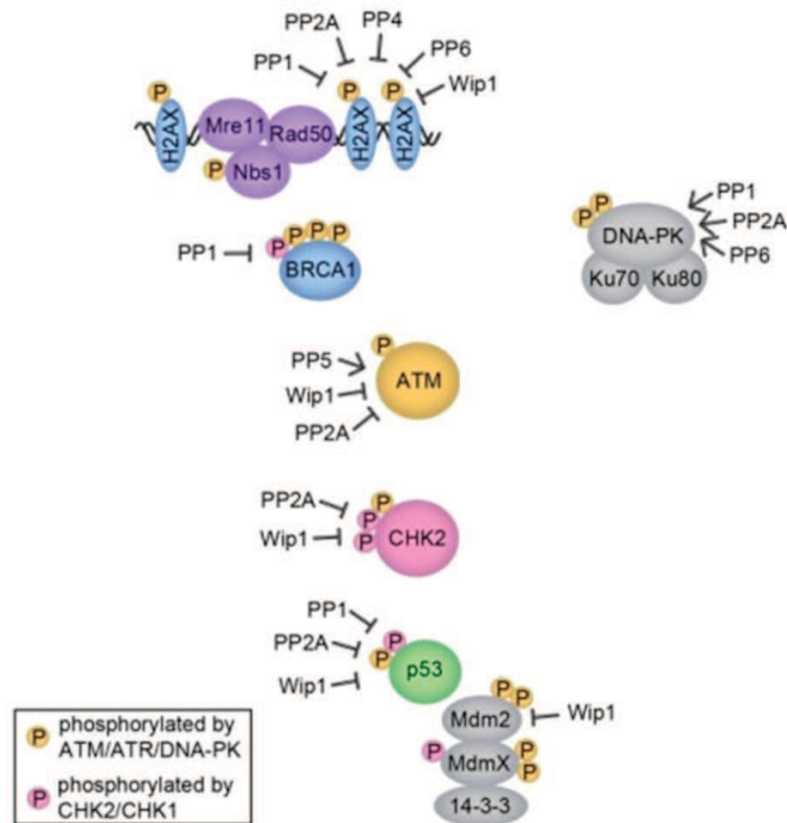


Figure 15 : Sérine/thréonine phosphatases des facteurs impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN

Les protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN (DSB) sont négativement régulées par leur déphosphorylation par plusieurs sérine/thréonine phosphoprotéines phosphatases (PP), et par Wip1 (Wild type p53 Induced phosphatase 1). Adapté de Freeman et Monteiro, 2010.

Par exemple, PP2A colocalise avec γ H2AX au niveau des foyers de DSB et le déphosphoryle. L'inhibition pharmacologique de PP2A ou le knock-down de PP2A par siRNA entraîne un plus grand nombre de foyers γ H2AX totaux, plus de cellules positives

pour γ H2AX une persistance des foyers γ H2AX, et une réparation inefficace. Les cellules deviennent hyper-sensibles aux dommages de l'ADN (Chowdhury et al., 2005). Wip1 a été trouvée comme se liant à H2AX, associée à la chromatine tout au long du cycle cellulaire et colocalise avec γ H2AX dans les foyers de γ H2AX induits après irradiation (Macurek et al., 2010). La surexpression de Wip1 induit un défaut d'induction de γ H2AX après irradiation, et bloque le recrutement de MDC1 et 53BP1 aux foyers de dommages de l'ADN (Macurek et al., 2010, Moon et al., 2010). De plus, les cellules de rates de souris Wip1^{-/-} ont un taux basal de γ H2AX plus grand que celles des rates de souris Wip1^{+/+} en absence de dommages de l'ADN, et après irradiation (Moon et al., 2010). Wip1 inhibe la réparation RH et NHEJ. En effet, la surexpression de Wip1 *in vitro* réduit l'efficacité de réparation RH et NHEJ de façon dose-dépendante (Moon et al., 2010).

L'activité de p53 peut aussi être modulée par sa déphosphorylation par deux déphosphorylases majoritaires : PP1 et Wip1 (**Figure 14**). PP1 déphosphoryle p53 sur sa sérine S15 et S37 *in vitro* et *in vivo*, ce qui baisse l'activité transcriptionnelle de p53 et atténue l'apoptose (Li et al., 2006). L'inhibition de PP1 augmente faiblement le niveau de p53 mais augmente fortement sa phosphorylation au niveau des sérines S15 et S37, ce qui amplifie son activité transcriptionnelle. L'expression des gènes cibles de p53 impliqués dans l'apoptose tels que bcl2 et bax est altérée, et l'apoptose des cellules est augmentée (Li et al., 2006).

Wip1 est induit en réponse à l'irradiation de manière dépendante de p53 en rétroaction négative (Fiscella et al., 1997). Wip1 déphosphoryle *in vitro* p53 au niveau de sa sérine S15 et non de sa sérine S46 (Lu et al., 2005). Les souris Wip1^{-/-} présentent un défaut dans la maturation des cellules T due à une activation soutenue de p53 (Schito et al., 2006). Les cellules MEF (fibroblastes embryonnaires murins) Wip1^{-/-} présentent une faible augmentation de p53 phosphorylé sur sa sérine S15 et une augmentation du niveau de p21, cible de p53. Ces cellules présentent un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 après irradiation (Choi et al., 2002). Wip1 déphosphoryle aussi Mdm2, le régulateur direct de p53, sur sa sérine S395, ce qui augmente la stabilité de Mdm2 et l'interaction entre Mdm2 et p53. Wip1 inhibe l'auto-ubiquitination de Mdm2 ce qui le stabilise (Lu et al., 2007). Le gène codant pour Wip1 a été trouvé amplifié dans 11% des cancers du sein chez l'Homme, dont la plupart présentent une protéine p53 WT, ce qui suggère que l'amplification de Wip1 annule l'activité suppressive de tumeur de p53 (Bulavin et al., 2002).

Ainsi, les DSB induisent l'activation d'une voie de signalisation complexe. L'activité de chaque facteur impliqué dans cette voie est finement régulée par leurs phosphorylations et déphosphorylations, (et notamment p53) afin de permettre une réparation efficace et une réponse globale cellulaire optimale. La dérégulation de l'activité des facteurs impliqués dans cette voie de signalisation dans les CSH perturbe leurs fonctions. Dans la prochaine partie, je décrirai quelques exemples illustrant ce propos en me focalisant sur la voie de signalisation régulée par p53.

5. Conséquences d'un défaut de réponses aux dommages de l'ADN dans les CSH

Deux études ont montré que la délétion de Puma dans les CSH les protège de l'apoptose induite après irradiation (Yu et al., 2010, Shao et al., 2010). Les CSH Puma^{-/-} sont plus quiescentes après irradiation, que les CSH WT (Yu et al., 2010). Les souris Puma^{-/-} sont plus résistantes à l'irradiation (Yu et al., 2010, Shao et al., 2010). Les CSH Puma^{-/-} ont un potentiel de reconstitution similaire à celui des CSH WT. Cependant, après irradiation, les CSH Puma^{-/-} ont un potentiel de reconstitution supérieur à celui des CSH WT (Yu et al., 2010, Shao et al., 2010). De même Slug, un répresseur transcriptionnel, protège les CSH de l'apoptose en réprimant la transcription de Puma (Wu et al., 2005).

Dans des expériences de transplantations compétitives, une étude a montré que des CSH WT non irradiées présentent un avantage compétitif face aux CSH WT irradiées (Bondar et Medzhitov, 2010). Cette compétition est médiée par p53. En effet, les CSH WT non irradiées n'ont pas cet avantage compétitif lorsqu'elles sont mises en compétition avec des CSH p53^{+/-} irradiées. Au contraire, les CSH WT ont un avantage compétitif face aux CSH Mdm2^{+/-} en absence, et après stress génotoxique. Ceci suggère que le niveau de p53 est important pour la compétition des CSH. P53 induit cette compétition via l'arrêt de la prolifération des CSH et non de leur entrée en apoptose. A long terme, les CSH qui n'ont pas l'avantage compétitif présentent un phénotype senescence-like ; elles sur-expriment des gènes pro-sénescents tels que p16.

Gadd45a (Growth arrest and DNA-damage-inducible protein alpha) est régulé par p53 et BRCA1 (Zhan, 2005) et est induit après un stress génotoxique. Il agit sur l'arrêt du cycle cellulaire, l'entrée en sénescence, et l'apoptose des cellules dans différents types cellulaires et

notamment dans les CSH (Zhan, 2005, Moskalev et al., 2012, Chen et al., 2014). En effet, bien qu'elles aient une hématopoïèse normale, les souris déficientes pour Gadd45a ont leurs CSH qui reconstituent le système hématopoïétique plus rapidement que les CSH WT après traitement au 5-FU, dû à une augmentation de la prolifération de ces cellules. Les CSH Gadd45a^{-/-} présentent une capacité de reconstitution plus grande que les CSH WT dans des expériences de transplantation en série. Après irradiation, les CSH Gadd45a^{-/-} résistent davantage aux dommages induits par irradiation. Ce phénotype est associé à une baisse de leur apoptose et à un retard de la réparation des dommages de l'ADN. Les CSH Gadd45^{-/-} accumulent alors des dommages de l'ADN ce qui engendre le développement de leucémies B dans des souris transplantées (Cheng et al., 2014).

Une étude intéressante a montré aussi que les CSH présentent un check point de différenciation, en réponse aux dommages de l'ADN, qui limite l'auto-renouvellement des CSH (Wang et al., 2012). Ce mécanisme serait alors une sorte de protection des CSH pour prévenir l'accumulation de mutations potentiellement oncogéniques. Dans cette étude, les auteurs ont identifié BATF (basic leucine zipper transcription factor) comme étant un facteur essentiel limitant l'auto-renouvellement des CSH en réponse à l'irradiation et au raccourcissement des télomères. Les dommages de l'ADN ou le raccourcissement des télomères induisent BATF, ce qui engendre la différenciation des CSH en cellules lymphoïdes. La délétion de BATF augmente l'auto-renouvellement et les fonctions des CSH mais celles-ci accumulent des dommages de l'ADN. De plus, BATF est impliqué dans l'activation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN. En effet, la phosphorylation de p53, et l'induction de p16 et de p21 sont dépendantes de BATF (Wang et al., 2012).

B. Vieillesse des CSH

L'activité des CSH décline avec le vieillissement (Waterstrat et VanZant, 2009). Les CSH âgées ont des capacités de reconstitution compétitive, de homing à la moelle osseuse et d'adhésion aux cellules stromales réduites (Geiger et Rudolph, 2009). Les CSH âgées présentent une différenciation biaisée (Linton et Dorshkind, 2004). Les études conduites sur des modèles murins présentant des défauts dans la réparation de leur ADN, la régulation des espèces d'oxygènes réactifs (ROS) intracellulaires et le maintien des télomères indiquent que ces voies sont critiques pour la longévité et la réponse au stress des CSH âgées (Rossi et al., 2008). Dans cette partie, je présenterai, tout d'abord, les mécanismes sous-jacents du vieillissement des CSH, puis les caractéristiques des CSH vieilles.

1. Mécanismes impliqués dans le vieillissement des CSH

a. Accumulation de dommages de l'ADN

Les dommages de l'ADN provoqués par des sources internes ou externes s'accumulent dans les CSH avec l'âge chez la souris et l'Homme (Rossi et al., 2007, Rossi et al., 2008, Rübe et al., 2011). En effet, les CSH de souris vieilles (âgées de 122 semaines) accumulent des foyers de γ H2AX, ce qui n'est pas le cas de CSH jeunes (âgées de 10 semaines) (Rossi et al., 2007). Rossi et al ont évalué les fonctions des CSH de souris jeunes et âgées déficientes pour XPD ou Ku80, qui sont des protéines impliquées respectivement dans la réparation NER (nucleotide excision repair) et NHEJ. Cette étude montre, dans des expériences de transplantation, que les CSH de ces deux types de souris mutantes ont leurs fonctions diminuées, dépendamment de l'âge, avec la perte de leur potentiel de reconstitution et de prolifération (Rossi et al., 2007). De même, les CSH humaines issues de donneurs à l'âge avancé montrent une accumulation de dommages de l'ADN (foyers γ H2AX) (Rübe et al., 2011). Rossi et al ont suggéré que cette accumulation de dommages de l'ADN venaient du fait que les CSH sont majoritairement quiescentes et que dans cet état, elles accumuleraient plus de lésions (Rossi et al., 2007b). Les travaux de l'équipe de Passegué ont confirmé cette hypothèse en montrant qu'à l'inverse des progéniteurs, les CSH réparent leur DSB en utilisant la voie NHEJ plutôt que la voie RH, et que cette voie favorise les erreurs de réparation qui, à long terme, engendrent des instabilités géniques (Mohrin et al., 2012). Récemment, l'équipe de Rossi a montré par des expériences de COMET assay, que les CSH accumulent des

dommages de l'ADN avec l'âge (plus que les progéniteurs), et que les CSH adultes quiescentes expriment moins des gènes codant des protéines de réparation et de réponses aux dommages de l'ADN tels que ATM, p53, p21, E2F7, Mre11, ligase IV, Rad51, comparées aux CSH fœtales en cycle. Lorsque les CSH sont forcées à entrer en cycle après traitement au 5-FU, elles réparent leurs dommages de l'ADN (Beerman et al., 2014). Ainsi, les CSH adultes étant majoritairement quiescentes, elles atténuent les voies de réponse aux dommages de l'ADN et de la réparation, ce qui engendre l'accumulation de dommages de l'ADN avec l'âge.

b. Accumulation de ROS

Les ROS ou « reactive oxygen species » sont produites à travers le métabolisme cellulaire ou après un stress exogène. Le maintien du niveau intracellulaire des ROS contribue à la préservation des fonctions des CSH pendant le vieillissement. Une augmentation du niveau intracellulaire des ROS mène à une diminution des fonctions des CSH.

Les CSH sont distribuées principalement à la fin du gradient de l'oxygène dans la moelle osseuse (Parmar et al., 2007), qui les protègent d'un stress oxydatif. Les cellules qui ont un haut niveau de ROS montrent des signes d'épuisement du pool de CSH après transplantation en série (Jang et Sharkis, 2007). Ceci suggère un rôle négatif du niveau de ROS dans les fonctions des CSH. Les souris déficientes pour ATM, (qui est aussi activé en réponse à un stress oxydatif ; par les ROS) ont leur CSH qui présentent une baisse de leurs fonctions avec une augmentation du niveau de ROS intracellulaire et une induction de p16 (Ito et al., 2004). Il a été montré plus tard que l'augmentation du niveau de ROS dans les CSH dans les souris ATM^{-/-} ou pendant le vieillissement (24 mois) active la voie p38-MAPK (mitogen activated protein kinase) qui mène à une augmentation de la prolifération des CSH (Ito et al., 2006). Cette même étude a montré dans des expériences de transplantation en série qu'après chaque transplantation, le niveau de ROS et l'activité de p38-MAPK augmentent (Ito et al., 2006). L'inactivation de la voie p38-MAPK ou le traitement avec des agents antioxydants améliorent la capacité de transplantation dans des expériences de transplantation en série (Ito et al., 2004, Ito et al., 2006).

De plus, les ROS peuvent induire des dommages de l'ADN. En effet, un excès de ROS dans des fibroblastes humains induit des dommages de l'ADN et le dysfonctionnement des

télomères (von Zglinicki et al., 1995). Une étude utilisant des transplantations en série, qui miment le vieillissement des CSH, montre que les CSH humaines ainsi transplantées présentent une élévation du niveau intracellulaire de ROS, et accumulent des dommages de l'ADN (Yahata et al., 2011). Ces CSH ont leur potentiel de reconstitution qui baisse après chaque round de la transplantation en série accompagnée d'une baisse de leur prolifération, et d'une augmentation de l'expression de marqueurs pro-sénescents tels que p16 et p21. L'augmentation du niveau de ROS par le traitement à l'inhibiteur de la glutathione synthétase augmente les dommages de l'ADN ce qui engendre une baisse de la fonction des CSH ainsi traitées, comparées aux CSH non traitées. Les CSH humaines traitées avec un antioxydant présentent beaucoup moins de dommages de l'ADN, et leur capacité de prolifération et de reconstitution est augmentée. Ainsi, les ROS jouent un rôle de précurseur de dommages de l'ADN. L'augmentation du niveau intracellulaire de ROS est donc associée au vieillissement des CSH humaines.

c. Raccourcissement des télomères

Un paramètre associé avec le vieillissement des CSH est le raccourcissement des télomères (Drummond et al., 2007). Bien que l'activité de la télomérase, qui maintient la longueur des télomères, est détectable dans les CSH, les télomères se raccourcissent pendant les divisions cellulaires et le vieillissement des CSH (Vaziri et al., 2004). Lors de transplantations en série, les télomères des CSH se raccourcissent d'environ 7kb après une transplantation secondaire (Allsopp et al., 2001). mTR (telomerase RNA component) et mTERT (telomerase reverse transcriptase) sont des gènes codant pour des composants de la télomérase. Les CSH de souris mTR^{-/-} ou mTERT^{-/-} présentent, dans des expériences de transplantations en série, un raccourcissement des télomères plus rapide que les CSH de souris WT, associé à une baisse de leur capacité de reconstitution (Allsopp et al., 2003a). Le raccourcissement des télomères limite le potentiel prolifératif des CSH. En effet, les CSH mTR^{-/-} perdent leur capacité d'auto-renouvellement dépendamment de l'âge, indiqués par une baisse du potentiel de reconstitution compétitive et de leur capacité proliférative et une augmentation de leur apoptose en culture (Rossi et al., 2007). Cependant, le raccourcissement des télomères n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la sénescence répllicative des CSH. En effet, les souris transgéniques sur-exprimant mTERT n'étendent pas la capacité répllicative des CSH à une cinquième transplantation lors de transplantations en série, même si la

longueur des télomères n'est pas réduite après la transplantation quaternaire (Allsopp et al., 2003b). De manière intéressante, le dysfonctionnement des télomères est reconnu par la voie de réponse aux dommages de l'ADN, et des foyers composés de 53BP1, γ -H2AX, Rad17, et Mre11, se forment au niveau de ces télomères (Takai et al., 2003). Ces foyers sont appelés TIF pour « telomere dysfunction-induced foci ».

d. Accumulation de cellules sénescentes

La sénescence est définie par un arrêt prolifératif des cellules. Une cellule sénescente se distingue d'une cellule quiescente par leur incapacité à entrer en cycle après stimulus pro-prolifératifs extérieurs. Elles sur-expriment des marqueurs anti-prolifératifs et notamment p16, impliqué dans l'établissement et le maintien de la sénescence (Lowe et al., 2003, Sharpless et DePinho, 1999). Ces cellules sénescentes ont une activité senescence associated β -galactosidase (SA- β -gal) due à leurs lysosomes qui rejettent la β -galactosidase dans le cytoplasme (Dimri et al., 1995). D'autres protéines antiprolifératives telles que p21, p27, et E2F7 sont impliquées dans l'induction de la sénescence des cellules (Lin et al., 2010, Campaner et al., 2010, Aksoy et al., 2012).

Wang et al. ont montré que les dommages de l'ADN induisent à long terme une sénescence précoce des CSH (et non des progéniteurs), ce qui perturbe leurs fonctions (Wang et al., 2006). En effet, les CSH de souris irradiées à dose létale ont leurs nombres et fonctions réduites. Ces CSH présentent une augmentation de l'expression de p16 et sont positives pour la SA- β -gal.

e. Niche des CSH

Les niches des CSH présentent plusieurs changements pendant le vieillissement (**Figure 15**). Le nombre d'ostéoblastes baisse (Bellantuono et al., 2009). Les ostéoblastes génèrent plus de ROS. La différenciation des MSC en adipocytes est accentuée. La composition de la matrice extracellulaire est altérée (Wagner et al., 2008, Bellantuono et al., 2009). Ces changements cellulaires pourraient expliquer la baisse du niveau de CXCL12 dans la niche (Tuljapurkar et al., 2011). Les niches présentent un fort taux de la chimiokine CCL5 qui promeut la différenciation des CSH en cellules myéloïdes (Ergen et al., 2012).

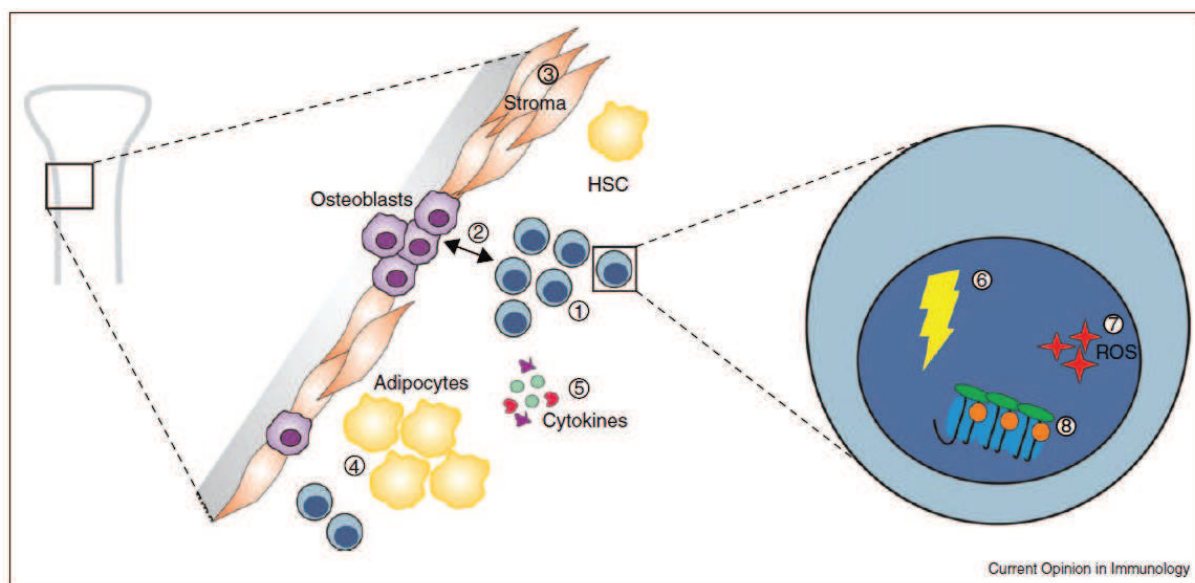


Figure 15 : Changements extrinsèques et intrinsèques associés au vieillissement des CSH

Adapté de Woolthuis et al., 2011. 1. Augmentation du nombre de CSH phénotypiquement définies, 2. Distance plus grande des CSH à l'endosteum, 3. Baisse du nombre de cellules supportrices, 4. Accumulation d'adipocytes dans la moelle osseuse, 5. Changement du milieu cytokinique extra-cellulaire, 6. Augmentation des dommages de l'ADN, 7. Augmentation de ROS, 8. Changements de l'expression de gènes de différenciation, notamment.

f. Rôle des suppresseurs de tumeurs p53 et p16 dans le vieillissement des CSH

P53 est aussi impliqué dans le vieillissement (Tyner et al., 2002, Dumble et al., 2007). Les souris knock-in exprimant une forme tronquée constitutionnellement active de p53 ($p53^{+/m}$) présentent un phénotype précoce de CSH âgées avec peu de CSH prolifératives comparées aux souris plus vieilles WT (Tyner et al., 2002). Les CSH $p53^{+/m}$ ont leur capacité de reconstitution réduite comparée au CSH WT ou CSH $p53^{-/-}$ (Tyner et al., 2002, Dumble et al., 2007).

L'augmentation de p16 a été proposée comme étant un biomarqueur principal du vieillissement (Krishnamurthy et al., 2004). P16 est élevé dans les CSH isolées de souris

vieilles, et les défauts de reconstitution et d'apoptose de ces CSH vieilles sont atténués après inhibition de p16 (Janzen et al., 2006).

Ainsi, ces checkpoints de la voie de réponse aux dommages de l'ADN protègent les CSH d'un processus leucémogène, mais contribuent à la baisse de leurs fonctions pendant le vieillissement (**Figure 16**).

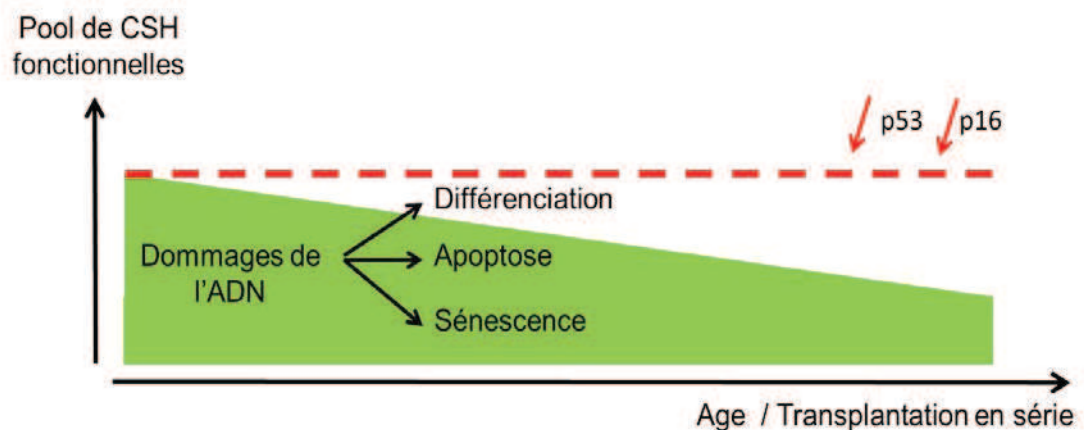


Figure 16 : Vieillesse : protection contre l'apparition de cancer

Avec l'âge, les CSH raccourcissent leurs télomères, accumulent des dommages de l'ADN, des ROS, qui peuvent induire des dommages de l'ADN. En réponse à cette accumulation de dommages de l'ADN avec l'âge, les CSH peuvent entrer en apoptose (Shao et al., 2010), se différencier (Wang et al., 2012), ou entrer en sénescence (Wang et al., 2006). Ces mécanismes font diminuer le pool de CSH fonctionnelles, ce qui protégerait le système hématopoïétique contre le développement de cancer. La dérégulation de l'activité des suppresseurs de tumeurs p53 et p16 entraîne une altération du vieillissement normal des CSH, ce qui perturbe leur fonction et la prolifération et contribue à la leucémogénèse (Dumble et al., 2007, Bondar et Medzhitov, 2010, Holmfeldt et al., 2012, Liu et al., 2011).

2. Conséquences du vieillissement des CSH sur leurs fonctions

a. Homing des CSH

Les CSH âgées présentent des défauts dans leur capacité de homing (Liang et al., 2005, Köhler et al., 2009). En effet, les CSH vieilles transplantées dans des souris jeunes et des CSH jeunes transplantées dans des souris vieilles ont une capacité de homing similaire

entre elles, mais réduite comparées aux CSH jeunes transplantées dans des souris jeunes, ce qui indique que les changements liés au vieillissement touchent les microenvironnements intrinsèques et extrinsèques aux CSH (Liang et al., 2005). Une étude de la localisation des CSH âgées et jeunes au sein des niches montre qu'après transplantation dans des souris jeunes, les CSH vieilles se localisent à une distance plus grande de l'endosteum comparé aux CSH jeunes (Köhler et al., 2009). Par des expériences d'adhérence CAFC, Köhler et al (Köhler et al., 2009) ont montré que les CSH vieilles présentent une réduction de leur adhérence aux cellules stromales.

De plus, après traitement des souris au G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) les CSH de souris vieilles ont montré une capacité de mobilisation, de la moelle osseuse au sang, 5 fois plus grande que celle des CSH de souris jeunes (Xing et al., 2006). Des expériences de mobilisation compétitive, c'est-à-dire, une transplantation compétitive (CSH de souris vieilles avec CSH de souris jeunes) suivie du traitement des souris receveuses par G-CSF (pour induire la mobilité des CSH de la moelle osseuse vers le sang), confirme que cette augmentation de la capacité de mobilisation est intrinsèque aux CSH. Cette mobilisation est corrélée avec une baisse de l'adhérence des CSH vieilles aux cellules stromales, et une augmentation du niveau de la forme active de la Rho-GTPase Cdc42 ; Cdc42 liée à la GTP (Xing et al., 2006). De plus, une autre étude a montré que l'élévation de l'activité de Cdc42 dans les CSH âgées est une cause de leur vieillissement, et qu'elle est corrélée à une perte de la polarité des CSH (Florian et al., 2012). En effet, l'augmentation constitutive de l'activité de Cdc42 dans les CSH jeunes entraîne un phénotype « vieux » de ces cellules ; elles ont un potentiel de reconstitution équivalent à celui de CSH vieilles après transplantation secondaire, ces cellules présentent un biais myéloïde de différenciation dès la transplantation primaire similaire à celui trouvé après transplantation avec des CSH vieilles, et le pool de LT-CSH augmente, celui de ST-CSH diminue à des niveaux comparables à ceux de souris vieilles. L'inhibition pharmacologique de Cdc42 rajeunit fonctionnellement les CSH âgées (Florian et al., 2012).

b. Potentiel de reconstitution des CSH

Le pool respectif de cellules LSK et de CSH de souris vieilles (âgées de 2 ans) est environ 2 et 3 fois plus grand que celui de souris jeunes (âgées de 2 mois) (Sudo et al., 2000, Rossi et al., 2005, Chambers et al., 2007). Cependant, ces CSH âgées sont moins

fonctionnelles que les jeunes. En effet, le potentiel de reconstitution décline avec l'âge. En effet, plusieurs études ont montré que des CSH de souris vieilles ont un potentiel de reconstitution beaucoup plus faible que les CSH de souris jeunes (Sudo et al., 2000, Rossi et al., 2005, Chambers et al., 2007). Une expérience de CRU (competitive repopulating unit) montre que les souris vieilles présentent environ 3 fois moins de CSH fonctionnelles comparé aux souris jeunes (Chambers et al., 2007). De plus, les CSH humaines sujettes à une transplantation en série baissent leur potentiel de reconstitution après chaque transplantation en série, associé à une baisse de leur prolifération (Yahata et al., 2011). Ces CSH montrent des signes de vieillissement tels que l'accumulation de dommages de l'ADN, de ROS et l'expression de gènes pro-sénescents (Yahata et al., 2011).

c. Différenciation des CSH

Le vieillissement engendre un biais myéloïde de la différenciation des CSH. En effet, la transplantation de CSH vieilles dans des souris jeunes ou de CSH jeunes dans des souris vieilles induit un biais de différenciation des CSH marqué au profit de la lignée myéloïde (Sudo et al., 2000, Liang et al., 2005, Rossi et al., 2005). De plus, la proportion des progéniteurs myéloïdes (GMP) et lymphoïdes (CLP) change avec l'âge des souris. En effet, les souris âgées de 2 ans ont environ 2 fois plus de GMP et deux fois moins de CLP que les souris jeunes. Après transplantation, la fréquence de CLP dérivées de CSH vieilles donneuses est 2 fois plus petite que celle de CLP dérivées de CSH jeunes donneuses (Rossi et al., 2005). Ce biais dans le potentiel de différenciation est accompagné de changements de l'expression de gènes dits pro-myéloïdes et pro-lymphoïdes (Rossi et al., 2005). Les CSH de souris vieilles présentent une sous-expression de gènes impliqués dans la différenciation lymphoïde tels que *flt3*, *cd3z*, *il7r* et une surexpression de gènes impliqués dans la différenciation myéloïde tels que *runx1*, *pml* (Rossi et al., 2005). De manière intéressante, les CSH de souris vieilles surexpriment des gènes qui ont été impliqués dans la genèse de plusieurs types de leucémies humaines tels que *pml*, *runx1*, *erg* (5% des gènes caractérisés). Plus tard, ce groupe a montré que les CSH peuvent être divisées en deux groupes de LT-CSH : LT-CSH ($\text{Lin}^- \text{cKit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD34}^+ \text{Flt3}^- \text{CD150}^{\text{hi}}$) et les LT-CSH ($\text{Lin}^- \text{cKit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD34}^+ \text{Flt3}^- \text{CD150}^{\text{lo}}$). Les LT-CSH ($\text{Lin}^- \text{cKit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD34}^+ \text{Flt3}^- \text{CD150}^{\text{hi}}$) présentent un biais de différenciation myéloïde après transplantation, et une surexpression de gènes pro-myéloïdes (*pml*, *runx1*, *vnf*). Les LT-CSH ($\text{Lin}^- \text{cKit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD34}^+ \text{Flt3}^- \text{CD150}^{\text{lo}}$) présentent un biais de différenciation lymphoïde

après transplantation et une sous-expression de gènes pro-lymphoïdes (notch1, il7r flt3). Le pool de CSH « pro-myéloïde » augmente d'environ 3 fois avec l'âge alors que celui des CSH « pro-lymphoïde » diminue d'environ 2 fois (Beerman et al., 2010).

MATERIEL ET METHODES

Material and methods

Mice

The Helios^{-/-} mouse line was described previously (Cai et al., 2009). Mice used here were on a mixed 129/Sv, C57BL/6 background, as He^{-/-} mice on pure backgrounds have poor viability. P53^{-/-} mice line was obtained from Jackson laboratory (Jacks et al., 1994) on a C57BL/6J background. The experiments described in this paper were performed using either young (8 weeks old) or old (2 years old) Helios mice, and young mice generated by crossing of Helios and p53 mice. Genotyping conditions were described previously (Cai et al., 2009, Wasylyk et al., 1999).

For competitive transplantation assays, the recipient mice used were F1 progeny between C57BL/6 mice (CD45.2+) and C57BL/6^{SJL} mice (CD45.1+), and were 5 to 7 weeks old, the competitor cells were from 8 to 10 weeks old C57BL/6^{SJL} mice (CD45.1+). Transplantations were performed by i.v. injection of 500 purified donor cells with 2.10^5 competitor BM cells. Recipient mice were lethally irradiated (9.5 Gy), delivered in split dose 3 hours apart with an X-ray irradiator. Peripheral blood was obtained from bleeding the tail vein and collected in 500 μ l PBS, 1mM EDTA.

For experiments with irradiated mice, animals were sub-lethally irradiated (6.5Gy). At the indicated time, mice were euthanized and analyzed. For long term study, mice were followed for sickness appearance. According to Ethical Committee recommendations, when mice developed first signs of sickness, they were euthanized and analyzed.

The Ethical Committee from the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire approved all animal experiments in our study. (Com'Eth #2012-035, #2012-036 and #2012-055).

CRU quantifications

CRU quantifications were performed as competitive reconstitution assays using fixed number of competitor BM cells (2.10^5) and limited number of donor BM or LSK cells. Five months after reconstitution, peripheral blood of recipients was analyzed by flow cytometry. A positive contribution from donor was defined as a donor frequency >1% in all analyzed lineages (B cells, T cells, myeloid cells and granulocytes).

Analysis of blood cells

Peripheral blood was obtained from retro-orbital bleeding and collected in EDTA coated tubes (Microvette, Sarstedt). Quantification of white blood cells, red blood cells, hemoglobin, and platelets was performed by the Institut Clinique de la Souris, Illkirch.

Preparation of cell suspensions

Bone marrow (BM) or fetal liver (FL) cell suspension was performed in PBS, 0.5%BSA, 2mM EDTA. After the erythrolysis with 0.83% NH₄Cl, cells were filtrated and stained with cocktail of antibodies (described in supplemental Methods) diluted in PBS, 0.5%BSA. Cells were then analyzed on LSRII (BD Biosciences) or sorted on a FACS ARIAII SORP sorter.

Flow cytometry and cell sorting

Antibodies used for flow cytometry analysis or cell sorting were purchased from Invitrogen, eBioscience, Biolegend or BD Biosciences. All the antibody clones and fluorescent labels for FACS sorting and analysis are listed in **Supplementary Table 1**. For cell sorting, total BM cells were stained with a cocktail of lineage markers (rat purified or biotinylated antibodies: anti-B220, anti-CD4, anti-CD8, anti-Mac-1, anti-Gr1, anti-Ter119, anti CD49b), followed by enrichment with anti-rat magnetic beads (DynaBeads, Invitrogen), or streptavidin magnetic beads (Miltenyi Biotec), respectively. The stained cells were then enriched with a magnet, stained with cell surface markers and sorted by flow cytometry (FACS ARIAII SORP).

Intracellular staining of Helios

Cells, beforehand stained with cell surface markers, were pelleted, fixed, and permeabilized, following the manufacturer's instructions of FoxP3 kit [00-5523, eBiosciences]. Cells were then stained with FITC-conjugated or APC-conjugated anti-Helios antibodies (see **Supplementary Table1**)

5-FU administration

5-FU (150 mg/kg) was injected intraperitoneally in mice. Mice were bled or euthanized at the indicated time points and their BM cells were subjected to fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis.

BrdU administration and detection

To label cells in S/G2 phase, 8 week old mice or pregnant mice were injected intraperitoneally with 5-Bromo-2-deoxyuridine [BrdU] (50 µg per gram of body weight) and sacrificed 2 h later. The BM or FL cell suspensions were stained for standard cell surface markers (supplemental Methods) and then subjected to intracellular staining with anti-BrdU FITC antibody according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, #559619). For oral administration, BrdU was put on drinking water during 3, 5, 7 or 14 days (0.5mg/ml), in bottles that were protected from light.

Cell culture

For liquid culture, 600 cells were plated per well of a 96-well plate in 200µl of Iscove's modified Dulbecco's media (IMDM) complemented with 10% FCS, 4%BSA, 50ng/mL stem cell factor, 50ng/mL thrombopoietin, 10ng/ml IL-3, 10ng/ml IL-6 (all from Pepro Tech), 1x penicillin/streptomycin, 1x gentamycine, and 2mM L-glutamine (Life Technologies) (complete IMDM). Cells were put in culture during 5 days and counted at the end of the culture by trypan blue exclusion using triplicate wells per condition. For the senescence assay, cell cultures were initiated with 600 or 12.000 cells. At the end of a 5 day culture, cells were harvested, counted, and LSK cells were sorted as described above, and replated for 5 more days in a freshly made complete medium.

For the ILC87-Helios-ER cell line, cells were cultured in flasks at a concentration of 10⁶cells/ml in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640 complemented with 25mM Hepes, 10% heat-inactivated FCS, 1mM Sodium Pyruvate, 1x penicillin/streptomycin, 50µg/ml gentamycine, and 2mM L-glutamine (Life Technologies) (complete RPMI). 4-hydroxy-tamoxifen (or an equivalent volume of ethanol) (Sigma-Aldrich) was used, at a 100nM concentration.

Proliferation and homing assay

For CFSE dilution assays, purified cells were washed once with IMDM complemented with 10% FCS, incubated with 5µg/ml CFSE (Sigma-Aldrich) for 10 min in a 37°C waterbath. Cells were then washed three times with FCS-complemented IMDM media, and analyzed by flow cytometry, then put in culture in complete IMDM.

For the homing assay, sorted LSK cells were labeled with CFSE as previously described or with Cy5. For Cy5 labeling, cells were washed with PBS, incubated with 6µg/ml of Cy5 (Amersham), and then washed with FCS-complemented IMDM. Labeled LSK cells

were then transplanted into irradiated recipient mice. Sixteen hours after transplantation, the homing of labeled cells is analyzed by flow cytometry.

Treatments with DNA damage inducing reagents

DNA damaging reagents neocarzinostatin (NCS), camptothecin (CPT), and etoposide (ETP) were all from Sigma-Aldrich. LSK cells were sorted, washed with FCS-complemented IMDM, and resuspended in 200 μ l of FCS-complemented IMDM. Depending of the experiment, 10^4 to 3.10^5 LSK cells were treated with 50 μ l of diluted NCS and placed in a 37°C incubator during 30 minutes. For apoptosis study, sorted LSK cells were put in culture for 24 hours. After culture, cells were harvested and resuspended in 200 μ l of FCS-complemented IMDM and treated with NCS, CPT, or ETP and placed in a 37°C incubator during 30 minutes for NCS and 3 hours for CPT and ETP. All the reagents were intermediately diluted in FCS-complemented IMDM. CPT and ETP were resuspended in DMSO to obtain a stock solution at 1mM and 500 μ M respectively. After treatments, cells were washed with FCS-complemented IMDM, and put in culture with complete IMDM.

For ILC87-HeER cells, 2.10^6 cells were resuspended in 400 μ l of complete RPMI, and treated with 100 μ l of NCS at 37°C during 30 minutes. Cells were then washed and cultured with complete RPMI.

Apoptosis and viability analysis

Indicated cells were stained with Annexin V, or Topro 3, followed by FACS analysis. The detailed methods are provided in the supplementary Methods.

Immunofluorescence

Sorted cells were fixed, permeabilized, and stained with antibodies. Detailed methods are provided in the supplementary Methods.

Senescence Associated β -galactosidase assay

Cultured cells were harvested and washed with PBS, cytospun on slides (Superfrost plus-TheermoScientific) for 3 min at 500 rpm, fixed with PBS/1% PFA for 10 minutes at RT, washed with PBS twice. Cells were then stained during 16 hours at 37°C, with the following staining solution (40mM citric acid/sodium phosphate pH 6.0, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mM potassium ferricyanide, 5mM potassium ferrocyanide, 1mg/ml X-gal). Positive controls

are replicative senescent fibroblast kindly given by Shankar Narayanan PATTABHIRAMAN from Gronemeyer's lab.

Western blot

Sorted LSK cells (3.10^5 cells) were treated or not with NCS, harvested, pelleted, washed twice with PBS, lysed in SDS buffer (50mM Tris Base, 2.5% glycerol, 1% SDS, 560mM β -mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue, pH adjusted to 6.8), and subjected to western blotting. The detailed methods are provided in the supplementary Methods.

For the ILC87 cell line, cytoplasmic and nuclear extracts from 2.10^6 cells were prepared using lysis buffer (10 mM Hepes, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, and protease inhibitor cocktail), during 10 minutes on ice. Lysates were then spun at full speed to pellet the nuclei. The supernatant (or cytoplasmic extract) was transferred to other tubes. Nuclei were lysed in SDS buffer (described above).

Microarray and transcriptome analysis

For BM cells, 5.10^3 (LT-HSCs) and 5.10^4 cells (ST-HSCs, MPP) were sorted. For microarray experiment on treated cells, 5.10^4 ST-HSCs were treated or not with NCS. Cells were harvested 4 hours after the treatment. RNA was extracted with the RNeasy Micro kit (Qiagen). Samples were prepared by the Biopuces platform (IGBMC) using standard amplification conditions. Data were normalized with the Robust Multi-array Average (RMA) software using default settings and analyzed with Excel (Microsoft) and Cluster 3. Probe sets that did not correspond to an identified gene were not considered for analysis. Clusters were visualized with Treeview.

Quantitative RT-PCR

RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) and reverse transcribed with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). mRNA levels for indicated genes were quantified by real-time RT-PCR using SYBR Green (Roche). Real-time RT-PCR was performed with the LightCycler 480 (Roche) with the following conditions: 95°C for 10 s, 64°C, or 68°C, or 70°C for 30s, and 72°C for 15 s for 50 cycles. Each measurement was performed in triplicate and was normalized to the expression levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) or ubiquitin. Primers are described in the **Supplementary Table 2**.

Chromatin immunoprecipitation-sequencing assay

ILC87-HeER cells were treated with 4-hydroxy-tamoxifen (or an equivalent volume of ethanol) during 48 hours, and then treated with NCS as described above. Two hours later, cells were harvested ($60 \cdot 10^6$ cells / condition), pelleted, cross-linked with PBS 0.5% BSA 1% formaldehyde (Electron Microscopy Sciences) at 37°C for 10 minutes, quenched with 125 mM glycine, and a cold PBS wash (containing 1x protease inhibitor cocktail (PIC; Roche) and then lysed with the lysis buffer: 1% Triton X-100, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl [pH7.1], 11% sucrose, 1x PIC for 10 min on ice. Nuclei were pelleted at 2,000 rpm for 10 min at 4°C and then lysed in 1% SDS, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1x PIC. Chromatin was sonicated with Bioruptor 200 (Diagenode) to shear DNA to 300-500 bp. Chromatin was then diluted 10 times with 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM TRIS-HCl pH 8.1, 167mM NaCl, 1x PIC and then subjected to immunoprecipitation. Briefly, chromatin was pre-cleared with Magna ChIP Protein A Magnetic Beads (Millipore 16-661) by rotating for 1 h at 4°C, and then incubated overnight with 25 µg of anti-Helios antibody (home-made) or 25 µg of IgG control. Protein-DNA complexes were then bound to Protein A Magnetic Beads for 5-6 h at 4°C and washed with increased salty buffer; 1x with low-salt buffer (20mM Tris-HCl, pH8.1, 150mM NaCl, 2 mM EDTA, 1%Triton X100, 0.1% SDS), 1x with high-salt buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.1, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1%Triton X100, 0.1% SDS), 1 time with LiCl buffer (10 mMTris-HCl, pH8.1, 1 mM EDTA, 1% deoxycholate, 1% NP40, 0.25 M LiCl), and 1 time with TE. Samples were then eluted, de-crosslinked and their DNA were purified using the iPure Kit ([AL-100-0100], Diagenode) following the manufacturer's instructions. Inputs were diluted 10 times. Libraries were prepared by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the "France Génomique" consortium (ANR-10-INBS-0009), according to standard Illumina protocols, and were validated with the Agilent Bioanalyzer. Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform. For this, single 50 bp read sequencing runs were performed on a HiSeq2000. Image analysis and base calling were performed with the Illumina pipeline. The reads were aligned to the mm9 mouse genome. Wig files were generated by extending the reads to 200 bp length. The read densities in 25 bp bins were normalized to the library size. Then the data can be visualized in the UCSC genome browser. All analyses were performed with unique reads.

Exome sequencing

DNA from liver cells, muscle cells and Lin^cKit⁺ cells from 2 years old mice was extracted. Briefly, tissues were harvested, and cells from BM were sorted. Cells and tissues

were then digested during 4 hours, at 55°C, in digestion buffer containing 100mM Tris-HCl pH8, 200mM NaCl, 5mM EDTA, 0.2% SDS, and 500µg/ml of proteinase K. RNase (0.1mg/ml) was then added to the digested solution during 20 minutes, at 37°C. A standard phenol-chloroforme DNA extraction was then performed. Libraries, exons capture and sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform using standard protocols.

Statistics

All the data are expressed as mean \pm standard deviation (error bar) except when indicated. P values were generated using unpaired Student's t-test and considered significant when ≤ 0.05 *, ≤ 0.01 **, ≤ 0.001 ***. N indicates the numbers of independent experiments performed or the number of mice used. For microarray analysis, P values were generated using ANOVA test and considered significant when ≤ 0.05 . The transcripts which present significant differences between Helios null and controls were then selected. For statistical analysis on γ H2AX foci, "chi-deux" test was used.

Kaplan-Meier survival curves and statistical analyses were performed with the log rank test. The hazard ratio and its 95% confidence interval were also measured, comparing Helios-/- and controls groups. Stem cell frequency was calculated using the ELDA software or L-Calc software (Stemcell Technologies). The hazard ratio and its 95% confidence interval were also measured comparing Helios null and control groups, control groups between themselves, Helios null groups between themselves.

Supplemental methods

Apoptosis and viability assays

Apoptosis levels were measured by flow cytometry by staining cells with FITC-conjugated Annexin V (BD Biosciences), and the 4',6 diamidino 2 phenyl-indol dihydrochloride (DAPI) (Molecular Probes) used at 0.1 μ g/ml. Cells were washed with binding buffer (10mM Hepes pH7.4, 0.14M NaCl, 2.5mM CaCl₂). Immediately after the staining, cells were analyzed by flow cytometry.

For Topro3 staining, cells were harvested in 200 μ l of medium and Topro3 (Invitrogen) was added on cells at 50nM, immediately followed by flow cytometry analysis.

Immunofluorescence

LSK sorted cells (\pm treated) were cytopun on slides (Superfrost plus, ThermoScientific) for 3 min at 500 rpm, fixed with PBS/4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C, permeabilized in PBS/0. 5% Triton-X100 for 10 min at RT, blocked 1 hour at RT in PBS/1% BSA and stained. For the staining, cells were incubated overnight, at 4°C in blocking solution containing primary antibody used at 1:1000 (anti-phospho-H2AX S139 [3F2, Abcam], washed twice in PBS, incubated for 1 hour at RT in PBS containing the Alexa-conjugated secondary antibody at 1:1000 (goat-anti-mouse AF488 [A11001]; Invitrogen) washed twice in PBS and then mounted in VectaShield (Vector Laboratories) containing 1 μ g/ml DAPI (Molecular Probes). Microscopy imaging was performed using a Leica BX-51 microscope (63x objective) driven by the CoolSnap software. Images were saved as Illustrator tiff files. Number of foci were scored on the observed cells by eye. All scorings were done blindly and 50 to 100 cells were counted per time point in each experiment.

Western Blot

Lysed samples were entirely deposited in one lane of a 10% SDS- polyacrylamide gel. Samples (< 5 μ g total protein) were resolved by electrophoresis, transferred to PVDF membranes, blocked for 1 hour at RT in blocking buffer, incubated overnight at 4°C in blocking buffer containing primary antibodies at 1:1000 (rabbit polyclonal anti-pp53 Ser15 [9284, Cell Signaling], mouse monoclonal anti-p53 1C12 [2524, Cell Signaling], and anti- β -actin [A1978, Sigma] (1:10000), washed three times in washing buffer, incubated for 1 hour at RT in blocking buffer containing the appropriate HRP-conjugated secondary antibody at 1:10000 (rat-anti-mouse HRP [H139-52.1] Abcam; goat-anti-rabbit HRP [sc-2004];

SantaCruz) washed 3 times in PBS/0.1% Tween 20 and visualized using an chemiluminescence system. Blocking and washing buffers are used according to the manufacturer's informations of the antibodies. Between antibodies reactions with anti-pp53 antibody and anti-p53 antibody, the PVDF membrane was stripped by submerging it with 100mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5mM Tris-HCl Ph6.7, at 50°C for 30 minutes.

For Western Blotting of samples from ILC87-HeER cell line, the following antibodies were used for detection: anti-Helios, anti-TBP (all in-house) at 1:1000, and anti- β -actin [A1978, Sigma] at 1:10.000.

Supplementary Table 1:**Antibody clones and fluorescent labels for FACS sorting and analysis:**

Antibody	Clone	Company	Reference #
Bst2-AF480	120G8	-	Home-made
AA4.1 (CD93)-APC	AA4.1	eBiosciences	17-5892
Annexin V-FITC	-	BD Biosciences	556420
Anti rat-Cy5	-	Jackson	112-176-075
Anti rat-DyLight™405	-	Jackson	112-475-003
B220-biotin	RA3-6B2	BD Biosciences	553086
B220-PE-Cy7	RA3-6B2	eBiosciences	25-0452
B220-purified	RA3-6B2	BD Biosciences	553084
BrdU-FITC	3D4	BD Biosciences	556028
CD11c-AF700	HL3	BD Biosciences	560583
CD11c-APC	HL3	BD Biosciences	550261
CD127-PE-CF594	SB/99	BD Biosciences	562419
CD150-PercP-Cy5.5	TC15-12F12.2	Biolegend	115922
CD25-PE	PC61	BD Biosciences	553866
CD34-biotin	RAM34	BD Biosciences	553732
CD34-PE	MEC14.7	Biolegend	119307
CD3-V500	500A2	BD Biosciences	560771
CD44-biotin	IM7.8.1	Invitrogen	RM5715
CD45.1-APCeF780	A20	eBiosciences	47-0453
CD45.1-PE-CF594	A20	BD Biosciences	562452
CD45.2-AF700	104	Biolegend	109822
CD45.2-APC	104.2	BD Biosciences	558702
CD45.2-PercP-Cy5.5	104	BD Biosciences	552950
CD48-APC	HM48-1	eBiosciences	17-0481
CD48-FITC	BCM1	BD Biosciences	557484
CD49b-biotin	DX5	eBiosciences	13-5971
CD49b-purified	DX5	BD Biosciences	553855
CD4-AF700	GK1.5	eBiosciences	56-0041
CD4-biotin	GK1.5	eBiosciences	13-0041
CD4-purified	GK1.5	BD Biosciences	553727

CD71-biotin	C2	BD Biosciences	557416
CD8-biotin	53-6.6	eBiosciences	13-0081
CD8-PercP-Cy5.5	53-6.6	BD Biosciences	551162
CD8-purified	53-6.6	eBiosciences	14-0081
cKit (CD117)-APC	2B8	eBiosciences	17-1171
cKit (CD117)-APC-Cy7	2B8	Biolegend	105825
Flt3 (CD135)-biotin	A2F10	eBiosciences	13-1351
Gr1-biotin	RB6-8C5	BD Biosciences	553125
Gr1-FITC	RB6-8C5	Invitrogen	RM3001
Gr1-purified	RB6-8C5	BD Biosciences	553123
Helios-APC	22F6	Biolegend	137222
Helios-FITC	22F6	Biolegend	137214
Mac-1-biotin	M1/70.15	BD Biosciences	557395
Mac-1-PE	M1/70.15	eBiosciences	12-0112
Mac-1-PercP-Cy5.5	M1/70.15	Biolegend	101228
Mac-1-purified	M1/70.15	BD Biosciences	557394
NK1.1-biotin	PK136	eBiosciences	13-5941
Sca1-PE-Cy7	D7	eBiosciences	25-5981
Streptavidine-PE	-	Jackson	016-110-084
Streptavidine-AF405	-	Invitrogen	S-32351
Streptavidine-eF710	-	eBiosciences	49-4317
Streptavidine-FITC	-	Jackson	016-010-084
Ter119-biotin	TER119	BD Biosciences	553672
Ter119-PE	TER119	BD Biosciences	553673
Ter119-purified	TER119	BD Biosciences	553671

Supplementary Table 2: Primers used for qPCRs

Gene targeted	Forward	Reverse
Atmin	GGATGTCCTCGAGGCC	GGTGCCGTAGGAATTACTG
Bbc3	GTACGAGCGGCGGAGACAAG	GCACCTAGTTGGGCTCCATTCT
Cdkn1b	AAAGGGCCAACAGAACAGAA	ACCGGAGCTGTTTACGTCTG
Cdkn2a	GTCTTGATGTCCCCGCTCT	CGAGGACCCCACTACCTTCT
Cdkn2c	GCCTCCATCAGGCTAATGAC	GAAGCACACAGCCTGCAAT
Cdkn2d	CCCTCTCTTATCGCCAGATG	TGAAGGTTCTGGTGGAGCAT
E2f7	ATCTCGTTGCACTGCTAGGC	GCGTTCCAAGTAGGTGGCTA
Ercc4	ACACGCAGGGTGGTATTATA	GCGCAGGATGAAGGCTTC
Fen1	CTGCTCCGAACATTCCTCTT	GACCAAAGTAGCTCTTGATG
Flt3	GTGGCATAGAATGGCTGCTC	GAACCCTTACCCTGGCATT
Foxo1	TTTCTAAGTGGCCTGCGAGT	CAGGTCATCCTGCTCTGTCA
Ikzf2	ACACCTCAGGACCCATTCTG	TCCATGCTGACATTCTGGAG
Ing5	TGCGAGAGCTAGACCAGAGA	CTTGCTGTAGGCGCTCTGG
Ku70	GGAGTCAAGCAAGCTGGAAGA	AGAACTCGCTTTTTGGTCTCCTT
Meg3	CATCTCCACAGAAGAGCAGC	GCAACGTGTTGTGCGTGAAG
Ndr2	CAGCATGAAGAGAGAGAAAC	CTGGTCCTCTTAAGGCGTAA
Necdin	GCGCTCAACAACCGTATGC	TGCGCAGCACATTCCAGAC
Noxa	GAAGTCGCAAAGAGCAGGATGA	TGCCGTAATTCACTTTGTCTCCA
Cdkn1a	CTGTCTTGCACTCTGGTGTCTGAG	TTTTCTCTTGCAAGACCAATCTG
Trp53	AAGATCCGCGGGCGTAA	CATCCTTTAACTCTAAGGCCTCA
Pml	GCAACCCTGCGCTGACTG	CATGCCACTGCTGAATCTCC
Rad51	AAGTTTTGGTCCACAGCCTATTT	CGGTGCATAAGCAACAGCC
Runx1	CATCGCTTTCAAGGTGGTGG	CCGCGGTAGCATTCTCAGT
Smarca5	GATGGACACAGAGTCCAG	CATCAACAGCATAGTTGGC
Thy1	ACTGCCGCCATGAGAATAAC	ACGTGCTTCTCTTCTCTCG
Xlf4	GTGGCATGAACAGGTGGAC	ACAGGAGAAAGTAGCTTTGCT
Ctdnn1_0	TGCCAGATCAGTTTGTACCAC	CTCTCCCTCCGTGTCTGTCTCG
Ctnnd1_-4100	ATGTAAAGTGTATTGATCTGG	GTCTGCCTTCTAAAGTGG

RESULTATS

The transcription factor Helios acts in synergy with p53 to mediate DNA damage responses in hematopoietic stem cells

Hematopoietic stem cells (HSCs) give rise to all blood cell lineages but the mechanisms responsible of HSCs responses to stress remain partially understood. We have studied the role of the transcription factor Helios in HSCs, where Helios is highly and specifically expressed. We found that HSCs from young Helios null ($He^{-/-}$) mice reconstitute the hematopoietic system of irradiated recipient mice similarly to HSCs from WT mice in primary competitive transplantations, but out-perform WT cells in secondary and tertiary transplantations. Strikingly, HSCs from 2-year-old $He^{-/-}$ mice had an 8-fold higher reconstitution potential than old WT HSCs in primary transplantations. Moreover, the pool of long-term HSCs in old $He^{-/-}$ mice resembles that of young WT animals in both frequency and phenotype. HSCs from old $He^{-/-}$ mice present a deregulation of genes implicated in aging. Further, young HSCs express reduced mRNA levels of genes encoding DNA repair proteins as well as those associated with the p53 pathway. When $He^{-/-}$ and WT HSCs were subjected to DNA damage by different agents neocarzinostatin, camptothecin or etoposide, DNA damage-induced apoptosis was significantly impaired in $He^{-/-}$ HSCs and accompanied by a poor induction of p53 target genes, and impaired clearance of γ H2AX foci. Our results suggest that Helios regulates HSC aging by preventing the accumulation of DNA damage in these cells, via the regulation of p53-dependent DNA damage responses.

Results

Helios is not required for hematopoiesis under homeostatic conditions

We tested Helios expression in several hematopoietic populations from young wild type (WT) mice (8 weeks old). RT-qPCR (Figure 1A) was performed in FACS sorted cells, (see supplementary Figure 1 for sorting strategies). These data show a significant higher expression level of Helios in LT-HSCs, compared with ST-HSCs and the different progenitors, confirming published data (Kelley et al., 1998). The analysis of Helios protein levels by intracellular staining (Figure 1B-C) further revealed high expression (similar to that seen in regulatory T cells) in LT-HSCs, ST-HSCs, and MPPs, but no longer in all of the committed progenitors. These data suggest a role for Helios in HSCs.

To investigate the role of Helios in HSCs, we first assessed whether the deletion of Helios affects hematopoiesis at steady state. No significant difference was found in the frequencies and numbers of stem cells and progenitors from bone marrow (BM), and mature cells from peripheral blood, spleen, and BM, between $He^{-/-}$ and $He^{+/+}$ mice (Figure 1D and supplementary Figure S2). We then compared the number of functional HSCs present in Helios-null and WT mice. We quantified competitive repopulation units (CRU) by limiting dilution after injecting limited numbers of total BM donor cells with a fixed number of competitor cells into irradiated recipient mice (Figure 1E). The data show that at steady state, the CRU frequency is similar between both types of mice.

Because quiescence is one of the key characteristics of the HSCs, we tested if the deletion of Helios affects their proliferation. We administrated BrdU to the water of mice during 3, 5, 7 or 14 days. At the indicated points, we stained the BM cells for LT-HSCs surface markers and BrdU (Figure 1F-G). We found that Helios-null LT-HSCs incorporated less BrdU when compared to WTs, suggesting that Helios regulates the proliferation of LT-HSCs.

Altogether, the results showed that at steady state Helios does not affect global hematopoiesis, but Helios regulates the proliferation of LT-HSCs.

Helios deficiency enhances HSCs under hematopoietic stress

We further investigated the role of Helios in HSCs functions in non-steady state conditions. We first analyzed the hematopoiesis in the fetal liver (FL). We found no

Figure 1: Helios is not required for hematopoiesis under homeostatic conditions

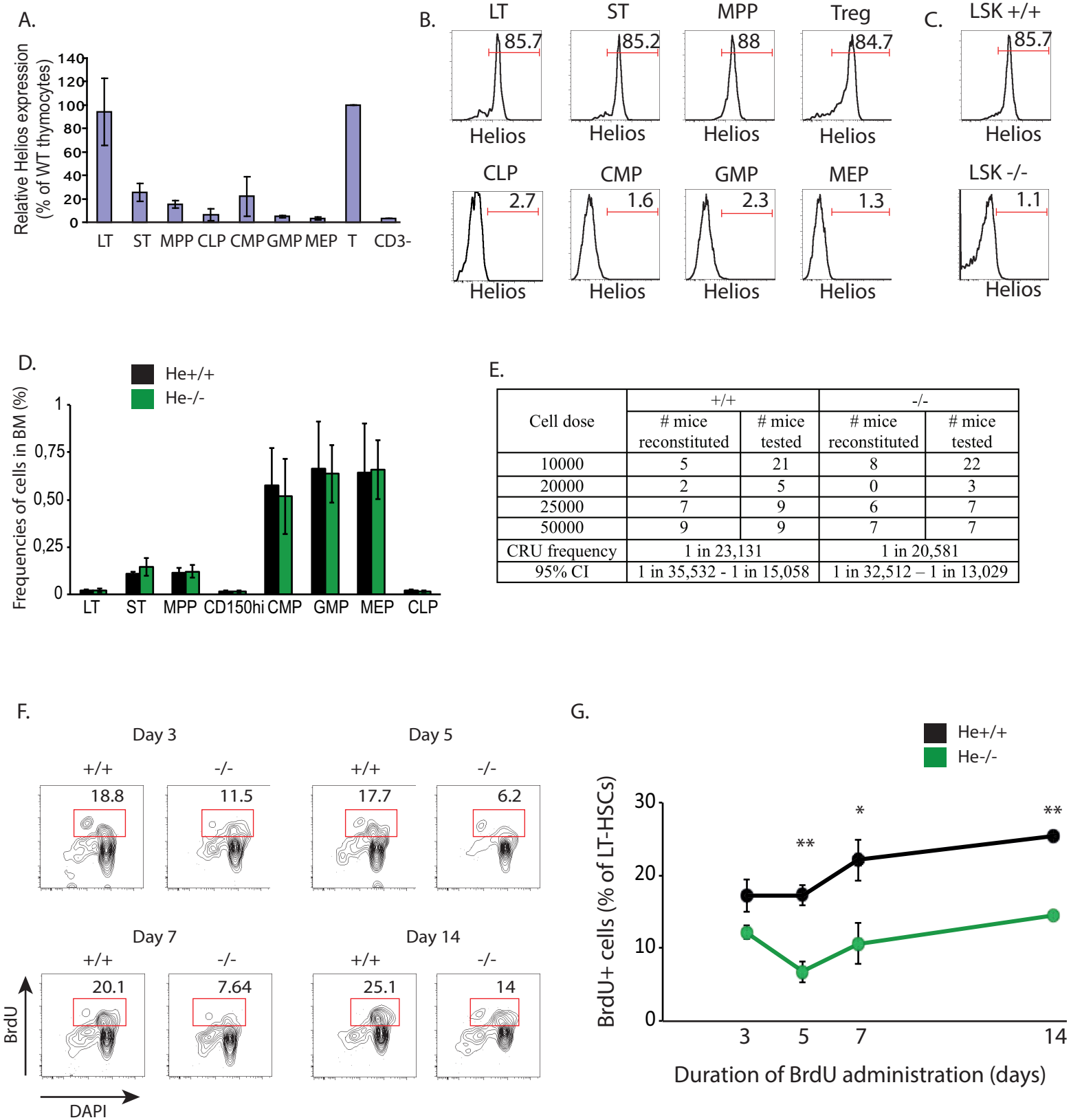


Figure 1. Helios is not required for hematopoiesis under homeostatic conditions.

A) Relative Helios mRNA expression in HSCs and hematopoietic progenitors. Cells were sorted from He^{+/+} BM cells. RT-q-PCR was performed for Helios and HPRT. Helios mRNA level was first normalized to HPRT. Helios^{+/+} thymocytes were used as the positive control, and CD3⁻ splenocytes as negative control. Results were then normalized to expression in the thymocytes. Error bars show standard deviations of samples collected independently (n≥3).

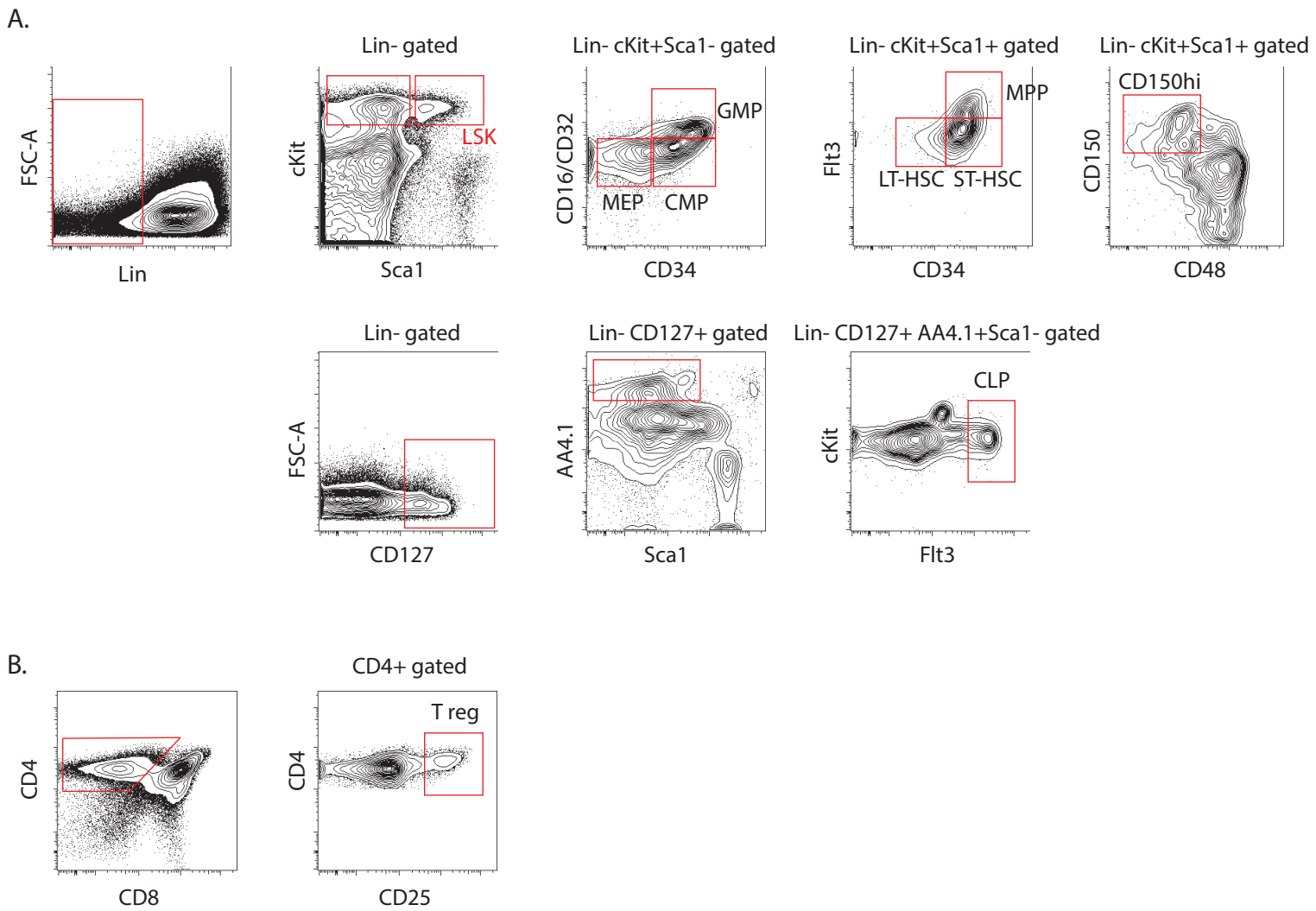
B) C) Expression of Helios protein in HSCs and progenitors. Cells were stained for cell surface markers specific to LT-HSCs (Lin⁻cKit⁺Sca1⁺Flt3⁻CD34⁻), ST-HSCs (Lin⁻cKit⁺Sca1⁺Flt3⁻CD34⁺), MPP (Lin⁻cKit⁺Sca1⁺Flt3⁺CD34⁺), CLP (Lin⁻cKit⁺Sca1^{lo}CD127⁺AA4.1⁺Flt3⁺), CMP (Lin⁻cKit⁺Sca1⁻CD16/32⁻CD34⁺), GMP (Lin⁻cKit⁺Sca1⁻CD16/32⁺CD34⁺), MEP (Lin⁻cKit⁺Sca1⁻CD16/32⁻CD34⁻), then intracellular staining of Helios was performed (B). He^{+/+} LSK cells were used as positive control, and He^{-/-} LSK cells as negative control (C). Representative profiles from 2 independent experiments (4 He^{+/+} mice were used per experiment).

D) Summaries of HSCs and progenitors frequencies in He^{+/+} and He^{-/-} mice. Results summarized from 9 independent experiments for the HSCs, and from 3-4 independent experiments for progenitors.

E) He^{+/+} and He^{-/-} mice have comparable CRU frequencies. CRU quantification was done as described in the Methods. Numbers of mice tested are total recipients mice used in 4 independent experiments.

F-G) BrdU incorporation in LT-HSCs. Mice were administrated with BrdU as a 0.5mg/ml solution in drinking water, during the indicated days (n≥2 per group and time point). BM cells were stained with surface markers for Lin⁻ckit⁺Sca1⁺CD150⁺CD48⁻ (LT-HSCs), then fixed, permeabilized and stained with anti-BrdU antibody. (F) Flow cytometry profiles of representative BrdU stainings at the indicated time point. (G) Profile of BrdU incorporation rate in LT-HSCs from Helios^{+/+} and Helios^{-/-} mice. Error bars show standard deviations of 2 independent experiments (* p<0.05, **p<0.01).

Supplementary Figure 1: Strategy of gating of HSCs, progenitors and Treg cells



A-B. Flow cytometry profiles of progenitors (MPP; multipotent progenitors, GMP; granulocyte and macrophage progenitors, CMP; common myeloid progenitors, MEP; megakaryocyte and erythrocyte progenitors, and CLP; common lymphoid progenitors), hematopoietic stem cells (LT-HSCs; long-term hematopoietic stem cells, ST-HSCs; short term hematopoietic stem cells), and Treg cells. Indicated gates were used for cytometry analyses and cell sortings.

difference in the frequencies of mature cells between WT and He^{-/-} fetuses (data not shown). However, the FLs of 13.5 to 15.5 dpc He^{-/-} fetuses had a higher frequency of LSK cells than He^{+/+} FLs (Figure 2A). To determine the underlying mechanisms, we performed a BrdU incorporation assay to examine the cell cycle status of fetal LSK cells (Figure 2B). We found a significant increase in BrdU-positive cells in He^{-/-} LSK cells compared to controls. No difference was seen in the apoptotic rate of those cells (Figure 2C). These data indicate that Helios deficiency enhances the frequency of LSK cells in the FL through increased cell proliferation.

We then compared the recovery of HSCs after 5-FluoroUracil (5-FU)-induced aplasia (Figure 2D-F). 5-FU kills all the cycling cells including most hematopoietic progenitors, and induces quiescent HSCs to divide and contribute to *de novo* hematopoiesis. We followed the recovery of mature cells in the peripheral blood and of LSK cells in the BM at indicated time points after treatment. At d5, white blood cells (WBC) and platelets were drastically depleted in both types of mice, but we found significant higher number of WBC in He^{-/-} mice (Figure 2D). The decrease of red blood cells (RBC) continued until d10, and we found also a significant higher number of RBCs in He^{-/-} mice. The recovery of all cell types occurred earlier in He^{-/-} mice compared to WT. At d7, the percentage of Lin⁻ cKit^{hi+lo} Sca1⁺ cells was also significantly higher in He^{-/-} than in He^{+/+} mice (Figure 2E). These data indicate that Helios deficiency increases the recovery of HSCs after 5-FU treatment. To determine the underlying mechanisms, we performed a BrdU incorporation assay to examine the cell cycle status of HSCs 6 days after 5-FU administration. We found a significant increase in the population of BrdU-positive cells in Helios-null LSK cells compared with WT (Figure 2F). Together, these data indicate that Helios deficiency enhances the capacity of HSCs to contribute to *de novo* hematopoiesis, likely through an increase in cell cycle progression.

Altogether, these results show that Helios deletion enhances the ability of HSCs to contribute to hematopoiesis in non-steady state conditions.

Helios^{-/-} HSCs show higher capacity of reconstitution in serial transplantation

To evaluate the self-renewal and differentiation potential of He^{-/-} and He^{+/+} HSCs *in vivo*, we performed serial transplantations as described in Figure 3A. After primary transplantations, the He^{-/-} LSK cells were able to reconstitute the hematopoietic system as the He^{+/+} cells (Figure 3B and supplementary Figure 3A). However, the percentage of chimerism in the LT-HSCs compartment was higher in the recipients which received He^{-/-} LSK cells than

Figure 2: Helios deficiency enhances HSCs under hematopoietic stress

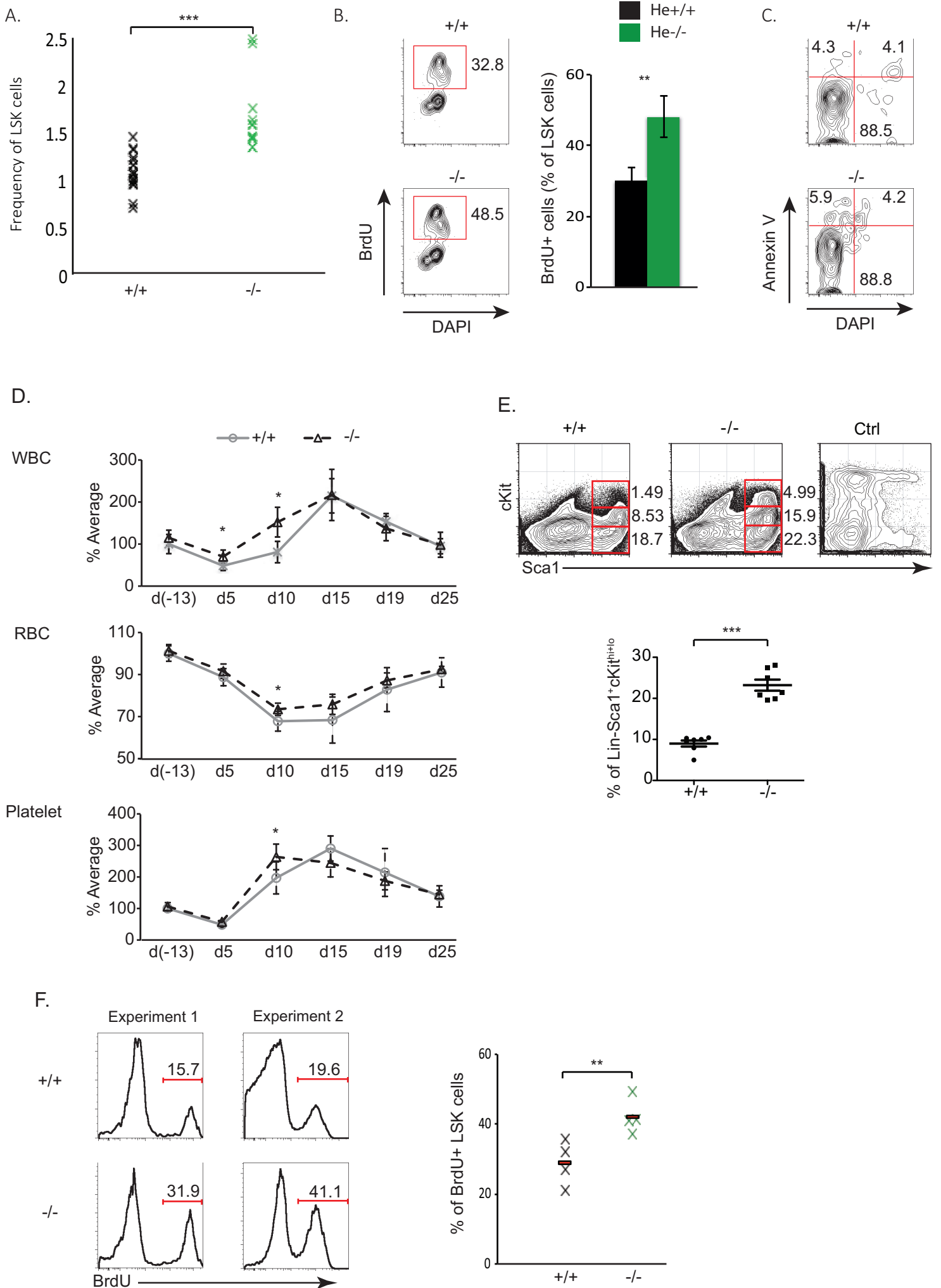


Figure 2. Helios deletion enhances HSCs under hematopoietic stress

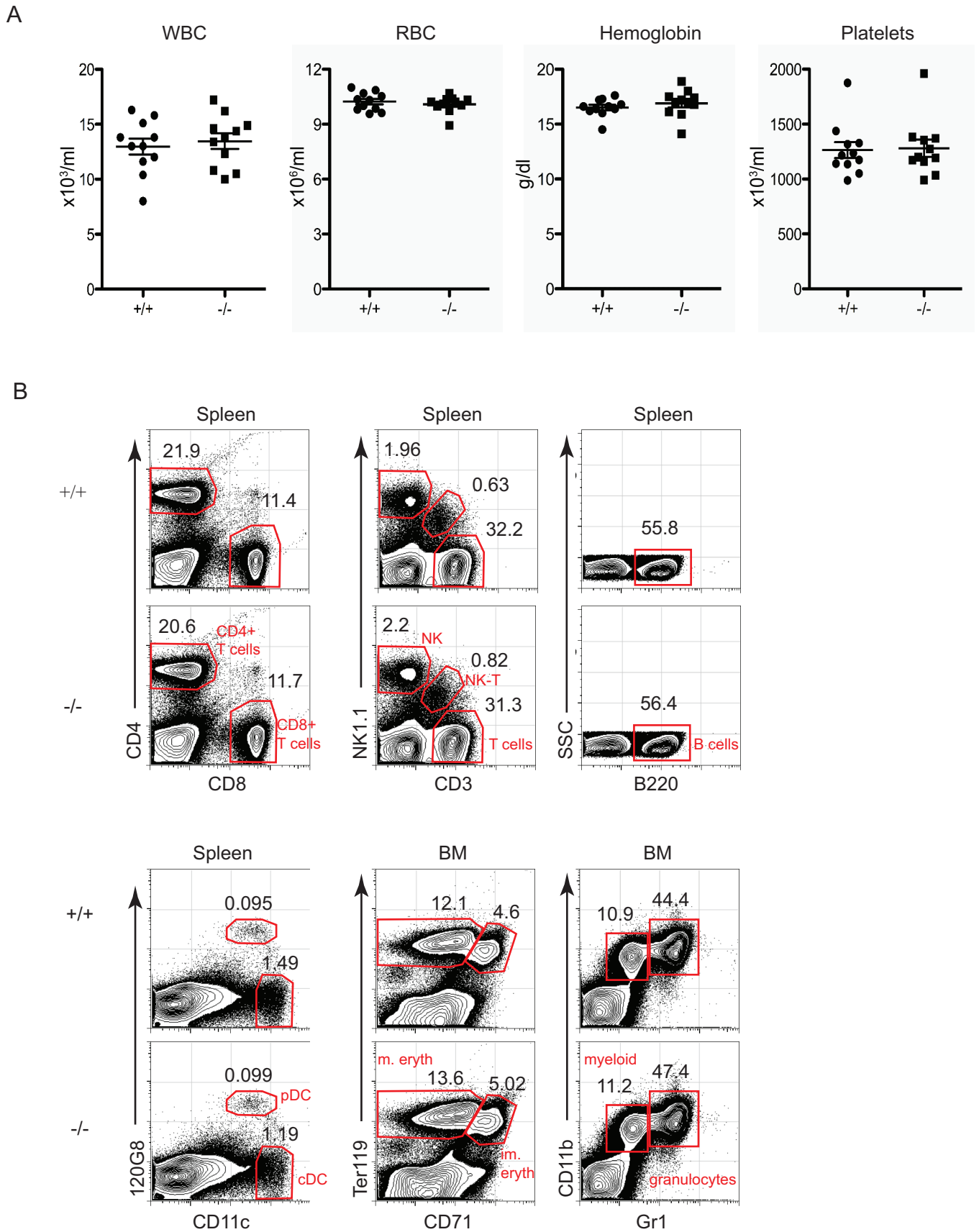
A) Frequencies of LSK cells in fetal livers. Fetal liver cells were stained for LSK cell surface markers. Results were pooled from embryos E15.5 days old. (n=16 for Helios^{+/+} and n=12 for Helios^{-/-}, from 4 independent experiments).

B) BrdU incorporation of fetal LSK cells. BrdU (50μg/g body weight) was injected intraperitoneally into mother. Two hours later, intracellular staining of BrdU from fetal LSK cells (E15.5) was performed (n≥2). Representative contour plots of BrdU and DAPI staining of LSK cells (left panel) from He^{+/+} (top) and He^{-/-} (bottom) embryos. Frequencies of BrdU+ LSK cells (right panel) from He^{+/+} and He^{-/-} fetuses. Error bars show standard deviations of 3 independent experiments (**p<0.01, student-test).

C) The apoptosis rate of LSK cells is similar between He^{+/+} and He^{-/-} embryos (E15.5), (n≥2). Representative contour plots of Annexin V and DAPI staining from 3 independent experiments.

D-F) Helios^{-/-} mice recover quicker after 5-FU treatment. Mice were treated with 5-FU by intraperitoneal injection at 150 mg/kg body weight on day 0. D) Peripheral blood was obtained by retro-orbital bleeding, and was counted before and after 5-FU treatment at different time points as indicated: d(-13), d5, d10, d15, d19 and d25. E) BM cells were harvested and stained with markers for Lineage, cKit, and Sca1 7 days after 5-FU injection. Experiments were repeated 4 times with a total of 7 mice per group. Representative contour plots (upper panel) for Sca1 and cKit expression in Lin⁻ gated BM cells and the summary of the percentage of Lin⁻cKit^{hi+lo}Sca1⁺ cells are shown (lower panel). F) Six days after 5-FU treatment, BrdU was injected intraperitoneally at 50μg/g body weight. BM cells were harvested 2 hours later and were stained with surface markers (Lineage, cKit, Sca1), followed by intracellular staining for BrdU. Representative histograms (left panel) of BrdU in LSK cells and the summary of the percentage of BrdU+ cells among LSK cells (right panel) from 2 independent experiments with a total of 4 mice per group (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Supplementary Figure 2: Helios does not affect the development of mature cells of peripheral blood, spleen, and bone marrow



A. Quantification of white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), hemoglobin and platelets in peripheral blood of Helios^{+/+} and Helios^{-/-} mice. Results were summarized from 4 independent experiments (n \geq 10).

B. Flow cytometry profiles of different mature cells in spleen and bone marrow of Helios^{+/+} and Helios^{-/-} mice. Representative results of 4 independent experiments (n=10)

Figure 3: Helios^{-/-} show higher capacity of reconstitution in serial transplantation

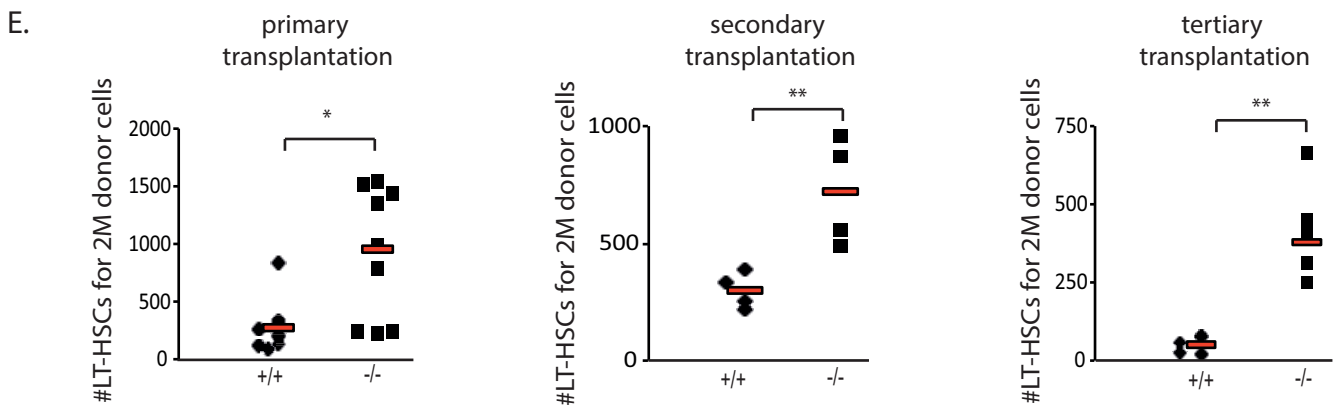
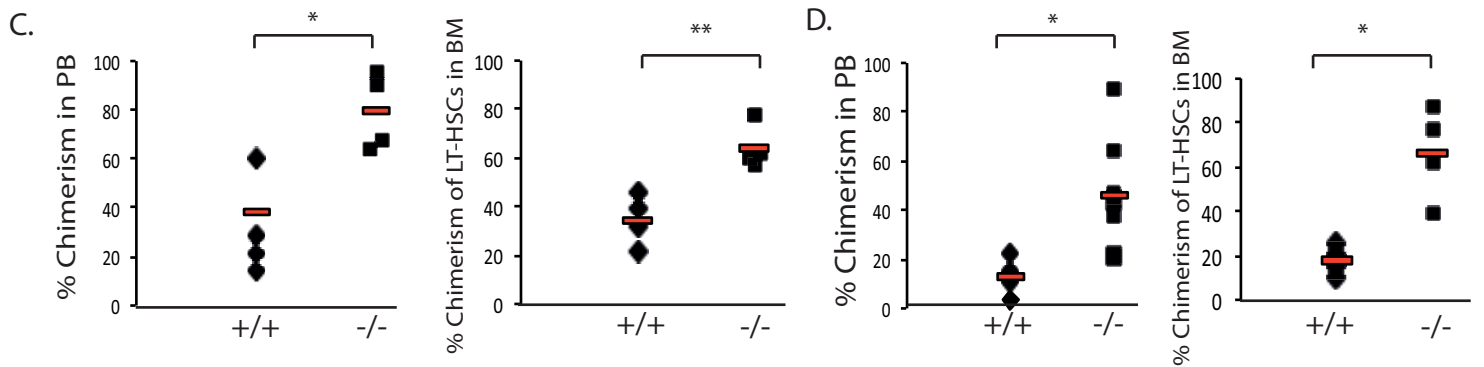
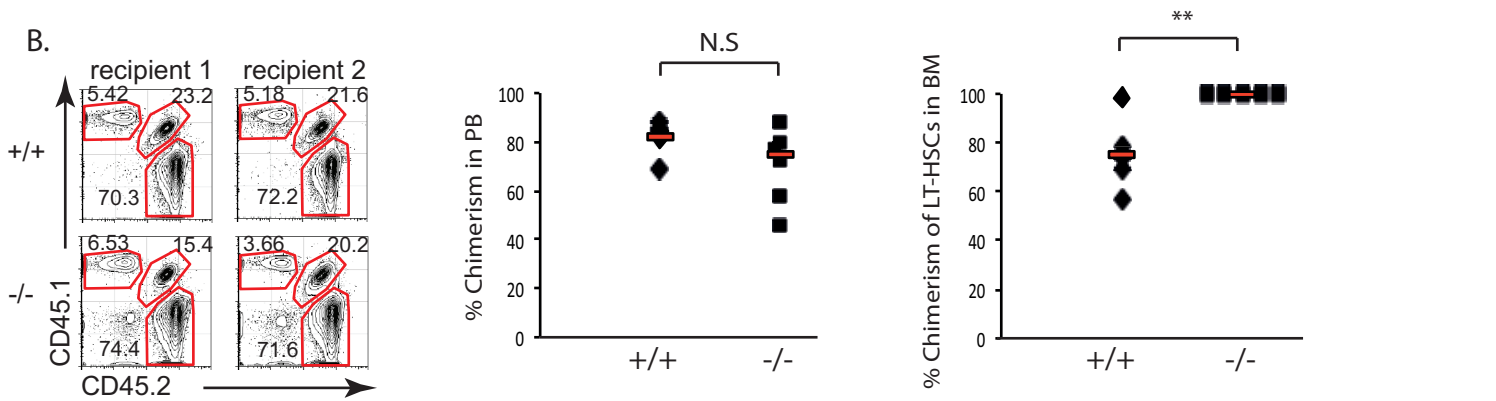
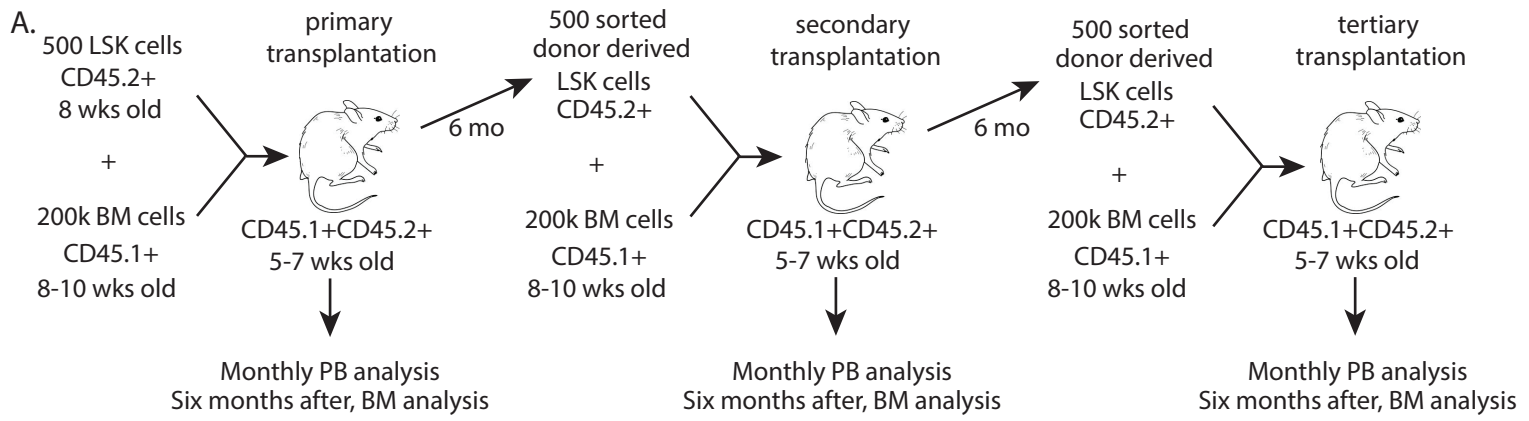


Figure 3. Helios^{-/-} HSCs show higher capacity of reconstitution in serial transplantations.

A) Scheme of the serial transplantation assay. 500 LSK cells from He^{+/+} and He^{-/-} mice (CD45.2+) and 200.000 BM competitor cells (CD45.1+) were injected into irradiated recipients (CD45.1+CD45.2+). Six months after transplantation, donor derived LSK cells (CD45.2+) were sorted and injected into secondary recipients with 200.000 BM competitor cells (CD45.1+). Six months later, donor derived cells from secondary recipients were used to perform the tertiary transplantation.

B) Peripheral blood and BM analyses of primary recipients 6 months after the transplantation. The left panel shows representative plots for the CD45.2 and CD45.1 markers. The right panels show the summary of the percentage of chimerism in peripheral blood, and of CD150^{hi} LT-HSCs (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD48⁻CD150^{hi}) in recipient BM.

C) D) Analysis of PB and BM of secondary (C) and tertiary (D) recipients 6 months after the transplantations. Summaries of the percentage of chimerism in peripheral blood (left panels) and among CD150^{hi} LT-HSCs (right panels).

E) Number of CD150^{hi} LT-HSCs for 2.10⁶ BM cells analyzed from primary, secondary, and tertiary recipients. Results are pooled from 2 independent experiments.

The serial transplantations were done three times with at least 5 mice per group. Percentage of chimerism = 100 x (% donor-derived cells) / (% donor-derived cells + % competitor-derived)

in recipients which received $He^{+/+}$ LSK cells. Strikingly, $He^{-/-}$ LSK cells show a significantly higher contribution to peripheral blood cells and to LT-HSCs in BM than $He^{+/+}$ LSK cells, in secondary and tertiary transplantations (Figure 3C-D and supplementary Figure 3A). These data indicate that Helios HSCs have an enhanced ability to reconstitute the hematopoietic system in serial transplantations. Interestingly, this phenotype is reminiscent to the one observed in transplantation of $p53^{+/-}$ LSK cells (Bondar et al., 2010). To exclude the possibility that the differences observed were due to a differential capacity of LT-HSCs to home to their bone marrow niches, we performed a homing assay by competitive transplantation of labelled $He^{-/-}$ and $He^{+/+}$ LSK cells. No significant difference in the homing capacity of $He^{-/-}$ and $He^{+/+}$ cells was observed in the BM and spleen of recipient mice. (supplementary Figure 4).

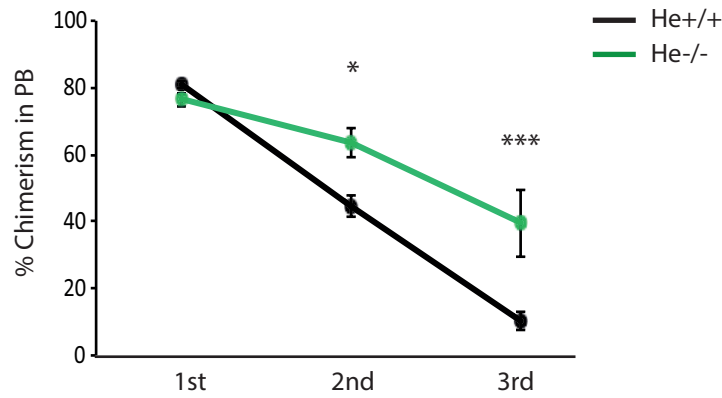
Further analysis of the BM of recipient mice revealed that Helios deficiency leads to a significant increase of the number of LT-HSCs after the primary, secondary and tertiary transplantation, suggesting that $He^{-/-}$ HSCs have enhanced self-renewal ability (Figure 3E). This could be in part due to the fact that, under homeostatic conditions, the $He^{-/-}$ LT-HSCs are less proliferative (Figure 1F-G). The pool of HSCs may be more preserved in $He^{-/-}$ mice, and maintained longer. Interestingly, we found that the differentiation potential of $He^{-/-}$ LSK cells is equivalent to that of $He^{+/+}$ LSK cells, in primary transplantations. However, after the secondary transplantation, $He^{-/-}$ cells differentiated less in B cells. In the tertiary transplantation, $He^{-/-}$ cells differentiate preferentially in myeloid cells at the expense of B cells (supplementary Figure 3B). Taken together, these results demonstrate that Helios regulates the function of HSCs during serial transplantation by enhancing their self-renewal potential.

Helios promotes the aging of HSCs

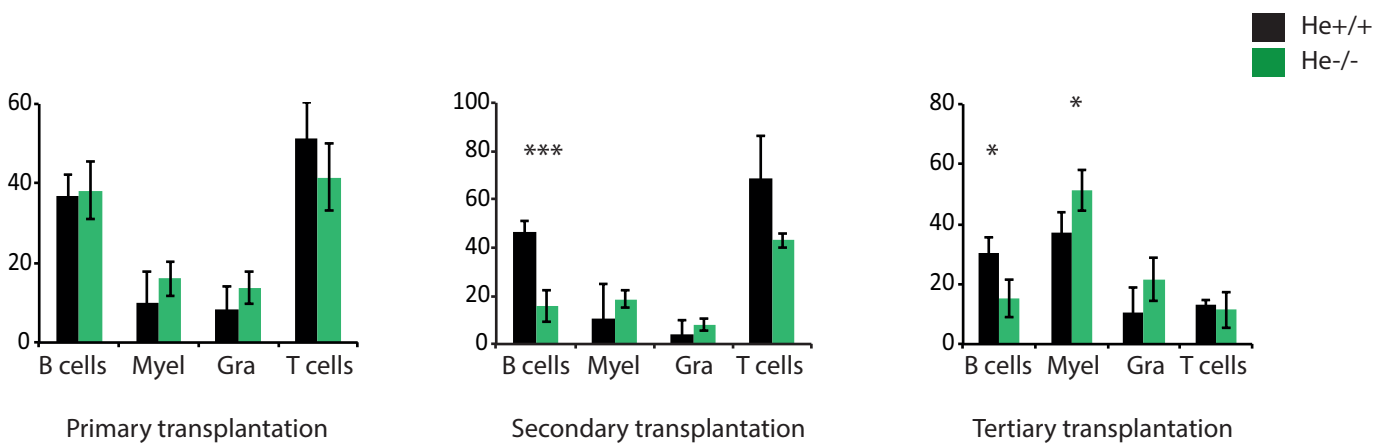
Because serial transplantation mimics the aging of HSCs, we investigated if HSCs from old $He^{-/-}$ mice had a higher reconstitution capacity than HSCs from old WT mice. Indeed, previous studies have shown that HSCs from old mice have on average a 10 fold lower ability to reconstitute the hematopoietic system than young HSCs (Chambers et al., 2007, Sudo et al., 2000). We performed competitive transplantation assays using cells from 2-year-old $He^{-/-}$ or $He^{+/+}$ mice in competition with young BM cells. We injected a number of LSK cells containing 10 or 100 LT-HSCs (Table 1). We observed that the injection of 10 LT-HSCs from old $He^{-/-}$ mice led to efficient reconstitution, in contrast to $He^{+/+}$ cells (Figure 4A). As we found in the serial transplantations (Figure 3), the number of LT-HSCs in the recipient

Supplementary Figure 3: Contribution of Helios^{+/+} and Helios^{-/-} donor cells to the hematopoiesis in serial transplantation

A.



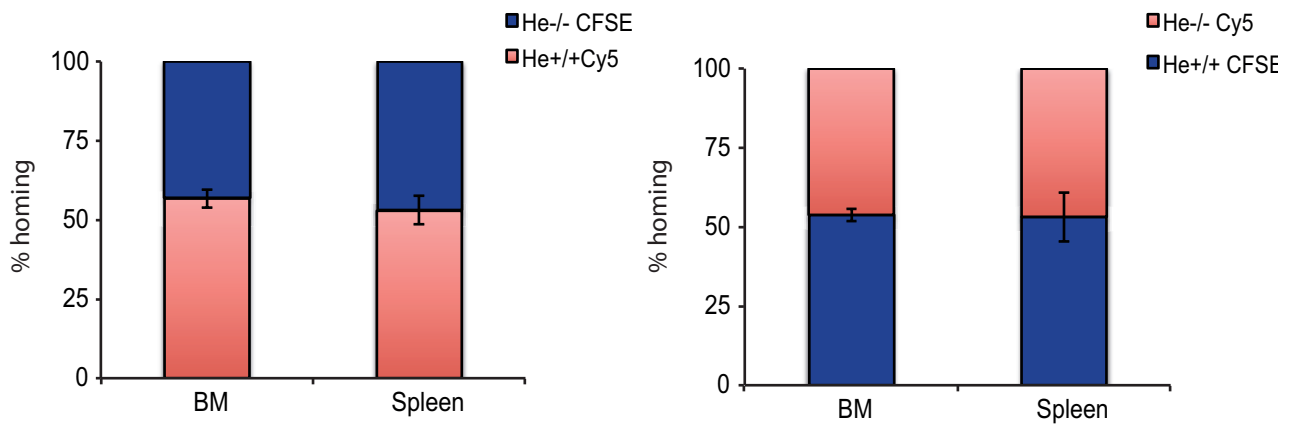
B.



A. Percentage of chimerism in peripheral blood of recipient mice from primary, secondary and tertiary transplantation. Percentage in recipients that received Helios^{+/+} LSK cells or Helios^{-/-} LSK cells as donor are represented in black or green, respectively. Results are pooled from 2 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (student test).

B. Percentage of CD45.2⁺ donor derived mature cells (B cells, myeloid cells, granulocytes, T cells) in peripheral blood of primary, secondary and tertiary recipients 6 months after transplantations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (student test). Representative results from 3 independent experiments.

Supplementary Figure 4: Helios^{-/-} HSCs do not have superior homing capability



Helios^{+/+} or Helios^{-/-} LSK cells were labelled with either Cy5 or CFSE and injected i.v. into irradiated recipient mice. Sixteen hours later, bone marrow and spleen from recipient mice were analyzed for their percentage of labelled cells. Histograms represent the percentage of Cy5⁺ and CFSE⁺ in indicated organs.

Error bars show standard deviations of three independent experiments.

Table 1: Number of old LSK cells i.v. injected in mice in transplantation experiments to get 100 LT-HSCs

Old mice	He+/+		He-/-	
	Percentage LT-HSC	# LSK cells injected to get 100 LT-HSC	Percentage LT-HSC	# LSK cells injected to get 100 LT-HSC
Experiment #1	16%	625	13.10%	763
Experiment #2	15.60%	641	10.30%	970

CRU freq He+/+ old mice	He+/+		He-/-	
	Percentage LT-HSC	# LSK cells injected to get 100 LT-HSC	Percentage LT-HSC	# LSK cells injected to get 100 LT-HSC
Experiment #1	21.80%	458	18.10%	522
Experiment #2	20.60%	485	13.20%	758

CRU freq He-/- old mice	He+/+		He-/-	
	Percentage LT-HSC	# LSK cells injected to get 100 LT-HSC	Percentage LT-HSC	# LSK cells injected to get 100 LT-HSC
Experiment #1	18.30%	546	11.80%	847
Experiment #2	24.40%	409	16.90%	591

Serial dilutions of LSK cells containing 100 LT-HSCs were performed to obtain a pool of LSK cells containing 50, 20, 10, 5, 2, or 1 LT-HSCs

mice which received $He^{-/-}$ cells was significantly increased compared to that in mice which received $He^{+/+}$ cells. These results demonstrate that Helios-null LT-HSCs keep a high reconstitution activity longer than the WT ones. Helios regulates the function of HSCs during their aging by enhancing their self-renewal potential. Interestingly, further investigations of the differentiation potential of the old $He^{-/-}$ and $He^{+/+}$ LSK cells showed that the $He^{-/-}$ LSK cells differentiate preferentially into myeloid cells and granulocytes at the expense of B and erythroid cells (Figure 4B). This phenotype is reminiscent to the one observed after tertiary transplantation of young LSK cells (supplementary figure 3B).

To assess whether the lack of one allele of Helios leads to an intermediate phenotype, we performed a competitive transplantation assay with LSK cells from 2 years old $He^{+/-}$, or $He^{-/-}$ or $He^{+/+}$ mice (supplementary Figure 5). The $He^{+/-}$ cells have the same activity as the $He^{+/+}$ ones.

We further compared the number of functional LT-HSCs in old mice by performing a CRU quantification assay with a limited number of old $He^{-/-}$ and $He^{+/+}$ LSK cells as donors and a fixed number of young competitor BM cells. For $He^{+/+}$ cells, we transplanted a number of LSK cells equivalent to 100 LT-HSCs (as a positive control giving 100% of transplantation efficiency) (see Table 1), 10 LT-HSCs (as negative control), and 20 or 50 LT-HSCs. For $He^{-/-}$ cells, we transplanted a number of LSK cells equivalent to 100 LT-HSCs and 10 LT-HSCs as positive control (see Table1), and 5, 2 or 1 LT-HSCs (Figure 4C). We used ELDA software to perform the statistical analyses (Figure 4D). The results show that the number of functional HSCs is in average 1/44.33 LT-HSCs equivalent for $He^{+/+}$ mice, and 1/5.33 for $He^{-/-}$ mice. The old $He^{-/-}$ mice present 8.3 fold more functional HSCs than $He^{+/+}$ mice.

We then asked if these differences observed in the function of HSCs in old $He^{-/-}$ mice have an impact in the global hematopoiesis of these mice. Previous data shows that during aging, the fate of LT-HSCs changes. Indeed, with aging the pool of HSCs increases and these cells preferentially give rise to myeloid rather than lymphoid cells (Chamber et al., 2007, Sudo et al., 2000). In thymus, immature $CD4^+CD8^-DN$ cells accumulate at the expense of DP cells (Liu et al., 2011). Because we found that old $He^{-/-}$ LSK cells differentiate more into myeloid cells and less into B cells in transplantation experiment, we reasoned that we would observe the same tendency under the homeostatic state in old mice. Thus, we stained bone marrow and thymic cells with cell surface markers for all mature and immature hematopoietic cells (Figure 4E and supplementary Figure 6). As previously described, the number of LSK cells, LT-HSCs, and thymic DN and $CD8^+$ cells increased in old $He^{+/+}$ mice when compared with young ones. The number of different types of myeloid cells and granulocytes slightly

Figure 4: Helios promotes the aging of HSCs

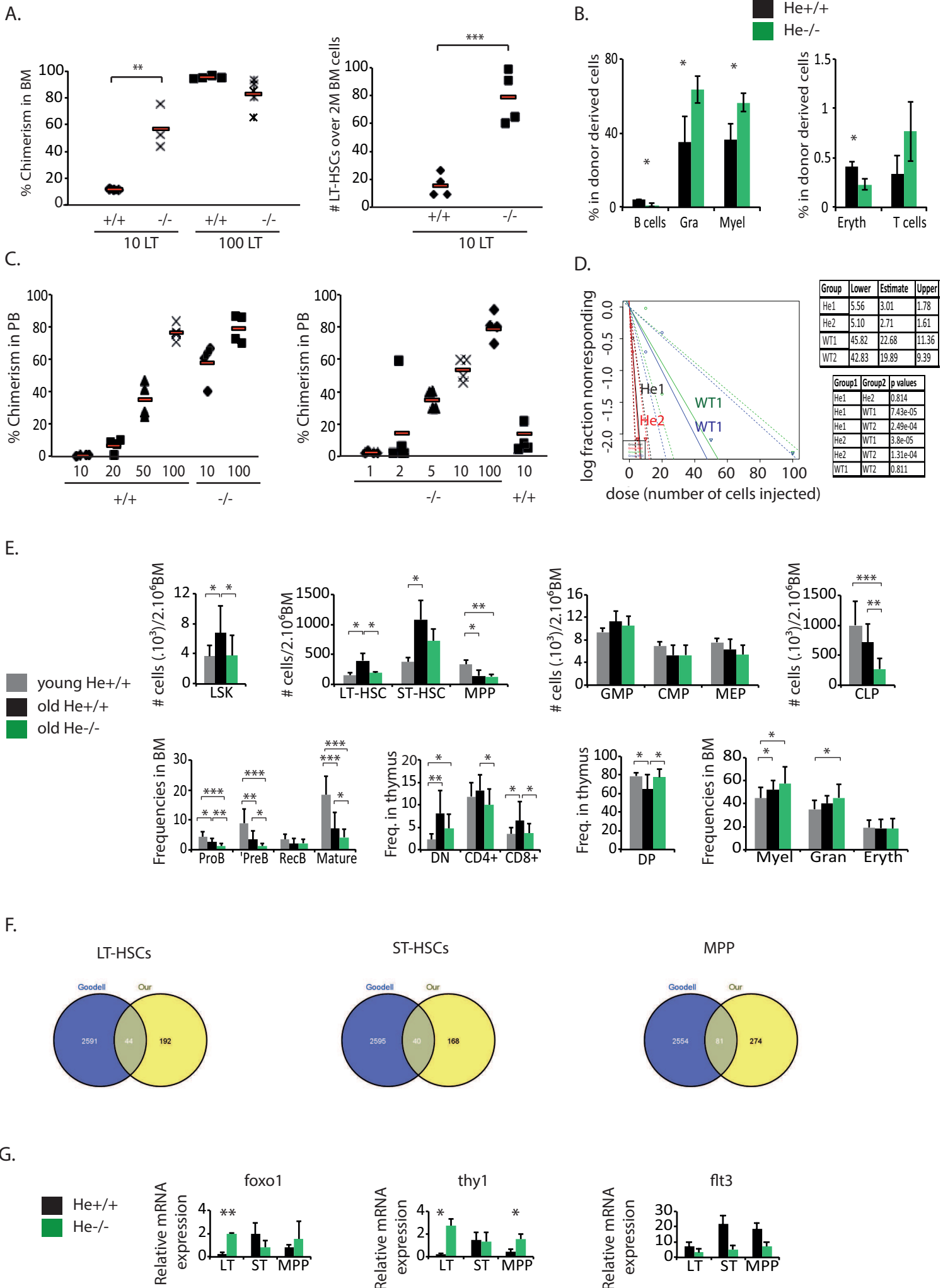


Figure 4: Helios promotes the aging of HSCs

A-B) BM and PB analyses of recipients 6 months after competitive transplantation with LSK cells from 2-year-old mice. A number of LSK cells containing 10 or 100 LT-HSCs from 2-year-old He^{+/+} or He^{-/-} mice were injected into recipients with 200,000 BM competitor cells from 8 weeks old mice. (A) Percentage of chimerism in BM cells from recipients 6 months after transplantation (left panel). Number of CD150^{hi} LT-HSCs (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD48⁻CD150^{hi}) over 2.10⁶ BM recipient cells analyzed 6 months after transplantation with 10 LT-HSCs. (B) Contribution of donor cells to the hematopoiesis. Percentage of donor derived mature cells (B cells, granulocytes, myeloid cells, erythroid cells and T cells) in BM of recipients 6 months after transplantation. Results are representative from 2 independent experiments, n≥5 per group, (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

C-D) CRU quantification of He^{+/+} and He^{-/-} LT-HSCs. (C) A number of He^{+/+} or He^{-/-} LSK cells which contains the indicated number of LT-HSCs (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD48⁻CD150^{hi}) were injected into recipients in competitive conditions as previously described. Results are representative from 4 independent experiments, n≥5 per group, (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). (D) Log plot and statistical analysis of the four experiments of CRU quantification using the ELDA software.

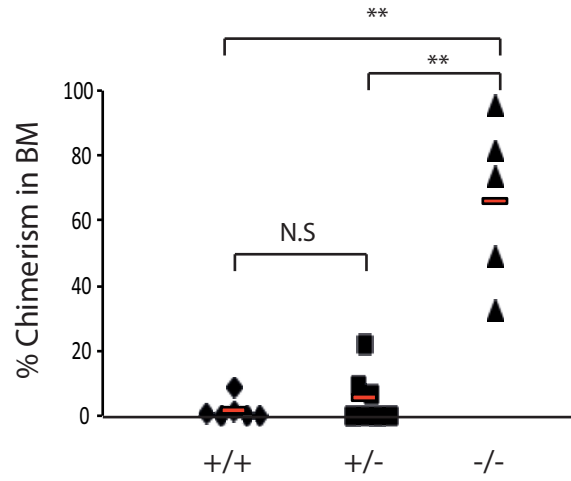
E) Frequencies of mature cells, progenitors and HSCs in BM from 2-year-old He^{+/+} and He^{-/-} mice and young He^{+/+} mice. GMP: granulocyte and macrophage progenitors, CMP: common myeloid progenitors, MEP: megakaryocyte and erythrocyte progenitors, CLP: common lymphoid progenitors, ProB: Pro B cells, PreB: Pre B cells, RecB: recycling B cells, DN: double negative thymocytes CD4⁻CD8⁻, DP: double positive thymocyte CD4⁺CD8⁺. Error bars show standard deviation of 10 independent experiments, n=14 for He^{+/+} and He^{-/-} old mice, n=10 for He^{+/+} young mice (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

F) Venn diagrams between results from transcriptomic analysis of young versus old WT mice (Sun et al., 2014); named “Goodell”, and results from our transcriptomic analysis of LT-HSCs, ST-HSCs and MPPs from 3 He^{-/-} old mice (2 years old mice); named “Our”. For transcriptomic analysis, the cells were directly sorted in RLT buffer and submitted to RNA extraction. The clustering was done using the fuzzy C-means partitioned clustering method on

the 5000 most variables genes among subgroups (selected by ANOVA). The lists of the genes found in both experiments were subjected to Venny software to get the Venn diagrams.

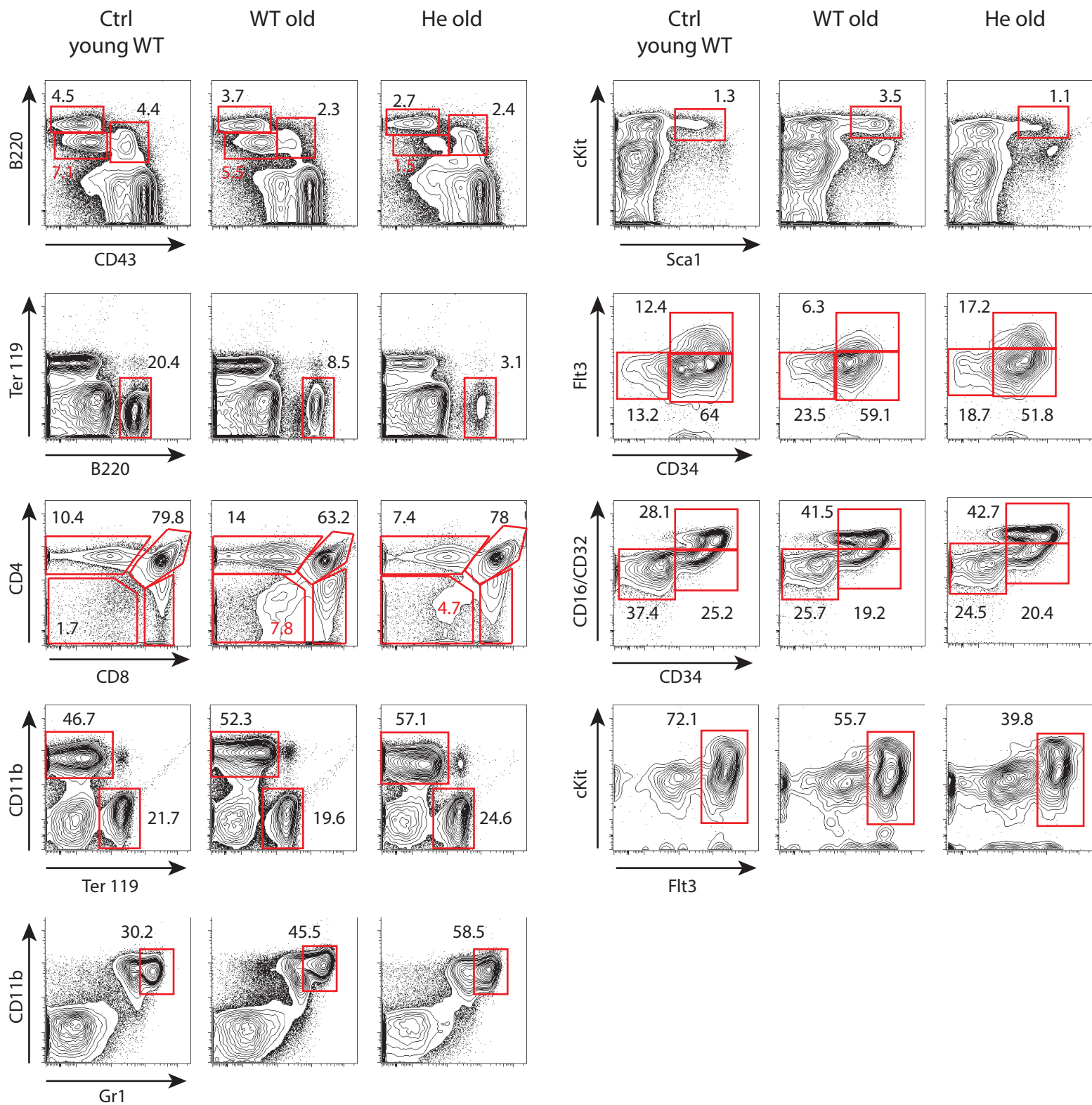
G) Relative mRNA expression of different genes found to be deregulated in He^{-/-} samples. mRNA levels of LSK cells, from 2-year-old He^{+/+} and He^{-/-} mice, were normalized to HPRT. Error bars show standard deviations of samples collected independently (n=2). * p<0.05, **p<0.01 (student-test).

Supplementary figure 5: Helios^{+/-} HSCs are equivalent to Helios^{+/+} HSCs



Percentage of chimerism in bone marrow of recipient mice transplanted with Helios^{+/+}, Helios^{+/-} or Helios^{-/-} LSK cells from 2-year-old mice. (n≥5 per group). N.S: statistically non significant, **p<0.01 (student test).

Supplementary figure 6: Helios deletion affects the hematopoiesis of aged mice



Representative flow cytometry profiles of different mature and immature cells in bone marrow and thymus from old Helios^{+/+} and Helios^{-/-} mice, and young Helios^{+/+} control mice.

increased with aging. In contrary, the number of lymphoid cells (B and T cells) decreased in old WT mice compared to young ones. In the thymus, the number of DP cells decreased. Interestingly, we found three types of abnormal phenotypes in $He^{-/-}$ mice. First, aging led to an increase of number of DN cells and ST-HSCs in WT mice. The Helios deletion leads to a decrease of the number of these cells, but this pool is still higher than in young WT mice. Second, the number of LSK cells, LT-HSCs in the BM and $CD8^{+}$ and DP cells in the thymus in $He^{-/-}$ mice is equivalent to that of young WT mice. Third, for some types of cells, the aging phenotype is more accentuated in old $He^{-/-}$ mice compared with old $He^{+/+}$ mice. Indeed, the number of MPP, CLP, proB cells, preB cells, and mature B cells and T cells decreased with aging, and in $He^{-/-}$ mice the number of these cells decreased even more. In the same way, the number of myeloid cells and granulocytes slightly increased with aging, and in $He^{-/-}$ mice this increase is accentuated. Interestingly, this myeloid bias is reminiscent of the one found in tertiary transplantation, as well as in transplantation with old cells (supplementary Figure 3B and Figure 4B). The decrease in global B cells observed in these experiments could be explained, at least in part, by the decrease of the number of CLP in old $He^{-/-}$ mice under homeostatic conditions.

To understand the mechanism underlying this phenotype, we performed a microarray analysis of LT-HSCs, ST-HSCs and MPP from old $He^{-/-}$ and $He^{+/+}$ mice. We observed a dysregulation of genes involved in differentiation of LT-HSCs to lymphoid and myeloid cells in $He^{-/-}$ cells. We compared our transcriptomic results with the ones, from Goodell's lab, which analyzed the changes in the gene expression in HSCs during aging (Sun et al., 2014) (Figure 4F). We found 44, 40, and 81 genes which are commonly deregulated during aging of HSCs and in $He^{-/-}$ LT-HSCs, ST-HSCs, and MPPs, respectively. Among them, we found notably a deregulation of the expression of *foxo1*, *thy1* and *flt3* in $He^{-/-}$ LT-HSCs. We confirmed the deregulation of these genes by RT-qPCR (Figure 4G). The expression of *foxo1* increases with aging (Sun et al., 2014), and increases in old $He^{-/-}$ LT-HSCs compared to old WT LT-HSCs. *Foxo1* is involved in the resistance of HSCs to oxidative stress (Tothova et al., 2007). Knowing that oxidative stress is one of the mechanisms responsible for HSC aging (Trifunovic et al., 2004), this up-regulation of *foxo1* in $He^{-/-}$ LT-HSCs might explain in part that those cells keep a “young” phenotype and functions. The expression of *thy1* decrease with aging (Sun et al., 2014, Rossi et al., 2005), but increase in old $He^{-/-}$ LT-HSCs and MPPs compared to old WT cells. *Thy1* is a T cell differentiation gene. Its up-regulation in $He^{-/-}$ cells could explain in part that aged $He^{-/-}$ mice present a normal development of T cells. The expression of *flt3* decreases with aging (Sun et al., 2014). Its expression decreased in old $He^{-/-}$

cells compared to old WT cells. Interestingly, a recent study showed that *flt3* permits the maintenance of MPP, CLP and progenitors that generate B cell precursors (Dolence et al, 2014). This could explain in part the loss of B cells and CLP in old $He^{-/-}$ mice.

In conclusion, these data show that Helios regulates the function of HSCs during aging by enhancing their self-renewal potential. The old $He^{-/-}$ mice contained 8.3 times more functional LT-HSCs than old WT mice, and their HSC pool is functionally equivalent to that of young WT mice. This higher number of functional LT-HSCs leads to changes in global hematopoiesis. Taken together, these results demonstrate that Helios promotes the aging of HSCs.

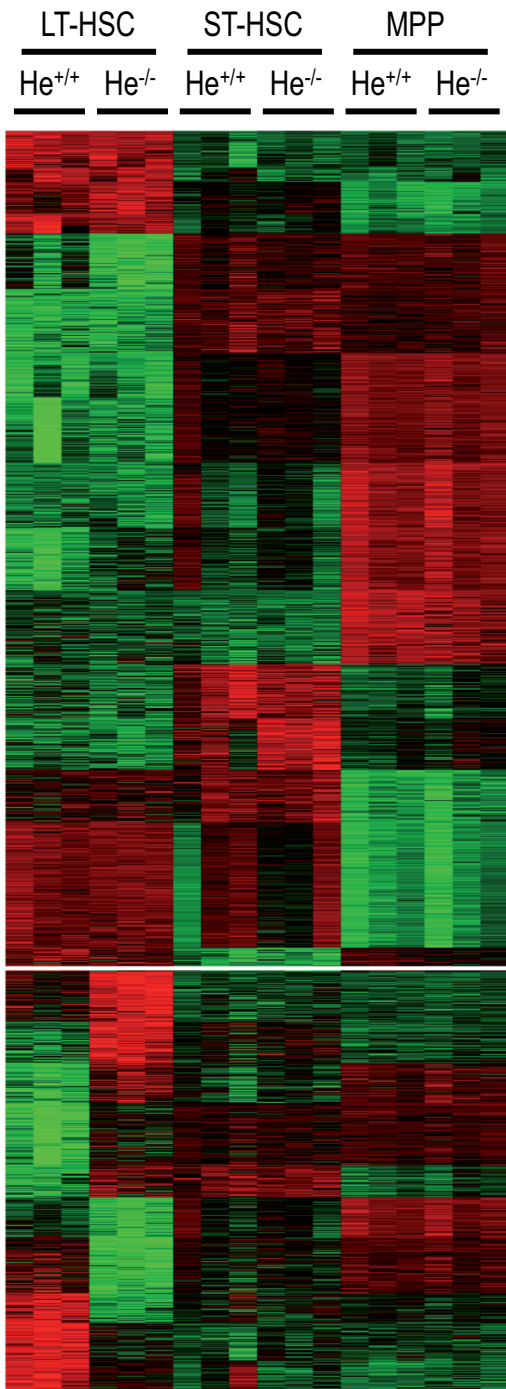
Helios^{-/-} LT-HSCs present a down-regulation of genes involved in DNA repair and in the p53 pathway

To understand the mechanisms underlying the phenotype that $He^{-/-}$ mice keep their stem cell activity longer compared to WT ones, we first performed a transcriptional analysis on LT-HSCs, ST-HSCs, and MPPs from three $He^{+/+}$ and three $He^{-/-}$ mice (Figure 5A-B). As shown, two third of the genes presented (upper part Figure 5A), are differently expressed in the three populations but are equally expressed in $He^{-/-}$ compared with control mice. Those genes are cell-type specific. Among the last third of the genes presented (lower part Figure 5A), we identified genes that normally fluctuate between LT-HSC, ST-HSCs and MPP, and those that are specifically deregulated in one of the $He^{-/-}$ subsets. We observed expected regulations between subsets: for instance, *Necdin*, previously found to be highly expressed in LT-HSCs, was also specifically expressed in this subset. *CD48* and *CD244*, known to be induced in ST-HSCs, also followed that expression profile. Strikingly, the large majority of gene deregulations observed in mutant cells occurred in the LT-HSC subset. Only very few genes were deregulated in the ST-HSC and MPP populations. This finding thus identifies the LT-HSC compartment as the one which is the most sensitive to Helios function. There was no clear bias toward overexpressed or under-expressed genes. We found that Helios controls directly or indirectly about 30% of the genes whose expression is altered between the LT-HSCs to ST-HSCs transition. Helios is thus an important transcription factor involved in establishing the LT-HSC-specific gene expression program.

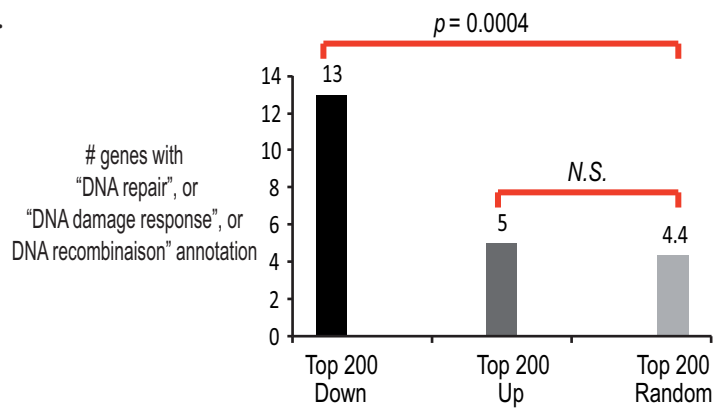
Several biological functions appeared particularly affected by Helios deficiency. Among the top down-regulated genes were several genes implicated in cell growth and division, such as *rnf17* and *smc2*. *Rnf17* encodes a protein that binds *Mad1* and inhibits its

Figure 5: Helios-/- LT-HSCs present a down-regulation of genes involved in DNA damage repair and in p53 pathways

A.



B.



C.

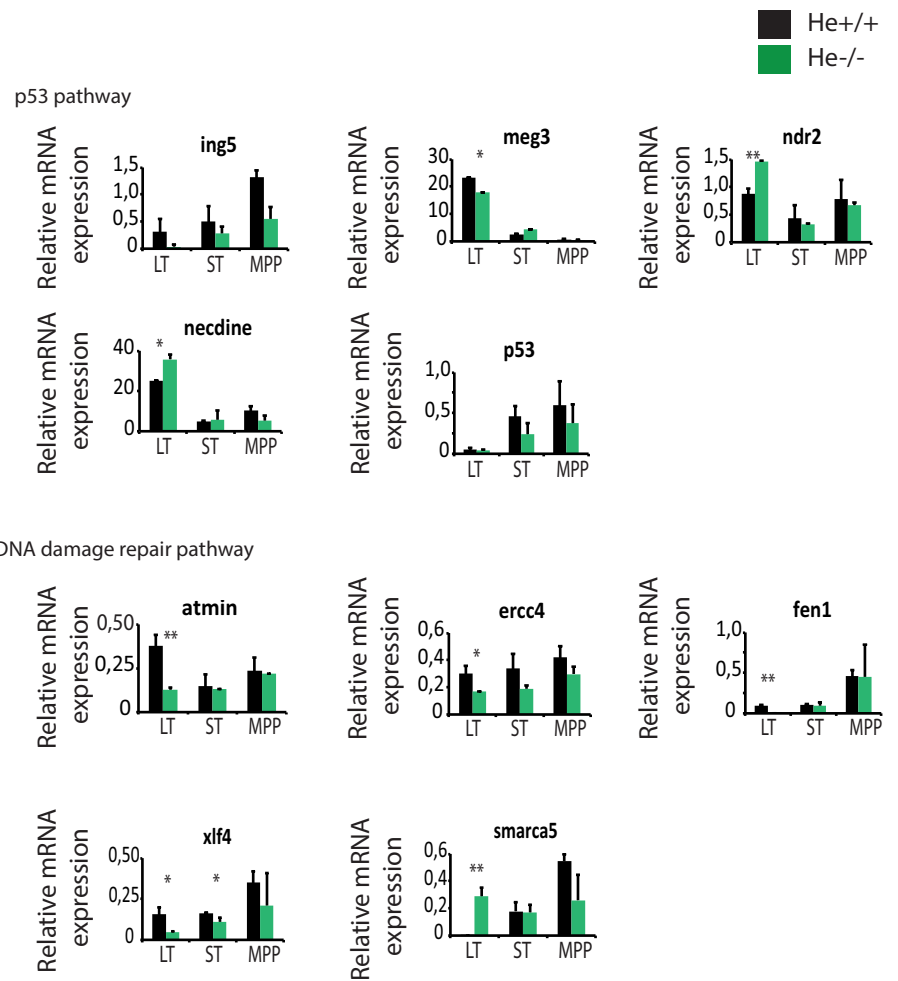


Figure 5: Helios^{-/-} LT-HSCs present a down-regulation of genes involved in DNA damage repair and a dysregulation of genes involved in p53 pathway.

A) Transcriptomic analysis of LT-HSCs, ST-HSCs and MPPs from 3 Helios^{+/+} and 3 Helios^{-/-} young mice. The cells were directly sorted in lysis buffer and submitted to RNA extraction. The clustering was done using the fuzzy C-means partitioned clustering method on the 5000 most variables genes among subgroups (selected by ANOVA).

B) Bar graph of genes with the annotation « DNA repair » present in the transcriptomic analysis in the top 200 genes down-regulated (left), top 200 up-regulated (middle) or randomly chosen (right) in Helios^{-/-} LT-HSCs. The statistical analysis then applied, determined that the 13 genes found in the top down-regulated genes in Helios^{-/-} LT-HSCs are statistically relevant.

C) Relative mRNA expression of genes found to be deregulated in Helios^{-/-} samples. Genes mRNA level were normalized to ubiquitin. Error bars show standard deviations of samples collected independently (n=2). * p<0.05, ** p<0.01 (student-test).

function. Smc2 (structural maintenance of chromosomes 2) belongs to the condensin complex which is required for chromosome condensation during mitosis. This down-regulation of genes involved in cell division may explain the proliferation phenotype observed in $He^{-/-}$ LT-HSCs (Figure 1F-G). Further analyses of the identity of the down-regulated genes show that those genes present a significant enrichment of genes associated with the Gene Ontology terms “DNA repair”, “DNA damage response”, or “DNA recombination” (Figure 5B).

Several among the top deregulated genes also appear to be involved in p53 responses. Meg3 encodes a non-coding RNA that interacts with and stabilizes p53. Meg3 is expressed at high level in $He^{+/+}$ LT-HSCs and turned off in ST-HSC and MPP (repressed >30 fold). This gene was expressed at slightly higher levels in $He^{-/-}$ LT-HSCs, and was not down-regulated as efficiently in ST-HSCs (Meg3 was among the few genes that was deregulated in $He^{-/-}$ ST-HSCs). Necdin encodes a protein belonging to the Melanoma Antigen family. It has been found to be important for maintaining quiescence under homeostatic conditions (Liu et al., 2009) and to be induced by p53 in LSK cells upon DNA damage (Asai et al., 2012). This gene was expressed at consistently lower levels in $He^{-/-}$ MPPs, and was among the few deregulated genes in this subset. Ndr2 (up 4 fold in $He^{-/-}$ LT-HSCs) is also a p53 target that has been shown to be involved in hypoxia-induced radio-resistance, and might protect cell from apoptosis by suppressing their growth. Finally, ing5, deregulated in $He^{-/-}$ LT-HSCs, encodes a chromatin regulator that interacts with complexes with H3 acetyltransferase activity. Ing5 has been shown to interact with p53, and synergizes with p53 for target gene activation. Altogether, these data suggest that p53 responses may be affected in $He^{-/-}$ HSCs.

We verified the expression level of some genes found in the microarray analysis by RT-qPCR (Figure 5C). We classified them in two categories: p53 pathway, DNA damage repair pathway. The results reveal that some genes involved in different pathway of DNA damage repair (atmin, ercc4, fen1, xlf4, smarca5) present a lower expression level in $Helios^{-/-}$ LT HSCs compared with wild type ones. Furthermore, $Helios^{-/-}$ cells present a deregulation of some genes involved in p53 pathway (ing5, meg3, ndr2), whereas the expression of p53 itself is not changed. Notably, necdin, is up-regulated in $Helios^{-/-}$ LT-HSCs. This could explain in part the reduced proliferative rate of $Helios^{-/-}$ HSCs at steady state of the hematopoietic system (Figure 1F-G).

Helios^{-/-} LSK cells have an impaired DNA damage response

Because He^{-/-} HSCs present a down-regulation of genes involved in different pathways of DNA repair or DNA damage responses, we asked whether these cells present defects in their ability to respond to DNA damage. We treated He^{-/-} and He^{+/+} sorted LSK cells with the radiomimetic agent neocarzinostatin (NCS) which induces single and double strand DNA breaks, or with inhibitors of topoisomerase I (camptothecin; CPT) or II (etoposide; ETP), which induce double strand DNA breaks. We followed the appearance and disappearance of γ H2AX foci (a marker of the damage response at DNA breaks) at various time points after the treatments (Figure 6, and supplementary Figure 7A for an independent experiment). We observed that the number of foci per nucleus is equivalent between He^{-/-} and He^{+/+} LSK cells after 30 min, and 3h. At 5h, the number of foci per nucleus decreased in both types of cells, but the He^{+/+} samples had cells which had already few foci, and even no foci with camptothecin treatment (Figure 6A-B and supplementary Figure 7A). Those cells repaired their DNA damage. In contrast, the He^{-/-} samples had cells which had retained a larger number of foci. After 10h, the differences between He^{-/-} and He^{+/+} samples were further accentuated. We then asked if this impaired response to DNA damage is also observed in vivo. We sub-lethally irradiated (6.5Gy) young He^{-/-} and He^{+/+} mice, and analyzed the γ H2AX foci in LSK cells sorted 3 and 10h after irradiation (Figure 6C and supplementary Figure 7B for an independent experiment). We found a statistically significant shift towards increased number of foci at 10h in the He^{-/-} cells. These results show that HSCs which lack Helios retain γ H2AX foci longer both in vitro and in vivo. Nevertheless, we cannot exclude the fact that the differences observed are due to an impaired signaling of γ H2AX.

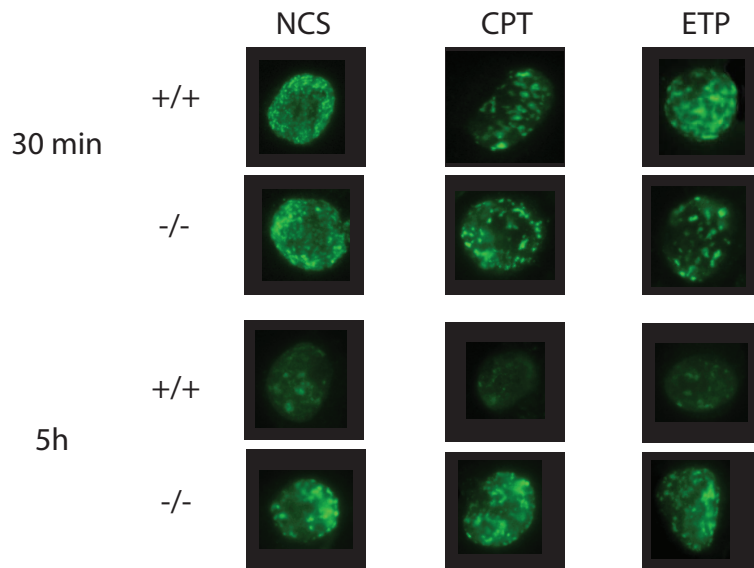
Because we found that Helios promotes the aging of HSCs, we asked whether HSCs from old Helios^{-/-} LSK cells accumulate more DNA damage than those from He^{+/+} mice (Figure 6D). However, there was no difference in the number of foci present in both types of cells.

Helios regulates the p53 dependent responses of HSCs upon DNA damage

P53 is a key regulator of some behavior of several important biological processes in HSCs: their quiescence, their responses upon DNA damage and their aging (Bondar et al., 2010, Liu et al., 2009, Tyner et al., 2002). We found that Helios promotes the aging of mice (Figure 4). Furthermore, we also found that Helios^{-/-} HSCs exhibit dysregulation of several

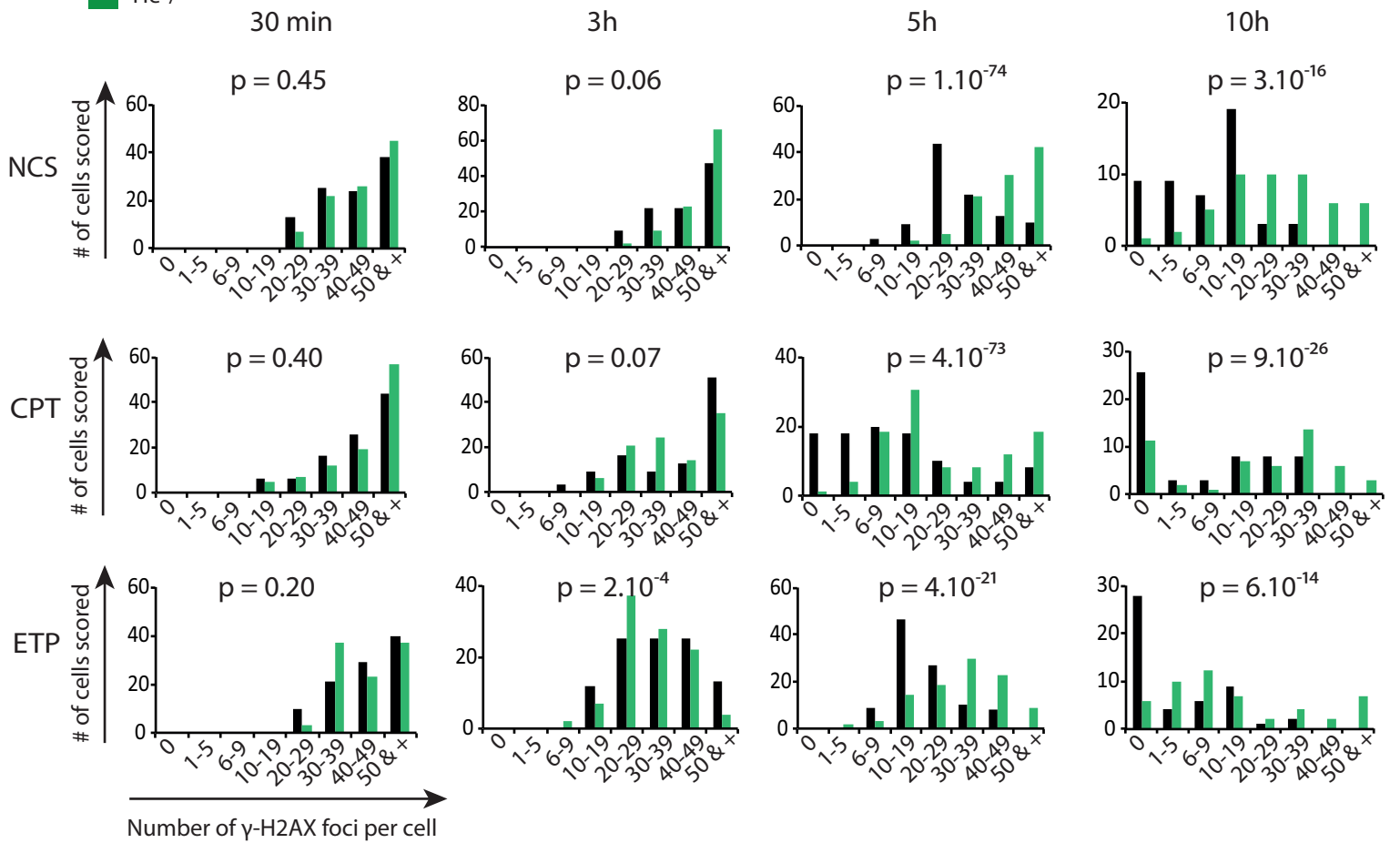
Figure 6: Helios^{-/-} LSK cells have an impaired DNA damage response

A.

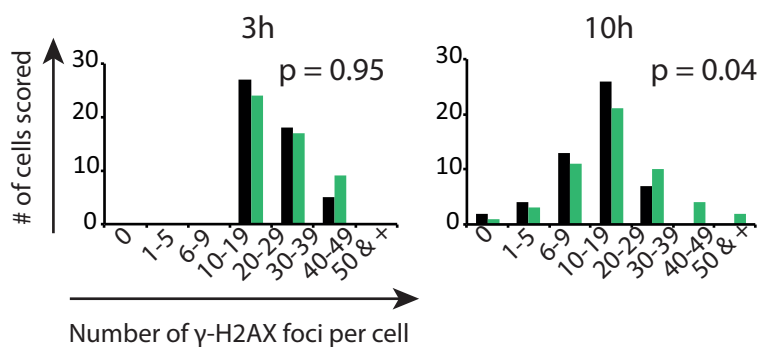


B.

■ He^{+/+}
■ He^{-/-}



C.



D.

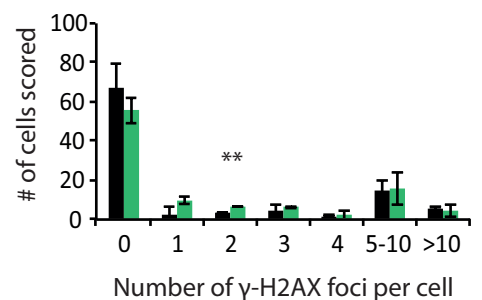


Figure 6: Helios^{-/-} LSK cells present defects in γ H2AX signaling

Immunofluorescence of γ H2AX in LSK cells from Helios^{+/+} and Helios^{-/-} mice. Cells were sorted, precultured for 24 hours and treated with neocarzinostatin (NCS) (500ng/ml), camptothecin (CPT) (10 μ M), or etoposide (ETP) (100 μ M). Immunostaining of γ H2AX was then performed at indicated time points.

A) Representative immunofluorescence stainings of γ H2AX at indicated time points.

B) Quantification of numbers of γ H2AX foci per nucleus at indicated time points and treatments. Representative results from 2 independent experiments. P values come from “Chi-deux” statistical test.

C) Quantification of numbers of γ H2AX foci per nucleus of LSK cells from irradiated mice. Mice were sub-lethally irradiated at 6.5 Gy. Three hours and 10 hours after irradiation, LSK cells were sorted and immunostained for γ H2AX. Representative results from 2 independent experiments. P values come from “Chi-deux” statistical test.

D) Quantification of numbers of γ H2AX foci per nucleus of sorted LSK cells from 2-year-old Helios^{+/+} and Helios^{-/-} mice. Error bars show standard deviations of samples collected independently (n=2).

Supplemental figure 7: Helios^{-/-} LSK cells have an impaired DNA damage response

A.

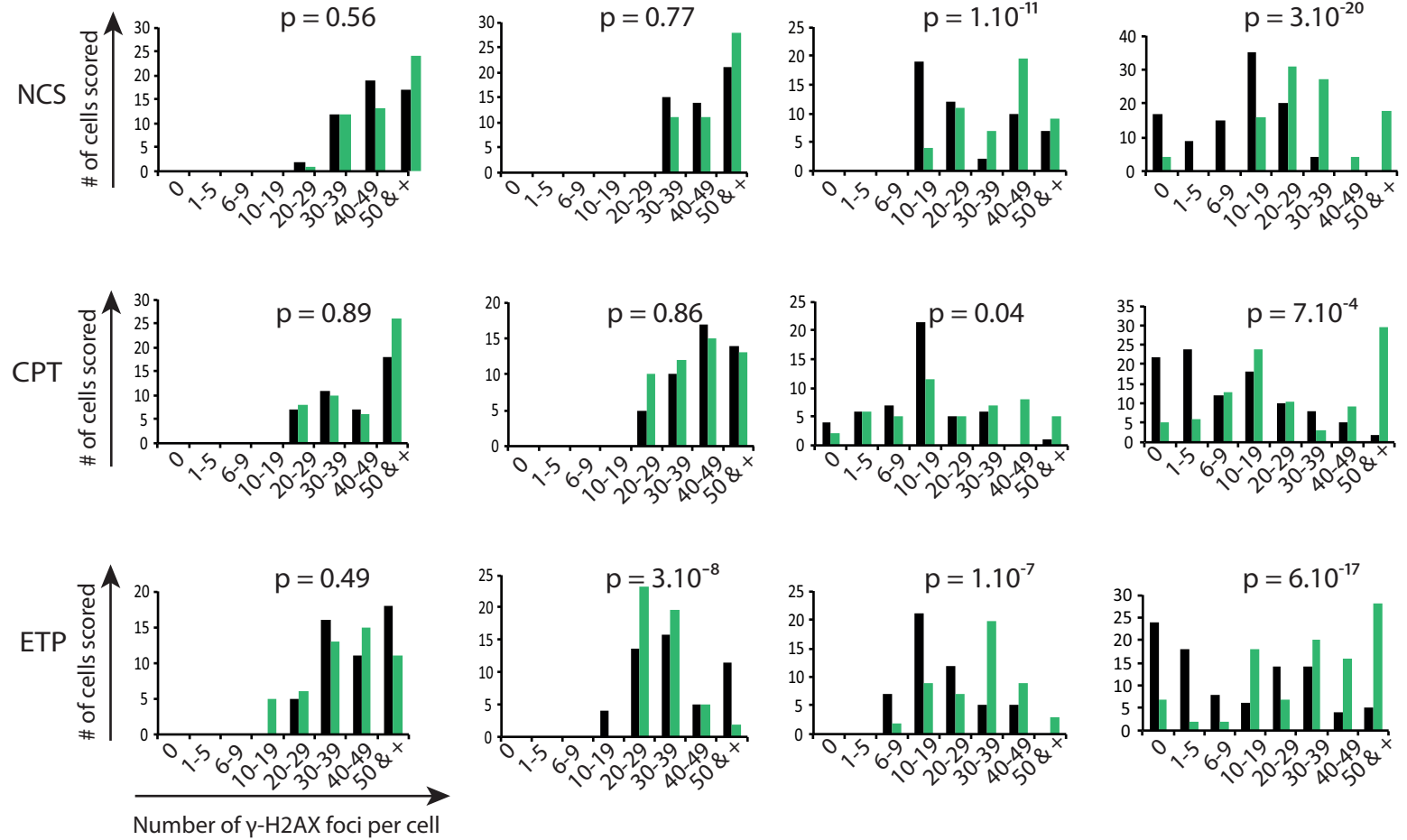
■ He^{+/+}
■ He^{-/-}

30 min

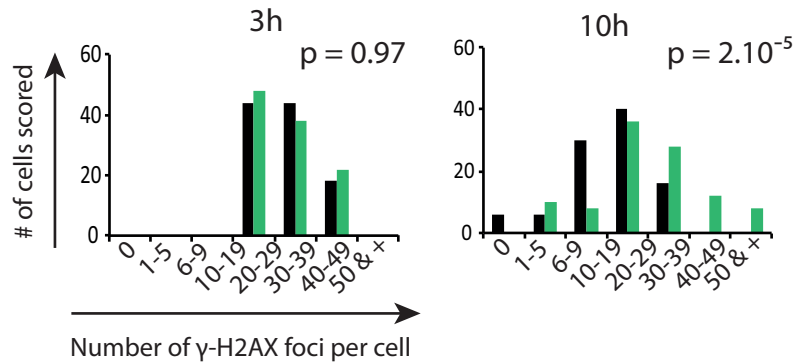
3h

5h

10h



B.



Repeat experiments of γ H2AX staining presented in Figure 6B-C

A-B. Quantification of numbers of γ H2AX foci per nucleus at indicated time points of NCS, or CPT, or ETP-treated LSK cells A), and of LSK cells from irradiated mice (6.5 Gy) B). P values come from "Chi-deux" statistical test.

genes involved in the p53 pathway and notably necdin which regulates HSC quiescence (Figure 5C). Our above results show that loss of Helios leads to increased numbers of functional HSCs during serial transplantations and aging, which are features that were also previously observed in p53^{+/-} mice (Figure 3, supplementary Figure 3 and Bondar et al., 2010). We therefore reasoned that Helios could regulate the p53 dependent responses of HSCs. Upon a genotoxic stress, p53 is stabilized and activated, which leads to three possible outcomes; the arrest of the cell cycle, the entry into apoptosis and the entry into senescence.

We first asked whether Helios is involved in p53 dependent-cell cycle arrest and apoptosis. We challenged He^{-/-} and He^{+/+} LSK cells with NCS, CPT, or ETP. The analysis of the survival with Topro3 staining revealed that NCS-treated He^{-/-} LSK cells survive better to the treatment than He^{+/+} cells (Figure 7A). The analysis of the apoptotic rate of treated LSK cells indicated that He^{-/-} LSK cells exhibit a significant reduced percentage of early apoptotic cells and a higher percentage of living cells compared with He^{+/+} LSK cells (Figure 7B). We then asked if the proliferation of LSK cells is affected after DNA damage. To test this, we treated LSK cells with various doses of NCS, and cultured them with a cocktail of cytokines known to support the proliferation of hematopoietic stem/progenitor cells. Five days later, we counted and sorted LSK cells, and replated for 5 additional days (Figure 7C). We found that the He^{-/-} LSK cells proliferate more than He^{+/+} cells after treatment with 5ng/ml and 0.5ng/ml of NCS. The analysis of the apoptotic rate of NCS-treated He^{-/-} and He^{+/+} LSK cells (with 5ng/ml and 0.5ng/ml of NCS) 18 hours after treatment showed no significant differences between He^{-/-} and He^{+/+} cells (not shown). These data suggest that Helios regulates the arrest of the proliferation and the survival of HSCs upon DNA damage.

To investigate the underlying mechanisms, we performed a transcriptomic analysis of NCS-treated and not treated ST-HSCs from He^{-/-} and He^{+/+} mice. We found that the NCS-treated He^{-/-} cells present a down-regulation of p53 dependent-DNA damage induced genes (green circle) compared to NCS-treated He^{+/+} cells (Figure 7D). Notably, RT-qPCR performed 4h after NCS treatment of ST-HSCs showed that p21 (anti-proliferative gene), puma and noxa (pro-apoptotic genes), which are direct target genes of p53, were less strongly expressed in He^{-/-} cells compared with He^{+/+} (Figure 7E). Interestingly, the expression of puma was already down-regulated in He^{-/-} LSK cells in the absence of treatment. The expression of p53 is however not affected by the deletion of Helios (Figure 7E). Together, these data show that He^{-/-} survive better and proliferate more than He^{+/+} LSK cells after DNA damage via, at least in part, the regulation of direct target genes of p53.

Figure 7: Helios regulates the p53 dependent responses of HSCs upon DNA damage

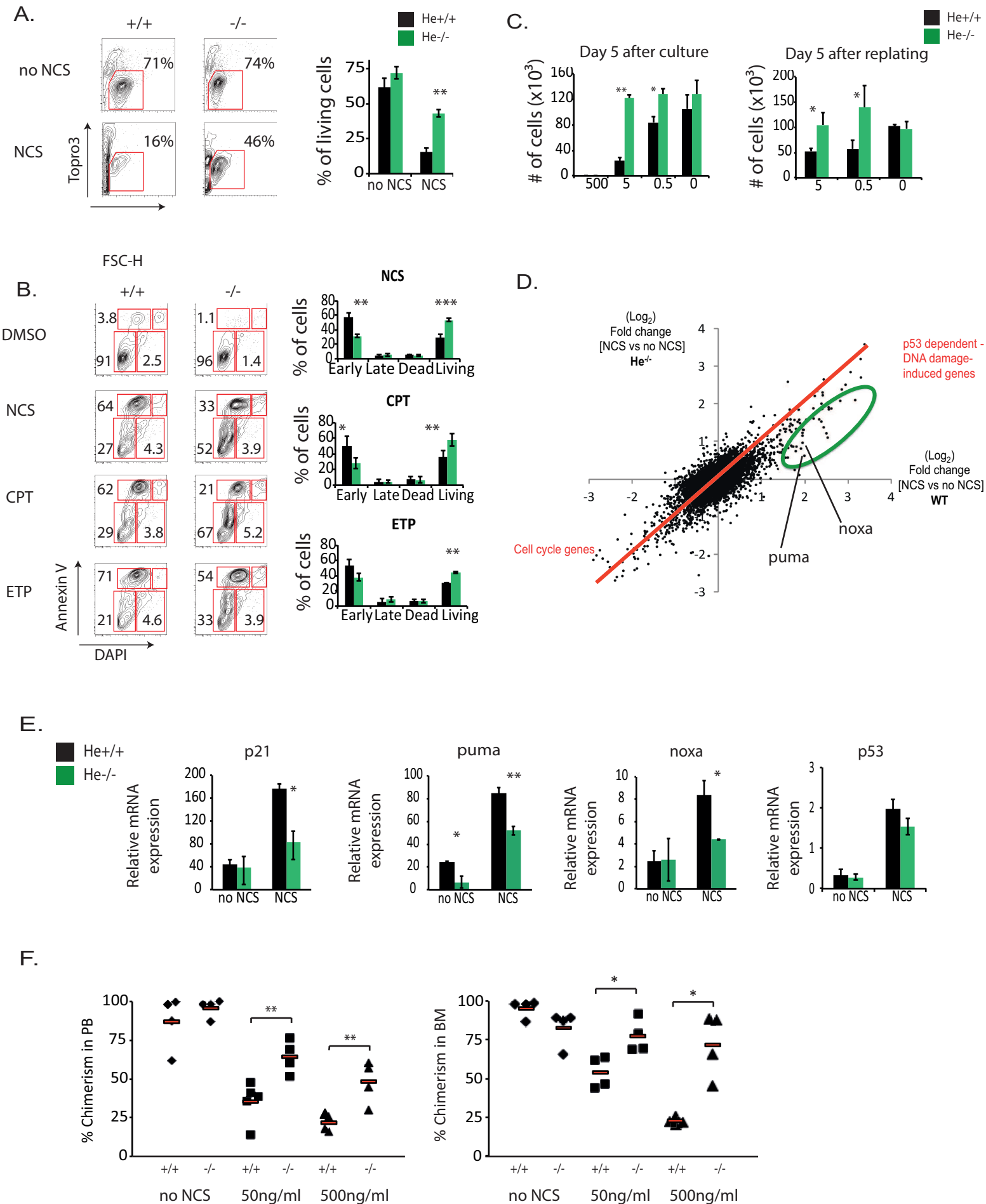


Figure 7: Helios regulates the p53 dependent responses of HSCs upon DNA damage

A) Topro3 staining of NCS-treated LSK cells 24 hours after treatment. Representative flow cytometry profile (left panels) and summary of the percentage of living cells (right panel), $n > 10$ (** $p < 0.01$).

B) Annexin V and DAPI stainings 18 hours after NCS, or CPT, or ETP treatment of precultured LSK cells. Flow cytometry profiles of representative Annexin V and DAPI stainings (left panels), and summary of the percentage of early apoptotic cells (Annexin V+ DAPI-), of late apoptotic cells (Annexin V+ DAPI+), of dead cells (Annexin V- DAPI+), and of living cells (Annexin V- DAPI-) (right panels), ($n = 3$).

C) Cell counting of LSK cells treated with different doses of NCS (500ng/ml, 5ng/ml, 0.5ng/ml, and no NCS) after their culture for 5 days (left panel) and after their replating for 5 more days (right panel) $n = 2$. Cell counting was performed by trypan blue exclusion.

D) Transcriptomic analysis of ST-HSCs pooled from 2 Helios^{+/+} mice or 2 Helios^{-/-} mice and then treated or not with NCS. Four hours after treatment, cells were harvested, lysed and submitted to RNA extraction. The clustering was done using the fuzzy C-means partitioned clustering method on the 5000 most variables genes among subgroups (selected by ANOVA). Results shown are from samples prepared two times independently.

E) Quantitative RT-PCR of p53 and genes found to be deregulated in NCS-treated Helios^{-/-} samples compared with NCS-treated Helios^{+/+} samples and performed 4 hours after treatment. Genes mRNA level were normalized to ubiquitin. Error bars show standard deviations of samples collected independently ($n = 2$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (student-test).

F) Chimerism in peripheral blood (left panel) and in bone marrow (right panel) from recipient mice, six months after transplantation with NCS-treated LSK cells. Results are representative from 2 independent experiments, $n = 5$ per group, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

During aging and serial transplantations, there is an accumulation of mutations in the DNA of HSCs which accounts for the decrease of reconstitution potential of WT HSCs (Rübe et al., 2011, Yahata et al., 2011). The fact that Helios null HSCs proliferate more and survive better upon DNA damage could therefore explain why these cells maintain their activity longer. To test this hypothesis, we performed a competitive transplantation assay where we injected into recipient mice 2.10^5 competitive BM cells together with 500 LSK cells, which were beforehand treated or not with 500ng/ml or 50ng/ml of NCS (Figure 7F). The analysis of the percentage of chimerism in the blood and BM showed that upon NCS treatment, the potential of reconstitution of $He^{-/-}$ and $He^{+/+}$ HSCs decreased. However, this percentage decreased much less in recipient mice which received $He^{-/-}$ cells.

In conclusion, these results show that Helios regulates the proliferation and entry into apoptosis of HSCs upon DNA damage. This leads to a higher reconstitution potential upon DNA damage.

Helios^{-/-} LSK cells exhibit a delayed entry into senescence

Because we found that Helios regulates the p53-dependent apoptosis and proliferation arrest of LSK cells after DNA damage, we tested if Helios is also involved in the entry into senescence. A senescent cell is a cell which irreversibly stops to proliferate and expresses different anti-proliferative genes like p16, p19, p21, p27, and the p53 target gene e2f7 (Wang et al., 2006, Aksov et al., 2012). It is known that senescence can be induced in vitro after several replatings, and that DNA damage accelerates entry into senescence (Wang et al., 2006). We treated or not sorted LSK cells with 10ng/ml of NCS, labelled them with CFSE and put them in culture. Five days later we counted cells, analyzed their CFSE staining. In parallel, we sorted LSK cells, labelled them with CFSE, and replated them for 5 additional days. We performed 3 such replatings (Figure 8, and supplementary figure 8 for independent experiment). We observed that, in both conditions, $He^{-/-}$ HSCs proliferate more upon replating than $He^{+/+}$ HSCs, as shown with the CFSE staining and the counting of cells (Figure 8A-B and supplementary figure 8A). At the end of first replating, in NCS-treated condition, $He^{-/-}$ cells proliferate already more than $He^{+/+}$ cells (Figure 8B). Interestingly, after the third replating, NCS-treated $He^{+/+}$ sample present cells which stop their proliferation. This is not observed in $He^{-/-}$ sample (Figure 8A and supplemental figure 8A). The SA- β galactosidase staining confirms that $He^{+/+}$ sample start to present cells which entered into senescence before the $He^{-/-}$ sample; they are positive for the SA- β galactosidase staining (Figure 8C). Indeed,

Figure 8: Helios^{-/-} LSK cells present a delay in their entry into senescence

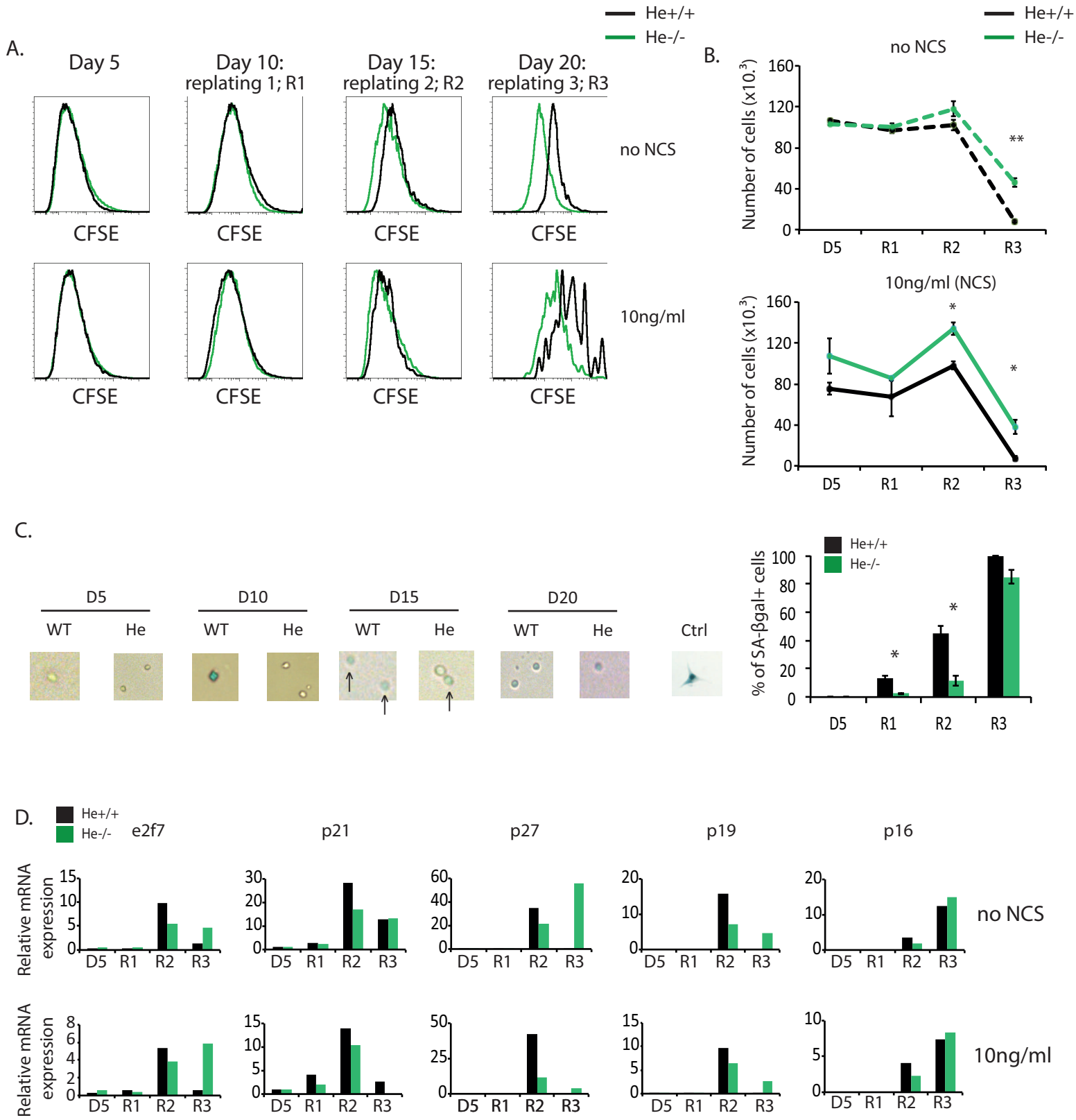


Figure 8: Helios^{-/-} LSK cells present a delay in their entry into senescence

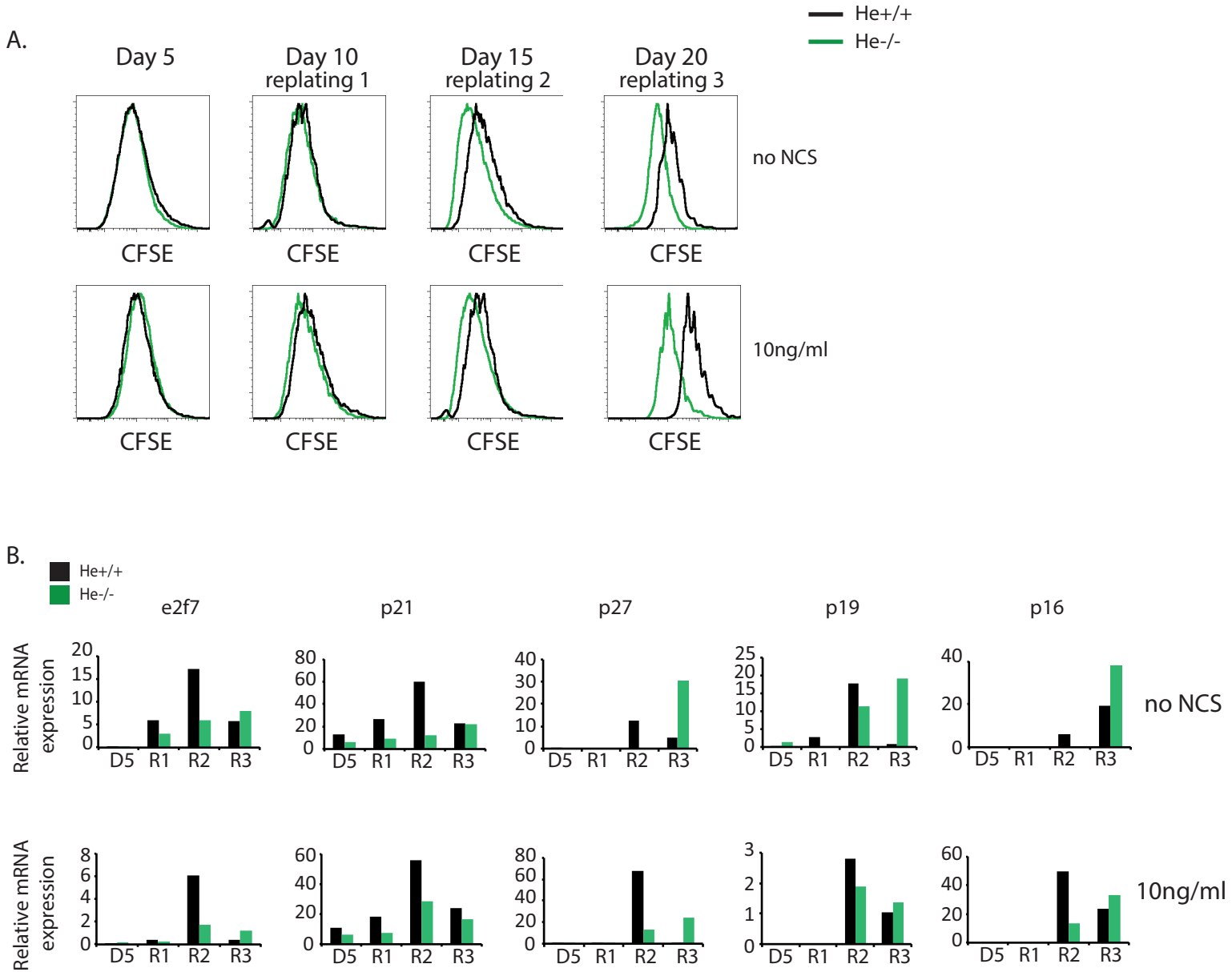
A) CFSE dilution assay in NCS-treated LSK cells from Helios^{+/+} and Helios^{-/-} mice in serial replating.

B) Cell counting of NCS-treated LSK cells at the end of each culture in serial replating, n=3. Cell counting was performed by trypan, blue exclusion.

C) Example of pictures for SA-β galactosidase activity (left panel), and quantification of SA-β galactosidase positive cells (right panel). At the end of each culture, NCS-treated cells were harvested and stained to reveal SA-β galactosidase activity. Control is a replicative senescent fibroblast.

D) Quantitative RT-PCR of senescent genes in LSK cells subjected to replatings. Sorted LSK cells were put in culture for 5 days. At the end of a culture, LSK cells were sorted and replated for 5 more days. Three replatings were performed. An aliquot of cells was used for gene expression analyses. Genes mRNA level were normalized to HPRT. Results are representative from 2 independent experiments.

Supplementary figure 8: Helios^{-/-} cells present a delay in their entry into senescence



Second experiments shown in Figure 8

A. CFSE dilution assay in NCS-treated LSK cells from Helios^{+/+} and Helios^{-/-} mice in serial replating

B. Quantitative RT-PCR of senescent genes in LSK cells subjected to replatings. Genes mRNA level were normalized to HPRT.

He^{+/+} sample present already an average of 12% of SA-βgalactosidase positive cells as early as after the first replating, compared to 2% in He^{-/-} sample. After the second replating, the percentage of SA-βgalactosidase positive cells increase in both samples, but whereas He^{+/+} sample had already around 45% of SA-βgalactosidase positive cells, He^{-/-} sample present only 10% of SA-βgalactosidase positive cells (Figure 8C). After the third replating, almost all He^{-/-} and He^{+/+} cells are positive for the SA-βgalactosidase staining.

We also analyzed the expression of senescence-associated genes after each replating (Figure 8D and supplementary Figure 8B for independent experiment). The results show that all the senescence-associated genes studied start to be expressed after the second replating in He^{-/-} and He^{+/+} HSCs, except for p21 which starts to be expressed after the first culture. After the second replating, whereas He^{+/+} HSCs have a high expression of all the “senescence genes”, He^{-/-} HSCs expressed these genes at lower levels, in both conditions. After the third replating, He^{-/-} cells express more e2f7, p27 and p19 than He^{+/+} cells and they express p21 and p16 at the same level as He^{+/+} HSCs. These differences in the expression of “senescence genes” are consistent with the delayed entry into senescence of He^{-/-} HSCs.

Taken together, these results show that He^{-/-} HSCs present a delayed entry into senescence, associated with a delay in the expression of “senescence genes”. Thus, third mechanism regulated by p53 upon DNA damage is also affected in the Helios deficient HSCs.

Helios acts in synergy with p53

Our results show that Helios regulates several behaviors of HSCs similarly to p53, suggesting that Helios synergies with p53 to regulate the DNA damage responses.

To verify our hypothesis, we first asked whether p53 is well activated in Helios null HSCs. We analyzed p53 expression and phosphorylated on sorted LSK cells by Western blot 1 hour after NCS treatment (Figure 9A). There were no differences in the induction of phosphorylated p53 and the stabilization of p53 itself between He^{-/-} and He^{+/+} HSCs. Because p53 expression and activation is not modulated by the loss of Helios, we reasoned that Helios could co-regulate with p53 some genes like p21, or puma. To test this hypothesis, we crossed Helios and p53 mice. We analyzed the viability and the expression of p21 and puma after NCS treatment of sorted LSK cells from all combinations of He and p53 null mutant allele mice (Figure 9B-C and D). Strikingly, we found that NCS-induced death was strongly impaired in LSK cells from compound heterozygote He^{+/-}p53^{+/-} mice, while it was similar to WT for cells from single heterozygotes (He^{+/-} or p53^{+/-}). Indeed, survival to NCS treatment

Figure 9: Helios acts in synergy with p53

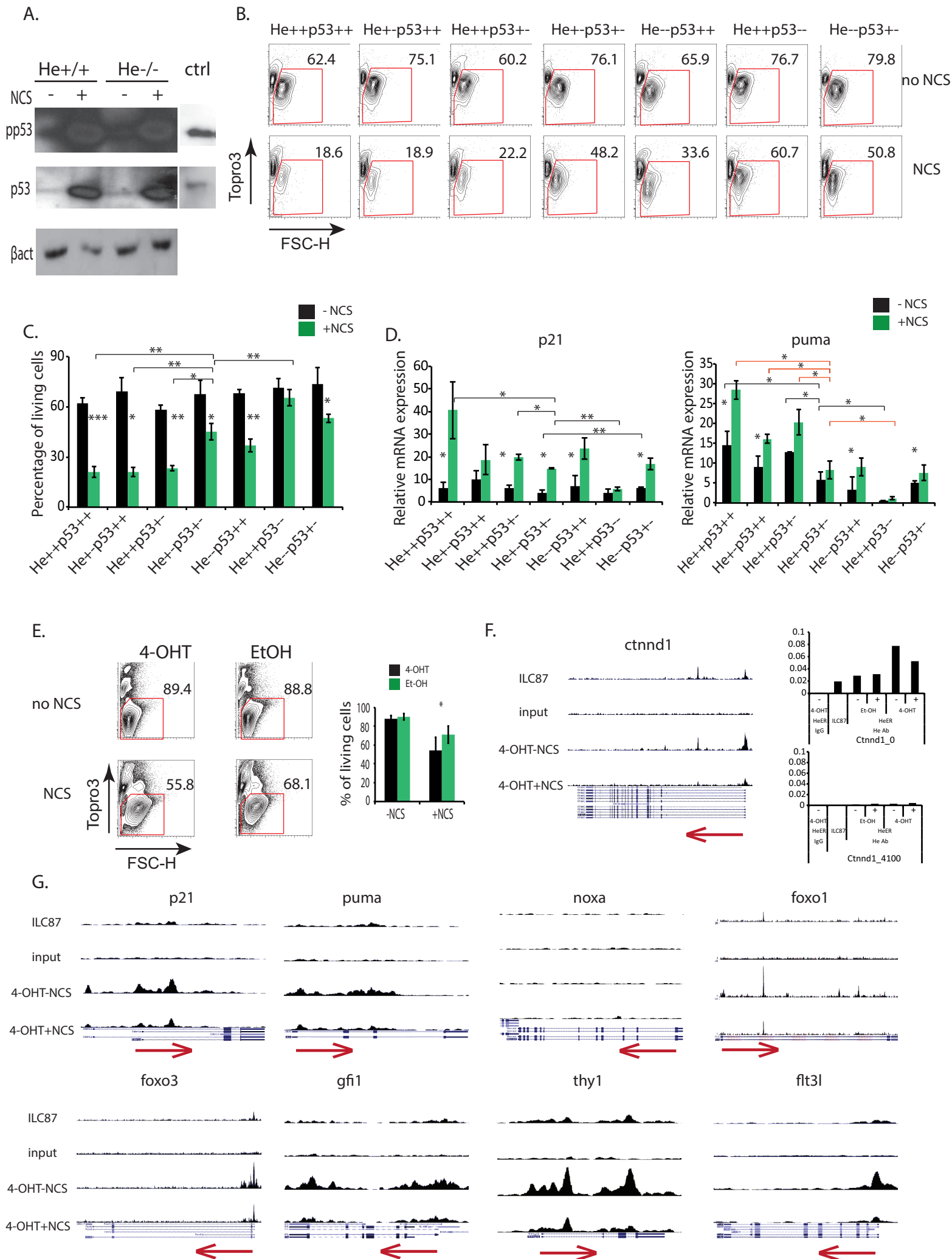


Figure 9: Helios acts in synergy with p53

A) Western blot on total extract of Helios^{+/+} and Helios^{-/-} LSK cells treated or not with NCS (1 hour after treatment) using antibodies against phosphorylated p53 (serine 15), and p53. B-actine was detected as a loading control. Protein extraction of BHEJ cell line which overexpressed phosphorylated p53 was used as positive control. Representative results of experiment done 2 times independently.

B) Topro3 staining of NCS-treated LSK cells from indicated genotype 18 hours after treatment. Representative flow cytometry profiles of three independent experiments.

C) Summary of the percentage of living cells measured by Topro3 staining. Error bars are standard deviation of three independent experiments (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

D) Quantitative RT-PCR of p53 target genes 4 hours after treatment. Genes mRNA level were normalized to ubiquitin. Error bars show standard deviations of samples collected independently (n≥2), * p<0.05, ** p<0.01 (student-test).

E) Flow cytometry profiles of 4-OHT or ethanol-treated ILC87 He-ER stained with Topro3, 18 hours after NCS treatment (left panel). Summary of the percentage of living cells measured by Topro3 staining (right panel). Error bars are standard deviation of five independent experiments (*p<0.05).

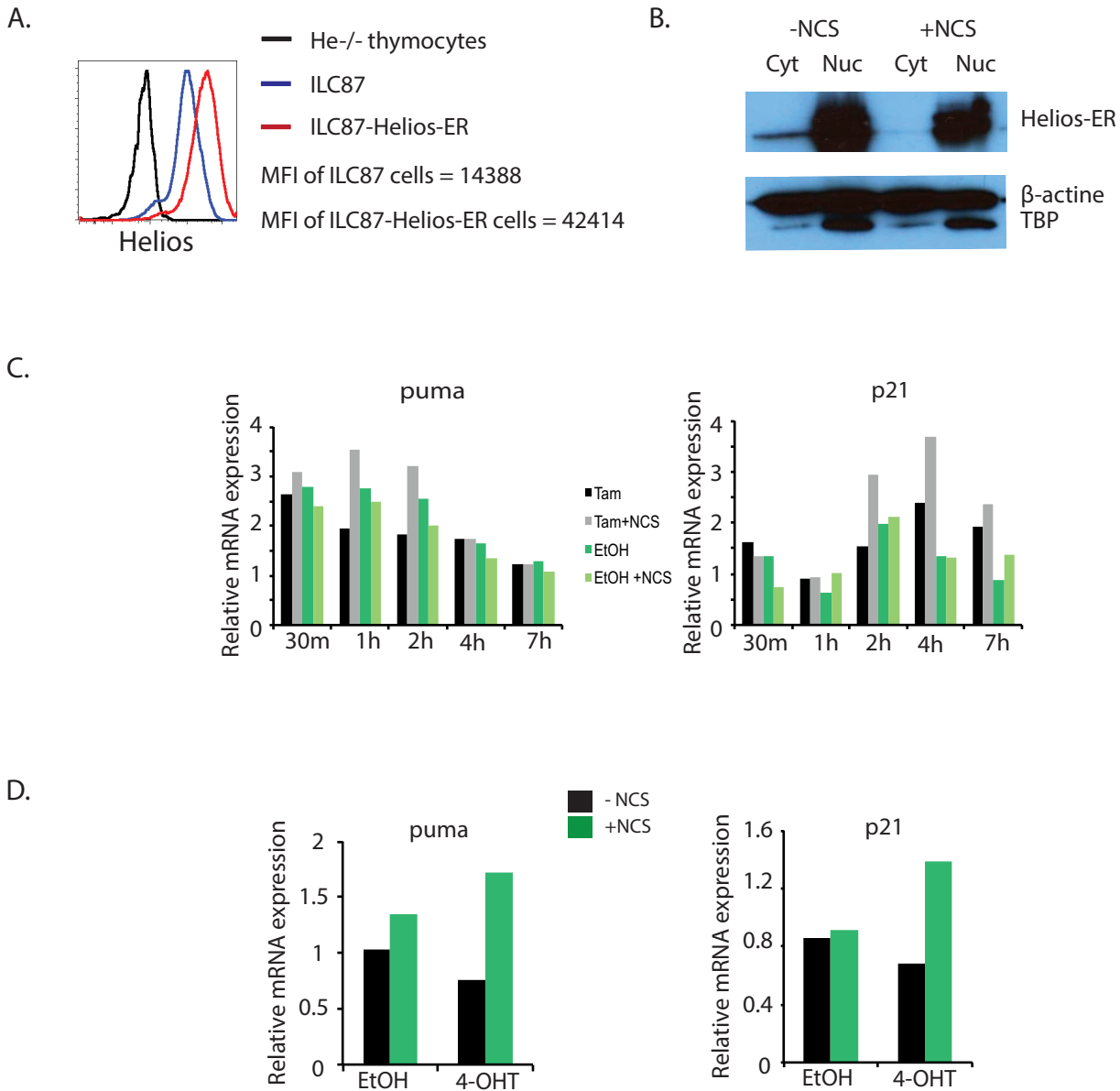
F) ChIP-seq analysis of Helios binding in *ctnnd1* loci from NCS-treated ILC87 He-ER cells beforehand treated with 4-OHT, and ILC87 cells subjected to ChIP-seq with anti-Helios. Helios pic on the promoter of *ctnnd1* (left panel). Q-PCR, on DNA eluted from NCS-treated ILC87 He-ER (He-ER) cells beforehand treated with 4-OHT or Et-OH, and from ILC87 cells subjected to ChIP-seq with anti-Helios (He Ab) or IgG control (IgG), was performed with primers of the promoter region of *ctnnd1* (*ctnnd1_0*), and an intragenic region of *ctnnd1* (*ctnnd1_-4100*). Q-PCR results are relative to the input.

G) ChIP-seq analysis of Helios binding in different loci from NCS-treated ILC87 He-ER cells beforehand treated with 4-OHT, and ILC87 cells subjected to ChIP-seq with anti-Helios antibody. Red arrows show the reading sense of the indicated gene.

was similar for He^{+/-}p53^{+/-} and He^{-/-}p53^{+/+} LSK cells. NCS-induced expression of puma was also nearly abrogated in the He^{+/-}p53^{+/-} LSK cells, while it was moderately decreased in single heterozygote cells. Puma expression was also significantly reduced in the absence of NCS treatment in He^{+/-}p53^{+/-} cells, indicating that both Helios and p53 contribute to its steady-state expression. We also analyzed p21 expression. In contrast to puma, p21 expression was not affected by the combined loss of Helios and p53 alleles, even though single heterozygotes already displayed an impaired induction of this gene. These results demonstrate that Helios and p53 acts in synergy to regulate the DNA damage responses of HSCs and a subset of the p53 target genes like p21 and puma.

We then reasoned that Helios could directly target a subset of p53 target genes. It was however not possible to perform a chromatin immunoprecipitation-sequencing experiment (ChIP-seq) for Helios in LSK cells due to the limited abundance of these cells. We therefore sought a surrogate cellular system. We used ILC87 T-cell leukemia cell line in which we overexpressed a fusion protein between Helios and the ligand binding domain of the estrogen receptor (ER), whose activity can be induced by the ER ligand 4-hydroxy tamoxifen (4-OHT). These cells express endogenous Helios, but markedly higher levels of the exogenous fusion protein (supplementary figure 9A). We first asked if Helios modulates NCS-induced cell death in this system (Figure 9E and supplementary figure 9). In parallel, we verified by Western Blot the efficiency of the translocation of Helios-ER after 4-OHT treatment (supplementary figure 9B). We found that the ethanol-treated cells survive better after NCS treatment than the 4-OHT-treated cells (Figure 9E). This phenotype is consistent with the one observed in Helios deficient LSK cells, and suggest that the Helios-dependent response to DNA damage is conserved between LSK and ILC87 cells. Furthermore, the ethanol-treated cells expressed less puma and p21 upon NCS treatment compared to 4-OHT-treated cells (supplemental figure 9C and D). We thus used the ILC87-He-ER cells to investigate the genomic Helios binding profile by ChIP-seq. Since the kinetic of expression of puma and p21 upon NCS treatment showed a maximal induction at 2h after treatment, we performed the ChIP-seq experiment on 4-OHT-treated cells and ethanol-treated cells at this time point (Figure 9F and G). The results showed that the ILC87 samples present binding of Helios on different genes presented, and ILC87-He-ER samples present an enrichment of Helios binding to its targets compared to ILC87 cells. The NCS-treated cells show global decrease of the scale of Helios binding to its targets (Figure 9F and G). The results show also that Helios binds to 2793 regions. Among them, Helios binds to 356 promoter regions of different genes like: Ctnnd1 (catenin cadherin-associated protein delta 1) (Figure 9F left panel). We verify by

Supplementary figure 9: The Tamoxifen-treated ILC87 Helios-ER cells induce more puma and p21 expression upon DNA damage than EtOH-treated ones



A. Intracellular level of Helios in ILC87 cells, ILC87-Helios-ER cells, and in He^{-/-} thymocytes as control. Representative results from 2 independent experiments. MFI: Mean fluorescence intensity

B. Western Blot showing the translocation of Helios-ER into the nucleus. Western Blot was performed on cytoplasmic (Cyt) and nuclear (Nuc) extracts of ILC87-Helios-ER cells, 48 hours after 4-OHT treatment, with antibodies against Helios, β-actine and TBP.

C. Kinetic of expression of puma and p21 genes on NCS-treated ILC87-Helios-ER cells beforehand treated with 4-OHT or vehicle during 48 hours. Genes mRNA level were normalized to ubiquitin.

D. RT-qPCR of puma and p21 two hours after NCS treatment of ILC87-Helios-ER beforehand treated with 4-OHT or vehicle during 48 hours used for ChIP experiment. Genes mRNA level were normalized to ubiquitin.

real time-PCR the binding of Helios on the promoter of *ctnnd1* (Figure 9F right panel). Helios seems to bind also to the promoter of other genes like *bbc3* (*puma*), *foxo3*, *gadd45a*, *thy1*, *flt3l*, *cdkn2a* (*p16*) and *foxo4* (not shown), and to the promoters of some isoforms of different genes like *cdkn1a* (*p21*), and *gfi1*. Then, these results suggest that Helios regulates directly the expression of *p21* and *puma*, plus other *p53* target genes like *gadd45a* and *gfi1*. Nevertheless, Helios does not bind to *noxa* and *neclin* genes (Figure 9F and not shown). Then, the dysregulation of the expression of these genes observed in *Helios*^{-/-} HSCs is an indirect effect of the deficiency of Helios. The results showed also that Helios bind to 1058 intron regions of different genes like *foxo1* and *flt3* (not shown). Helios could help to the regulation of the expression of these genes. Altogether, these results suggest that Helios can bind to genes involved in HSCs differentiation, survival, oxidative stress, and proliferation. Nevertheless, this experiment needs to be repeated, and the binding of Helios on these potential target genes needs to be verified by qPCR first, and then verified by ChIP experiment on LSK cells.

Altogether these data suggest that Helios acts in synergy with *p53* to regulate the DNA damage responses of HSCs, and share with *p53* the regulation of some key genes like *p21* and *puma*.

Résultats complémentaires

Dans cette partie, je présente des résultats et expériences qui formeront la dernière figure de l'article.

Mes recherches sur le rôle de Helios dans les CSH montrent que Helios agit en synergie avec p53 pour réguler les réponses aux dommages de l'ADN. Notamment, Helios permet l'entrée en apoptose et l'arrêt de la prolifération des CSH après induction de dommages à l'ADN, qui sont des mécanismes de protection des cellules contre l'apparition de mutations potentiellement oncogéniques. Ma dernière grande question est donc de savoir si la perte de Helios permet d'accélérer l'apparition de mutations oncogéniques et par conséquent de tumeurs chez les souris.

Les souris $He^{-/-}$ ne développent pas spontanément de tumeurs. Il est possible que ces souris, qui ne vivent que 2 ans, n'aient pas le « temps » de développer des tumeurs, d'autant plus qu'elles ne subissent aucun évènement mutagène extérieur dans leurs conditions d'élevage. Pour répondre à ma question, j'ai donc irradié des souris $He^{+/+}$ et $He^{-/-}$ à 6.5 Gy trois fois, à 6 et 4 mois d'intervalle. J'ai ensuite suivi la mortalité de ces souris, ainsi que l'apparition de signes de maladie (isolement, déplacements ralentis, mutilation). Dès l'apparition de ces signes, les souris ont été analysées. La Figure 10A présente la courbe de survie des deux expériences que j'ai réalisées.

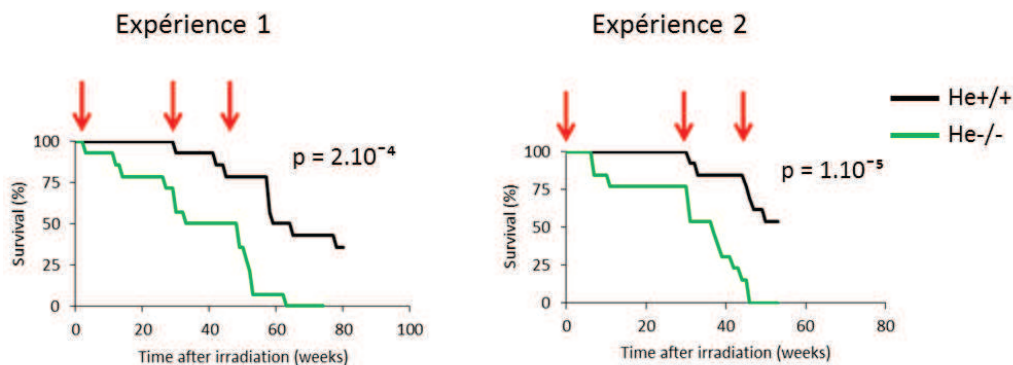


Figure 10A : Courbe de survie de souris $He^{+/+}$ et $He^{-/-}$ irradiées à 6.5 Gy

Quatorze ou douze souris de chaque génotype ont été respectivement irradiées à 6.5 Gy trois fois, à 6 et 4 mois d'intervalle, pour la première et la deuxième expérience respectivement. Les flèches indiquent les irradiations effectuées.

Les résultats montrent que les souris $He^{-/-}$ meurent de manière significative plus rapidement que les souris $He^{+/+}$. Après la deuxième et la troisième irradiation, les souris $He^{+/+}$ meurent d'anémie avant le 14^{ème} jour après l'irradiation, et ceci plus que les souris $He^{-/-}$. En

effet, 15% des souris Helios^{+/+} meurent d'anémie pour les deux expériences après chaque irradiation. Au contraire, les souris He^{-/-} ne sont pas mortes d'anémie lors de la première expérience, et 7% en sont mortes dans la deuxième expérience après chaque irradiation. Les CSH de ces souris n'ont pas réussi à reconstituer le système hématopoïétique après irradiation.

Les souris qui ont présenté des signes de faiblesses n'ont pour certaines pas développé de leucémies ou de lymphomes (environ 20 à 25% des souris irradiées). A l'inverse, certaines souris qui ne présentaient aucun signe de maladie sont mortes subitement (environ 40%). Pour d'autres, les signes de maladie ont corroboré avec le développement de lymphomes de type T CD4⁺ ou CD8⁺, tel que présenté dans la Figure 10B.

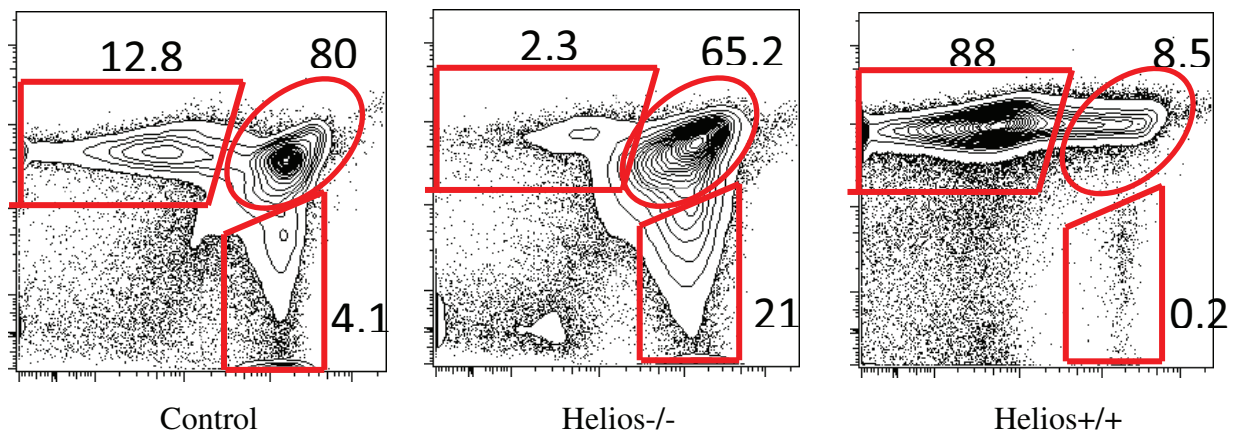


Figure 10B : Profils de cytométrie en flux de thymus de souris irradiées malades.

Ces résultats suggèrent donc que les souris He^{-/-} accumuleraient des mutations oncogéniques après irradiation, et développeraient des lymphomes. Au contraire, les souris He^{+/+} qui accumulent des mutations dues à l'irradiation mourraient de lymphomes, mais aussi d'anémie. Leurs CSH ne sont alors plus fonctionnelles. Cependant, le manque de données ne permet pas de conclure sur la cause de la mort de toutes les souris He^{-/-} et He^{+/+}.

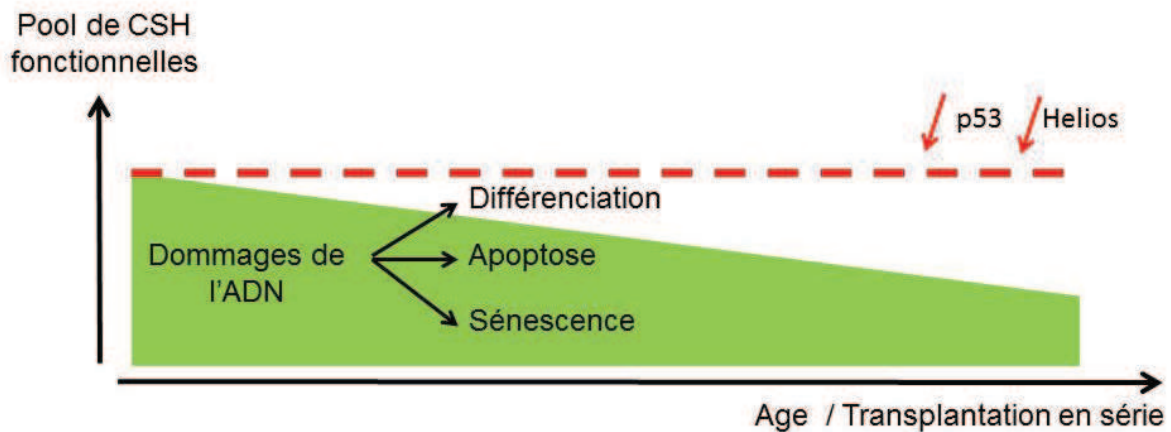
Pour tester si les souris He^{-/-} accumulent plus de mutations à long terme que les souris He^{+/+} en raison de leur défaut de réponse aux dommages à l'ADN, j'ai donné à séquencer de l'ADN de tissus de souris vieilles He^{-/-} et He^{+/+}. J'ai extrait de l'ADN de foie, de muscle, et de progéniteurs Lin⁻cKit⁺ purifiés par FACS. Le foie et le muscle serviront de contrôle du taux de base de mutations et du polymorphisme engendré par le fond génétique mixte dans lequel les souris Helios ont été générées et maintenues. Mon hypothèse est que les progéniteurs hématopoïétiques dans lesquels Helios est physiologiquement exprimé accumuleraient plus de mutations chez les souris He^{-/-} vieilles que chez les souris He^{+/+} vieilles. Les tissus de foie et

de muscle devraient montrer un taux de mutations équivalent chez les souris $He^{+/+}$ et $He^{-/-}$ puisque Helios n'est physiologiquement pas exprimé dans ces cellules. La plateforme de séquençage de l'IGBMC a préparé les bibliothèques de l'ADN génomique des tissus décrits précédemment et après capture des exons, les a séquencés. L'analyse des mutations est en cours et est réalisée par la plateforme de bioinformatique de l'IGBMC.

CONCLUSION

Conclusion générale

Ainsi, l'ensemble de mes résultats suggèrent que Helios est un régulateur de l'intégrité du génome qui agit en synergie avec p53 pour contrôler les réponses des CSH aux dommages de l'ADN. Helios joue donc un rôle clé dans le maintien de CSH fonctionnelles au cours du temps. Le modèle par lequel nous pensons que Helios agit dans les CSH est présenté ci-dessous :



Modèle du rôle de Helios dans les CSH

En condition sauvage, le pool de CSH fonctionnelles diminue au cours du temps du fait de l'accumulation de dommages de l'ADN qui engendrent l'apoptose des cellules, leur différenciation ou leur entrée en sénescence. Ces trois mécanismes seraient des protections face aux dommages de l'ADN pour prévenir l'apparition de mutations oncogéniques dans ces cellules. Si on baisse l'activité conjointe de Helios et de p53, ou en absence de Helios, les CSH répareraient moins efficacement leur ADN, échapperaient à la mort cellulaire, à la sénescence et proliféreraient davantage. Ceci expliquerait pourquoi les souris $He^{-/-}$ gardent plus de CSH fonctionnelles au cours du temps. En contrepartie, elles seraient aussi plus aptes à développer des cancers.

DISCUSSION

Discussion

Helios régule-t-il directement l'expression de gènes cibles de p53 ?

Nous avons montré que Helios régule la prolifération des CSH (Figure 1F-G). De plus, les CSH $He^{-/-}$ sur-expriment la necdine, cible directe de p53 et connu pour être impliqué dans la quiescence des CSH (Liu et al., 2009). Il se pourrait donc que Helios agisse sur la quiescence des CSH via la régulation de l'expression de la necdine. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions croiser les souris $He^{-/-}$ avec les souris $Necdine^{-/-}$ et analyser le taux de CSH quiescentes des souris WT, $He^{-/-}$ et $He^{-/-}Necdine^{-/-}$ par le marquage des CSH avec le DAPI et Ki67 qui permet de distinguer les cellules en phase G1 (DAPI⁺Ki67⁺), des cellules quiescentes en G0 (DAPI⁺Ki67⁻), des cellules en phases G2/S/M (DAPI⁺Ki67⁺). Si notre hypothèse se vérifie, le taux de CSH $He^{-/-}Necdine^{-/-}$ quiescentes serait comparable à celui des CSH WT, et inférieur à celui des CSH $He^{-/-}$.

De plus, Helios contrôle les réponses des CSH aux dommages de l'ADN dépendantes de p53, en régulant leur prolifération, leur entrée en apoptose et en senescence. Les CSH $He^{-/-}$ présentent une baisse de l'induction de l'expression de gènes cibles de p53 tels que p21, puma, noxa (Figure 7), et e2f7 (Figure 8) après induction de dommages de l'ADN. Ceci mène à une augmentation du potentiel de reconstitution des LT-CSH après induction de dommages de l'ADN (Figure 7G), et peut expliquer le maintien de l'activité des LT-CSH au cours de transplantations en série et du vieillissement (Figure 3 et Figure 4). De plus, cette augmentation du nombre de CSH fonctionnelles pendant les transplantations en série et le vieillissement observés chez les souris $He^{-/-}$ sont également observées dans les souris $p53^{+/-}$ (Figure 3, supplementary Figure 3 and Bondar et al., 2010). Enfin, le groupe de Mullighan a étudié les fréquences des mutations de 124 cas de LAL-B hypodiploïdes, une maladie généralement développée chez les personnes âgées. Son étude montre que la perte de p53 est accompagnée de la perte de Helios dans 53% des cas étudiés (Holmfeldt et al., 2013). Tout ceci suggère que Helios pourrait agir en synergie avec p53.

Nous avons justement montré que Helios agit en synergie avec p53 pour réguler la prolifération et l'entrée en apoptose des CSH. En effet, les CSH $He^{+/-}p53^{+/-}$ présentent une résistance aux dommages de l'ADN supérieure à celle des CSH simple hétérozygotes $He^{+/-}$ et

p53^{+/-}, et une baisse de l'expression de puma par rapport aux CSH He^{+/-} et p53^{+/-} après induction de DBS.

L'expérience de ChIP-seq dans les cellules ILC87-He-ER suggère que Helios se lierait aux promoteurs de gènes cibles de p53, et dont l'expression a été montrée comme dérégulée dans les CSH en absence de Helios : *cdkn1a* (p21), et *bbc3* (puma) (Figure 7E, Figure 9G). De plus, Helios se lierait aux promoteurs d'autres gènes cibles de p53 ; *gfi1* et *gadd45a*. Helios régulerait donc directement l'expression de plusieurs gènes cibles de p53 : p21, puma *gfi1* et *gadd45a*. Cependant, Helios ne régulerait pas tous les gènes cibles de p53. En effet, aucun pic de liaison de Helios n'a été trouvé dans les gènes *necdine* et *noxa*, dont l'expression est dérégulée dans les CSH He^{-/-} (Figure 5, Figure 7E). La dérégulation de l'expression de ces deux gènes dans les CSH serait donc un effet indirect de la perte de Helios. De manière intéressante, *gfi1* est connu pour réguler la quiescence des CSH (Liu et al., 2009). Ainsi, Helios modulerait la quiescence des CSH en régulant de façon directe l'expression de *Gfi1* et indirecte de la *Necdine*, deux gènes cibles directes de p53. *Gadd45a* est induit par p53 en réponse aux dommages de l'ADN et régule les réponses des CSH aux dommages de l'ADN. Les CSH *Gadd45a*^{-/-} ont des caractéristiques communes avec les CSH He^{-/-} (Chen et al., 2014). En effet, les souris *Gadd45a*^{-/-} ont une hématopoïèse normale dans des conditions homéostatiques, cependant, la perte de *Gadd45a* augmente la prolifération des CSH après traitement au 5-FU. Les CSH *Gadd45a*^{-/-} ont une capacité de reconstitution augmentée par rapport aux CSH WT dans des expériences de transplantations en série, et présentent des défauts de l'apoptose et un retard dans la réparation après irradiation (Cheng et al., 2014). Nous pouvons donc supposer que Helios induit l'expression de *Gadd45a* communément avec p53 en réponses aux dommages de l'ADN. De manière intéressante, les CSH *Gadd45a*^{-/-} vieilles accumulent des dommages de l'ADN ce qui promeut la leucémogénèse (Cheng et al., 2014).

Ainsi, Helios modulerait les fonctions des CSH en régulant notamment l'expression de gènes communs avec p53 tels que p21, puma, *gadd45a* et *gfi1*. Cependant, il semblerait que Helios ne régule pas directement certains gènes cibles de p53 tels que *necdine* et *noxa*. Il serait intéressant de réaliser une analyse bioinformatique pour identifier le(s) motif(s) lié par Helios, et le comparer à celui de p53. Nous nous attendons à ce que les séquences consensus reconnues par Helios et p53 soient proches.

Cependant, nous n'avons réalisé cette expérience qu'une seule fois. Nous devons donc répéter cette expérience pour pouvoir conclure. Aussi, nous n'avons pour le moment vérifié la liaison de Helios sur le promoteur que d'un seul gène : *ctnd1*. Il est nécessaire avant de conclure sur la régulation directe de Helios de ces gènes, de vérifier par ChIP-PCR la liaison de Helios au niveau de tous ces gènes cibles potentiels. De plus, ces résultats ne doivent pas être pris pour acquis car ils proviennent de l'utilisation d'un système de cellules tumorales sur-exprimant Helios-ER, donc éloigné des CSH. Il est donc indispensable de vérifier par ChIP-PCR la liaison de Helios sur ces potentielles cibles dans les cellules LSK.

De plus, nous avons eu un problème technique lors de cette expérience. Nous nous sommes aperçu que le plasmide, codant la séquence de Helios utilisé dans cette lignée cellulaire, portait une mutation ponctuelle dans une cystéine d'un doigt de Zinc en N-terminal. Les données présentées ici proviennent de cette lignée. Les doigts de Zinc en N-terminaux sont impliqués dans le domaine de liaison à l'ADN (Hahm et al., 1998). Cette mutation peut donc modifier la liaison de Helios au niveau du génome. Ces données sont donc à analyser avec attention. Nous avons entrepris de créer une nouvelle lignée avec un plasmide codant pour Helios intact. J'ai vérifié la viabilité de cette lignée après induction de dommages de l'ADN (**Figure 1**). Le phénotype est similaire à celui observé dans l'ancienne lignée. Nous avons donc utilisé cette nouvelle lignée pour réaliser un nouveau ChIP-seq. Les données sont en cours d'analyse.

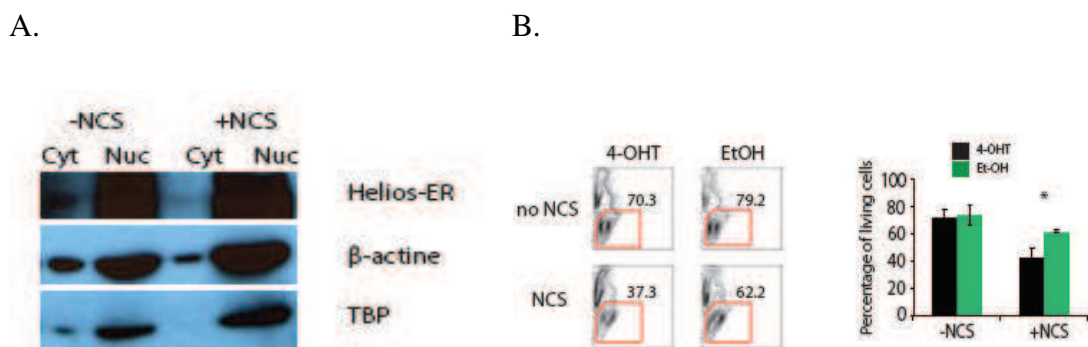


Figure 1 : La nouvelle lignée cellulaire est équivalente à l'ancienne en terme de survie après traitement au NCS.

A. Western Blot montrant la translocation de Helios-ER dans le noyau. Le Western Blot a été réalisé dans des extraits cytoplasmiques et nucléaires des cellules ILC87-Helios-ER, 48h après traitement au 4-OHT, avec les anticorps anti-Helios, anti-TBP, et anti- β -actine.

B. Profils de cytométrie en flux des cellules ILC87-Helios-ER préalablement traitées avec le 4-OHT ou l'éthanol marquées avec le Topro3 18h après leur traitement au NCS (Panneau de gauche). Pourcentage de cellules vivantes mesuré par le marquage au Topro3 (panneau de droite). Les barres d'erreur sont les déviations standard de 2 expériences indépendantes (* $p < 0.05$).

Enfin, le traitement au NCS des cellules baisse de façon globale l'échelle de liaison de Helios au niveau du génome (Figure 9F and G). Nous nous attendions à obtenir une augmentation de la liaison de Helios aux promoteurs de puma et p21 dans les cellules traitées au NCS. Ceci peut être dû à un problème intrinsèque à l'expérience ; au niveau de la qualité de l'échantillon, ou à un effet du traitement des cellules au NCS sur l'ensemble de la chromatine. Le NCS créant des cassures simple et double brins, nous pouvons imaginer qu'il induit alors indirectement des changements de l'accessibilité de la chromatine, ce qui interférerait avec la liaison de Helios sur le génome. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions traiter les cellules ILC87 au NCS et réaliser l'expérience de ChIP-seq. Si l'hypothèse se vérifie, alors nous observerons une baisse globale de la liaison de Helios au niveau de ses cibles dans l'échantillon traité par rapport à l'échantillon non traité.

Helios régule-t-il le niveau d'activation de p53 ?

Nous avons montré, par Western Blot, que les taux de p53 total et de p53 phosphorylé sont similaires entre les CSH He^{-/-} et WT (Figure 9A). Cependant, en plus de la phosphorylation, l'activité de p53 est contrôlée par d'autres modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination, la méthylation, la sumoylation, la neddylation et l'acétylation (Kruse et Gu., 2009). Plusieurs études ont montré l'importance de l'acétylation de p53 pour la régulation de ces fonctions. Ainsi, le groupe de Gu (Luo et al., 2000) a montré, dans les cellules HeLa, que p53 peut être ciblé par le complexe NuRD à travers l'interaction directe de MTA2, ce qui entraîne la désacétylation de p53 *in vitro*. Dans les cellules MEF, l'expression de MTA2 réduit significativement le niveau d'acétylation de p53 et son activation transcriptionnelle, ce qui diminue l'arrêt de la prolifération des cellules et leur entrée en apoptose (Luo et al., 2000). De manière intéressante, Helios peut s'associer à des composants des complexes de remodelage de la chromatine NuRD, Mi2 α et Mi2 β (Sridharan et Smale, 2007). On peut donc supposer que Helios pourrait réguler le niveau d'activation de p53 en

ciblant p53 au complexe NuRD. De plus, les CSH He^{-/-} présentent une baisse de l'expression de Ing5. De manière intéressante, ING5 agit comme un cofacteur de Tip60 dans l'acétylation de p53 en réponse aux dommages de l'ADN (Liu et al., 2013). On peut donc imaginer que Helios régulerait le niveau d'activation de p53 indirectement en modulant l'expression d'Ing5. Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle Helios est impliqué dans l'acétylation de p53, nous pourrions, par Western Blot, comparer le taux de p53 acétylé dans les CSH He^{-/-} et WT. Si notre hypothèse se vérifie, alors le niveau de p53 acétylé serait plus important dans les CSH He^{-/-} comparé aux CSH WT. De plus, nous pourrions réaliser des immunoprécipitations pour tester la présence de p53, Helios et du complexe NuRD au sein d'un même complexe. Pour réaliser cette expérience, le nombre de LSK étant limité, nous devrions utiliser la lignée cellulaire ILC87-He-ER.

Helios est-il impliqué dans la réparation des cassures double brins (DSB) de l'ADN dans les CSH?

Nos résultats suggèrent que Helios pourrait avoir un rôle dans la réparation de l'ADN des CSH. En effet, les LT-CSH de souris Helios^{-/-} sous-expriment des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN tels que atmin, ercc4, fen1, xlf4 (Figure 5). Les résultats de CHIP-seq suggèrent que Helios se lierait au promoteur de gènes de réparation des cassures doubles brins rad51, rad52, ku70, ku80, modulant ainsi leur expression. Après traitement des CSH avec des agents inducteurs de cassures doubles brins (DSB) (néocarzinostatine, camptothécine et étoposide), 30 minutes après l'induction de DSB, l'apparition de foyers γ H2AX est similaire dans les noyaux des CSH He^{-/-} et WT. La voie de signalisation permettant la phosphorylation de γ H2AX n'est donc pas affectée par la perte de Helios. Cependant, les CSH He^{-/-} présentent une persistance de foyers γ H2AX, 5h et 10h après induction de DSB, comparées aux CSH WT (Figure 6 et Supplementary figure 7). Cette persistance de foyers γ H2AX ne permet pas de conclure sur le fait que les CSH He^{-/-} réparent moins bien leur DSB de l'ADN.

En effet, après réparation, les histones γ H2AX vont être déphosphorylées notamment par PP2A et Wip1 qui se localisent à leurs niveaux (Chowdhury et al., 2005, Macurek et al., 2010). La persistance de foyers γ H2AX observée dans les CSH He^{-/-} peut donc être due à un retard dans la réparation et/ou à un défaut de la déphosphorylation de ces histones γ H2AX. La déphosphorylation des γ H2AX par PP2A et Wip1 est nécessaire pour une réparation efficace (Chowdhury et al., 2005), et le niveau d'expression de ces protéines est essentiel pour une

réparation optimale. En effet, l'inhibition de PP2A, ou la surexpression de Wip1 entraînent une réparation inefficace des DSB (Chowdhury et al., 2005, Moon et al., 2010). Pour vérifier si Helios est impliqué dans la déphosphorylation des histones γ H2AX, nous pourrions, tout d'abord, analyser le niveau d'expression de PP2A et de Wip1 dans les CSH He^{-/-} et WT. De manière intéressante, une étude récente a montré que Ikaros, le principal membre de la famille à laquelle Helios appartient, régule négativement l'expression de PP2A en se liant au premier intron du gène codant pour PP2A, et en modulant les modifications épigénétiques à ce site via le recrutement de HDAC1 (Nagpal et al., 2014). De plus, Helios et Ikaros partagent des propriétés communes ; Helios possède une structure très proche de celle de Ikaros et peut se lier avec HDAC1, HDAC2, Sin3, Mi-2, CtBP et CtIP tout comme Ikaros le fait (Sridharan and Smale, 2007). Ikaros et Helios reconnaissent des séquences d'ADN similaires contenant le motif consensus tGGGAa (Hahm et al., 1998). Ainsi, cette récente publication impliquant Ikaros dans la régulation de l'expression de PP2A renforce l'hypothèse selon laquelle Helios aurait le même rôle. Helios contrôlerait positivement l'expression de PP2A, et sa perte engendrerait une baisse celle-ci. Il a été montré que Ikaros peut réprimer la transcription de gènes en occupant le site cible qui chevauche le site de reconnaissance d'autres facteurs de transcription. Par exemple, Ikaros et RBP-J κ sont en compétition pour lier le promoteur de Hes1 (Kleinmann et al., 2008). On peut imaginer alors que Ikaros et Helios soient en compétition pour ce site commun de PP2A, et que dans des conditions WT, l'expression de PP2A est équilibrée. La perte de Helios serait un avantage compétitif pour Ikaros, et PP2A serait donc régulé négativement par Ikaros.

Pour compléter l'étude du rôle de Helios dans la déphosphorylation des γ H2AX, nous pourrions étudier la cinétique d'expression et de la localisation de PP2A et Wip1 dans les CSH He^{-/-} et WT après induction de DSB, par immunofluorescence. Si notre hypothèse se vérifie, alors les CSH He^{-/-} auraient moins de phosphatases au niveau des γ H2AX comparées aux CSH WT, ou leur cinétique de localisation serait retardée. On peut également supposer que Helios est important pour le ciblage de ces phosphatases au niveau des foyers γ H2AX. Pour tester cette hypothèse, j'ai entrepris de localiser par immunofluorescence Helios par rapport aux foyers γ H2AX. Pour le moment, des problèmes techniques ne m'ont pas permis de conclure.

La persistance des foyers γ H2AX dans les CSH He^{-/-} peut également être due à un défaut ou retard de la réparation des DSB. L'expérience de COMET assay est une technique sensible qui permet d'évaluer l'efficacité de réparation des cellules. Dans cette expérience, les

cellules sont lysées puis sujettes à une électrophorèse. L'ADN est ensuite marqué avec du Bromure d'Ethidium. Les fragments d'ADN générés par cassures simple et/ou doubles brins migrent en fonction de leur taille sur gel d'agarose, ce qui donne des aspects de « comètes » visualisées par luminescence. Ainsi, seul l'ADN d'une cellule qui possède des cassures de l'ADN migrera en forme de comète, une cellule possédant un ADN intact ne présentera pas de comète (**Figure 2**).

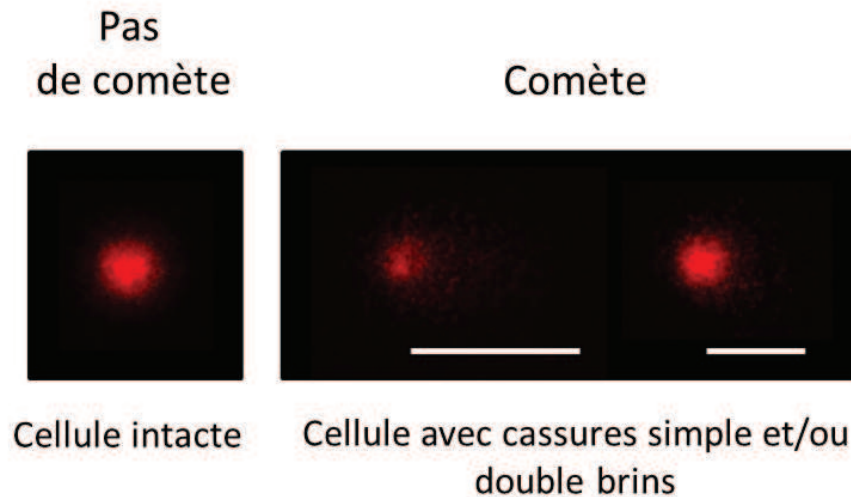


Figure 2 : Exemples de cellule avec ADN intact (gauche) et ADN présentant des cassures (droite)

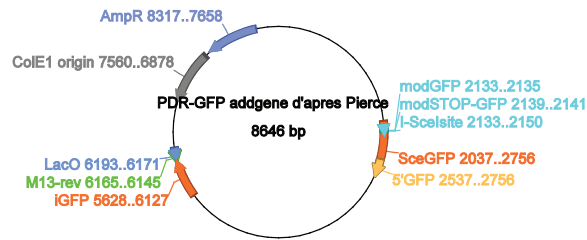
Plus l'ADN est fragmenté, plus la queue de la comète sera importante. La longueur de la queue peut être mesurée et répertorié sur une échelle de gravité de dommages comprise généralement entre 0 et 4 (Mohrin et al., 2010). Il existe deux types de COMET assay : le COMET assay alcalin (qui permet de visualiser l'ADN fragmenté par cassures simple et double brins) et le COMET assay neutre (qui permet de visualiser l'ADN fragmenté par cassures double brins). J'ai réalisé une expérience de COMET assay alcalin et je n'ai observé aucune différence entre les CSH He^{-/-} et WT 30 minutes et 4h après traitement des CSH au NCS (résultats non montrés). Ainsi, il semblerait que les CSH He^{-/-} réparent efficacement leurs cassures de l'ADN. Cependant, je n'ai réalisé cette expérience qu'une seule fois, et la longueur des comètes que j'ai obtenu semble être moindre comparée à celles obtenues dans la littérature (Beerman et al., 2014). Cette expérience devrait donc être encore mise au point, et répétée pour pouvoir conclure. Pour vérifier l'hypothèse d'un retard dans la réparation des DSB dans les CSH He^{-/-} comparées aux CSH WT, nous pourrions étudier la cinétique de

réparation en réalisant cette expérience de COMET assay à différents temps situés entre 30 minutes et 4h.

Les CSH He^{-/-} utilisent-elles préférentiellement une voie de réparation des DSB ?

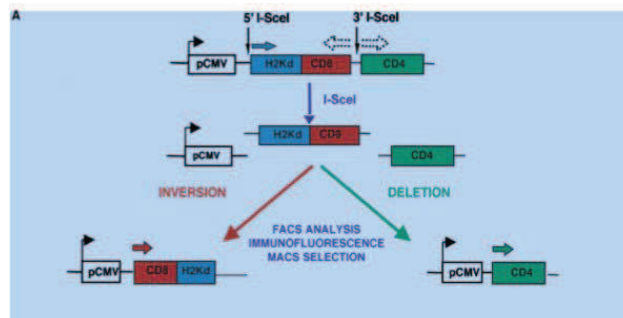
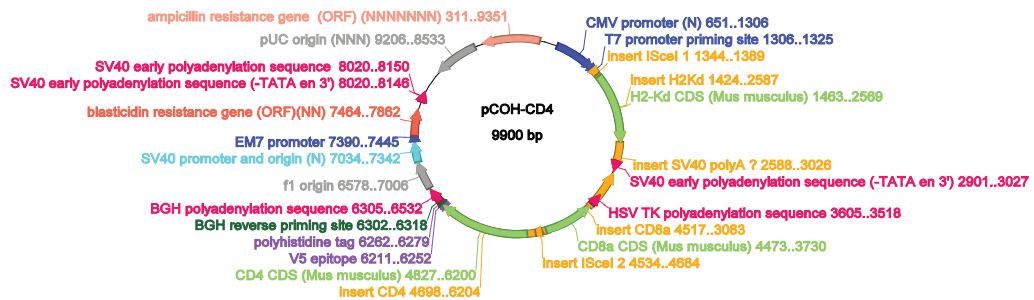
Il existe deux voies de réparation des DSB : la voie RH et la voie NHEJ. L'analyse transcriptomique de l'expression des gènes des CSH WT et He^{-/-} montre que dans des conditions normales (sans stress génotoxique), les CSH He^{-/-} présentent une sous-expression de gènes impliqués dans les deux voies de réparation tels que : rad51 (impliqué dans la voie RH) et xlf4 (impliqué dans la voie NHEJ). L'expérience de ChIP-seq suggère que Helios régulerait l'expression des gènes rad51, rad52 (impliqués dans la voie RH), ku70, ku80 (impliqués dans la voie NHEJ), en se liant à leurs promoteurs. De plus, nos données suggèrent que les CSH He^{-/-} seraient plus quiescentes que les CSH WT (Figure 1F-G, Figure 5). Le groupe de Passegué a montré que la voie de réparation de DSB choisie par les CSH dépend de leur état de prolifération (Mohrin et al., 2010). En effet, les CSH en conditions homéostatiques sont majoritairement quiescentes et utilisent préférentiellement la voie de réparation NHEJ, alors que les CSH forcées à entrer en cycle vont utiliser la voie RH. Notre hypothèse est que les CSH He^{-/-} qui seraient plus quiescentes que les CSH WT répareraient leurs cassures doubles brins par la voie NHEJ avec une fréquence plus grande que les CSH WT. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions comparer la fréquence de réparation par les voies RH et NHEJ dans les CSH He^{-/-} et WT. Pour se faire, nous allons transfecter des CSH avec des plasmides spécifiques qui permettent de mesurer la réparation de l'ADN soit par la voie RH, soit par la voie NHEJ (Pierce et al., 1999, Guirouilh-Barbat et al., 2004) (**Figure 3**).

A



(Pierce et al, 1999)

B



(Guirouilh-Barbat et al., 2004)

Figure 3 : Constructions des plasmides permettant de mesurer la réparation des DSB par les voies RH et NHEJ (donnés par le Dr. Bernard Lopez)

Le premier plasmide permet de mesurer la voie de réparation par RH (**Figure 3A**). Il contient la séquence tronquée du gène codant pour la GFP modifiée. La première séquence du gène codant la GFP tronquée contient en son sein, un site de restriction reconnu par I-SceI (en bleu clair) ; il se nomme SceGFP (en orange). La deuxième séquence, nommée IGFP (en orange) code pour la deuxième partie tronquée de la GFP et porte une partie contenue dans la séquence SceGFP. Cette séquence commune va pouvoir être reconnue comme ADN modèle lors de la réparation par RH. Ainsi, sans cassure, les cellules transfectées avec ce plasmide n'expriment pas la GFP. Après action de l'enzyme I-SceI, si la cellule répare cette cassure

double brins par la voie RH, le gène codant la GFP sera alors entier et les cellules exprimeront la GFP visualisable par FACS (Pierce et al., 1999)

Le deuxième plasmide contient les séquences du gène codant pour H2-Kd sous le contrôle du promoteur pCMV (**Figure 3B**). Ce plasmide contient aussi les séquences des gènes codant pour les marqueurs de surface CD4 et CD8. Cependant, les cellules transfectées avec ce plasmide n'expriment pas CD8 car sa séquence codante est orientée dans le sens inverse du promoteur pCMV, ni CD4 car la séquence codante est située trop loin du promoteur pCMV. De plus, le plasmide contient deux séquences de reconnaissance de l'enzyme de restriction I-SceI : l'une est localisée entre le promoteur pCMV et H2-Kd et l'autre entre les séquences codantes pour CD8 et CD4. Ainsi, l'action de cette enzyme sur ce plasmide provoque deux cassures doubles brins, et le fragment H2-Kd/CD8 est excisé. La réparation NHEJ peut mener à deux événements : la ligation de la séquence codante pour CD4 au promoteur pCMV, ce qui permettra l'expression de CD4, et l'inversion du fragment H2-Kd/CD8 puis sa ligation au promoteur pCMV, ce qui permet l'expression de CD8. Ainsi, ces événements de délétion et inversion après réparation par NHEJ peuvent être mesurés par FACS en marquant les cellules transfectées avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8. De plus, les jonctions de réparation peuvent être amplifiées par PCR, en utilisant des primers spécifiques, et séquencées, ce qui permet d'évaluer le taux de mutations, autrement dit la « fidélité de réparation » (Guirouilh-Barbat et al., 2004). Nous pourrions alors comparer le taux de mutations accumulées dans les CSH WT et He^{-/-}.

Ainsi, en transfectant les CSH WT et He^{-/-} avec l'un ou l'autre de ces plasmides ainsi qu'avec un plasmide codant pour l'enzyme de restriction I-SceI, nous pourrions analyser la fréquence de réparation par les voies RH et NHEJ de ces cellules. Cette expérience est en cours de mise au point. La limite à cette technique est que les cellules GFP négatives (pour la voie RH) et CD4⁻, CD8⁻ (pour la voie NHEJ) ne permettra pas de distinguer les cellules qui n'ont pas réparées, de celles dans lesquelles I-SceI n'aura pas agi. Pour parer à cette éventualité, nous pourrions essayer de transfecter le plasmide déjà digéré par l'enzyme ISceI *in vitro* comme le groupe de Passegué l'a fait dans son expérience de « NHEJ activity assay » (Mohrin et al., 2010).

Helios a-t-il un rôle de suppresseur de tumeur?

La voie NHEJ est plus mutagène que la voie RH (Weinstock et al., 2006). Le groupe de Passegué a montré que les CSH, qui sont majoritairement quiescentes, utilisent préférentiellement cette voie de réparation, et ont tendance à accumuler des mutations ce qui engendre des instabilités chromosomiques (Mohrin et al., 2010). De plus, Beerman et al., ont montré que les CSH quiescentes accumulent des dommages de l'ADN avec le vieillissement (Beerman et al., 2014).

Notre hypothèse est que les CSH $He^{-/-}$ qui seraient plus quiescentes utiliseraient davantage la voie NHEJ comparées aux CSH WT pour réparer leurs DSB, et accumuleraient davantage de mutations potentiellement oncogéniques lors du vieillissement. De plus, nous avons montré que les réponses aux dommages de l'ADN sont défectueuses dans les CSH $He^{-/-}$. En effet, après induction de DSB, les CSH $He^{-/-}$ survivent et prolifèrent davantage comparées aux CSH WT (Figure 7A-C), et ont un potentiel de reconstitution supérieur à celles des CSH WT après une transplantation compétitive (Figure 7G). Ce phénotype explique en partie pourquoi les CSH $He^{-/-}$ gardent un potentiel de reconstitution à plus long terme que les CSH WT tout comme le font les CSH $p53^{+/-}$, et les CSH $Gadd45a^{-/-}$ (Bondar et Medzhitov, 2010, Chen et al., 2014), Figure 3 et Figure 4A-C-D). Bien que nous n'ayons pas observé de différences dans le nombre de foyers γ H2AX dans les CSH $He^{-/-}$ et WT de souris vieilles (Figure 6D), ce phénotype appuie l'hypothèse selon laquelle les CSH $He^{-/-}$ accumuleraient des mutations potentiellement oncogéniques, tout comme le font les CSH $p53^{+/-}$, et les CSH $Gadd45a^{-/-}$. Afin de la vérifier, nous avons entrepris de séquencer l'ADN « whole exons » de progéniteurs hématopoïétiques et de cellules de foie et de muscle (servant de contrôle de polymorphisme de nos souris à fond génétique mixte) de souris vieilles âgées de 2 ans. Le séquençage est en cours d'analyse.

De plus, plusieurs études suggèrent que Helios est un suppresseur de tumeur dans le système hématopoïétique. En effet, les isoformes dominantes négatives de Helios ont été détectées chez des patients atteints de LAL-T (Fujii et al., 2003, Nakase et al., 2002, Sun et al., 2002, Takanashi et al., 2002), et chez des patients atteints de leucémies et lymphomes T chroniques (Fujii et al., 2003). La surexpression de Helios ou de son isoforme dominante négative Hel3 dans les progéniteurs hématopoïétiques entraîne un blocage du développement des cellules T (Zhang et al., 2007). Soixante pourcent des souris transplantées avec ces progéniteurs modifiés développent un lymphome T agressif et transplantable (Zhang et al., 2007). De plus, Helios est exprimé dans les cellules B immatures proB, puis son expression

diminue dès lors qu'elles se différencient en cellules préB (Kelley et al., 1998). Les souris transgéniques surexprimant Helios développent des lymphomes B métastatiques quand elles vieillissent (âgées de plus d'un an) (Dovat et al., 2005). Enfin, le groupe de Mullighan a étudié les fréquences de mutations de 124 patients atteints de LAL-B hypodiploïdes qui est une leucémie développée souvent par des personnes âgées. Son étude montre que la perte de p53 est accompagnée de la perte de Helios dans 53% des patients étudiés. Cette étude suggère qu'il existe une synergie entre la perte des protéines p53 et Helios dans ces leucémies, et que Helios a un rôle de suppresseur de tumeur dans ce type de leucémies (Holmfeldt et al., 2013).

Pour tester l'hypothèse selon laquelle Helios est un suppresseur de tumeur en régulant les réponses des CSH aux dommages de l'ADN, nous avons entrepris d'irradier des souris WT et He^{-/-} jeunes à des doses sub-létale (à 6.5Gy) puis analyser l'apparition de cancers dans ces souris. Nous nous attendions à ce que les souris He^{-/-} développent des leucémies/lymphomes plus rapidement que les souris WT. Nous avons observé que les souris He^{-/-} meurent plus rapidement que les souris WT après plusieurs irradiations. Plusieurs de ces souris (He^{-/-} et WT) sont mortes de lymphomes T. Cependant, nous n'avons pas les données de toutes les souris mortes car certaines sont mortes sans avoir développé des signes cliniques suggérant une leucémie et certaines ont été sacrifiées car elles étaient atteintes d'autres pathologies. La limite de cette expérience est que l'irradiation n'est pas spécifique au système hématopoïétique et touche tous les organes. La mort des souris peut être due à des déficiences d'autres organes tels que le cerveau (zum Winkel et al., 1987, Littley et al., 1990).

Pour vérifier notre hypothèse, nous allons donc transplanter des souris avec des CSH WT ou He^{-/-} préalablement irradiées, ou traitées au NCS tel que décrit en Figure 7G, et suivre l'apparition de leucémies dans les souris transplantées.

Par quels mécanismes Helios régule-t-il l'auto-renouvellement des CSH ?

Nos résultats suggèrent que Helios contrôle le maintien de la quiescence des CSH via, au moins, la régulation de l'expression de la necdine, gène cible de p53 et important pour la quiescence des CSH (Liu et al., 2009, Asai et al., 2012) (Figure 1F-G). Il serait intéressant d'analyser l'expression de gfi1, autre cible directe de p53 qui régule la quiescence des CSH (Liu et al., 2009), d'autant plus que les résultats de CHIP-seq suggère que Helios se lierait au

niveau du promoteur de ce gène (Figure 9G). Nous avons également montré que Helios agit sur l'auto-renouvellement des CSH pendant le développement foetal, et après un stress hématopoïétique (après traitement au 5-FU), en contrôlant la progression de leur cycle cellulaire (Figure 2A-B-F). Les expériences de transplantations en série et de transplantation avec des CSH de souris vieilles montrent que Helios régule l'auto-renouvellement des CSH. En effet, le nombre de CSH dérivées des CSH He^{-/-} est supérieur à celui des CSH dérivées des CSH WT dans la moelle osseuse des souris transplantées, après chaque transplantation en série et après les transplantations avec les CSH vieilles (Figure 3E et Figure 4A). Cependant, nous n'avons pas montré si ce nombre augmenté est dû à une élévation de la prolifération des CSH He^{-/-} donneuses ou à une baisse de leur apoptose, ou de leur différenciation. Pour pouvoir conclure sur le rôle de Helios dans l'auto-renouvellement des CSH adultes après transplantations, il faudrait comparer le taux de prolifération, et d'apoptose des CSH He^{-/-} et WT transplantées. Pour analyser le taux de prolifération des CSH He^{-/-} et WT, nous pourrions d'une part, réaliser un test d'incorporation de BrdU à long terme en donnant à boire aux souris transplantées du BrdU pendant 2 à 6 semaines après la transplantation (Yahata et al., 2011). D'autre part, nous pourrions analyser l'expression de gènes pro-prolifératifs tels que des cyclines, des kinases dépendantes des kinases (cdk), des mapk, et anti-prolifératifs tels que p21, p27 et p16, dans les CSH triées deux et six semaines après transplantation. Nous pourrions analyser, dans cette même expérience de transplantation, le niveau d'apoptose des CSH WT et He^{-/-} en les marquant avec l'Annexine V et le DAPI à 2 et 6 semaines après la transplantation.

Helios est-il impliqué dans la différenciation des CSH ?

Nous avons montré que les souris He^{-/-} vieilles présentent des défauts dans l'hématopoïèse globale (Figure 4E). En effet, les souris He^{-/-} âgées de deux ans ont plus de cellules myéloïdes et granulocytaires et moins de cellules B matures et immatures, accompagnées d'une baisse du nombre de CLP, comparées aux souris âgées WT. De même après des transplantations secondaires et tertiaires, le pourcentage de cellules B dérivées des cellules LSK He^{-/-} diminue comparé à celui dérivé des cellules LSK WT (Supplementary figure 3). Après transplantation tertiaire, le pourcentage de cellules myéloïdes dérivées des cellules LSK He^{-/-} est supérieur à celui dérivé des cellules LSK WT (Supplementary figure 3). De manière intéressante, le groupe de Chen a montré que les souris p53^{-/-} présentent aussi des

défauts dans leur hématopoïèse : elles ont plus de cellules myéloïdes CD11b⁺ et moins de cellules B CD45⁺ (TeKippe et al., 2003). Ce phénotype est similaire avec celui décrit chez les souris vieilles He^{-/-}.

Les CSH He^{-/-} de souris âgées présentent des dérégulations de gènes impliqués dans la différenciation des CSH. Par exemple, les CSH He^{-/-} expriment plus faiblement flt3 comparées aux CSH WT. Les protéines Flt3 (récepteur de Flt3L) et Flt3L (ligand du récepteur Flt3) permettent le maintien des CLP et des progéniteurs qui génèrent les précurseurs des cellules B (Stinicka et al., 2002, Dolence et al., 2011, Dolence et al., 2014). Il a été montré que l'expression du récepteur Flt3 baisse avec le vieillissement (Rossi et al., 2005, Beerman et al., 2010), ce qui explique en partie la baisse du nombre de cellules B et de CLP avec le vieillissement. L'expression du récepteur Flt3 est diminuée avec la perte de Helios (Figure 4). Ceci expliquerait en partie les défauts de différenciation en CLP et cellules B plus sévères chez les souris He^{-/-} vieilles comparées aux souris WT vieilles. Nous avons aussi trouvé que thy1, un gène de différenciation des cellules T, est surexprimé dans les MPP He^{-/-} (Figure 4). Son expression baisse avec le vieillissement (Sun et al., 2014). Sa sur-expression dans les cellules He^{-/-} âgées explique en partie pourquoi les souris âgées He^{-/-} présentent un développement normal des cellules T. Les expériences de ChIP-seq suggèrent que Helios régulerait l'expression du ligand de Flt3 et de thy1 en se liant aux promoteurs de ces gènes, ainsi que potentiellement l'expression du récepteur flt3, en se fixant aux introns de ce gène. Ces introns liés par Helios représenteraient des enhanceurs. Helios contrôlerait donc la différenciation des CSH en régulant directement l'expression de flt3l et thy1.

Il serait intéressant d'ajouter à ces données *in vivo*, des données *in vitro* pour pouvoir comparer la fréquence de progéniteurs fonctionnels des souris He^{-/-} et WT. A cette fin, nous pourrions réaliser des expériences de CFC (colony-forming cell) qui mesurent la capacité des progéniteurs hématopoïétiques à se différencier. Une suspension de cellules de moelle osseuse est mise en culture dans un milieu semi-solide complétement de différents cocktails de cytokines qui induisent la différenciation hématopoïétique. Par exemple, l'ajout d'érythropoïétine dans le milieu permettra d'évaluer les fonctions des progéniteurs érythroïdes (CFU-E ; « colony-forming unit erythroid »), celui de thrombopoïétine permettra d'évaluer les fonctions des progéniteurs des mégacaryocytes (CFU-Mk ; « colony-forming unit megakaryocyte »). A la fin de la culture, les colonies sont comptées en fonction de critères morphologiques pour déterminer la proportion des différents CFU (van os et al., 2008).

Helios module-t-il des changements extrinsèques aux CSH pour réguler leurs fonctions?

Les niches des CSH contribuent au contrôle de la quiescence, la prolifération, l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH (Geiger et al., 2013). Nous avons montré que les souris $He^{-/-}$ jeunes ne présentent pas de défauts dans leur hématopoïèse globale (Figure 1 et Supplementary figure 2), et que les CSH $He^{-/-}$ ont une capacité de homing similaire à celle des CSH WT (Supplementary figure 4). Après les transplantations primaires, les pourcentages de cellules matures dérivées des cellules LSK $He^{-/-}$ et WT sont similaires. L'analyse transcriptomique des cellules LSK $He^{-/-}$ jeunes n'indique pas de défauts d'expression des gènes de différenciation pro-myéloïde et pro-lymphoïdes. Il semblerait donc que les défauts de différenciation en absence de Helios se développent au cours de transplantations en série, ou avec le vieillissement des CSH associé à des changements de l'expression de gènes de différenciation (Figure 3 et 4). De même, la perte de Helios n'engendre pas de défaut des fonctions des CSH après transplantation primaire, mais permet le maintien de la capacité de reconstitution des CSH lors du vieillissement ou lors de transplantation en série. Les niches des CSH subissent des changements morphologiques avec le vieillissement (Wagner et al., 2008, Bellantuono et al., 2009), ce qui altère les fonctions des CSH. En effet, des CSH jeunes injectées dans des souris vieilles présentent une baisse de leur capacité de reconstitution (Liang et al., 2005). On ne peut donc pas exclure la possibilité selon laquelle le maintien des fonctions des CSH $He^{-/-}$ au cours du vieillissement soit également dû, en partie, à des changements extrinsèques aux CSH. Il est possible que la perte de Helios protège les CSH de certaines modifications de la composition des niches des CSH, ce qui expliquerait en partie le maintien des fonctions des CSH $He^{-/-}$ à plus long terme comparé aux CSH WT. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait comparer la capacité de homing des CSH WT jeunes transplantées dans des souris vieilles $He^{-/-}$ et WT (Rossi et al., 2012). Si notre hypothèse se vérifie, on s'attend à ce que le homing des CSH WT soit supérieur dans les souris vieilles $He^{-/-}$ que dans les souris vieilles WT.

Helios régule-t-il le niveau de ROS intracellulaires dans les CSH ?

Nous avons observé que les LT-CSH $He^{-/-}$ vieilles sur-expriment le gène *foxo1*. De plus, les expériences de ChIP-seq suggèrent que Helios se lierait aux introns de *foxo1* et au

REFERENCES

Bibliographie

- Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Astrand-Grundström I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE.** (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 15, 659-69.
- Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE.** (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 22, 295-306.
- Ahn JY, Schwarz JK, Piwnica-Worms H, Canman CE.** (2000) Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res.* 1, 5934-6.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL.** (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 9, 193-7.
- Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW.** (2011). Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One*. 6, e24226.
- Aksoy O, Chicas A, Zeng T, Zhao Z, McCurrach M, Wang X, Lowe SW.** (2012). The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence. *Genes Dev.* 15, 1546-57.
- Allsopp RC, Cheshier S, Weissman IL.** (2001) Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 16, 917-24.
- Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, Harley CB, Weissman IL.** (2003a) Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood.* 15, 517-20.
- Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, Harley CB, Weissman IL.** (2003a). Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* 15, 517-20.
- Allsopp RC, Morin GB, Horner JW, DePinho R, Harley CB, Weissman IL.** (2003b) Effect of TERT over-expression on the long-term transplantation capacity of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 9, 369-71.
- Appella E, Anderson CW.** (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem.* 268, 2764-72.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al.** (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 23, 149-61.

Asai T, Liu Y, Di Giandomenico S, Bae N, Ndiaye-Lobry D, Deblasio A, Menendez S, Antipin Y, Reva B, Wevrick R, Nimer SD. (2012). Necdin, a p53 target gene, regulates the quiescence and response to genotoxic stress of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 23, 1601-12.

Attema JL, Pronk CJ, Norrdahl GL, Nygren JM, Bryder D. (2009). Hematopoietic stem cell ageing is uncoupled from p16 INK4A-mediated senescence *Oncogene*. 4, 2238-43.

Baine I, Basu S, Ames R, Sellers RS, Macian F. (2013). Helios induces epigenetic silencing of IL2 gene expression in regulatory T cells. *J Immunol*. 190, 1008-16.

Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW. (2002) Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11, 8173-8.

Beerman I, Seita J, Inlay MA, Weissman IL, Rossi DJ. (2014) Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell*. 3, 37-50.

Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman IL, Bryder D, Rossi DJ. (2010) Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23, 5465-70.

Beerman I, Bock C, Garrison BS, Smith ZD, Gu H, Meissner A, Rossi DJ. (2013) Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell*. 4, 413-25.

Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M. (2009) Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. *Biochim Biophys Acta*. 1792, 364-70.

Blank U, Karlsson G, Karlsson S. (2008). Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*. 15, 492-503.

Blomberg, I., and I. Hoffman. (1999). Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G₁/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol*. 19, 6183-6194.

Bocker MT, Hellwig I, Breiling A, Eckstein V, Ho AD, Lyko F. (2011) Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging. *Blood*. 12, e182-9.

Bondar T, Medzhitov R. (2010) p53-mediated hematopoietic stem and progenitor cell competition. *Cell Stem Cell*. 2, 309-22.

Boyer MJ, Cheng T. (2008). The CDK inhibitors: potential targets for therapeutic stem cell manipulations? *Gene Ther*. 15, 117-25.

Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, Ambrosino C, Sauter G, Nebreda AR, Anderson CW, Kallioniemi A, Fornace AJ Jr, Appella E. (2002). Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet*. 31, 210-5.

- Caballero R, Setien F, Lopez-Serra L, Boix-Chornet M, Fraga MF, Ropero S, Megias D, Alaminos M, Sanchez-Tapia EM, Montoya MC, Esteller M, Gonzalez-Sarmiento R, Ballestar E.** (2007). Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos. *J Cell Sci* 120, 2619-30
- Cai Q, Dierich A, Oulad-Abdelghani M, Chan S, Kastner P.** (2009). Helios deficiency has minimal impact on T cell development and function. *J Immunol* 183, 2303-11.
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT** (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche.
- Campaner S, Doni M, Hydbring P, Verrecchia A, Bianchi L, Sardella D, Schleker T, Perna D, Tronnersjö S, Murga M, Fernandez-Capetillo O, Barbacid M, Larsson LG, Amati B.** (2010) Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. *Nat Cell Biol.* 12, 54-9.
- Cantor, A. B. and Orkin, S. H.** (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21, 3368-3376.
- Carvajal LA, Hamard PJ, Tonnessen C, Manfredi JJ.** E2F7, a novel target, is up-regulated by p53 and mediates DNA damage-dependent transcriptional repression. *Genes Dev.* 15, 1533-45.
- Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A.** (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol.* 5, 675-9.
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A.** (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science.* 3, 922-7.
- Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA.** (2007) Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol.* 5, e201.
- Chen BP, Uematsu N, Kobayashi J, Lerenthal Y, Krempler A, Yajima H, Lobrich M, Shiloh Y, Chen DJ.** (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J. Biol. Chem.* 282, 6582–6587.
- Chen Y, Ma X, Zhang M, Wang X, Wang C, Wang H, Guo P, Yuan W, Rudolph KL, Zhan Q, Ju Z.** (2014) Gadd45a regulates hematopoietic stem cell stress responses in mice. *Blood.* 6, 851-62.
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT.** (2000a) Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 10, 1804-8.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Dombkowski, D., Stier, S. & Scadden, D. T.** (2000) Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nat. Med.* 6, 1235–1240

- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL.** (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 16, 3120-5
- Choi J, Nannenga B, Demidov ON, Bulavin DV, Cooney A, Brayton C, Zhang Y, Mbawuike IN, Bradley A, Appella E, Donehower LA.** (2002). Mice deficient for the wild-type p53-induced phosphatase gene (Wip1) exhibit defects in reproductive organs, immune function, and cell cycle control. *Mol Cell Biol.* 22, 1094-105.
- Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N, Tanaka M, Merad M, Frenette PS.** (2011). Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med.* 14, 261-71.
- Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J.** (2005) gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell.* 9, 801-9.
- Cumano, A. and Godin, I.** (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu.Rev. Immunol.* 25, 745-785.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al.** (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26, 9363-7.
- Ding L, Morrison SJ.** (2013) Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature.* 14, 231-5.
- Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ.** (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature.* 25, 457-62.
- Dolence JJ, Gwin K, Frank E, Medina KL.** Threshold levels of Flt3-ligand are required for the generation and survival of lymphoid progenitors and B-cell precursors. *Eur J Immunol.* 2011; 41:324–334.
- Dolence JJ, Gwin KA, Shapiro MB, Medina KL.** (2014). Flt3 signaling regulates the proliferation, survival, and maintenance of multipotent hematopoietic progenitors that generate B cell precursors. *Exp Hematol.* 42, 380-393.e3.
- Dovat S, Montecino-Rodriguez E, Schuman V, Teitell MA, Dorshkind K, Smale ST.** (2005). Transgenic expression of Helios in B lineage cells alters B cell properties and promotes lymphomagenesis. *J Immunol.* 15, 3508-15.
- Dovat S, Ronni T, Russell D, Ferrini R, Cobb BS, Smale ST.** (2002). A common mechanism for mitotic inactivation of C2H2 zinc finger DNA-binding domains. *Genes Dev.* 16, 2985-90.
- Drummond MW, Balabanov S, Holyoake TL, Brummendorf TH.** (2007) Concise review: Telomere biology in normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Stem Cells.* 25, 1853-61.

Dumble M, Moore L, Chambers SM, Geiger H, Van Zant G, Goodell MA, Donehower LA. (2007) The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood*. 15, 1736-42.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 19, 817-25.

Ema H, Morita Y, Yamazaki S, Matsubara A, Seita J, Tadokoro Y, Kondo H, Takano H, Nakauchi H. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nat Protoc* 1, 2979-87.

Ergen AV, Boles NC, Goodell MA. (2012) Rantes/Ccl5 influences hematopoietic stem cell subtypes and causes myeloid skewing. *Blood*. 15, 2500-9.

Eruslanov E, Kusmartsev S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol*. 594, 57-72.

Fiscella M, Zhang H, Fan S, Sakaguchi K, Shen S, Mercer WE, Vande Woude GF, O'Connor PM, Appella E. (1997) Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10, 6048-53.

Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, Guo J, Leahy KM, Kronenberg HM, Scadden DT. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell*. 6, 274-83.

Florian MC, Dörr K, Niebel A, Daria D, Schrezenmeier H, Rojewski M, Filippi MD, Hasenberg A, Gunzer M, Scharffetter-Kochanek K, Zheng Y, Geiger H. (2012) Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell*. 4, 520-30.

Fujii K, Ishimaru F, Nakase K, Tabayashi T, Kozuka T, Naoki K, Miyahara M, Toki H, Kitajima K, Harada M, Tanimoto M. (2003). Over-expression of short isoforms of Helios in patients with adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br J Haematol*. 120, 986-9.

G.E. Taccioli, T.M. Gottlieb, T. Blunt, A. Priestley, J. Demengeot, R. Mizuta, A.R. Lehmann, F.W. Alt, S.P. Jackson, P.A. Jeggo (1994). Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination, *Science* 265, 1442–1445.

Galloway, J. L. and Zon, L. I. (2003). Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* 53, 139-158.

Gan B, Hu J, Jiang S, Liu Y, Sahin E, Zhuang L, Fletcher-Sananikone E, Colla S, Wang YA, Chin L, Depinho RA. (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2, 701-4.

García-Cao I, García-Cao M, Tomás-Loba A, Martín-Caballero J, Flores JM, Klatt P, Blasco MA, Serrano M. (2006) Increased p53 activity does not accelerate telomere-driven ageing. *EMBO Rep*. 7, 546-52.

- Gatza C, Moore L, Dumble M, Donehower LA.** (2007) Tumor suppressor dosage regulates stem cell dynamics during aging. *Cell Cycle*. 1, 52-5.
- Geiger H, Rudolph KL.** (2009). Aging in the lympho-hematopoietic stem cell compartment. *Trends Immunol*. 30, 360-5.
- Geiger H, de Haan G, Florian MC.** (2013) The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol*. 13, 376-89.
- Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, Molnar A, Wu P, Winandy S, Sharpe A.** (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell*. 79, 143-56.
- Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC, Durham NM, Hipkiss EL, Pyle KJ, Wada S, Pan F, Pardoll DM, Drake CG.** (2010). A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol*. 47, 1595-600.
- Gómez-del Arco P, Koipally J, Georgopoulos K.** (2005). Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol*. 25, 2688-97.
- Gottschalk RA, Corse E, Allison JP.** (2012). Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 188, 976-80.
- Guirouilh-Barbat J, Huck S, Bertrand P, Pirzio L, Desmaze C, Sabatier L, Lopez BS** (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol Cell*. 4, 611-23.
- Hahn K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, Akashi K, Weissman IL, Fisher AG, Smale ST.** (1998). Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* 12, 782-96.
- Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T.** (2001). Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25, 11318-23.
- Harker N, Naito T, Cortes M, Hostert A, Hirschberg S, Tolaini M, Roderick K, Georgopoulos K, Kioussis D.** (2002). The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins. *Mol Cell*. 10, 1403-15.
- Harrison DE.** (1980). Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity. *Blood* 55, 77-81.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M.** (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997 15, 296-9.
- Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, Mathis D, Benoist C.** (2007). Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity*. 27, 786-800.
- Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK.** (2013). Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J Immunol*. 190, 2001-8.

Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, Orkin SH. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature*. 21, 1002-7.

Hogart A, Lichtenberg J, Ajay SS, Anderson S; NIH Intramural Sequencing Center, Margulies EH, Bodine DM. (2012) Genome-wide DNA methylation profiles in hematopoietic stem and progenitor cells reveal overrepresentation of ETS transcription factor binding sites. *Genome Res*. 22, 1407-18.

Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, Payne-Turner D, Churchman M, Andersson A, Chen SC, McCastlain K, Becksfort J, Ma J, Wu G, Patel SN, Heatley SL, Phillips LA, Song G, Easton J, Parker M, Chen X, Rusch M, Boggs K, Vadodaria B, Hedlund E, Drenberg C, Baker S, Pei D, Cheng C, Huether R, Lu C, Fulton RS, Fulton LL, Tabib Y, Dooling DJ, Ochoa K, Minden M, Lewis ID, To LB, Marlton P, Roberts AW, Raca G, Stock W, Neale G, Drexler HG, Dickins RA, Ellison DW, Shurtleff SA, Pui CH, Ribeiro RC, Devidas M, Carroll AJ, Heerema NA, Wood B, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, Raimondi SC, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Hunger SP, Loh ML, Mullighan CG. (2013). The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 45, 242-52.

Honda R, Tanaka H, Yasuda H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 22, 25-7.

Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, Enver T. (1997) Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev*. 15, 774-85.

Hu R, Sharma SM, Bronisz A, Srinivasan R, Sankar U, Ostrowski MC. (2007). Eos, MTF, and PU.1 recruit corepressors to osteoclast-specific genes in committed myeloid progenitors. *Mol Cell Biol*. 27, 4018-27.

Ichii M, Frank MB, Iozzo RV, Kincade PW. (2012). The canonical Wnt pathway shapes niches supportive of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 16, 1683-92.

Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW, Suda T. (2004) Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 21, 997-1002.

Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. (2006) Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 12, 446-51.

Iyama T, Wilson DM 3rd. (2013) DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 12, 620-36.

Jagannathan-Bogdan and Zon. (2013) Hematopoiesis *Development* 140, 2463-2467

Jang YY, Sharkis SJ. (2007) A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 15, 3056-63.

Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, Cheng T, DePinho RA, Sharpless NE, Scadden DT. (2006) Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*. 28, 421-6.

- Janzen V, Scadden DT.** (2006). Stem cells: good, bad and reformable. *Nature*. 25, 418-9.
- Jordan CT, McKearn JP, Lemischka IR.** (1990) Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells. *Cell* 15, 953-63.
- Karlsson G, Rörby E, Pina C, Soneji S, Reckzeh K, Miharada K, Karlsson C, Guo Y, Fugazza C, Gupta R, Martens JH, Stunnenberg HG, Karlsson S, Enver T.** (2013). The tetraspanin CD9 affords high-purity capture of all murine hematopoietic stem cells. *Cell Rep*. 29, 642-8.
- Kelley CM, Ikeda T, Koipally J, Avitahl N, Wu L, Georgopoulos K, Morgan BA.** (1998). Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol* 8, 508-15.
- Kiel MJ, Morrison SJ.** (2006). Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche. *Immunity*. 25, 862-4.
- Kiel MJ, Morrison SJ.** (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 8, 290-301.
- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ.** (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stemcells. *Cell*. 1, 1109-21.
- Kim I, He S, Yilmaz OH, Kiel MJ, Morrison SJ.** (2008). Enhanced purification of fetal liver hematopoietic stem cells using SLAM family receptors. *Blood*. 15, 737-44.
- Kim J, Sif S, Jones B, Jackson A, Koipally J, Heller E, Winandy S, Viel A, Sawyer A, Ikeda T, Kingston R, Georgopoulos K.** (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*. 10, 345-55.
- Kim JA, Kang YJ, Park G, Kim M, Park YO, Kim H, Leem SH, Chu IS, Lee JS, Jho EH, Oh IH.** (2009). Identification of a stroma-mediated Wnt/beta-catenin signal promoting self-renewal of hematopoietic stem cells in the stem cell niche. *Stem Cells*. 27, 1318-29.
- Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C.** (2006) Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol*. 7, 1048-56.
- Klauke K, Radulović V, Broekhuis M, Weersing E, Zwart E, Olthof S, Ritsema M, Bruggeman S, Wu X, Helin K, Bystrykh L, de Haan G.** (2013) Polycomb Cbx family members mediate the balance between haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Nat Cell Biol*. 15, 353-62.
- Kleinmann E, Geimer Le Lay AS, Sellars M, Kastner P, Chan S.** (2008). Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development. *Mol Cell Biol*. 28, 7465-75.
- Köhler A, Schmithorst V, Filippi MD, Ryan MA, Daria D, Gunzer M, Geiger H.** (2009) Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. *Blood*. 9, 290-8.
- Koipally J, Georgopoulos K.** (2000). Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J Biol Chem*. 275, 19594-602.

- Koipally J, Georgopoulos K.** (2002)a. Ikaros-CtIP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression. *J Biol Chem.* 277, 23143-9.
- Koipally J, Georgopoulos K.** (2002)b. A molecular dissection of the repression circuitry of Ikaros. *J Biol Chem.* 277, 27697-705.
- Koipally J, Renold A, Kim J, Georgopoulos K.** (1999). Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J.* 18, 3090-100.
- Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P.** (2004) Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118, 477–491
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE.** (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest.* 114, 1299-307.
- Kruse JP, Gu W.** (2009). Modes of p53 regulation. *Cell.* 15, 609-22.
- Ku CJ, Hosoya T, Maillard I, Engel JD.** (2012). GATA-3 regulates hematopoietic stem cell maintenance and cell-cycle entry. *Blood.* 8, 2242-51.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH.** (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 1997 15, 299-303.
- Lammer, C., S. Wagerer, R. Saffrich, D. Mertens, W. Ansorge, and I. Hoffmann.** (1998). The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J. Cell Sci.* 111, 2445-2453
- LeBron C, Chen L, Gilkes DM, Chen J.** (2006) Regulation of MDMX nuclear import and degradation by Chk2 and 14-3-3. *EMBO J.* 22, 1196-206.
- Lees-Miller SP, Meek K.** (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie.* 85, 1161–1173.
- Li DW, Liu JP, Schmid PC, Schlosser R, Feng H, Liu WB, Yan Q, Gong L, Sun SM, Deng M, Liu Y.** (2006). Protein serine/threonine phosphatase-1 dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to modulate its transcriptional and apoptotic activities. *Oncogene.* 18, 3006-22.
- Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ.** (2005) Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 15, 1479-87.
- Liippo J, Nera KP, Veistinen E, Lähdesmäki A, Postila V, Kimby E, Riikonen P, Hammarström L, Pelkonen J, Lassila O.** (2001). Both normal and leukemic B lymphocytes express multiple isoforms of the human Aiolos gene. *Eur J Immunol.* 31, 3469-74.
- Lin HK, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee SW, Chan CH, Yang WL, Wang J, Egia A, Nakayama KI, Cordon-Cardo C, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP.** (2010) Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature.* 18, 374-9.
- Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A, Müller S, Scheffner M.** (2003) HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14, 12009-14.

Linton PJ, Dorshkind K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 5, 133-9.

Littley MD, Shalet SM, Beardwell CG. (1990). Radiation and hypothalamic-pituitary function. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 4, 147-75.

Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G, Di Giandomenico S, Lee JM, Deblasio A, Menendez S, Antipin J, Reva B, Koff A, Nimer SD. (2009) p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell.* 9, 37-48.

Liu Y, Johnson SM, Fedoriw Y, Rogers AB, Yuan H, Krishnamurthy J, Sharpless NE. (2011). Expression of p16(INK4a) prevents cancer and promotes aging in lymphocytes. *Blood.* 24, 3257-67.

Liu N, Wang J, Wang J, Wang R, Liu Z, Yu Y, Lu H. (2013). ING5 is a Tip60 cofactor that acetylates p53 in response to DNA damage. *Cancer Res.* 15, 3749-60.

Lorenz E, Congdon C, Uphoff D. (1952). Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. *Radiology* 58, 863-77.

Lowe SW, Sherr CJ. (2003) Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev.* 13, 77-83.

Lu X, Ma O, Nguyen TA, Jones SN, Oren M, Donehower LA. (2007) The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell.* 12, 342-54.

Lu X, Nannenga B, Donehower LA. (2005) PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev.* 15, 1162-74.

Luc S, Buza-Vidas N, Jacobsen SE. (2007). Biological and molecular evidence for existence of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Ann N Y Acad Sci.* 1106, 89-94.

Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, Lerenthal Y, Jackson SP, Bartek J, Lukas J. (2004) Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J.* 7, 2674-83.

Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature.* 16, 377-81.

Macurek L, Lindqvist A, Voets O, Kool J, Vos HR, Medema RH. (2010) Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene.* 15, 2281-91.

Malumbres M, Sotillo R, Santamaría D, Galán J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M. (2004) Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell.* 20, 493-504.

Martín-Ibáñez R, Crespo E, Esgleas M, Urban N, Wang B, Waclaw R, Georgopoulos K, Martínez S, Campbell K, Vicario-Abejón C, Alberch J, Chan S, Kastner P, Rubenstein JL, Canals JM. (2012). Helios transcription factor expression depends on

Gsx2 and Dlx1&2 function in developing striatal matrix neurons. *Stem Cells Dev.* 10, 2239-51

Maryanovich M, Oberkovitz G, Niv H, Vorobiyov L, Zaltsman Y, Brenner O, Lapidot T, Jung S, Gross A. (2012). The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol.* 25, 535-41.

Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ. (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12, 10389-94.

Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M. (2001) ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* 1, 1067-77.

McCarty AS, Kleiger G, Eisenberg D, Smale ST. (2003). Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. *Mol Cell.* 11, 459-70.

McGrath, K. E., Frame, J. M., Fromm, G. J., Koniski, A. D., Kingsley, P. D., Little, J., Bulger, M. and Palis J. (2011). A transient definitive erythroid lineage with unique regulation of the β -globin locus in the mammalian embryo. *Blood* 117, 4600-4608.

Meek K, Dang V, Lees-Miller SP. (2008) DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol.* 99, 33-58.

Meleshko AN, Movchan LV, Belevtsev MV, Savitskaja TV. (2008). Relative expression of different Ikaros isoforms in childhood acute leukemia. *Blood Cells Mol Dis.* 41, 278-83

Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 12, 829-34.

Mohrin M, Bourke E, Alexander D, Warr MR, Barry-Holson K, Le Beau MM, Morrison CG, Passegué E. (2010) Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell.* 6, 174-85.

Molnár A, Georgopoulos K. (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 14, 8292-303.

Montecino M, Stein JL, Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Cruzat F, Gutiérrez S, Olate J, Marcellini S, Gutiérrez JL. (2007). Nucleosome organization and targeting of SWI/SNF chromatin-remodeling complexes: contributions of the DNA sequence. *Biochem Cell Biol.* 85, 419-25.

Moon SH, Lin L, Zhang X, Nguyen TA, Darlington Y, Waldman AS, Lu X, Donehower LA. (2010) Wild-type p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant gamma-H2AX and suppresses DNA double strand break repair. *J Biol Chem.* 23, 12935-47.

Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E, Wu P, Neben S, Georgopoulos K. (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J.* 16, 2004-13.

- Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E, Wu P, Neben S, Georgopoulos K.** (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J.* 15, 2004-13.
- Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL.** (1995). The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 24, 10302-6.
- Morrison SJ, Wright DE, Weissman IL.** (1997). Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4, 1908-13.
- Moskalev AA, Smit-McBride Z, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Tacutu R, Fraifeld VE.** (2012) Gadd45 proteins: relevance to aging, longevity and age-related pathologies. *Ageing Res Rev.* 11, 51-66.
- Mucenski, M. L., McLain, K., Kier, A. B., Swerdlow, S. H., Schreiner, C. M., Miller, T. A., Pietryga, D. W., Scott, W. J., Jr and Potter, S. S.** (1991). A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65, 677-689.
- Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, White D, Hughes TP, Le Beau MM, Pui CH, Relling MV, Shurtleff SA, Downing JR.** (2008). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 453, 110-4.
- Nagpal K, Watanabe KS, Tsao BP, Tsokos GC.**(2014). Transcription factor Ikaros Represses Protein Phosphatase 2A (PP2A) Expression through an Intronic Binding Site. *J Biol Chem.* 16, 13751-7.
- Nagy Z, Soutoglou E.** (2009) DNA repair: easy to visualize, difficult to elucidate. *Trends Cell Biol.* 19, 617-29.
- Nakada D, Saunders TL, Morrison SJ.** (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature.* 2, 653-8.
- Nakano K, Vousden KH.** (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 7, 683-94.
- Nakase K, Ishimaru F, Fujii K, Tabayashi T, Kozuka T, Sezaki N, Matsuo Y, Harada M.** (2002). Overexpression of novel short isoforms of Helios in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol.* 30, 313-7.
- Nie Y, Han YC, Zou YR.** CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med.* 2008;205(4):777-783.
- Noda S, Horiguchi K, Ichikawa H, Miyoshi H.** (2008). Repopulating activity of ex vivo-expanded murine hematopoietic stem cells resides in the CD48-c-Kit+Sca-1+lineage marker-cell population. *Stem Cells.* 26, 646-55.
- Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, Canty KJ, Harley B, Mahoney JE, Park SY, Lu J, Protopopov A, Silberstein LE.** (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bonemarrow microenvironment. *Nat Cell Biol.* 15, 533-43.

- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N.** (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 12, 1053-8.
- Oguro H, Ding L, Morrison SJ.** (2013). SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell*. 3, 102-16.
- Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, Ikawa T, Yamazaki S, Kawamoto H, Nakauchi H, Iwama A.** (2010) Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. *Cell Stem Cell*. 5, 279-86.
- 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*. 15, 3044-50.
- O'Neill DW, Schoetz SS, Lopez RA, Castle M, Rabinowitz L, Shor E, Krawchuk D, Goll MG, Renz M, Seelig HP, Han S, Seong RH, Park SD, Agalioi T, Munshi N, Thanos D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bank A.** (2000). An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol*. 20, 7572-82.
- Orford KW, Scadden DT.** (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet*. 9, 115-28.
- Orkin, S. H. and Zon, L. I.** (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H.** (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 12, 242-5.
- Palis, J. and Yoder, M. C.** (2001). Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp. Hematol*. 29, 927-936.
- Papathanasiou P, Attema JL, Karsunky H, Hosen N, Sontani Y, Hoyne GF, Tunningley R, Smale ST, Weissman IL.** (2009). Self-renewal of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells is regulated by Ikaros. *Stem Cells*. 27, 3082-92.
- Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF.** (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*. 15, 302-5.
- Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD.** (2007) Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27, 5431-6.
- Passegué E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL.** (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med*. 5, 1599-611.
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM.** (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*. 10, 886-95.

- Perdomo J, Holmes M, Chong B, Crossley M.** (2000). Eos and pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities. *J Biol Chem* 275, 38347-54.
- Perdomo J, Crossley M.** (2002). The Ikaros family protein Eos associates with C-terminal-binding protein corepressors. *Eur J Biochem.* 269, 5885-92.
- Pereg Y, Shkedy D, de Graaf P, Meulmeester E, Edelson-Averbukh M, Salek M, Biton S, Teunisse AF, Lehmann WD, Jochemsen AG, Shiloh Y.** (2005) Phosphorylation of Hdmx mediates its Hdm2- and ATM-dependent degradation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5, 5056-61.
- Petrini, J. H.** (2000). The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 293–296.
- Pierce AJ, Johnson RD, Thompson LH, Jasin M.**(1999). XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev.* 15, 2633-8.
- Popescu M, Gurel Z, Ronni T, Song C, Hung KY, Payne KJ, Dovat S.** (2009). Ikaros stability and pericentromeric localization are regulated by protein phosphatase 1. *J Biol Chem.* 284, 13869-80.
- Popławski T, Błasiak J.** (2006) DNA homologous recombination repair in mammalian cells. *Postepy Biochem.* 52, 180-93.
- Poyurovsky MV, Priest C, Kentsis A, Borden KL, Pan ZQ, Pavletich N, Prives C.** (2007) The Mdm2 RING domain C-terminus is required for supramolecular assembly and ubiquitin ligase activity. *EMBO J.* 10, 90-101.
- Purton LE, Scadden DT.** (2007). Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell Stem Cell* 1, 263-70.
- Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, et al.** Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.*2007;1(6):671-684.
- Qing Y, Wang Z, Bunting KD, Gerson SL.** (2014). Bcl2 overexpression rescues the hematopoietic stem cell defects in Ku70deficient mice by restoration of quiescence. *Blood.* 13, 1002-11.
- R.C. Getts, T.D. Stamato,** (1994). Absence of a Ku-like DNA end binding activity in the xrs double-strand DNA repair-deficient mutant, *J. Biol. Chem.* 269, 15981–15984.
- Randall TD, Weissman IL.** (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood.* 15, 3596-606.
- Rebollo A, Schmitt C.** (2003). Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol Cell Biol.* 81, 171-5
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM.** (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 6, 905-16.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM.** (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 6, 5858-68.

- Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL.** (2007) Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 7, 725-9.
- Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL.** (2005) Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28, 9194-9.
- Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL.** (2008) Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell*. 22, 681-96.
- Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL.** (2008). Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell*. 22, 681-96.
- Rossi DJ, Seita J, Czechowicz A, Bhattacharya D, Bryder D, Weissman IL.** (2007) Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging. *Cell Cycle*. 1, 2371-6.
- Rossi L, Lin KK, Boles NC, Yang L, King KY, Jeong M, Mayle A, Goodell MA.** (2012). Less is more: unveiling the functional core of hematopoietic stem cells through knockout mice. *Cell Stem Cell*. 7, 302-17.
- Rübe CE, Fricke A, Widmann TA, Fürst T, Madry H, Pfreundschuh M, Rübe C.** (2011) Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. *PLoS One*. 7, e17487.
- Rübe CE, Fricke A, Widmann TA, Fürst T, Madry H, Pfreundschuh M, Rübe C.** (2011) Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. *PLoS One*. 7, e17487.
- Sato T, Laver JH, Ogawa M.** (1999). Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 15, 2548-54.
- Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG, Leutz A.** (2006) Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol*. 7, 1037-47.
- Schito ML, Demidov ON, Saito S, Ashwell JD, Appella E.** (2006). Wip1 phosphatase-deficient mice exhibit defective T cell maturation due to sustained p53 activation. *J Immunol*. 15, 4818-25.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. and Singh, H.** (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-1577.
- Shao L, Sun Y, Zhang Z, Feng W, Gao Y, Cai Z, Wang ZZ, Look AT, Wu WS.** (2010) Deletion of proapoptotic Puma selectively protects hematopoietic stem and progenitor cells against high-dose radiation. *Blood*. 10, 4707-14.
- Sharpless NE, DePinho RA.** (1999) The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev*. 9, 22-30.
- Shi J, Wei Y, Xia J, Wang S, Wu J, Chen F, Huang G, Chen J.** (2014). CXCL12-CXCR4 contributes to the implication of bone marrow in cancer metastasis. *Future Oncol*. 10, 749-59.

- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C.** (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*. 31, 325-34.
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA.** (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*. 18, 134–147
- Shrivastav M, Miller CA, De Haro LP, Durant ST, Chen BP, Chen DJ, Nickoloff JA.** (2009) DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. 6, 920-9.
- Sirin O, Lukov GL, Mao R, Conneely OM, Goodell MA.** (2010). The orphan nuclear receptor Nurr1 restricts the proliferation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*. 12, 1213-9.
- Smith GC, Jackson SP.** (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev*. 15, 916-34.
- Snouwaert JN, Gowen LC, Latour AM, Mohn AR, Xiao A, DiBiase L, Koller BH.** (1999) BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a brca1 transgene. *Oncogene*. 20, 7900-7.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL.** (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1, 58-62.
- Sridharan R, Smale ST.** (2007). Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes. *J Biol Chem* 282, 30227-38.
- stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149-161.
- Stevens C, Smith L, La Thangue NB.** (2003) Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*. 5, 401-9.
- Stiff T, O’Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA.** (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res*.64, 2390–2396.
- Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Buza-Vidas N, Adolfsson J, Jacobsen SE.** Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity*. 2002; 17:463–472.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP.** (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*. 29, 1213-26.
- Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H.** (2000) Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 6, 1273-80.
- Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, Sakaguchi S.** (2006). Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol*. 18, 1197-209.
- Sun L, Crotty ML, Sensel M, Sather H, Navara C, Nachman J, Steinherz PG, Gaynon PS, Seibel N, Mao C, Vassilev A, Reaman GH, Uckun FM.** (1999)b. Expression of dominant-negative Ikaros isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 5, 2112-20.

- Sun L, Heerema N, Crotty L, Wu X, Navara C, Vassilev A, Sensel M, Reaman GH, Uckun FM.** (1999)a Expression of dominant-negative and mutant isoforms of the antileukemic transcription factor Ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci.* 19, 680-5.
- Sun L, Kerawalla H, Wu X, Lehnert MS, Uckun FM.** (2002). Expression of a unique helios isoform in human leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 43, 841-9.
- Sun L, Liu A, Georgopoulos K.** (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO.* 15, 5358-69.
- Sun D, Luo M, Jeong M, Rodriguez B, Xia Z, Hannah R, Wang H, Le T, Faull KF, Chen R, Gu H, Bock C, Meissner A, Göttgens B, Darlington GJ, Li W, Goodell MA.** (2014). Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. *Cell Stem Cell.* 1, 673-88.
- Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ.** (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8736-40.
- Tabayashi T, Ishimaru F, Takata M, Kataoka I, Nakase K, Kozuka T, Tanimoto M.** (2007). Characterization of the short isoform of Helios overexpressed in patients with T-cell malignancies. *Cancer Sci.* 98, 182-8.
- Tajima F, Sato T, Laver JH, Ogawa M.**(2000). CD34 expression by murine hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1, 1989-93.
- Takai H, Smogorzewska A, de Lange T.** (2003) DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol.* 2, 1549-56.
- Takanashi M, Yagi T, Imamura T, Tabata Y, Morimoto A, Hibi S, Ishii E, Imashuku S.** (2002). Expression of the Ikaros gene family in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 117, 525-30.
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M., and Suda, T.** (2010). Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 391–402.
- TeKippe M, Harrison DE, Chen J.** (2003) Expansion of hematopoietic stem cell phenotype and activity in Trp53-null mice. *Exp Hematol.* 31, 521-7.
- Thompson BJ, Jankovic V, Gao J, et al.** Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7. *J Exp Med.* 2008;205(6):1395-1408.
- Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM.** Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. (2010). *J Immunol.* 184, 3433-41.

Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegué E, DePinho RA, Gilliland DG. (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 126, 325-39.

Tuljapurkar SR, McGuire TR, Brusnahan SK, Jackson JD, Garvin KL, Kessinger MA, Lane JT, O' Kane BJ, Sharp JG. (2011) Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging. *J Anat.* 219, 574-81.

Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA. (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature.* 3, 45-53.

Uchida N, Weissman IL. (1992). Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med.* 1, 175-84.

Uldrijan S, Pannekoek WJ, Vousden KH. (2007) An essential function of the extreme C-terminus of MDM2 can be provided by MDMX. *EMBO J.* 10, 102-12.

Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* 15, 5612-21.

van Os R, Kamminga LM, Ausema A, Bystrykh LV, Draijer DP, van Pelt K, Dontje B, de Haan G. (2007). A Limited role for p21^{Cip1}/Waf1 in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning. *Stem Cells.* 25, 836-43.

van Os RP, Dethmers-Ausema B, de Haan G. (2008). In vitro assays for cobblestone area-forming cells, LTC-IC, and CFU-C. *Methods Mol Biol.* 430, 143-57.

Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. (1994) Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11, 9857-60.

Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, Goodell MA. (2004). Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* 2, e301.

Verhagen J, Wraith DC. (2010). Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells". *J Immunol.* 185, 7129.

Viatour P, Somervaille TC, Venkatasubrahmanyam S, et al. Hematopoietic stem cell quiescence is maintained by compound contributions of the retinoblastoma gene family. *Cell Stem Cell.* 2008;3(4):416-428.

von Zglinicki T, Saretzki G, Döcke W, Lotze C. (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res.* 220, 186-93.

Wagner W, Horn P, Bork S, Ho AD. (2008) Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche. *Exp Gerontol.* 43, 974-80.

Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. (1996). Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16, 3444-9.

Wang J, Sun Q, Morita Y, Jiang H, Gross A, Lechel A, Hildner K, Guachalla LM, Gompf A, Hartmann D, Schambach A, Wuestefeld T, Dauch D, Schrezenmeier H, Hofmann WK, Nakauchi H, Ju Z, Kestler HA, Zender L, Rudolph KL. (2012) A differentiation checkpoint limits hematopoietic stem cell self-renewal in response to DNA damage. *Cell.* 2, 1001-14.

Wang L, Zhang H, Rodriguez S, Cao L, Parish J, Mumaw C, Zollman A, Kamoka MM, Mu J, Chen DZ, Srour EF, Chitteti BR, HogenEsch H, Tu X, Bellido TM, Boswell HS, Manshoury T, Verstovsek S, Yoder MC, Kapur R, Cardoso AA¹, Carlesso N. (2014). Notch-Dependent Repression of miR-155 in the Bone Marrow Niche Regulates Hematopoiesis in an NF- κ B-Dependent Manner. *Cell Stem Cell.* 3, 51-65.

Wang HC, Chou WC, Shieh SY, Shen CY. (2006) Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res.* 1, 1391-400.

Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, Ogawa M, Zhou D. (2006) Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood.* 1, 358-66.

Waterstrat A, Van Zant G. (2009). Effects of aging on hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Immunol.* 21, 408-13.

Weinstock DM, Richardson CA, Elliott B, Jasin M. (2006). Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst).* 8, 1065-74.

Weissman IL. (1994) Stem cells, clonal progenitors, and commitment to the three lymphocyte lineages: T, B, and NK cells. *Immunity* 1, 529-31.

Weissman IL. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 7, 157-68

Weksberg DC, Chambers SM, Boles NC, Goodell MA. (2008). CD150- side population cells represent a functionally distinct population of long-term hematopoietic stem cells. *Blood.* 15, 2444-51.

Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature.* 22, 448-52.

Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 12, 1118-29.

Winandy S, Wu P, Georgopoulos K. (1995). A dominant mutation in the *Ikaros* gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell.* 83, 289-99.

- Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, Jacobsen RN, Forristal CE, Patton JT, Magnani JL, Lévesque JP.** (2012). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med.* 18, 1651-7.
- Woolthuis CM, de Haan G, Huls G.**(2011). Aging of hematopoietic stem cells: Intrinsic changes or micro-environmental effects? *Curr Opin Immunol.* 2011 23, 512-7.
- Wu WS, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, Adams JM, Look AT.** (2005) Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell.* 18, 641-53.
- Xing Z, Ryan MA, Daria D, Nattamai KJ, Van Zant G, Wang L, Zheng Y, Geiger H.** (2006) Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood.* 1, 2190-7.
- Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K.** (2011) Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood.* 15, 2941-50.
- Yan L, Womack B, Wotton D, Guo Y, Shyr Y, Davé U, Li C, Hiebert S, Brandt S, Hamid R.** (2013). Tgif1 regulates quiescence and self-renewal of hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol.* 33, 4824-33
- Yang L, Wang L, Geiger H, Cancelas JA, Mo J, Zheng Y.** (2007). Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20, 5091-6.
- Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Månsson R, Sigvardsson M, Jacobsen SE.** (2005). Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood.* 1, 2717-23.
- Yap WH, Yeoh E, Tay A, Brenner S, Venkatesh B.** (2005). STAT4 is a target of the hematopoietic zinc-finger transcription factor Ikaros in T cells. *FEBS Lett.* 579, 4470-8.
- Yilmaz OH, Kiel MJ, Morrison SJ.** (2006). SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity. *Blood.* 1, 924-30.
- Yoshida T, Landhuis E, Dose M, Hazan I, Zhang J, Naito T, Jackson AF, Wu J, Perotti EA, Kaufmann C, Gounari F, Morgan BA, Georgopoulos K.** (2013). Transcriptional regulation of the *Ikzf1* locus. *Blood.* 122, 3149-59.
- Yu H, Shen H, Yuan Y, XuFeng R, Hu X, Garrison SP, Zhang L, Yu J, Zambetti GP, Cheng T.** (2010) Deletion of Puma protects hematopoietic stem cells and confers long-term survival in response to high-dose gamma-irradiation. *Blood.* 29, 3472-80.
- Yu H, Yuan Y, Shen H, Cheng T.** (2006). Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18 INK4C and p21 Cip1/Waf1 in opposite manners. *Blood.* 1, 1200-6.
- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B.** (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell.* 7, 673-82.

Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T. (2004). In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol.* 6, 436-42.

Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, Park BV, Ceccato CM, Bruno TC, Tam AJ, Getnet D, Drake CG. (2012). Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS One.* 7, e34547.

Zhan Q. (2005) Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat Res.* 6, 133-43.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 23, 836-41.

Zhang Z, Swindle CS, Bates JT, Ko R, Cotta CV, Klug CA. (2007). Expression of a non-DNA-binding isoform of Helios induces T-cell lymphoma in mice. *Blood.* 109, 2190-7

Zhou J, Lim CU, Li JJ, Cai L, Zhang Y. (2006) The role of NBS1 in the modulation of PIKK family proteins ATM and ATR in the cellular response to DNA damage. *Cancer Lett.* 1, 9-15.

Zhu X, Asa SL, Ezzat S. (2007). Ikaros is regulated through multiple histone modifications and deoxyribonucleic acid methylation in the pituitary. *Mol Endocrinol.* 21, 1205-15.

Zimdahl B, Ito T, Blevins A, Bajaj J, Konuma T, Weeks J, Koechlein CS, Kwon HY, Arami O, Rizzieri D, Broome HE, Chuah C, Oehler VG, Sasik R, Hardiman G, Reya T. (2014) Lis1 regulates asymmetric division in hematopoietic stem cells and in leukemia. *Nat Genet.* 46, 245-52.

Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Suda, T. (2011). p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell* 9, 247–261.

zum Winkel K, Frey M, Fritz P, Höver KH, Kimmig B, Körbling M, Kuttig H, Mende U, Rieden K, Sturm V. (1987). Perspectives of radiotherapy. *Arzneimittelforschung.* 37, 263-72.

Etude du rôle du facteur de transcription Helios dans les cellules souches hématopoïétiques

Résumé

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine de l'ensemble des cellules hématopoïétiques, mais les mécanismes responsables de leurs réponses au stress ne sont que partiellement compris. J'ai étudié le rôle du facteur de transcription Helios dans les CSH, dans lesquelles il est fortement exprimé. J'ai trouvé que les CSH de souris nulles pour Helios (He^{-/-}) possèdent un plus fort potentiel de reconstitution que les CSH WT dans des expériences de transplantations en série. De manière frappante, les souris âgées de 2 ans possèdent 8 fois plus de CSH fonctionnelles par rapport aux souris vieilles WT. De plus, le pool de CSH de long terme de souris He^{-/-} vieilles ressemblent aux CSH WT jeunes en termes de phénotype et de fréquences. Les CSH He^{-/-} vieilles présentent une dérégulation de gènes impliqués dans le vieillissement. De plus, les CSH He^{-/-} jeunes sous-expriment des gènes codant des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ainsi que dans la voie p53. Quand les CSH He^{-/-} et WT sont traitées avec différents agents radiomimétiques qui induisent des cassures simple et double brins à l'ADN, tels que la néocarzinostatine, la camptothécine ou l'étoposide, l'entrée en apoptose, en sénescence et l'arrêt de la prolifération des CSH He^{-/-} sont altérées. Ce phénotype est accompagné d'une faible induction des gènes cibles de p53 et d'une altération du dégagement des foyers gammaH2AX. De plus, j'ai montré que Helios agit en synergie avec p53 pour réguler les réponses aux dommages à l'ADN des CSH. Mes résultats suggèrent qu'en synergie avec p53, Helios contrôle le vieillissement des CSH en prévenant l'accumulation des dommages de l'ADN des CSH.

Cellules souches hématopoïétiques Réparation de l'ADN Vieillissement Helios

Résumé en anglais

Hematopoietic stem cells (HSCs) give rise to all blood cell lineages but the mechanisms responsible of HSCs responses to stress remain partially understood. I studied the role of the transcription factor Helios in HSCs, where Helios is highly and specifically expressed. I found that HSCs from young Helios null mice (He^{-/-}) reconstitute the hematopoietic system of irradiated recipient mice similarly to HSCs from WT mice in primary transplantations, but out-perform WT cells in secondary and tertiary transplantations. Strikingly, HSCs from 2-year-old He^{-/-} mice had 8-fold higher reconstitution potential than old WT HSCs in primary transplantations. Moreover, the pool of long-term HSCs in old He^{-/-} mice resembles that of young WT animals in both phenotype and frequency. HSCs from old He^{-/-} mice present a downregulation of genes involved in aging. Further, young He^{-/-} HSCs express reduced mRNA levels of genes encoding DNA repair proteins as well as those associated with the p53 pathway. When He^{-/-} and WT HSCs were subjected to DNA damage by different agents like neocarzinostatin, camptothecin, or etoposide, DNA damage-induced apoptosis, senescence and cell cycle arrest were significantly impaired in He^{-/-} HSCs. This phenotype was accompanied by a poor induction of p53 target genes and impaired clearance of gammaH2AX foci. Furthermore, I found that Helios synergies with p53 to regulate the DNA damage responses of HSCs. My results suggest that, in synergy with p53, Helios controls HSC aging by preventing the accumulation of DNA damage in these cells.

Hematopoietic stem cells DNA repair Aging Helios