



HAL
open science

Etude du rôle et du mode d'action du proto-oncogène fli-1 dans les érythroleucémies de Friend

Gaëtan Juban

► **To cite this version:**

Gaëtan Juban. Etude du rôle et du mode d'action du proto-oncogène fli-1 dans les érythroleucémies de Friend. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT : . tel-00347366

HAL Id: tel-00347366

<https://theses.hal.science/tel-00347366>

Submitted on 15 Dec 2008

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.

N° d'ordre : 119-2008

Année 2008

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 3 Juillet 2008

par

M. Gaëtan JUBAN

TITRE :

**Etude du rôle et du mode d'action du proto-oncogène
fli-1 dans les érythroleucémies de Friend**

Directeur de thèse : François MORLE

JURY :	M. Jérôme LAMARTINE,	Président
	Mme Françoise MOREAU-GACHELIN,	Rapporteur
	M. Olivier HERMINE,	Rapporteur
	M. François MORLE,	Examineur

REMERCIEMENTS

N° d'ordre : 119-2008

Année 2008

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 3 Juillet 2008

par

M. Gaëtan JUBAN

TITRE :

**Etude du rôle et du mode d'action du proto-oncogène
fli-1 dans les érythroleucémies de Friend**

Directeur de thèse : François MORLE

JURY :	M. Jérôme LAMARTINE,	Président
	Mme Françoise MOREAU-GACHELIN,	Rapporteur
	M. Olivier HERMINE,	Rapporteur
	M. François MORLE,	Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de
Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur G. CLERC

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	9
PREAMBULE	12
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
I- L'érythropoïèse	13
A/ Les différents stades de l'érythropoïèse	13
1) De la cellule souche aux progéniteurs engagés	13
2) Des progéniteurs engagés aux érythrocytes matures	14
B/ Régulation physiologique de l'érythropoïèse	15
1) Production des progéniteurs engagés	15
2) Contrôle de l'érythropoïèse tardive.....	16
2.1) Contrôle de la prolifération	16
2.2) Contrôle de la survie cellulaire	17
2.2.1) Contrôle par l'EPO.....	17
2.2.2) Contrôle par le récepteur Fas	17
2.3) Contrôle de la différenciation terminale	18
2.3.1) Activation des gènes de différenciation	18
2.3.2) Activation des protéines caspases	19
2.3.3) Enucléation	20
C/ L'érythropoïèse de stress	20
1) Les progéniteurs érythrocytaires de stress	21
2) Rôle du BMP4.....	21
3) Rôle de c-Kit	22
II- Les érythroleucémies de Friend	23
A/ Pathologie induite par le virus de Friend	23
B/ Evènements moléculaires induits par le virus de Friend	24
1) Evènements moléculaires induits par le complexe viral de Friend	24
1.1) Activation de de l'érythropoïèse de stress par le virus de Friend	24
1.1.1) Activation de l'EPO-R par la protéine GP55	25
1.1.2) Rôle de sf-stk	25
1.1.3) Rôle de c-kit.....	26
1.1.4) Rôle du BMP4	27
1.2) Activation transcriptionnelle du gène <i>spi-1</i>	28
1.3) Inactivation de P53	29
2) Evènements moléculaires induits par le virus F-MuLV seul.....	30
2.1) Activation transcriptionnelle du gène <i>fli-1</i>	30
2.2) Inactivation de P53	31
2.3) Activation de la voie de la signalisation de l'EPO	32
2.4) Le site d'insertion Fli-2.....	32
2.5) Le site d'insertion Fli-3.....	33
III- Comparaison des effets de SPI-1 / PU.1 et FLI-1 sur la différenciation érythrocytaire	34
A/ Effet de SPI-1 / PU.1 sur la différenciation érythrocytaire	35

1) Surexpression de <i>spi-1</i> dans les lignées érythroleucémiques.....	35
2) Expression forcée de <i>spi-1</i> dans des progéniteurs érythrocytaires natifs.....	36
3) Inactivation de <i>spi-1</i> dans des cellules érythroleucémiques.....	37
4) Inactivation de <i>spi-1</i> dans des cellules natives.....	38
B/ Effet de FLI-1 sur la différenciation érythrocytaire.....	40
1) Surexpression de <i>fli-1</i> dans les lignées érythroleucémiques.....	40
2) Expression forcée de <i>fli-1</i> dans des progéniteurs érythrocytaires.....	41
3) Inactivation de <i>fli-1</i> dans des cellules érythroleucémiques.....	42
4) Inactivation de <i>fli-1</i> dans des cellules natives.....	42
IV- Comparaison des mécanismes d'action de SPI-1 / PU.1 et FLI-1.....	43
A/ SPI-1 / PU.1.....	43
1) Inhibition de la différenciation.....	43
1.1) SPI-1 / PU.1 inhibe l'activité de GATA-1.....	43
1.1.1) SPI-1 / PU.1 inhibe la liaison à l'ADN de GATA-1.....	44
1.1.2) SPI-1 / PU.1 inhibe l'activité acétylase de CBP sur certains de ses substrats.....	45
1.1.3) SPI-1 / PU.1 recrute des complexes répresseurs sur les gènes activés par GATA-1.....	47
a) Via l'interaction avec la protéine RB.....	47
b) Via la fixation au niveau de l'intron 2 du gène globine β	49
1.2) Inhibition réciproque de l'activité de SPI-1 / PU.1 par GATA-1.....	50
1.3) SPI-1 / PU.1 régule l'épissage.....	51
2) Inhibition de l'arrêt de prolifération.....	52
3) SPI-1 / PU.1 active la transcription de <i>fli-1</i>	52
B/ FLI-1.....	53
1) Inhibition de la différenciation.....	53
1.1) FLI-1 interagit avec GATA-1.....	53
1.2) FLI-1 inhibe l'activité de EKLF.....	54
1.3) Inhibition réciproque de l'activité de FLI-1 par EKLF.....	54
1.4) Régulation de la signalisation induite par l'EPO-R.....	55
1.4.1) Activation de la voie shc/ras.....	55
1.4.2) Activation de slap.....	55
1.5) Activation du gène <i>lmo2</i>	57
2) Inhibition de l'arrêt de prolifération.....	58
3) Inhibition de l'apoptose.....	59
3.1) Activation du gène <i>bcl2</i>	59
3.2) Activation du gène <i>mdm2</i>	60
4) Activation du gène <i>inpp5p</i>	61
OBJECTIFS.....	62
RESULTATS.....	64
Première partie : Etude du rôle et du mode d'action de FLI-1 dans les érythroleucémies induites par le virus SFFV.....	64
I- Etude du rôle du facteur FLI-1 endogène dans les cellules érythroleucémiques 745-A.....	64
A/ Développement de lignées érythroleucémiques de Friend présentant une répression inductible de l'expression de <i>fli-1</i>	64
1) Validation de 2 séquences shRNA dirigées contre <i>fli-1</i>	64
2) Lignée 745-A.....	65
2.1) Lignée 745/TR.....	65
2.2) Lignée 745/TR/shfli-1.....	65
3) Lignée NN10.....	66
B/ Analyse du phénotype induit par la répression de l'expression de <i>fli-1</i>	67
1) La réduction du taux de protéine FLI-1 réduit la clonogénicité des cellules 745-A.....	67
2) La réduction du taux de protéine FLI-1 accélère la différenciation induite par l'HMBA.....	67
3) La réduction du taux de protéine FLI-1 provoque une mort cellulaire par apoptose aux temps tardifs de différenciation.....	69
C/ Contrôle de la spécificité des phénotypes observés.....	70

II- Recherche du mode d'action de FLI-1	72
A/ Analyse des gènes cibles connus de FLI-1	72
B/ FLI-1 inhibe la synthèse de l'inhibiteur de cycline kinase P27 ^{KIP1}	73
1) FLI-1 réduit le taux de protéine P27 ^{KIP1} de manière post-transcriptionnelle	73
2) FLI-1 active la transcription du gène <i>skp2</i>	74
3) L'expression forcée de <i>skp2</i> n'empêche pas l'accélération du blocage en phase G1 induit par la réduction du taux de protéine FLI-1	76
4) FLI-1 inhibe la synthèse de P27 ^{KIP1}	78
C/ Analyse globale du transcriptome	79
1) Gènes activés par FLI-1	80
2) Gènes réprimés par FLI-1	81
D/ Recherche de la fonction et du mécanisme de la régulation de <i>btg2</i> par FLI-1	83
1) Expression forcée de <i>btg2</i> dans les cellules <i>shfli-1#44</i>	83
2) Recherche du mécanisme de régulation de <i>btg2</i> par FLI-1	84
2.1) FLI-1 inhibe la transcription du gène <i>btg2</i>	84
2.2) FLI-1 n'est pas présent sur les régions régulatrices du gène <i>btg2</i>	84
2.3) FLI-1 inhibe le recrutement de GATA-1 sur la région R3 du gène <i>btg2</i>	85
2.4) Recherche de l'effet de FLI-1 sur le recrutement de GATA-1 sur les régions régulatrices du gène globine α	86
 Deuxième partie : Mise au point de nouveaux systèmes inductibles de production de shRNA	89
I- Production de shRNA à partir d'un promoteur CMV	89
II- Mise au point d'un nouveau promoteur U6	90
DISCUSSION	92
I- Coopération entre SPI-1 / PU.1 et FLI-1	92
II- Identification de réseaux de gènes régulés par FLI-1	97
III- Mise en évidence d'un rôle de FLI-1 dans la régulation de la traduction ?	102
IV- Mécanisme de régulation par FLI-1 de l'expression des gènes de différenciation érythrocytaires	107
V- Rôle de FLI-1 au cours de l'érythropoïèse normale	112
CONCLUSION	114
MATERIELS ET METHODES	116
I- Plasmides recombinants	116
A/ Vecteur d'expression de shRNA	116
1) Production inductible de shRNA à partir d'un promoteur H1 modifié	116
2) Construction du vecteur pBsd/CMVpAsi	117
3) Construction du promoteur TREU6	117
B/ Vecteurs d'expressions divers	119
II- Culture cellulaire	120
A/ Lignées érythroleucémiques de Friend 745-A	120
1) Description des lignées et des conditions de culture	120
2) Mesure de la clonogénicité	122
3) Mesure de la différenciation érythroïde	122
4) Analyse du cycle cellulaire	123
5) Mesure de la mortalité cellulaire	123
B/ Lignées érythroleucémiques de Friend NN10	123
C/ Autre lignées cellulaires	124

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AHSP : Alpha Haemoglobin Stabilising Protein
ALAS2 : 5-Aminolevulinate synthase 2
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 4
BTG2 : B-Cell Translocation Gene 2
CDK6 : Cyclin-Dependent Kinase 6
ChIP : Chromatin Immunoprecipitation
CHX : Cycloheximide
CMV : Cytomegalovirus
DOX : Doxycycline
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Dimethyl Sulfoxide
EF1 α : Elongation factor-1 α
EKLF : Erythroid Krüppel-like Factor
EPO : Erythropoietine
EPO-R : EPO-Receptor
Ets : E-twenty-six
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting
FLI-1 : F-MuLV integration site 1
F-MuLV : Friend murine leukemia virus
HA : Influenza hemagglutinin
IFIT1 : Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IL3 : Interleukin 3
IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INPP5P : Inositol Polyphosphate 5' Phosphatase
IRES : Internal Ribosome Entry Site
kDa : kiloDalton

LMO2 : LIM domain only 2
M-MLV : Moloney-Murine Leukemia Virus
MDM2 : Murine Double Minute 2
MTT : 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OAS1 : 2',5'-oligoadenylate synthetase 1
pb : paire de bases
PBS : Phosphate-buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PHZ : Phénylhydrazine
pIpC : poly(deoxyinosinic deoxycytidylic) acid
RB : Retinoblastoma
rpm : rotation per minute
SDS-PAGE : Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sf-stk : Short form-Stem cell Tyrosine Kinase
SFFV : Spleen focus-forming virus
shRNA : small hairpin RNA
siRNA : small interfering RNA
SLAP : Src-Like Adapter Protein 1
SPI-1 : SFFV integration site 1
SVF : Sérum de veau foetal
SCF : Stem Cell Factor
UTR : Untranslated Region

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse

Figure 2 : Représentation schématique des différents stades de l'érythropoïèse

Figure 3 : Antagonismes fonctionnels entre facteurs de transcription contrôlant l'engagement des progéniteurs dans les voies de différenciation granulo-monocytaire, érythrocytaire et mégacaryocytaire .

Figure 4 : Représentation schématique du contrôle de la différenciation érythrocytaire terminale.

Figure 5 : Représentation schématique du contrôle de la survie cellulaire au cours de la différenciation érythrocytaire

Figure 6 : Représentation schématique de l'érythropoïèse de stress

Figure 7 : Activation de l'érythropoïèse de stress par le virus SFFV

Figure 8 : Représentation schématique du rôle de SPI-1 dans l'érythropoïèse

Tableau 1 : Comparaison des domaines de SPI-1 nécessaires au blocage de la différenciation érythrocytaire et à l'altération des propriétés de GATA-1.

Figure 9 : Modèle de l'inhibition de l'activité de GATA-1 par SPI-1

Figure 10 : Activation transcriptionnelle des gènes *spi-1* et *fli-1* dans les érythroleucémies de Friend.

Figure 11 : Bilan des mécanismes d'action du facteur SPI-1

Figure 12 : Bilan des mécanismes d'action du facteur FLI-1

Figure 13 : Représentation schématique du principe de production inductible de shRNA

Figure 14 : Répression inductible de l'expression de *fli-1* dans les cellules érythroleucémiques de Friend

Figure 15 : La répression de l'expression de FLI-1 réduit la clonogénicité des cellules 745-A

Figure 16 : La répression de l'expression de *fli-1* accélère la différenciation induite par l'HMBA

Figure 17 : La réduction du taux de protéine FLI-1 induit une mort par apoptose aux temps tardifs de différenciation

Figure 18 : Les shRNA *shfli-1* et *shfli-2* n'activent pas l'expression des gènes *ifit1* et *oas1*

Figure 19 : Analyse de la spécificité des phénotypes induits par la doxycycline dans les cellules *shfli-1#44* et *shfli-2#1*

Figure 20 : Analyse de l'expression des gènes cibles connus de FLI-1

Figure 21 : FLI-1 réduit le taux de protéine P27^{KIP1} de manière post-transcriptionnelle

Figure 22 : FLI-1 active la transcription du gène *skp2*

Figure 23 : FLI-1 fixe le promoteur du gène *skp2* *in vivo*

Figure 24 : Surexpression inductible de *skp2* dans la lignée shfli-1#44

Figure 25 : Surexpression inductible de *skp2* dans la lignée 745/TR

Figure 26 : FLI-1 inhibe la synthèse de P27^{KIP1}

Figure 27 : Expression relative des gènes régulés par FLI-1 dans les cellules shfli-1#44

Tableau 2 : Liste des gènes dont la réduction de l'expression par l'HMBA dans les cellules shfli-1#44 est amplifiée en présence de doxycycline

Tableau 3 : Liste des gènes dont l'augmentation de l'expression par l'HMBA dans les cellules shfli-1#44 est amplifiée en présence de doxycycline

Figure 28 : FLI-1 inhibe l'expression des gènes érythrocytaires dans les cellules érythroleucémiques

Figure 29 : La réduction du taux de protéine FLI-1 augmente le taux d'ARNm *btg2* dans les cellules érythroleucémiques de Friend

Figure 30 : Surexpression inductible de *btg2* dans les cellules 745-A

Figure 31 : FLI-1 inhibe la transcription du gène *btg2*

Figure 32 : FLI-1 inhibe le recrutement de GATA-1 sur la région R3 du gène *btg2*

Figure 33 : L'augmentation du taux d'ARNm globine alpha après réduction du taux de FLI-1 est elle transcriptionnelle ?

Figure 34 : Le vecteur pBsd/CMVpAshfli-1 ne réduit pas le taux de protéine FLI-1 endogène de cellules 745-A

Figure 35 : Représentation schématique du fonctionnement du promoteur TREU6

Figure 36 : Fuite d'expression du promoteur TREU6 dans les cellules 745-A

Figure 37 : Représentation schématique de la biogenèse des ribosomes

Figure 38 : Inhibition récurrente de la synthèse de P27^{KIP1} dans les érythroleucémies de Friend

Figure 39 : Représentation schématique du modèle d'antagonisme fonctionnel entre les facteurs FLI-1 et EKLF

Figure 40 : Représentation schématique des modes d'action possibles de FLI-1 dans les cellules érythroleucémiques 745-A

Figure 41 : Représentation schématique des différents vecteurs d'expression utilisés (1)

Figure 42 : Représentation schématique des différents vecteurs d'expression utilisés (2)

Tableau 4 : Liste des couples d'oligonucléotides utilisés en RT-PCR quantitative

Tableau 5 : Liste des couples d'oligonucléotides utilisés en ChIP

PREAMBULE

PREAMBULE

Les proto-oncogènes exercent des fonctions essentielles dans la cellule normale mais la dérégulation de leur expression est à l'origine de nombreux cancers et en particulier de leucémies. Les conséquences dramatiques de la production dérégulée de protéines pourtant normales ont conduit à s'interroger sur les mécanismes par lesquels ces protéines peuvent perturber la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. L'un des résultats les plus remarquables de l'étude du modèle des érythroleucémies induites par le virus de Friend est l'identification d'une activation quasi-systématique des proto-oncogènes *spi-1* ou *fli-1*, codant pour des facteurs de transcription de la famille ETS. De plus, l'équipe a montré que le proto-gène *fli-1* est directement activé par le facteur SPI-1 / PU.1.

Mon travail de thèse, qui fait l'objet de ce mémoire, a consisté à démontrer l'implication du proto-oncogène *fli-1* endogène dans la leucémogénèse induite par le proto-oncogène *spi-1* et étudier les mécanismes par lesquels il y contribue.

Afin de discuter les résultats et de les replacer dans le contexte des connaissances actuelles, la première partie de ce mémoire est consacrée à la présentation des données bibliographiques. Le premier chapitre présente de manière générale l'érythropoïèse. Le second chapitre se concentre sur les érythroleucémies de Friend. Ensuite, un troisième chapitre regroupe les données mettant en évidence l'implication des proto-oncogènes *spi-1* et *fli-1* dans la transformation de la lignée érythrocytaire. Enfin, une synthèse des mécanismes connus par lesquels les facteurs SPI-1 / PU.1 et FLI-1 peuvent contribuer à cette transformation est présentée dans le dernier chapitre.

A la suite de cette analyse bibliographique, les résultats acquis au cours de ma thèse sont présentés puis discutés, en tentant de faire le lien avec les connaissances actuelles.

**INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE**

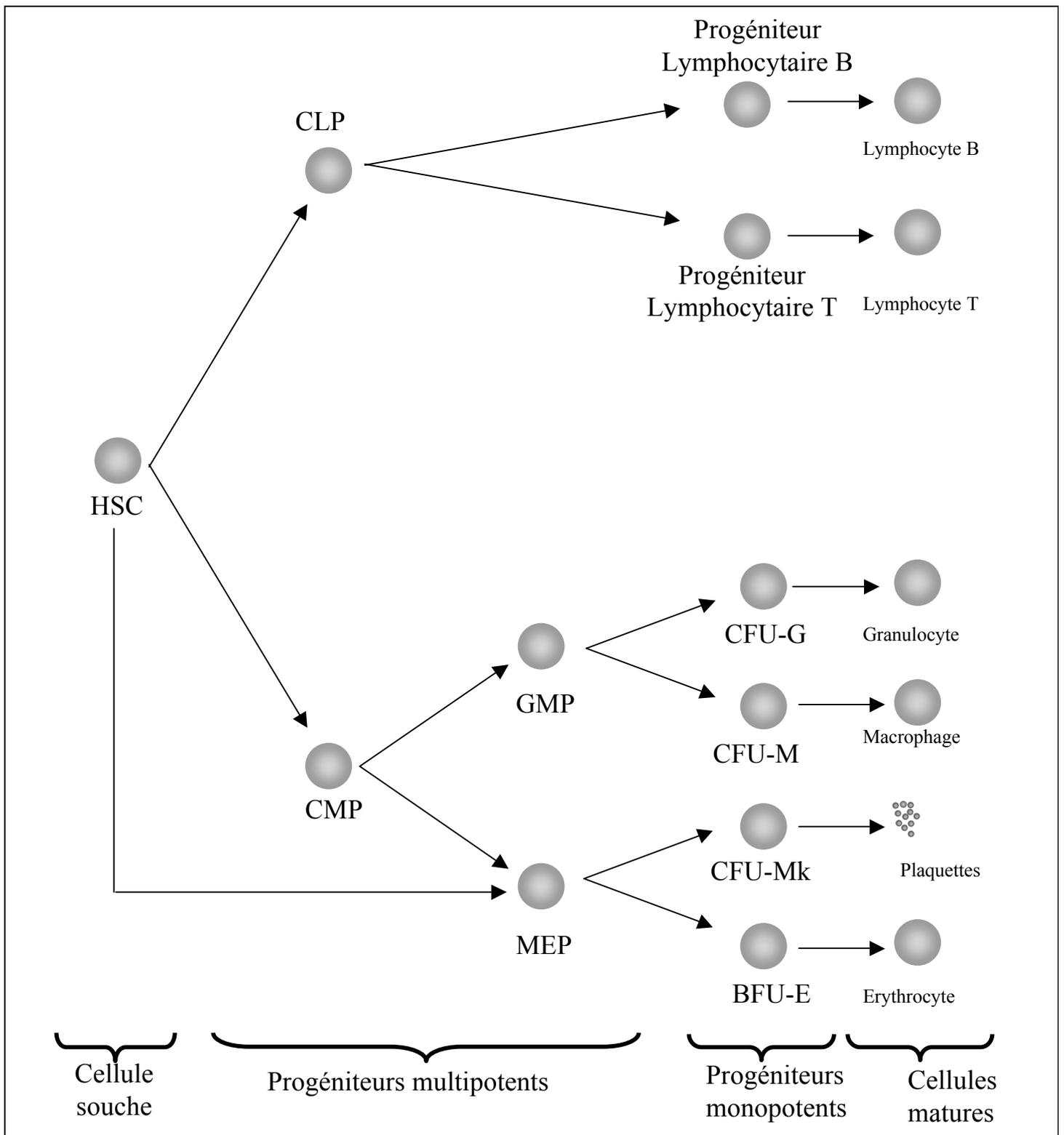


Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse.

HSC = Hematopoietic Stem Cell

CLP = Common Lymphoid Progenitor

CMP = Common Myeloid Progenitor

GMP = Granulocyte-Monocyte Progenitor

MEP = Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor

CFU-G = Colony Forming Unit-Granulocyte

CFU-M = Colony Forming Unit-Macrophage

CFU-Mk = Colony Forming Unit-Megakaryocyte

BFU-E = Burst Forming Unit-Erythrocyte

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I- L'érythropoïèse

Le sang est constitué en grande majorité par les globules rouges ou érythrocytes. Leur fonction est de fixer l'oxygène, grâce à l'hémoglobine qu'ils produisent, au niveau des poumons et de le transporter vers les tissus. La durée de vie moyenne chez l'homme des érythrocytes est de 120 jours et il en est produit 200.10^9 par jour. L'érythropoïèse est le processus par lequel l'organisme assure la production des érythrocytes. L'érythropoïèse s'inscrit dans un processus plus global, l'hématopoïèse, qui représente les phénomènes assurant la production de l'ensemble des cellules du sang (ou cellules hématopoïétiques) à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH).

A/ Les différents stades de l'érythropoïèse

1) De la cellule souche aux progéniteurs engagés

Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules multipotentes capables de générer l'ensemble des cellules hématopoïétiques. Elles sont caractérisées d'une part par une capacité d'auto-renouvellement assurant leur maintien tout le long de la vie de l'individu. D'autre part, ces cellules peuvent s'engager dans la différenciation hématopoïétique et générer des progéniteurs unipotents spécifiques d'une lignée. Selon le modèle hiérarchique, qui est le modèle le plus couramment admis, ces progéniteurs sont générés successivement selon la filiation décrite sur la Figure 1. Ainsi les CSH peuvent générer soit un progéniteur lymphoïde (CLP pour Common Lymphoid Progenitor) soit un progéniteur myéloïde (CMP pour Common Myeloid Progenitor). Le CMP peut à son tour générer soit un progéniteur bipotent

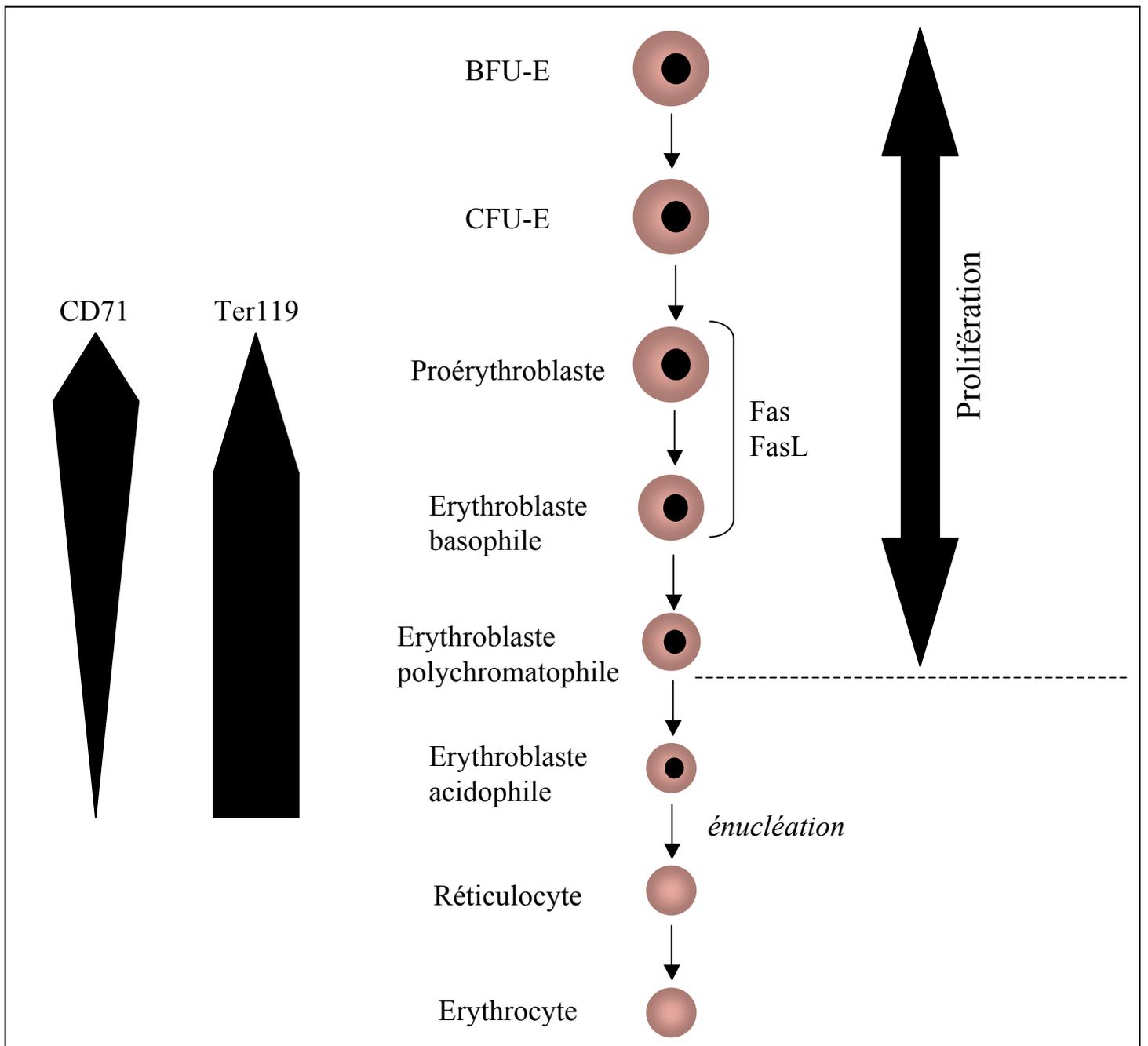


Figure 2 : Représentation schématique des différents stades de l'érythropoïèse.

Granulo-monocytaire (GMP pour Granulocyte / Monocyte Progenitor) soit un progéniteur bipotent érythro-mégacaryocytaire (MEP pour Megakaryocyte / Erythrocyte Progenitor). Finalement, le MEP peut générer des progéniteurs unipotents engagés dans la voie de différenciation soit mégacaryocytaire soit érythrocytaire. Le progéniteur engagé dans la voie de différenciation érythrocytaire le plus immature est appelé BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid). Il a récemment été identifié un progéniteur possédant une potentialité myéloïde et lymphoïde mais incapable de se différencier en érythrocyte ou mégacaryocyte, ce qui suggère que le MEP pourrait dériver directement de la CSH (Adolfsson et al., 2005).

2) Des progéniteurs engagés aux érythrocytes matures

Les progéniteurs érythrocytaires BFU-E vont se différencier par étapes successives pour former en 7 jours des érythrocytes (Figure 2). Cette différenciation a lieu dans la moelle osseuse au sein des îlots érythroblastiques, composés d'un macrophage entouré de progéniteurs érythrocytaires à différents stades de différenciation. Les BFU-E vont d'abord former des progéniteurs plus matures appelés CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) qui prolifèrent activement, puis des proérythroblastes qui sont morphologiquement reconnaissables après une coloration par le MGG et qui sont fortement basophiles en raison de la grande quantité d'ARN qu'ils contiennent. Ces proérythroblastes vont alors subir 4 mitoses successives au cours desquelles ils vont continuer leur maturation. Cette maturation est caractérisée par une réduction de la taille de la cellule et une condensation progressive de la chromatine. A partir du stade polychromatophile, les érythroblastes commencent à produire de l'hémoglobine ce qui va entraîner la perte de la basophilie du cytoplasme et donner les érythroblastes acidophiles. A partir de ce stade, les cellules vont poursuivre leur différenciation sans se diviser. Les cellules vont alors subir une énucléation pour former des

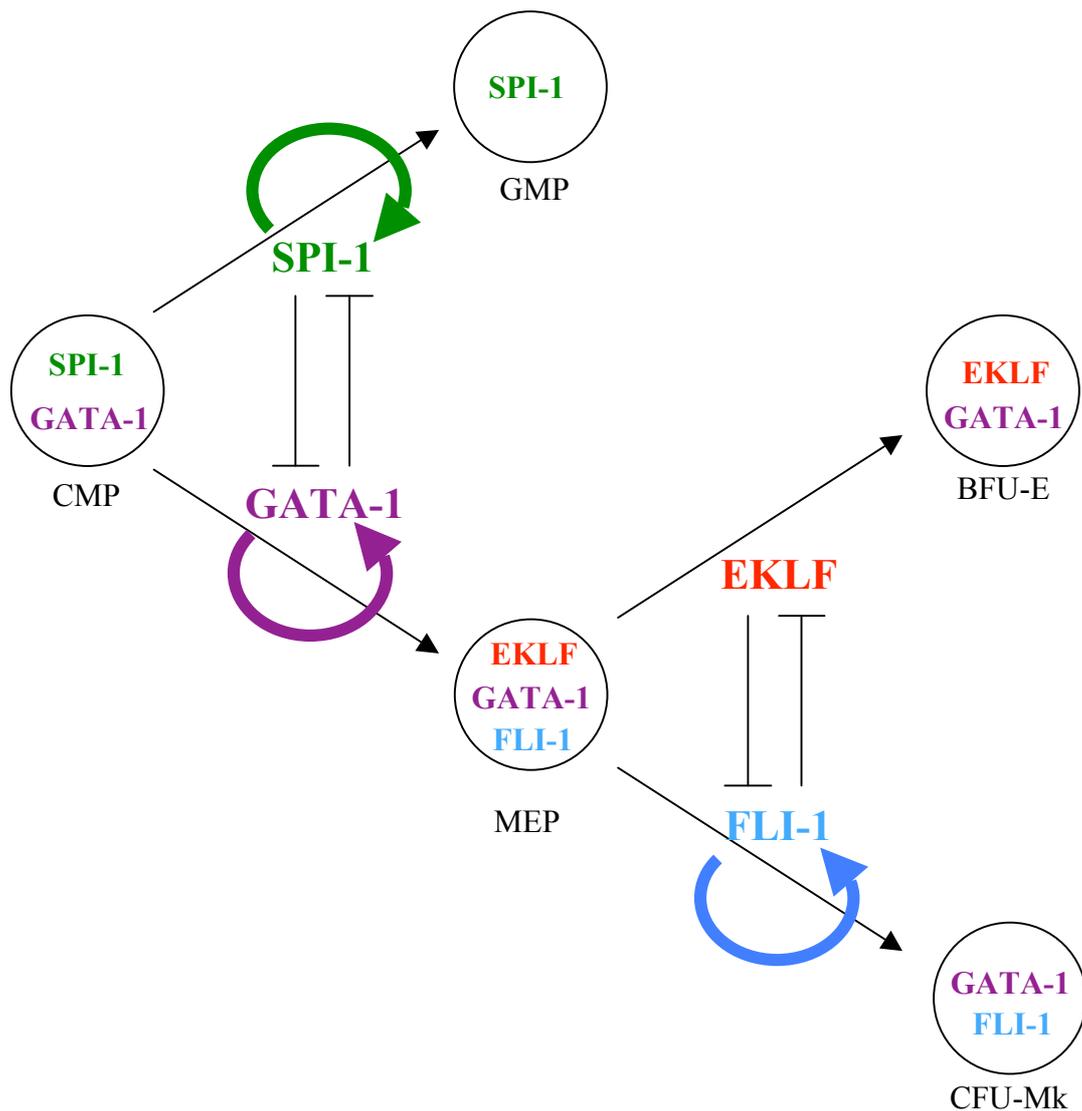


Figure 3 : Antagonismes fonctionnels entre facteurs de transcription contrôlant l'engagement des progéniteurs dans les voies de différenciation granulo-monocytaire, érythrocytaire et mégacaryocytaire .

La contribution positive de SPI-1 et GATA-1 à la différenciation granulo-monocytaire et érythro-mégacaryocytaire serait renforcée par l'inhibition réciproque de leur activité. De même, l'antagonisme fonctionnel entre FLI-1 et EKLF contribuerait au renforcement de la différenciation mégacaryocytaire ou érythrocytaire.

réticulocytes qui vont passer dans le sang et qui vont ensuite donner des érythrocytes matures dépourvus d'organelles.

B/ Régulation physiologique de l'érythropoïèse

1) Production des progéniteurs engagés

L'engagement des progéniteurs multipotents vers les différentes voies de différenciation est contrôlé par une combinaison de facteurs de transcription spécifique de chaque lignée. La production de ces facteurs de transcription est elle-même contrôlée par des réseaux de régulation très hiérarchisés. Ces réseaux comprennent notamment des boucles d'autorégulation positive, où la production d'un facteur donné est amplifiée par l'activation de son propre gène, ou encore d'antagonismes fonctionnels réciproques entre facteurs de transcription contrôlant l'engagement dans des lignées alternatives. A titre d'exemple, la Figure 3 montre une représentation schématique de certains facteurs de transcription participant à cet engagement à partir du progéniteur CMP. Le facteur de transcription SPI-1 / PU.1 est un régulateur positif de la différenciation granulo-monocytaire alors que GATA-1 est un régulateur positif de la différenciation érythro-mégacaryocytaire. Ces 2 facteurs sont capables d'activer l'expression de leur propre gène et de réprimer réciproquement leur activité respective ((Choe et al., 2003; Matsumura et al., 2000; Nerlov et al., 2000; Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 1999), voir chapitre IV-A/ de la partie INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE). L'antagonisme fonctionnel entre SPI-1 / PU.1 et GATA-1 permet ainsi de renforcer le processus de différenciation des deux lignées à partir du progéniteur multipotent. En effet, la modification du taux relatif des facteurs SPI-1 / PU.1 et GATA-1 entraîne non seulement l'activation de gènes spécifiques d'une lignée mais également la répression des gènes spécifiques de la lignée alternative. Au niveau du progéniteur MEP, GATA-1 active à son tour l'expression de plusieurs autres facteurs de transcription tels que SCL, LMO2, GFI1B, FOG-1, NF-E2, EKLF et FLI-1 impliqués dans l'activation de

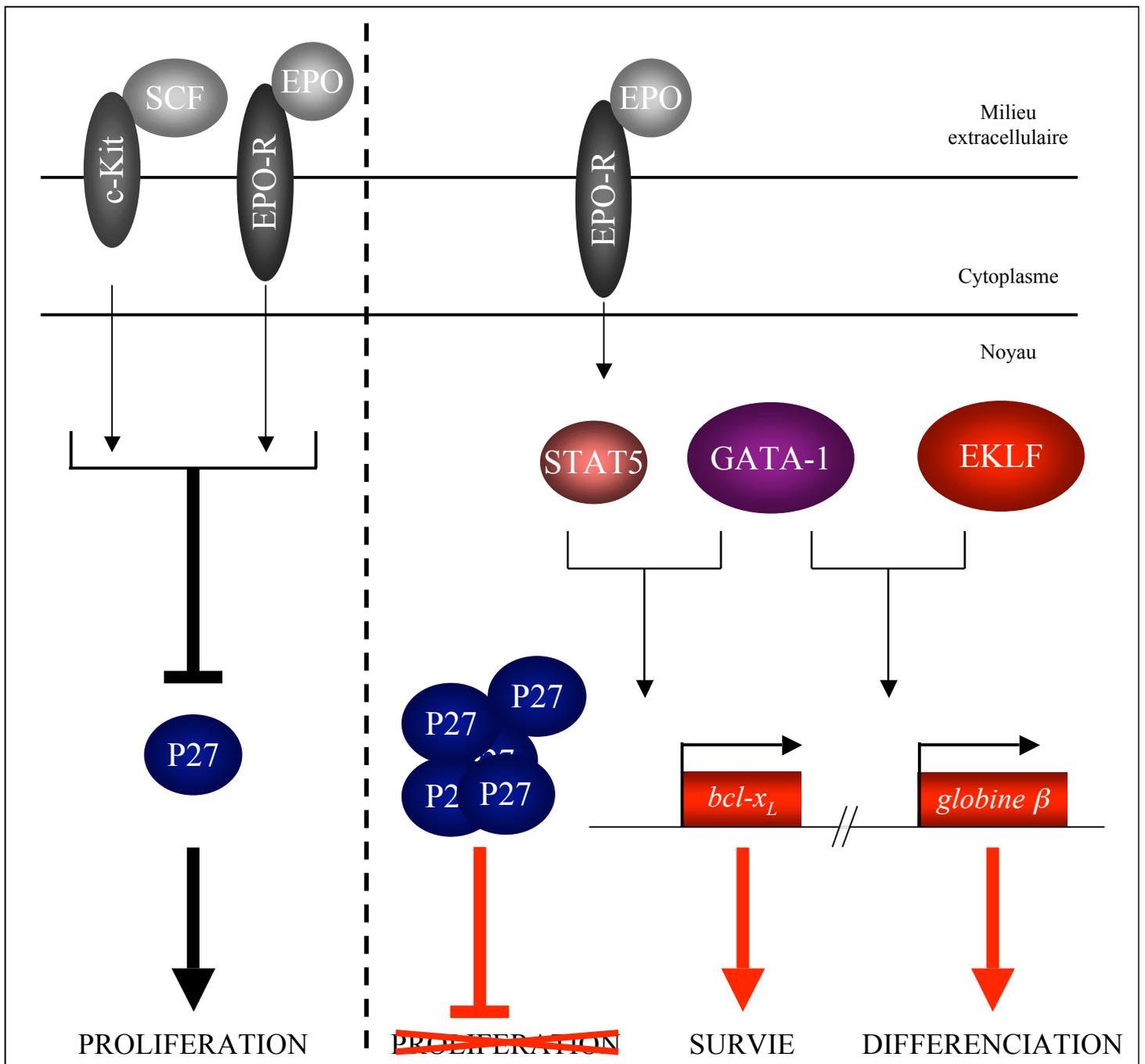


Figure 4 : Représentation schématique du contrôle de la différenciation érythrocytaire terminale.

L'EPO et le SCF sont 2 cytokines dont la fixation sur leur récepteur respectif induit un signal de prolifération qui semble lié au maintien d'un taux de protéine P27^{KIP1} faible dans les cellules (partie gauche). En présence d'EPO seul (partie droite), les cellules arrêtent de proliférer, ce qui est associé à une augmentation du niveau de P27^{KIP1}. Parallèlement, le signal envoyé par l'EPO-R coopère avec le facteur GATA-1 ce qui conduit à l'activation transcriptionnelle du gène anti-apoptotique *bcl-x_L*, et à la survie des cellules. Le facteur GATA-1 coopère avec d'autres facteurs de transcription comme le facteur EKLF ce qui aboutit à l'expression de gènes spécifiques du lignage érythrocytaire comme le gène *globine β*.

l'expression de gènes spécifiques des lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire. Parmi ces facteurs, FLI-1 est impliqué spécifiquement dans le développement des mégacaryocytes alors que EKLF participe à celui des érythrocytes. FLI-1 et EKLF sont également capables d'inhiber leur activité respective ((Frontelo et al., 2007; Starck et al., 2003), voir chapitre IV-B/ de la partie INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE). L'antagonisme fonctionnel entre FLI-1 et EKLF renforcerait l'engagement du progéniteur MEP vers les lignées érythrocytaire ou mégacaryocytaire par un mécanisme de répression croisée similaire à celui agissant entre GATA-1 et SPI-1 / PU.1.

2) Contrôle de l'érythropoïèse tardive

2.1) Contrôle de la prolifération

La prolifération des progéniteurs érythrocytaires est contrôlée par 2 cytokines principales : le Stem Cell Factor (SCF) et l'Erythropoïétine (EPO) (Munugalavadla & Kapur, 2005). Plus précisément, le SCF semble jouer un rôle jusqu'au stade CFU-E alors que l'EPO est nécessaire jusqu'au stade des érythroblastes. Ces 2 cytokines agissent en synergie pour donner un signal de prolifération aux progéniteurs érythrocytaires. La différenciation érythrocytaire terminale s'accompagne d'un arrêt de la prolifération des cellules caractérisé par un blocage en phase G1 du cycle cellulaire. Cet arrêt de prolifération est associé à la perte de la sensibilité des cellules au SCF. Plusieurs arguments suggèrent un rôle important de l'inhibiteur de cycline kinase P27^{KIP1} dans ce blocage en phase G1 du cycle cellulaire (Figure 4).

En effet, la différenciation érythroïde de plusieurs lignées cellulaires est caractérisée par une augmentation de la proportion de cellules en phase G1 du cycle cellulaire, ce qui est associé à une augmentation du taux de protéine P27^{KIP1} (Hsieh et al., 2000; Matushansky et al., 2000a; Matushansky et al., 2000b; Munoz-Alonso et al., 2005; Rylski et al., 2003; Tamir

et al., 2000). De plus, la surexpression inducible du gène $p27^{kip1}$ dans des lignées érythroleucémiques murines (Matushansky et al., 2000a; Matushansky et al., 2000b; Tamir et al., 2000) ou humaines (Munoz-Alonso et al., 2005) provoque un blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Cependant, ce blocage en phase G1 du cycle cellulaire induit par la surexpression de $p27^{kip1}$ ne semble pas suffisant pour induire l'hémoglobination des cellules.

2.2) Contrôle de la survie cellulaire

2.2.1) Contrôle par l'EPO

L'EPO est indispensable à la survie des cellules au cours de la différenciation érythrocytaire. Des érythroblastes privés d'EPO meurent par apoptose, ce qui est associé au clivage du facteur GATA-1 par les caspases (De Maria et al., 1999b). L'activation de l'EPO-R par l'EPO aboutit à une homodimérisation des récepteurs. Ceci va permettre le recrutement de diverses protéines à activité tyrosine kinase parmi lesquelles JAK2 qui va induire la phosphorylation et la dimérisation de la protéine STAT5, qui migre alors dans le noyau et, en synergie avec le facteur de transcription GATA-1, active l'expression du gène anti-apoptotique $bcl-x_l$ (Figure 4). Le gène $bcl-x_l$ est indispensable à la différenciation érythrocytaire car son inactivation conditionnelle chez la souris provoque une anémie (Wagner et al., 2000).

2.2.2) Contrôle par le récepteur Fas

Il existe un mécanisme de régulation négative de l'érythropoïèse impliquant le récepteur de mort Fas. Selon certains auteurs, les érythroblastes les plus matures expriment Fas-Ligand et interagissent avec les récepteurs Fas présents sur les progéniteurs plus immatures au sein des îlots érythroblastiques (De Maria et al., 1999a). L'interaction entre Fas-

Ligand et son récepteur Fas va conduire à l'activation des protéines caspases, au clivage de leurs substrats parmi lesquels le facteur GATA-1 (De Maria et al., 1999b) pour finalement aboutir à la mort de la cellule par apoptose. Ainsi, le taux d'érythroblastes matures permet donc de réguler négativement l'érythropoïèse, via l'induction de la mort par apoptose des progéniteurs immatures, ce qui évite une production trop importante d'érythrocytes. Pour d'autres auteurs, le récepteur Fas et Fas-L sont coexprimés au même stade de différenciation érythrocytaire (pro-érythroblaste et érythroblaste basophile) et c'est l'interaction entre ces cellules plus qu'entre cellules matures et immatures qui conduit à la régulation négative de l'érythropoïèse par apoptose (Liu et al., 2006; Socolovsky, 2007; Socolovsky et al., 2007). De façon intéressante, l'injection d'EPO diminue la proportion de cellules coexprimant Fas et Fas-L ce qui semble être un autre moyen par lequel l'EPO contribue au contrôle de l'érythropoïèse à travers la survie cellulaire.

2.3) Contrôle de la différenciation terminale

2.3.1) Activation des gènes de différenciation

La principale caractéristique de la différenciation érythrocytaire est l'expression de gènes spécifiques codant des protéines qui vont permettre aux érythrocytes d'assurer leur fonction. Parmi ces gènes, les plus étudiés sont les gènes de *globine α* et *globine β* qui codent respectivement les chaînes α et β de l'hémoglobine. L'expression des gènes spécifiques de la lignée érythrocytaire est régulée par un complexe multiprotéique regroupant plusieurs facteurs de transcription parmi lesquels GATA-1, EKLF, SCL, LMO2, FOG1, GFI1B et NF-E2. Parmi tous ces facteurs, nous retiendrons GATA-1 et EKLF (Figure 4) car leur fonction est altérée lors des érythroleucémies de Friend (voir chapitre IV de la partie INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE). Des souris déficientes pour GATA-1 meurent *in utero* d'anémie caractérisée par un arrêt de l'érythropoïèse et une mort par apoptose des progéniteurs

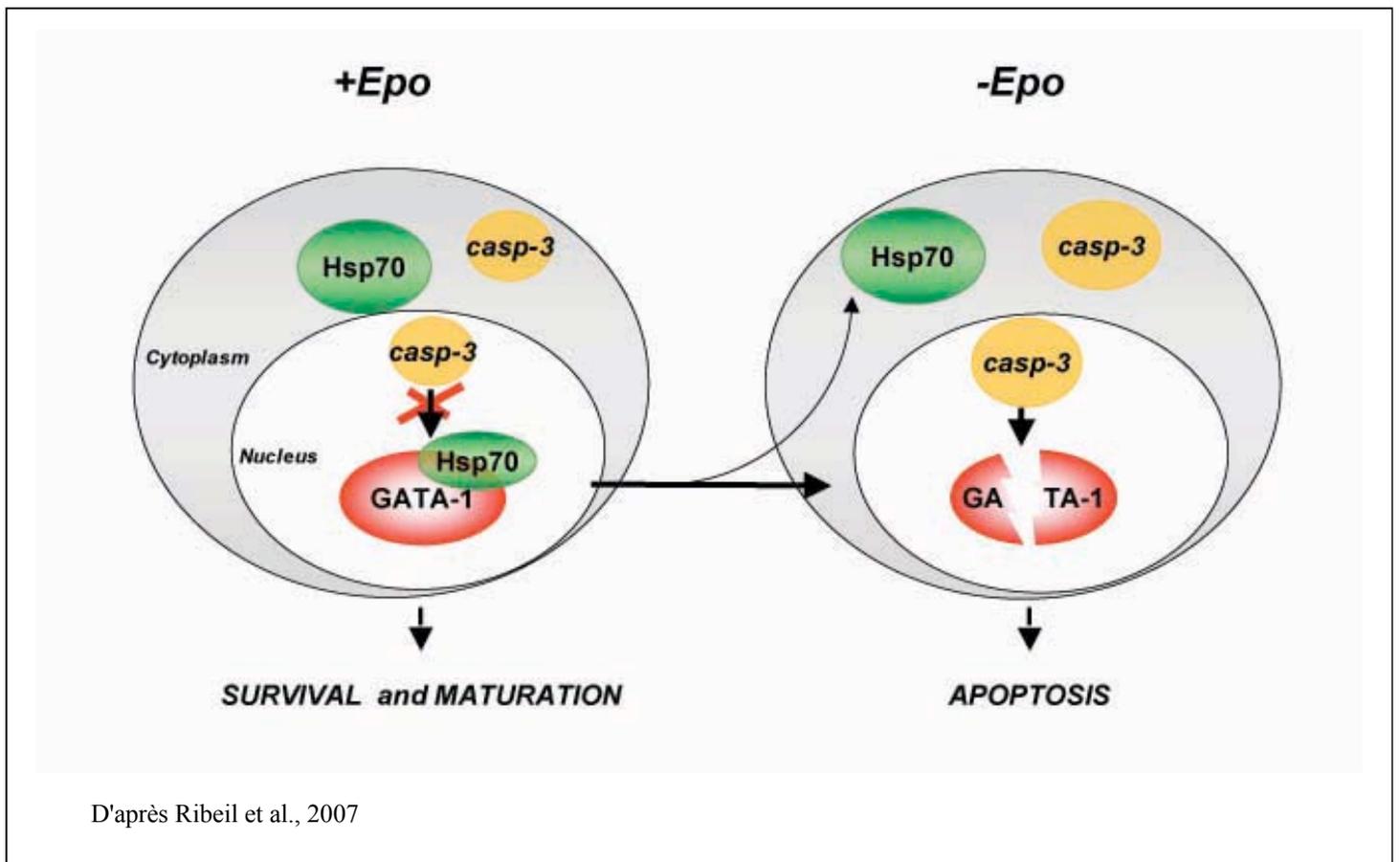


Figure 5 : Représentation schématique du contrôle de la survie cellulaire au cours de la différenciation érythrocytaire.

érythrocytaires (Fujiwara et al., 1996; Pevny et al., 1991; Weiss & Orkin, 1995). Des souris déficientes pour EKLF meurent *in utero* d'anémie ce qui est associé à un défaut de transcription de plusieurs gènes érythrocytaires dont le gène *globine β* (Nuez et al., 1995; Perkins et al., 1995). Les sites de fixation à l'ADN de ces deux facteurs sont souvent associés dans les régions régulatrices de transcription spécifiques de la lignée érythrocytaire. EKLF interagit avec GATA-1 et stimule la transcription d'un gène rapporteur placé sous contrôle d'un site de fixation de GATA-1 suggérant une coopération entre ces deux facteurs pour l'activation des gènes érythrocytaires (Merika & Orkin, 1995). De plus, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont mis en évidence leur co-recrutement sur les régions régulatrices de plusieurs gènes érythrocytaires comme les gènes *globine β* (Kooren et al., 2007) ou *alas2* (Kramer et al., 2000).

2.3.2) Activation des protéines caspases

De manière surprenante, l'activation des protéines caspases est nécessaire à la différenciation érythrocytaire terminale. En effet, l'inhibition de leur activité par le Z-VAD bloque la différenciation de progéniteurs érythrocytaires humains natifs (Zermati et al., 2001). En accord avec ces résultats, la réduction du taux de protéine caspase 3 par la transfection de siRNA dans des progéniteurs hématopoïétiques humains CD34+ provoque une réduction du nombre d'érythrocytes énucléés obtenus après culture *in vitro* (Carlile et al., 2004). Cette activation des caspases entraîne le clivage de protéines telles que la LAMIN B ou ACINUS, ce qui pourrait être impliqué dans la condensation de la chromatine observée au cours de la différenciation. Paradoxalement, le facteur GATA-1, qui est une cible des caspases lors de l'apoptose induite par la privation d'EPO (De Maria et al., 1999b), n'est pas clivé au cours de la différenciation érythrocytaire. Le mécanisme permettant à GATA-1 d'échapper à ce clivage a été identifié récemment (Figure 5). Il a été montré qu'au cours de la différenciation en

présence d'EPO de progéniteurs érythrocytaires humains, la protéine chaperon HSP70 est co-localisée et interagit avec la protéine GATA-1 dans le noyau des cellules (Ribeil et al., 2007). Cette interaction n'est pas observée en absence d'EPO, ce qui est corrélé à une localisation cytoplasmique de HSP70. De plus, HSP70 protège GATA-1 du clivage par la caspase-3 *in vitro*. Enfin, la réduction du taux de protéine HSP70 par transfection transitoire de siRNA dans les progéniteurs érythrocytaires provoque le clivage de GATA-1 ce qui s'accompagne d'une diminution du taux de protéine BCL-XL et de la mort des cellules par apoptose. L'effet de la réduction du taux de protéine HSP70 est annulé par l'expression d'une protéine GATA-1 non clivable par les caspases, confirmant le rôle de protection de GATA-1 joué par HSP70.

Les mécanismes contrôlant la compartimentation de HSP70 par l'EPO restent à déterminer.

2.3.3) Enucléation

Une des caractéristiques des érythrocytes de mammifères est qu'ils ne possèdent pas de noyau. Cette énucléation se produit en fin de différenciation au stade d'érythroblaste acidophile et le macrophage présent dans l'îlot érythroblastique semble jouer un rôle déterminant, notamment dans la dégradation de l'ADN expulsé par l'érythroblaste (Chasis, 2006).

C/ L'érythropoïèse de stress

L'induction d'une anémie (baisse du taux d'hémoglobine dans le sang) a pour conséquence une hypoxie tissulaire. Cette hypoxie provoque une augmentation de la production d'EPO par le rein et une induction de production de BMP4 par les cellules stromales de la rate (Lenox et al., 2005; Socolovsky, 2007). Ceci conduit à l'activation d'une érythropoïèse de stress qui va permettre la production rapide d'érythrocytes et de rétablir le

taux d'hémoglobine dans le sang. Contrairement à l'érythropoïèse normale qui a lieu dans la moelle osseuse, l'érythropoïèse de stress a lieu dans la rate et est similaire à l'érythropoïèse foetale.

1) Les progéniteurs érythrocytaires de stress

L'érythropoïèse de stress est caractérisée par l'amplification rapide de progéniteurs érythrocytaires particuliers, appelés BFU-E de stress, dotés d'une forte capacité de prolifération. Ces BFU-E de stress se distinguent des BFU-E classiques par leur capacité à générer de larges colonies *in vitro* en présence d'EPO seule en 5 jours alors que les BFU-E classiques requièrent 7 jours et une cytokine accessoire (l'IL3 ou le SCF). Ces BFU-E de stress requièrent également des concentrations d'EPO plus importantes que les BFU-E classiques.

En dehors de cette importante capacité de prolifération, les BFU-E de stress sont également caractérisés par leur plus faible sensibilité à l'apoptose ce qui s'explique par une faible expression de Fas et FasL (Socolovsky, 2007).

L'érythropoïèse de stress est également caractérisée par l'amplification d'une population de précurseurs PEM (Precursor Erythrocyte-Megakaryocyte) capables de générer rapidement *in vitro* aussi bien des érythrocytes que des mégacaryocytes après seulement une division (Sanchez et al., 2005; Vannucchi et al., 2000). L'existence de ces PEM suggère ainsi que l'érythropoïèse de stress est associée à la persistance de la bipotence érythro-mégacaryocytaire jusqu'à l'arrêt de leur prolifération.

2) Rôle du BMP4

L'augmentation du nombre de BFU-E de stress dans la rate d'une souris anémiée par la Phénylhydrazine (PHZ), est précédée par une augmentation de l'expression de *bmp4* (Lenox

et al., 2005). Dans le cas de cellules de rate issues de souris déficientes pour la protéine Smad5 (molécule de signalisation activée par le BMP4), l'augmentation du nombre de BFU-E induite par la PHZ est retardée. De plus, un co-traitement de cellules de rate par l'EPO et le BMP4 entraîne une augmentation (jusqu'à 6 fois) dose-dépendante du nombre de BFU-E normalement obtenu en présence d'EPO seule. Cet effet peut être obtenu en présence d'EPO seule si les cellules ont préalablement été traitées par le BMP4. Enfin, les auteurs montrent que la population de cellules sensibles au BMP4 est contenue dans la population de progéniteurs bipotents MEP présents dans la rate. En effet, le co-traitement par l'EPO et le BMP4 de progéniteurs MEP purifiés à partir de la rate induit une augmentation du nombre de BFU-E normalement obtenu en présence d'EPO seule, alors qu'il n'a pas d'effet dans le cas de progéniteurs MEP purifiés à partir de moelle osseuse. L'ensemble de ces résultats identifie donc une population de progéniteurs bipotents MEP dans la rate, qui sont différents des MEP présents dans la moelle osseuse, et qui sont capables de générer des BFU-E de stress sous l'action du BMP4 qui est produit lors de l'induction d'une anémie par la PHZ.

3) Rôle de c-Kit

Des souris mutantes soit pour le gène *W* codant le récepteur c-Kit, soit pour le gène *Sl* codant le SCF, présentent également un retard dans l'érythropoïèse de stress après l'induction d'une anémie par la PHZ (Broudy et al., 1996; Harrison & Russell, 1972). Des études réalisées plus récemment sur des souris mutantes pour le gène *W* confirment un retard dans l'augmentation transitoire du nombre de BFU-E de stress normalement induit par la PHZ spécifiquement dans la rate (Perry et al., 2007). Ceci n'est pas dû à une absence d'induction de l'expression de *bmp4*. En revanche, le co-traitement par l'EPO et le BMP4 de cellules issues de la rate des souris mutantes n'augmente pas le nombre de BFU-E normalement obtenu en présence d'EPO seule. De plus, le même groupe a mis en évidence une très forte réduction du

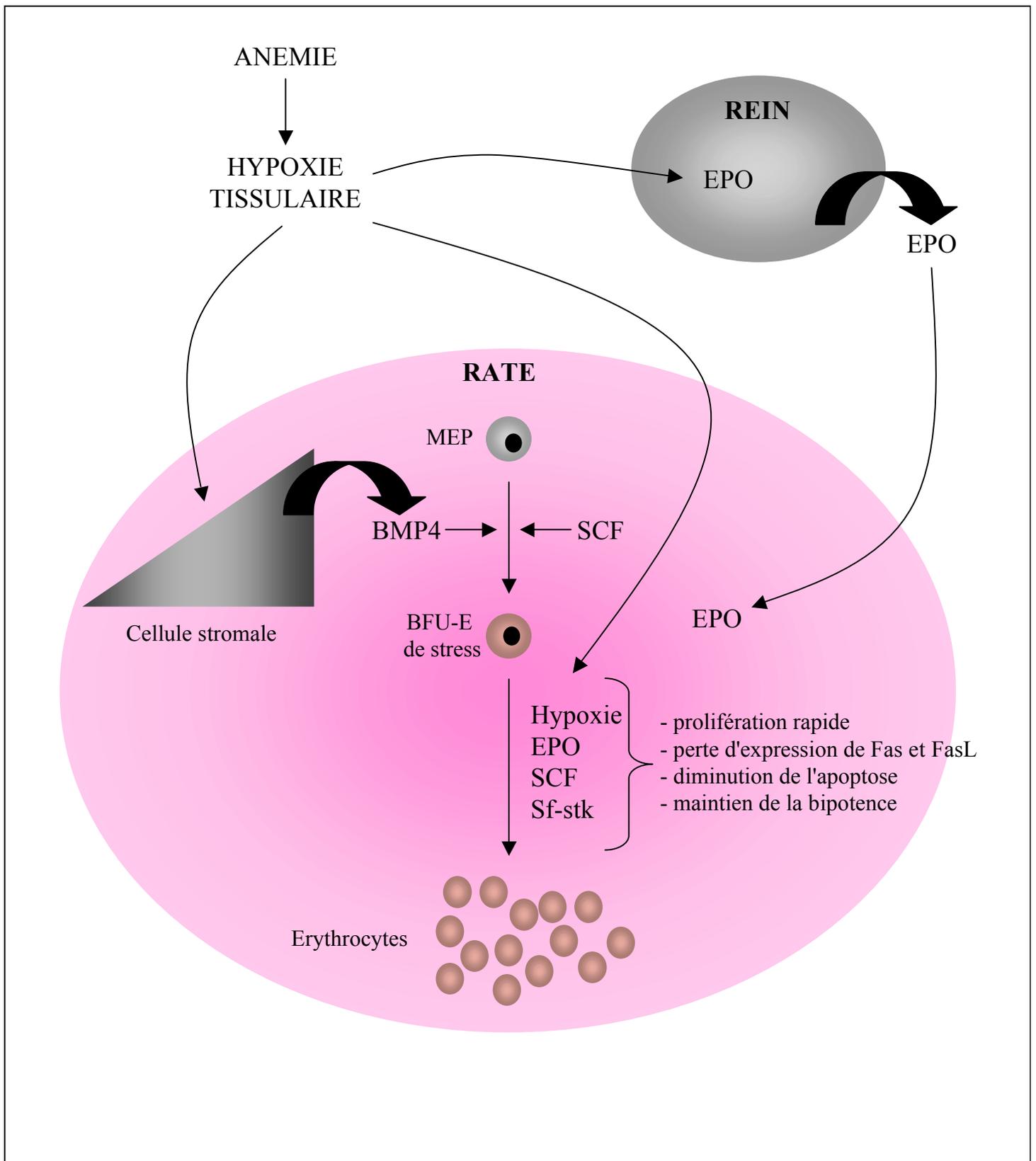


Figure 6 : Représentation schématique de l'érythropoïèse de stress.

nombre de progéniteurs MEP spécifiquement dans la rate de ces souris, ce qui est associé à une absence de l'expression du récepteur tronqué à domaine tyrosine kinase *sf-stk* (Subramanian et al., 2005). Ces résultats démontrent donc que la déficience de la voie de signalisation activée par le récepteur c-Kit provoque une chute du nombre de progéniteurs sensibles au BMP4 et par conséquent une réduction de l'efficacité de l'érythropoïèse de stress BMP4-dépendante.

Finalement, l'augmentation transitoire d'environ 50 fois des progéniteurs BFU-E, normalement observée dans la rate de souris traitées par la PHZ, a pu être reproduite *in vitro*. En effet, la culture de cellules de rate de souris non anémiées en présence d'EPO, de SCF, de BMP4 et en condition d'hypoxie (2% d'oxygène), produit 41 fois plus de colonies que les mêmes cellules cultivées en présence d'EPO et 20% d'oxygène (Perry et al., 2007). Ces résultats suggèrent donc une synergie entre l'hypoxie, l'EPO, le SCF et le BMP4 pour l'amplification des progéniteurs de stress (Figure 6).

II- Les érythroleucémies de Friend

A/ Pathologie induite par le virus de Friend

Des souris de souches sensibles infectées par le virus de Friend (Friend, 1957) développent des érythroleucémies appelées érythroleucémies de Friend (Ben David & Bernstein, 1989; Ruscetti, 1999). Il existe deux variants du virus de Friend : le virus FV-P (Polycythemia-inducing Friend Virus) induisant une érythroleucémie associée à une polycythémie (augmentation du nombre d'érythrocytes dans le sang), et le virus FV-A (Anemia-inducing Friend Virus) qui provoque une érythroleucémie associée à une anémie (réduction de l'hématocrite provoquée dans ce cas non pas par une diminution du nombre

d'érythrocytes dans le sang mais par une augmentation du volume plasmatique (Tambourin et al., 1979)). Chacun de ces virus est un complexe composé de deux rétrovirus : un virus défectif pour la réplication, le Spleen Focus Forming Virus (SFFV-A ou SFFV-P en fonction du variant) correspondant à l'élément pathogène du complexe (Linemeyer et al., 1981), et un virus compétent pour la réplication, le Friend Murine Leukemia Virus (F-MuLV) .

Quel que soit le variant, le virus de Friend induit une érythroleucémie évoluant en deux phases et qui est létale entre 8 et 14 semaines après l'infection (Tambourin et al., 1981). La première phase débute 48 heures après l'infection. Elle est caractérisée par une prolifération polyclonale de progéniteurs érythrocytaires non leucémiques (BFU-E et CFU-E) dans la rate et le foie des souris infectées. La prolifération et la différenciation de ces cellules sont indépendantes de l'EPO dans le cas d'une infection par le virus FV-P, et partiellement dépendantes de l'EPO lors d'une infection par le virus FV-A. Ces cellules disposent d'une capacité d'autorenouvellement limitée *in vitro*. Plusieurs semaines après l'infection, émerge alors une population clonale de cellules transformées incapables de se différencier en érythrocytes matures (ces cellules sont bloquées au stade BFU-E ou CFU-E (Shibuya & Mak, 1983)) et disposant d'une capacité d'autorenouvellement illimitée *in vitro*. Ces cellules sont tumorigènes et elles peuvent être établies en lignées permanentes (lignées MEL).

B/ Evènements moléculaires induits par le virus de Friend

1) Evènements moléculaires induits par le complexe viral de Friend

1.1) Activation de de l'érythropoïèse de stress par le virus de Friend

Le virus SFFV est défectif pour la réplication et pour l'assemblage des particules virales. Ceci est dû à de larges délétions dans les gènes *gag* et *pol* et à des mutations dans le gène *env* (Clark & Mak, 1984; Pinter & Honnen, 1989). Le génome du virus SFFV ne

contient pas de séquence oncogénique issue de proto-oncogène cellulaire (Ben-David & Bernstein, 1991). En revanche, il a été montré que le gène *env* est à lui seul responsable de la pathogénicité du virus SFFV (Kaminchik et al., 1982; Linemeyer et al., 1982; Linemeyer et al., 1981). Le gène *env* code une glycoprotéine virale de 55 kDa appelée GP55 dont l'expression dans les progéniteurs érythrocytaires est responsable de leur prolifération lors de la première phase de la maladie (Aizawa et al., 1990; Berger et al., 1985).

1.1.1) Activation de l'EPO-R par la protéine GP55

Il a été démontré que la protéine GP55 est capable d'interagir avec le récepteur de l'EPO et de l'activer constitutivement (Hoatlin et al., 1990; Li et al., 1990). Il est possible de rendre certaines lignées cellulaires, normalement dépendantes de l'interleukine 3 (IL-3), dépendantes de l'EPO après expression de l'EPO-R. La coexpression de la protéine GP55 dans ces lignées permet leur prolifération en absence d'EPO (Hoatlin et al., 1990; Li et al., 1990). Ces résultats suggèrent que le virus SFFV induirait la prolifération des progéniteurs infectés via l'activation constitutive de l'EPO-R par la protéine GP55.

1.1.2) Rôle de sf-stk

Il existe plusieurs gènes de susceptibilité au virus SFFV. Parmi ceux-ci, le gène Fv2 (Friend virus susceptibility gene 2) code pour le récepteur à domaine tyrosine kinase Stk/RON (Persons et al., 1999). Ce gène comporte un promoteur interne conduisant à la production d'une forme tronquée du récepteur appelée sf-Stk (short form Stk) et qui porte une délétion du domaine extracellulaire de reconnaissance du ligand. Le transcrit correspondant à sf-Stk est présent dans certains progéniteurs érythrocytaires. Les souches de souris sensibles au virus SFFV expriment les deux formes du récepteur. En revanche, les souches résistantes

ne produisent pas sf-Stk en raison d'une délétion dans le promoteur interne du gène Fv2. Ces souris peuvent être rendues sensibles au virus SFFV par l'expression de sf-Stk (Persons et al., 1999).

Il a été démontré que sf-Stk est capable d'interagir avec la protéine GP55 et l'EPO-R (Finkelstein et al., 2002; Nishigaki et al., 2001). Cette interaction induit l'activation constitutive de sf-Stk et la prolifération EPO-indépendante des progéniteurs. L'infection de cellules fibroblastiques NIH 3T3, qui n'expriment pas l'EPO-R, par le virus SFFV induit leur transformation s'ils expriment sf-Stk, ceci démontrant le rôle majeur de sf-Stk et de GP55 dans la transformation induite par le virus SFFV (Nishigaki et al., 2005). Cependant, une étude récente montre que la transformation induite par le virus SFFV dans les fibroblastes exprimant sf-Stk n'active qu'une partie des molécules de signalisation normalement activées par le virus SFFV dans les cellules érythroïdes (Jelacic et al., 2007). Ceci suggère la nécessité d'une coopération entre les voies de signalisation induites par sf-Stk et l'EPO-R pour la transformation du lignage érythrocytaire.

1.1.3) Rôle de *c-kit*

Les gènes *W* (Dominant white spotting) et *Sl* (Steel) sont également des gènes de susceptibilité au virus SFFV. Ces gènes codent respectivement pour le récepteur c-Kit et son ligand le SCF. Des souris mutantes pour ces gènes sont résistantes au virus SFFV. L'infection par le virus SFFV de cellules issues de la rate de souris mutantes pour le gène *W* ne permet pas leur prolifération en absence d'EPO *in vitro*, ce qui est associé à une absence d'expression de sf-Stk spécifiquement dans la rate et à une chute du nombre de progéniteurs MEP de stress (Subramanian et al., 2005). Ceci montre l'importance de la voie de signalisation du récepteur c-Kit, dont un des rôles pourrait être d'activer l'expression de sf-Stk dans les progéniteurs de la rate infectés par le virus SFFV.

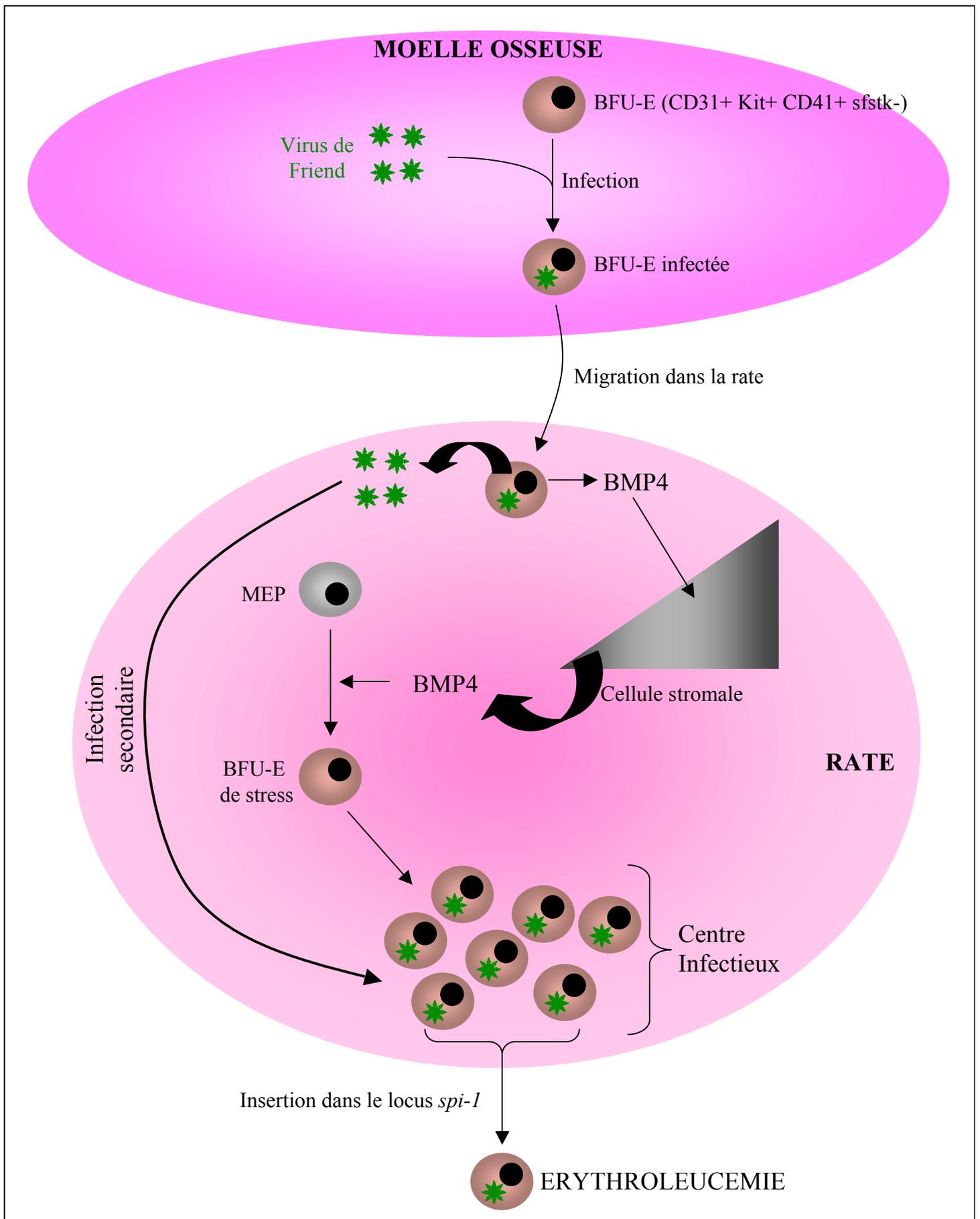


Figure 7 : Activation de l'érythropoïèse de stress par le virus SFFV.

1.1.4) Rôle du BMP4

Un autre gène de résistance au virus SFFV est le gène *f* (flexed-tail) (Axelrad, 1969). Ce gène code pour la protéine Madh5 ou Smad5, une molécule de signalisation activée par le récepteur au BMP4 (Lenox et al., 2005). Des souris homozygotes *ff*, qui présentent une déficience dans la voie de signalisation du BMP4, sont résistantes au virus SFFV. Corrélativement, le nombre de colonies BFU-E EPO-indépendantes, obtenues après infection de cellules de rate *in vitro* par le virus SFFV, est fortement réduit dans le cas de cellules issues de la rate de souris *ff* (Subramanian et al., 2007). Ceci n'est pas dû à une réduction du nombre de progéniteurs MEP dans la rate mais plutôt à une incapacité de ces progéniteurs à répondre à l'infection par le virus SFFV, ce qui est associé à une absence d'expression de *Sf-Stat3*. Des souris *ff* peuvent être rendues sensibles au virus SFFV par l'induction préalable d'une anémie par la PHZ (Subramanian et al., 2007). En effet, des souris *ff* anémiées par la PHZ puis infectées par le virus SFFV développent une splénomégalie équivalente à celle observée lors de l'infection de souris sensibles non anémiées. De même, le traitement par la PHZ augmente le nombre de BFU-E EPO-indépendantes obtenues après infection *in vitro* par le virus SFFV de cellules de la rate de souris *ff*. Ces résultats mettant en évidence l'importance de l'érythropoïèse de stress suggèrent que le virus lui-même serait capable d'induire une érythropoïèse de stress. Cette hypothèse est confortée par l'observation que l'infection de souris par le virus SFFV est accompagnée d'une expression de *bmp4* dans la rate.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que la prolifération EPO-indépendante observée lors de la première phase de la maladie induite par le virus SFFV est liée à l'activation par le virus de l'érythropoïèse de stress (Figure 7). Des résultats obtenus

réemment indiquent que cette activation de l'érythropoïèse de stress est déclenchée lors de la migration dans la rate, d'une population particulière de cellules de la moëlle osseuse de phénotype CD31+ Kit+ CD41+ sf-stk- infectées par le virus (Subramanian et al., 2007). Ces cellules vont induire une synthèse de BMP4 par les cellules stromales de la rate, activant ainsi l'amplification des progéniteurs BFU-E de stress dans la rate. Ces BFU-E de stress vont alors servir de réservoir cible pour une infection secondaire par le virus et constituer un centre d'infection (appelé IC pour Infectious Center). L'apparition d'un événement secondaire tel que l'insertion d'un provirus en amont du gène *spi-1* conduit alors à l'induction d'une érythroleucémie.

1.2) Activation transcriptionnelle du gène *spi-1*

Cette activation de l'érythropoïèse de stress par le virus SFFV n'est pas suffisante pour induire l'apparition d'une population clonale de proérythroblastes tumorigènes (Moreau-Gachelin et al., 1985). Ce n'est que tardivement qu'émerge une population clonale de cellules leucémiques transformées (Ruscetti, 1999). La nature clonale de ces cellules suggère l'existence d'un évènement de sélection.

Un de ces évènements de sélection est l'intégration du provirus SFFV dans le locus *spi-1* (SFFV integration site 1). En effet, cette intégration, conduisant à l'activation transcriptionnelle du gène *spi-1* a été mise en évidence dans 95 % des clones érythroleucémiques induits par le virus SFFV (Moreau-Gachelin et al., 1988). Le gène *spi-1* code un facteur de transcription de la famille ETS (Moreau-Gachelin, 1994), le facteur SPI-1 ou PU.1, normalement exprimé dans les macrophages, les lymphocytes B et les mastocytes mais très peu dans la lignée érythrocytaire (Galson et al., 1993; Schuetze et al., 1992). Ceci suggère que l'activation transcriptionnelle anormale du gène *spi-1* dans les lignées induites par le virus SFFV pourrait être impliquée dans la transformation et le blocage de la

différenciation de ces lignées, ce qui a été largement démontré depuis (voir chapitre III-A/ de la partie INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE).

1.3) Inactivation de P53

Un autre évènement de sélection observé est la perte de l'activité de la protéine P53. Tous les clones érythroleucémiques induits par le virus de Friend ne produisent pas de protéine P53 normale (Chow et al., 1987; Mowat et al., 1985). Ceci est dû à des altérations du gène *p53* telles que des délétions, des insertions provirales ou des mutations ponctuelles qui conduisent soit à la perte de production de la protéine P53 soit à la production d'une protéine P53 tronquée ou mutée (Ben-David et al., 1990b; Munroe et al., 1990). Cette perte de l'activité de la protéine P53 favorise le développement de la maladie mais n'est pas suffisante à elle seule pour transformer les progéniteurs érythrocytaires. En effet, l'expression d'une forme mutée de P53 dans des érythroblastes aviaires n'est pas suffisante pour empêcher la différenciation des progéniteurs en réponse de l'EPO ni leur mort en absence d'EPO (Quang et al., 1997). En revanche, cette forme mutée de P53 augmente le blocage de la différenciation et la survie des cellules provoqués par l'expression forcée de *spi-1* (Quang et al., 1997). De plus, l'érythroleucémie induite par le virus de Friend se développe plus rapidement chez des souris transgéniques portant une forme mutée de P53 (Lavigueur & Bernstein, 1991), ainsi que chez des souris déficientes pour le gène *p53* (Prasher et al., 2001). De même, l'érythroleucémie provoquée par la surexpression de *spi-1* se développe plus rapidement chez des souris déficientes pour le gène *p53* (Solan et al., 2001). L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle direct de la perte de fonction de P53 dans la transformation de la lignée érythrocytaire.

2) Evènements moléculaires induits par le virus F-MuLV seul

Le virus F-MuLV seul n'induit pas d'érythroleucémie lorsqu'il est injecté à des souris adultes. En revanche, lorsqu'il est injecté à des souris de souches sensibles nouveau-nées, il provoque des érythroleucémies caractérisées par une anémie et une splénomégalie (MacDonald et al., 1980).

Deux à trois semaines après l'infection par le virus F-MuLV, les souris développent une anémie sévère et une splénomégalie provoquées, non pas par un blocage de la différenciation érythrocytaire, mais par une hémolyse des réticulocytes (appelée EHA pour Early Hemolytic Anemia) et une induction de l'érythropoïèse dans la rate (Sitbon et al., 1986). L'antigène GCSA, codé par le gène *gag* est exprimé à la surface des cellules infectées, semble jouer un rôle dans cette EHA puisqu'un virus F-MuLV mutant n'exprimant plus cet antigène n'est pas capable d'induire l'EHA (Corbin et al., 1994).

La plupart des souris infectées meurent lors de cette première phase en moins de 25 jours après l'infection. Les souris qui survivent à cette première phase développent de nouveau, deux mois après l'infection, une anémie et une splénomégalie. A ce stade, les souris présentent une érythroleucémie caractérisée par un blocage de la différenciation érythrocytaire.

2.1) Activation transcriptionnelle du gène *fli-1*

La première phase des érythroleucémies induites par le virus F-MuLV est caractérisée par la prolifération oligoclonale de progéniteurs érythroïdes non leucémiques bloqués dans leur différenciation (Silver & Kozak, 1986; Wong et al., 1999). Contrairement au virus SFV, le virus F-MuLV ne code pas pour la GP55. En revanche, 75 % des clones érythroleucémiques issus de souris infectées par le virus F-MuLV présentent une activation de

la transcription du gène *fli-1* en raison de l'insertion du provirus en 5' du gène (Ben-David et al., 1990a). Cette activation est le premier évènement génétique détectable dans les cellules pré-leucémiques et elle coïncide avec le blocage de la différenciation et la prolifération des progéniteurs érythroïdes dans la rate des souris infectées (Howard et al., 1993).

Le gène *fli-1* code un facteur de transcription de la famille ETS (Ben-David et al., 1991) majoritairement exprimé dans les cellules endothéliales et mégacaryocytaires, et peu dans la lignée érythrocytaire (Starck et al., 1999b). Ceci suggère que l'activation transcriptionnelle anormale du gène *fli-1* dans les lignées induites par le virus F-MuLV pourrait être impliquée dans la transformation et le blocage de la différenciation de ces lignées.

La surexpression de *fli-1* n'est cependant pas suffisante à elle seule pour établir des lignées cellulaires dont la prolifération est indépendante de tout facteur de croissance (Howard et al., 1993).

2.2) Inactivation de P53

Il est possible d'établir des lignées cellulaires dont la croissance est dépendante de l'EPO *in vitro* après transplantation des cellules érythroleucémiques primaires dans des souris syngéniques. Dans toutes les lignées étudiées il a été mis en évidence une perte de l'activité de la protéine P53 (absence de production de la protéine ou production d'une protéine tronquée) alors que cette protéine est normale dans les tumeurs avant transplantation (Howard et al., 1993). L'importance de la perte de la fonction de P53 dans l'immortalisation des cellules érythroleucémiques est confirmée par le fait que des souris transgéniques *p53 +/-* ou *p53 -/-* infectées par le virus F-MuLV succombent plus rapidement à la maladie (Wong et al., 1999). Cependant, cette perte de la fonction de P53 n'est pas suffisante, à elle seule, à

l'établissement de lignées complètement transformées en culture car la plupart des cellules tumorales *p53* -/- infectées par le virus F-MuLV ne sont pas capables de survivre *in vitro*.

2.3) Activation de la voie de la signalisation de l'EPO

La transplantation de cellules érythroleucémiques dépendantes de l'EPO dans des souris *nude* permet de dériver des lignées cellulaires transformées dont la croissance *in vitro* est indépendante de l'EPO (Howard et al., 1996). Dans 80 % de ces lignées, il a été mis en évidence une activation transcriptionnelle du gène *epo*, ce qui conduit à une production autocrine d'EPO par les cellules et à une activation constitutive du récepteur de l'EPO. Cette autocrinie est associée à une augmentation de la tumorigénicité des cellules érythroleucémiques car des souris ayant reçu en injection intraveineuse des cellules issues de lignées EPO-indépendantes meurent d'une érythroleucémie plus rapidement que celles ayant reçu des cellules issues de lignées EPO-dépendantes. Cependant, l'activation transcriptionnelle du gène *epo* n'est pas suffisante pour transformer à elle seule des progéniteurs érythroïdes. En effet, les souris transgéniques surexprimant le gène *epo* ne développent pas d'érythroleucémie, elles présentent seulement une hyperprolifération des progéniteurs érythroïdes (Semenza et al., 1989).

2.4) Le site d'insertion Fli-2

Un deuxième site récurrent d'insertion provirale du virus F-MuLV, appelé *fli-2* (Friend Leukemia integration 2), a été identifié (Ben-David et al., 1992). Ce site d'intégration a été mis en évidence dans 3 lignées érythroleucémiques de Friend sur 30 étudiées (Lu et al., 1994). Cette insertion entraîne une altération de l'expression du gène *p45*, qui code une sous-unité du facteur de transcription NF-E2, suggérant un rôle de ce gène dans le développement

des érythroleucémies induites par le virus de Friend. En effet, des souris transgéniques hétérozygotes *p45* +/- infectées par le virus F-MuLV meurent plus rapidement que des souris sauvages (Li et al., 2001). De plus, l'établissement en culture des cellules érythroleucémiques issues des souris *p45* +/- est associé, dans 90 % des cas, à la perte de l'allèle *p45* restant, ce qui s'accompagne d'une chute de l'expression du gène érythrocytaire *globine α* . La réexpression de *p45* dans ces cellules provoque une réduction de leur prolifération en culture et la restauration de l'expression du gène de *globine α* . Enfin, des souris *nude* ayant reçu une injection de ces cellules érythroleucémiques réexprimant *p45* succombent moins rapidement que les souris ayant reçu une injection de cellules érythroleucémiques n'exprimant pas *p45*.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que la perte de fonction de P45 pourrait contribuer à la fois à la prolifération et au blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques induites par le virus F-MuLV.

2.5) Le site d'insertion Fli-3

Récemment, un troisième site d'insertion provirale du virus F-MuLV, appelé *fli-3* (Friend Leukemia integration 3), a été mis en évidence par Cui et al. (2007). Ce groupe avait auparavant dérivé 12 lignées de cellules érythroleucémiques à partir de tumeurs issues de souris hétérozygotes *p53* +/- infectées par le virus F-MuLV. Parmi ces 12 lignées, 4 ne présentent pas d'intégration de provirus F-MuLV au niveau du locus *fli-1*. Une altération du locus *fli-3*, soit par intégration provirale soit par amplification génique a été mise en évidence dans 2 de ces lignées ne présentant pas d'altération du locus *fli-1*. Cette altération conduit à une augmentation de l'expression du locus *fli-3*, ce qui suggère que le produit de ce locus pourrait contribuer au processus de transformation. Le locus *fli-3* correspond à un cluster comprenant 7 miRNA appelé mir-17-92.

Afin de rechercher l'implication de *fli-3* dans la transformation des cellules, le miRNA mir-17-92 a été surexprimé dans la lignée érythroleucémique HB60-5. Bien qu'infectée par le virus F-MuLV, cette lignée possède un locus *fli-1* intact et une activation par insertion provirale du gène *spi-1*. Ces cellules prolifèrent en présence d'EPO et de SCF. La suppression du SCF induit leur différenciation érythrocytaire en présence d'EPO, ce qui est associé à une forte réduction de l'expression de *fli-1*. La surexpression du miRNA mir-17-92 dans la lignée HB60-5 bloque leur différenciation induite par la suppression du SCF, ce qui est caractérisé par un maintien des cellules dans un état de prolifération et d'une réduction de l'expression du gène de *globine α*. De plus, la surexpression du miRNA mir-17-92 est associée à une réduction importante du taux de protéine P27^{KIP1}, inhibiteur du cycle cellulaire normalement impliqué dans la différenciation érythrocytaire. Cette régulation du taux de protéine P27^{KIP1} est post-transcriptionnelle, elle n'est pas due à une modification de sa stabilité, et elle ne semble pas impliquer la région 3' UTR de l'ARNm p27^{kip1}. Cependant, le mécanisme de cette régulation du taux de protéine P27^{KIP1} reste encore à déterminer.

III- Comparaison des effets de SPI-1 / PU.1 et FLI-1 sur la différenciation érythrocytaire

L'activation transcriptionnelle des gènes *spi-1* ou *fli-1* par insertion provirale apparaissant comme des événements récurrents lors des érythroleucémies de Friend, diverses expériences ont été réalisées afin de déterminer la contribution des facteurs codés par ces gènes au cours du processus de leucémogénèse.

A/ Effet de SPI-1 / PU.1 sur la différenciation érythrocytaire

1) Surexpression de *spi-1* dans les lignées érythroleucémiques

La différenciation érythrocytaire de certaines lignées SFFV peut être induite par des agents chimiques tels que le DMSO ou l'HMBA. Cette différenciation, caractérisée par l'arrêt de la prolifération des cellules et la production d'hémoglobine, est associée à une extinction de l'expression du gène *spi-1* (Hensold et al., 1996; Schuetze et al., 1992). La surexpression constitutive de *spi-1* dans ces lignées bloque l'arrêt de prolifération et inhibe l'expression du gène de *globine β* normalement induits par l'HMBA (Rao et al., 1997). De la même manière, l'expression inductible par le zinc de *spi-1* dans ces lignées inhibe l'expression du gène de *globine β* normalement induite par le DMSO (Yamada et al., 1997). De manière surprenante, dans ce cas, la surexpression de *spi-1* provoque également une réduction de la prolifération des cellules en absence de DMSO, ainsi qu'une mort cellulaire par apoptose en présence de DMSO. Cependant, la quantité de protéine SPI-1 / PU.1 produite après induction par le zinc étant beaucoup plus importante que lors de la surexpression constitutive de *spi-1*, il est envisageable que cette réduction de prolifération et cette mort cellulaire par apoptose soient liés à la présence d'un fort taux de protéine SPI-1 / PU.1 ne reflétant pas la fonction de la protéine SPI-1 / PU.1 endogène. Enfin, la surexpression de *spi-1* inhibe l'hémoglobinisation de la lignée érythroleucémique humaine K562 normalement induite par un traitement par de l'ara-C, ce qui est associé à une réduction de l'expression du gène de *globine ε* (Delgado et al., 1998).

Ces résultats montrent que la surexpression de *spi-1* bloque l'hémoglobinisation de plusieurs lignées érythroleucémiques et qu'elle peut également inhiber l'arrêt de prolifération normalement observé au cours de leur différenciation.

2) Expression forcée de *spi-1* dans des progéniteurs érythrocytaires natifs

La capacité du facteur SPI-1 / PU.1 à transformer le lignage érythrocytaire a été recherchée directement par expression forcée du gène *spi-1* dans un contexte non transformé.

Tout d'abord, il est possible d'immortaliser des érythroblastes murins *in vitro* après l'infection de cultures de moelle osseuse de souris par un rétrovirus exprimant le gène *spi-1* (Schuetze et al., 1993). Des expériences ont également été réalisées sur des érythroblastes primaires aviaires modifiés. Ces érythroblastes expriment une forme thermosensible de la tyrosine kinase *sf-stk* qui leur permet de proliférer à 37°C. Le passage des cellules à 42°C entraîne l'inactivation de cette tyrosine kinase et permet la différenciation des érythroblastes en présence d'EPO. En absence d'EPO, les cellules meurent par apoptose. La surexpression de *spi-1* inhibe la différenciation des cellules ainsi que l'apoptose observée en absence d'EPO. Cependant, cet effet n'est observé que lors de la co-expression d'un EPO-R constitutivement activé (Quang et al., 1997) ou de la protéine GP55 du virus SFFV (Pereira et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo* chez la souris. En effet, l'infection de souris par un rétrovirus surexprimant *spi-1* n'induit une érythroleucémie que si la protéine GP55 du virus SFFV-P est produite conjointement (Afrikanova et al., 2002).

L'injection d'ARN codant la protéine SPI-1 / PU.1 dans un embryon de xénope bloque l'érythropoïèse primitive. De plus, l'injection de vecteur d'expression de *spi-1* dans des explants isolés et mis en culture induit une réduction de l'expression du gène de *globine β* (Rekhtman et al., 1999).

Enfin, des souris transgéniques surexprimant *spi-1* développent spontanément des érythroleucémies en deux étapes proches des érythroleucémies de Friend (Moreau-Gachelin et al., 1996). En effet, 6 semaines après la naissance, elles développent une hépatosplénomégalie due à la prolifération de proérythroblastes bloqués dans leur différenciation

mais toujours dépendants de l'EPO pour leur croissance. Plus tardivement, ces proérythroblastes perdent leur EPO-dépendance et deviennent tumorigènes, ce qui est associé à d'autres événements de sélection parmi lesquels des mutations activatrices de c-Kit, le récepteur du SCF (Kosmider et al., 2005; Monni et al., 2008). Le fait que ces souris ne développent la maladie que quelques semaines après la naissance suggère que les érythroblastes doivent avoir subi un événement génétique secondaire à la surexpression de *spi-1* avant d'être bloqués dans leur différenciation. Cette hypothèse est également confortée par les résultats obtenus *in vitro* qui montrent que l'expression de *spi-1* n'est transformante qu'en association avec une signalisation anormale de l'EPO-R (Afrikanova et al., 2002; Quang et al., 1997).

Ces résultats démontrent donc que la surexpression de *spi-1* est capable de transformer la lignée érythrocytaire. Cependant, elle semble nécessiter la coopération avec une voie de transduction du signal comme l'activation constitutive de l'EPO-R. Les bases moléculaires de cette coopération entre la signalisation de l'EPO-R et SPI-1 / PU.1 ne sont pas connues.

3) Inactivation de *spi-1* dans des cellules érythroleucémiques

Afin de déterminer la contribution directe du facteur SPI-1 / PU.1 endogène dans la transformation des cellules érythroleucémiques, des expériences de réduction de l'expression de *spi-1* dans ces cellules ont été réalisées.

L'utilisation d'ARN antisens dirigés contre *spi-1* sur deux lignées érythroleucémiques de Friend a d'abord montré que la diminution de l'expression de *spi-1* entraîne une réduction de la prolifération de ces cellules sans pour autant induire leur différenciation (Delgado et al., 1994). L'infection de cellules érythroleucémiques de Friend par un rétrovirus produisant un shRNA dirigé contre *spi-1* (Atar & Levi, 2005), ou la transfection directe de siRNA dirigé contre *spi-1* (Papetti & Skoultchi, 2007; Stopka et al., 2005) permet une disparition presque

complète de la protéine SPI-1 / PU.1. Dans ce cas, on peut observer une réduction de la prolifération des cellules ainsi qu'une différenciation érythroïde spontanée. La réduction de l'expression de *spi-1* par interférence par l'ARN a également été réalisée de manière conditionnelle dans la lignée cellulaire 663 (lignée préleucémique issue de souris surexprimant *spi-1* et dont la croissance est dépendante de l'EPO). La réduction du taux de protéine SPI-1 / PU.1 dans cette lignée induit un arrêt de prolifération associé à la différenciation érythroïde des cellules ainsi que d'une mort par apoptose (Rimmele et al., 2007).

Ces résultats démontrent que le facteur SPI-1 / PU.1 endogène contribue effectivement à la prolifération et au blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend. Il semble également contribuer à la survie des cellules préleucémiques.

4) Inactivation de *spi-1* dans des cellules natives

L'effet inhibiteur de SPI-1 / PU.1 sur la différenciation érythrocytaire a également été mis en évidence grâce à un modèle de souris transgéniques présentant une inactivation du gène *spi-1* (Back et al., 2004; Kastner & Chan, 2008). Ces souris ont été obtenues après l'insertion par recombinaison homologue d'un cDNA codant la protéine GFP dans l'exon 1 du gène *spi-1* (cette mutation est appelée PU.1^G). Des souris homozygotes PU.1^{G/G} produisent donc la protéine GFP à la place du facteur SPI-1 / PU.1 ce qui permet de visualiser l'expression du gène *spi-1* au cours de l'hématopoïèse. Ainsi, les auteurs montrent une faible expression de *spi-1* dans les progéniteurs érythrocytaires immatures qui diminue dans les cellules matures. Les souris homozygotes PU.1^{G/G} meurent un jour après la naissance ce qui est associé à une absence des cellules myélo-monocytaires et lymphocytaires. Ceci est en accord d'autres modèles de souris transgéniques *spi-1* *-/-* qui ont montré une mort *in utero* ou 48 heures après la naissance caractérisée par un défaut de développement des lignages myélo-

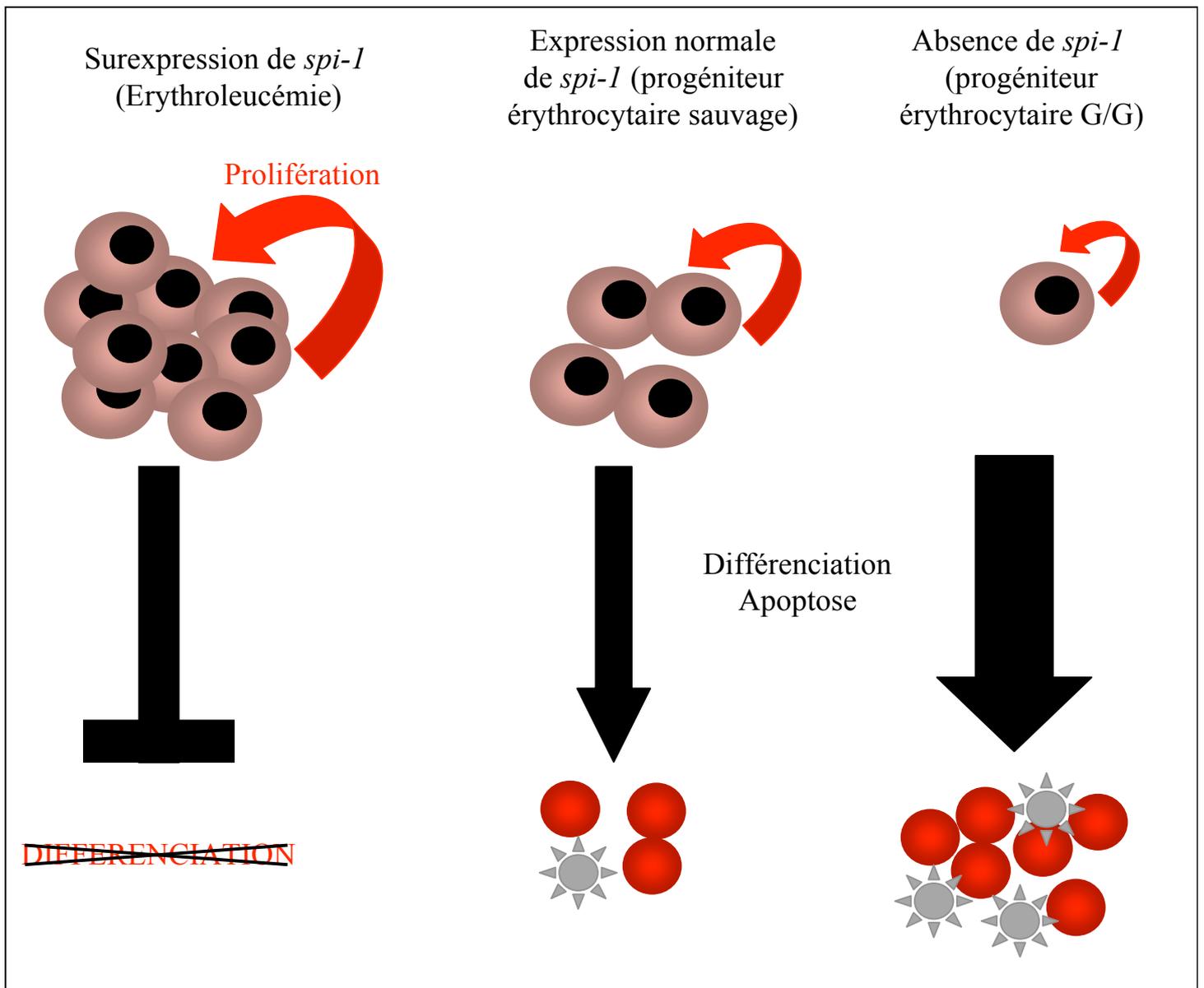


Figure 8 : Représentation schématique du rôle de SPI-1 dans l'érythropoïèse.

monocytaires et lymphocytaires (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994). Des analyses du foie foetal des souris homozygotes PU.1^{G/G} montrent une réduction du nombre de cellules érythrocytaires matures après 12,5 jours de développement. En revanche, le nombre de cellules érythrocytaires matures est augmenté après 16,5 jours de développement dans le foie foetal des souris PU.1^{G/G} comparé aux souris normales. De même, le nombre de progéniteurs érythrocytaires CFU-E est doublé après 17,5 jours de développement dans les souris PU.1^{G/G}. Au contraire, le nombre de progéniteurs érythrocytaires plus immatures est réduit de 4 fois environ dans les souris PU.1^{G/G} après 17,5 jours de développement. Ces résultats montrent donc une modification de la répartition des différentes populations de progéniteurs érythrocytaires dans le foie foetal des souris PU.1^{G/G}. En effet, dans ces souris, un nombre réduit de progéniteurs érythrocytaires immatures donne un nombre anormalement élevé de progéniteurs plus matures. Des expériences de culture *in vitro* montrent que les progéniteurs issus des souris PU.1^{G/G} ont une capacité de prolifération réduite par rapport aux progéniteurs issus de souris sauvages. De plus, cette réduction de la prolifération est corrélée à une différenciation érythrocytaire plus rapide et à une mort de certaines cellules par apoptose.

Des résultats similaires sont également observés chez les souris adultes hétérozygotes PU.1^{+G}. En effet, l'augmentation du nombre de progéniteurs érythrocytaires CFU-E et de cellules matures dans la rate, normalement observée lors de l'induction d'une anémie par traitement à la PHZ, est accélérée chez les souris hétérozygotes PU.1^{+G}.

L'ensemble de ces résultats conduit à un modèle (Figure 8) selon lequel le faible niveau d'expression de *spi-1* dans les progéniteurs érythrocytaires immatures suffirait à promouvoir leur prolifération et bloquer leur différenciation, assurant ainsi le maintien d'une population de progéniteurs immatures capables de s'engager dans la différenciation érythrocytaire, notamment au cours du développement embryonnaire et en cas de stress chez l'adulte.

B/ Effet de FLI-1 sur la différenciation érythrocytaire

1) Surexpression de *fli-1* dans les lignées érythroleucémiques

Notre équipe a montré que la surexpression, constitutive ou inductible, de *fli-1* dans la lignée 745-A, lignée érythroleucémique induite par le virus SFFV, bloque l'hémoglobinisation normalement induite par l'HMBA (Starck et al., 1999a).

Une étude réalisée sur la lignée érythroleucémique HB60-5 a également permis de mettre en évidence l'implication de *fli-1* dans le blocage de la différenciation érythrocytaire (Tamir et al., 1999). Bien qu'infectée par le virus F-MuLV, cette lignée possède un locus *fli-1* intact et une activation par insertion provirale du gène *spi-1*. Ces cellules prolifèrent en présence d'EPO et de SCF. La suppression du SCF induit leur différenciation érythrocytaire en présence d'EPO, ce qui est associé à une forte réduction de l'expression de *fli-1*. La surexpression de *fli-1* bloque l'arrêt de prolifération et l'hémoglobinisation normalement observés au cours de cette différenciation, ce qui est associé à une réduction de l'expression du gène *globine α* .

L'expression forcée de *fli-1* bloque également l'hémoglobinisation des lignées érythroleucémiques humaines K562 et HEL normalement induite par l'ara-C ou l'hémine (Athanasίου et al., 2000).

Ces résultats montrent que la surexpression de *fli-1* inhibe la différenciation érythroïde de plusieurs lignées érythroleucémiques.

2) Expression forcée de *fli-1* dans des progéniteurs érythrocytaires

La capacité de FLI-1 de transformer la lignée érythrocytaire a également été recherchée dans des érythroblastes primaires aviaires modifiés (Pereira et al., 1999). L'expression forcée de *fli-1* bloque la différenciation induite en présence d'EPO seule et maintient les cellules dans un état d'autorenouvellement. La surexpression de *fli-1* inhibe également la mort par apoptose de ces érythroblastes normalement observée en absence d'EPO. Contrairement à SPI-1 / PU.1, il n'est pas nécessaire que l'EPO-R soit constitutivement activé pour observer l'effet transformant de FLI-1.

Des souris transgéniques surexprimant *fli-1* à partir du promoteur H2k ont été établies (Zhang et al., 1995). De manière surprenante, elles ne développent pas d'érythroleucémie comme dans le cas de *spi-1*. Néanmoins, ces souris développent une maladie rénale d'origine auto-immune caractérisée par l'accumulation anormale, dans les tissus lymphoïdes périphériques, de lymphocytes auto-réactifs qui possèdent en culture une résistance accrue à l'apoptose. L'absence de phénotype observée dans la lignée érythrocytaire peut être expliquée par le fait que, contrairement à *spi-1*, la surexpression de *fli-1* suffit à elle seule pour bloquer la différenciation érythrocytaire. Il est donc probable que les souris exprimant un niveau de *fli-1* suffisant pour bloquer la différenciation érythrocytaire meurent d'anémie avant la naissance. En accord avec cette hypothèse, les souris utilisées lors de cette étude présentent un faible niveau de surexpression de *fli-1* (légèrement plus de 2 fois de protéines FLI-1 par rapport aux souris sauvages).

Ces résultats montrent que la surexpression de *fli-1* bloque la différenciation de progéniteurs érythrocytaires natifs et qu'elle permet leur survie en absence d'EPO.

3) Inactivation de *fli-1* dans des cellules érythroleucémiques

Il n'existe aujourd'hui aucune donnée démontrant, via la réduction de l'expression de *fli-1* dans des cellules érythroleucémiques, la participation directe du facteur FLI-1 endogène dans le processus de transformation.

4) Inactivation de *fli-1* dans des cellules natives

Des souris mutantes dont les deux allèles du gène *fli-1* ont été inactivés par recombinaison homologue meurent in utero après 11,5 jours de développement suite à des hémorragies (Hart et al., 2000; Spyropoulos et al., 2000). Comme dans le cas des souris PU.1^{G/G} à ce stade (Back et al., 2004), il est observé une forte réduction du nombre de progéniteurs érythrocytaires présents dans le foie foetal (Spyropoulos et al., 2000). Cependant, un biais important est induit par l'hémorragie affectant les embryons, qui pourrait empêcher la colonisation du foie foetal par les progéniteurs hématopoïétiques provenant du sac vitellin. En accord avec cette hypothèse, la diminution du nombre de progéniteurs érythrocytaires dans le sac vitellin est plus modérée. Des cultures *in vitro* de cellules de la région AGM (Aorte-Gonades-Mesonephros) d'embryons de 10 jours ont montré une augmentation du nombre d'érythrocytes dans les souris *fli-1* ^{-/-} dans cette région (Kawada et al., 2001). En revanche, le pourcentage de précurseurs érythrocytaires précoces (pronormoblastes et normoblastes basophiles), par rapport à la population totale de précurseurs érythrocytaires, est réduit d'environ 6 fois chez les souris *fli-1* ^{-/-}.

Le modèle de souris transgéniques développé par Spyropoulos et col (2000) a ensuite été utilisé afin de dériver des souris chimères (Masuya et al., 2005). L'étude des souris chimères possédant des cellules hétérozygotes *fli-1* ^{+/-} montre que le nombre de progéniteurs érythrocytaires dans la moelle osseuse issus des cellules *fli-1* ^{+/-} est 6 à 11 fois supérieur à ceux issus de cellules sauvages.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que, de façon similaire à SPI-1 / PU.1, FLI-1 pourrait être impliqué dans l'érythropoïèse, en assurant la prolifération de progéniteurs immatures et en inhibant leur différenciation.

IV- Comparaison des mécanismes d'action de SPI-1 / PU.1 et FLI-1

Parmi les différents aspects de la différenciation érythrocytaire qui sont inhibés par SPI-1 / PU.1 et FLI-1, le plus étudié est la répression de l'expression de gènes spécifiques de la lignée érythrocytaire comme le gène de *globine β* . Les auteurs ont d'abord recherché une diminution de la production de facteurs de transcription importants pour la différenciation érythrocytaire comme GATA-1 et EKLF. La production de ces facteurs n'étant pas ou peu modifiée par la surexpression de *spi-1* ou *fli-1*, l'hypothèse d'une inhibition directe de leur fonction a été envisagée.

A/ SPI-1 / PU.1

1) Inhibition de la différenciation

1.1) SPI-1 / PU.1 inhibe l'activité de GATA-1

Une interaction entre les protéines SPI-1 / PU.1 et GATA-1 a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* (Nerlov et al., 2000; Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 1999). De plus, SPI-1 / PU.1 réprime l'expression d'un gène rapporteur placé sous contrôle d'un promoteur normalement activé par GATA-1 (Matsumura et al., 2000; Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 1999). Cette répression nécessite à la fois les domaines ETS et transactivateur de SPI-1 /

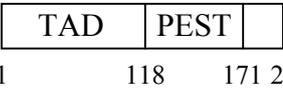
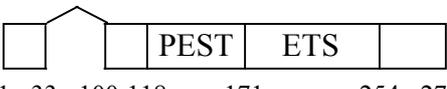
Protéine SPI-1	Interaction avec GATA-1	Blocage de la différenciation érythrocytaire	Répression de l'activité de GATA-1	Inhibition de l'acétylation de GATA-1	Inhibition de la liaison de GATA-1 à l'ADN
<p style="text-align: center;">SPI-1</p>  <p>1 118 171 254 272</p>	+	+	+	+++	+
	(14, 18, 29)	(17, 25, 30)	(12, 18, 29)	(9)	(12, 26, 30)
<p style="text-align: center;">ΔETS</p>  <p>1 118 171 201</p>	-	-	-	+	ND
	(18)	(18)	(18)	(9)	
<p style="text-align: center;">N70/75</p>  <p>1 70/75*</p>	+	ND	ND	ND	+
	(29)				(30)
<p style="text-align: center;">ΔTAD</p>  <p>1 33 100 118 171 254 272</p>	+	-	-	+	-
	(12, 18)	(18)	(12, 18)	(9)	(12)

Tableau 1 : Comparaison des domaines de SPI-1 nécessaires au blocage de la différenciation érythrocytaire et à l'altération des propriétés de GATA-1.

Les domaines de SPI-1 ainsi que leurs coordonnées exprimées en acides aminés sur les différents mutants de délétion étudiés sont présentés dans la colonne de gauche. Les autres colonnes indiquent successivement la capacité de ces mutants d'interagir avec GATA-1, puis leur effet sur la différenciation érythrocytaire, sur l'activité de GATA-1, sur son acétylation par CBP et sur sa capacité de liaison à l'ADN.

Dans le cas de l'inhibition de l'acétylation de GATA-1, l'intensité de cette inhibition est représentée par le nombre de signes +.

* L'inhibition de la liaison à l'ADN de GATA-1 a été testée sur le mutant N70 alors que le mutant N75 a été utilisé pour le test d'interaction avec GATA-1.

Les références à partir desquelles ont été tirées ces données sont indiquées entre parenthèses.

TAD : domaine transactivateur ; PEST : domaine de dégradation par le protéasome ; ETS : domaine de liaison à l'ADN ; ND : non déterminé.

PU.1 (Matsumura et al., 2000; Rekhtman et al., 1999). D'autres résultats ont montré que le blocage de la différenciation de cellules SFFV par SPI-1 / PU.1 peut être levé par la production d'une protéine GATA-1 exogène inductible (Choe et al., 2003; Rekhtman et al., 1999). De même, l'injection d'un ARN codant la protéine GATA-1 est suffisante pour sauver l'érythropoïèse d'embryons de Xénope surexprimant *spi-1* (Rekhtman et al., 1999). Tous ces résultats attestent que GATA-1 est bien une cible de SPI-1 / PU.1 dont l'inhibition de la fonction peut expliquer le blocage de la différenciation érythrocytaire.

1.1.1) SPI-1 / PU.1 inhibe la liaison à l'ADN de GATA-1

Yamada *et col.* ont observé que le blocage de la différenciation de cellules SFFV par SPI-1 / PU.1 s'accompagne d'une réduction de la fixation de GATA-1 à l'ADN *in vitro* (Yamada et al., 1998). Ces résultats ont également été observés lors de la coexpression de *gata-1* et *spi-1* dans des cellules 293T (Matsumura et al., 2000). De même, la différenciation de la lignée humaine K562 et d'une lignée murine inductible par le β -oestradiol est bloquée par l'expression forcée de *spi-1*, ce qui est associé à la perte de l'activité de liaison à l'ADN des protéines GATA-1 (Zhang et al., 2000).

L'utilisation de protéines SPI-1 / PU.1 et GATA-1 recombinantes a permis de montrer que cette inhibition de la liaison de GATA-1 à l'ADN se fait par une interaction directe entre ces deux facteurs. Bien que les domaines ETS et transactivateur de SPI-1 / PU.1 soient tous deux capables d'interagir avec le domaine de liaison à l'ADN de GATA-1, le domaine transactivateur à lui seul est nécessaire et suffisant pour inhiber la liaison de GATA-1 à l'ADN (Tableau 1).

Ces résultats ont conduit à un modèle selon lequel l'inhibition par SPI-1 / PU.1 de la fixation à l'ADN de GATA-1 serait responsable de sa perte de fonction et du blocage de la différenciation érythrocytaire. Cependant, une analyse critique des résultats présentés permet

de mettre en doute le rôle de l'inhibition de la liaison à l'ADN de GATA-1 dans le blocage de la différenciation érythrocytaire. D'abord, les résultats concluant à une réduction par SPI-1 / PU.1 de la fixation de GATA-1 à l'ADN ont été obtenus par des expériences de retard de migration sur gel *in vitro*. Ensuite, cette inhibition n'a pas été observée dans une autre lignée SFFV surexprimant *spi-1* (Hong et al., 2002). De plus, le domaine ETS de SPI-1 / PU.1 n'est pas nécessaire à l'inhibition de la liaison de GATA-1 à l'ADN alors qu'il est indispensable à la répression de son activité transcriptionnelle et au blocage de la différenciation érythrocytaire (Tableau 1). D'autre part, le blocage de la différenciation des cellules SFFV décrit par Yamada *et col.* est accompagné d'une apoptose massive des cellules qui peut être empêchée en présence de 30% de sérum dans le milieu de culture. Or dans ces conditions, la fixation de GATA-1 à l'ADN n'est plus inhibée mais la différenciation est toujours bloquée (Yamada et al., 1998; Yamada et al., 1997). Enfin, il a été démontré que l'inhibition par SPI-1 / PU.1 de la liaison de GATA-1 à l'ADN nécessite un excès molaire de SPI-1 / PU.1 supérieur à 20 fois (Rekhtman et al., 2003). De plus, la réduction du taux de protéine SPI-1 / PU.1 par transfection de siRNA entraîne la différenciation de cellules érythroleucémiques induites par le virus SFFV, ce qui n'est pas associé à l'augmentation du recrutement de GATA-1 *in vivo* (Stopka et al., 2005).

En conclusion, ces résultats montrent que SPI-1 / PU.1 peut inhiber la liaison à l'ADN de GATA-1. En revanche, ils ne permettent pas d'établir formellement de lien causal entre cette inhibition et le blocage de la différenciation érythrocytaire.

1.1.2) SPI-1 / PU.1 inhibe l'activité acétylase de CBP sur certains de ses substrats

La protéine GATA-1 est acétylée par CBP *in vitro* et *in vivo* au niveau de deux lysines de son domaine de liaison à l'ADN (Boyes et al., 1998). Cette acétylation joue un rôle positif sur

l'activité transcriptionnelle de GATA-1. Elle ne semble pas modifier sa capacité de liaison à l'ADN *in vitro*, mais elle est nécessaire à sa fixation à la chromatine *in vivo* (Hung et al., 1999; Lamonica et al., 2006).

SPI-1 / PU.1 inhibe l'acétylation de GATA-1 par CBP *in vitro* et *in vivo*, ainsi que celle d'autres protéines nucléaires comme la sous-unité MAFG du facteur NF-E2, EKLF, P53 et des protéines histones H2, H3 et H4 (Hong et al., 2002). SPI-1 / PU.1 interagit avec le domaine acétyl-transférase (AT) de CBP et réprime l'activation d'un gène rapporteur par une protéine de fusion associant le domaine AT de CBP au domaine de liaison à l'ADN du facteur GAL4. De plus, la surexpression de *spi-1* inhibe également l'augmentation de l'acétylation de l'histone H3 au niveau du promoteur du gène de *globine β* observée au cours de la différenciation des cellules SFFV.

Les domaines ETS et transactivateur de SPI-1 / PU.1 sont tous deux nécessaires pour assurer une répression maximale de l'acétylation par CBP. Ceci est en accord avec les observations indiquant le rôle essentiel de ces deux domaines dans le blocage de la différenciation érythrocytaire et la répression de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 (Tableau 1).

Ces résultats indiquent donc que la répression de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 par SPI-1 / PU.1 pourrait passer par une inhibition de son acétylation par CBP. Ils suggèrent également que GATA-1 n'est probablement pas le seul facteur dont l'inhibition de l'acétylation pourrait contribuer au blocage de la différenciation. En effet, SPI-1 / PU.1 apparaît plutôt comme un inhibiteur général de l'activité des facteurs impliqués dans la différenciation érythrocytaire (GATA-1, EKLF, NF-E2), via l'inhibition de leur acétylation par CBP.

1.1.3) SPI-1 / PU.1 recrute des complexes répresseurs sur les gènes activés par GATA-1

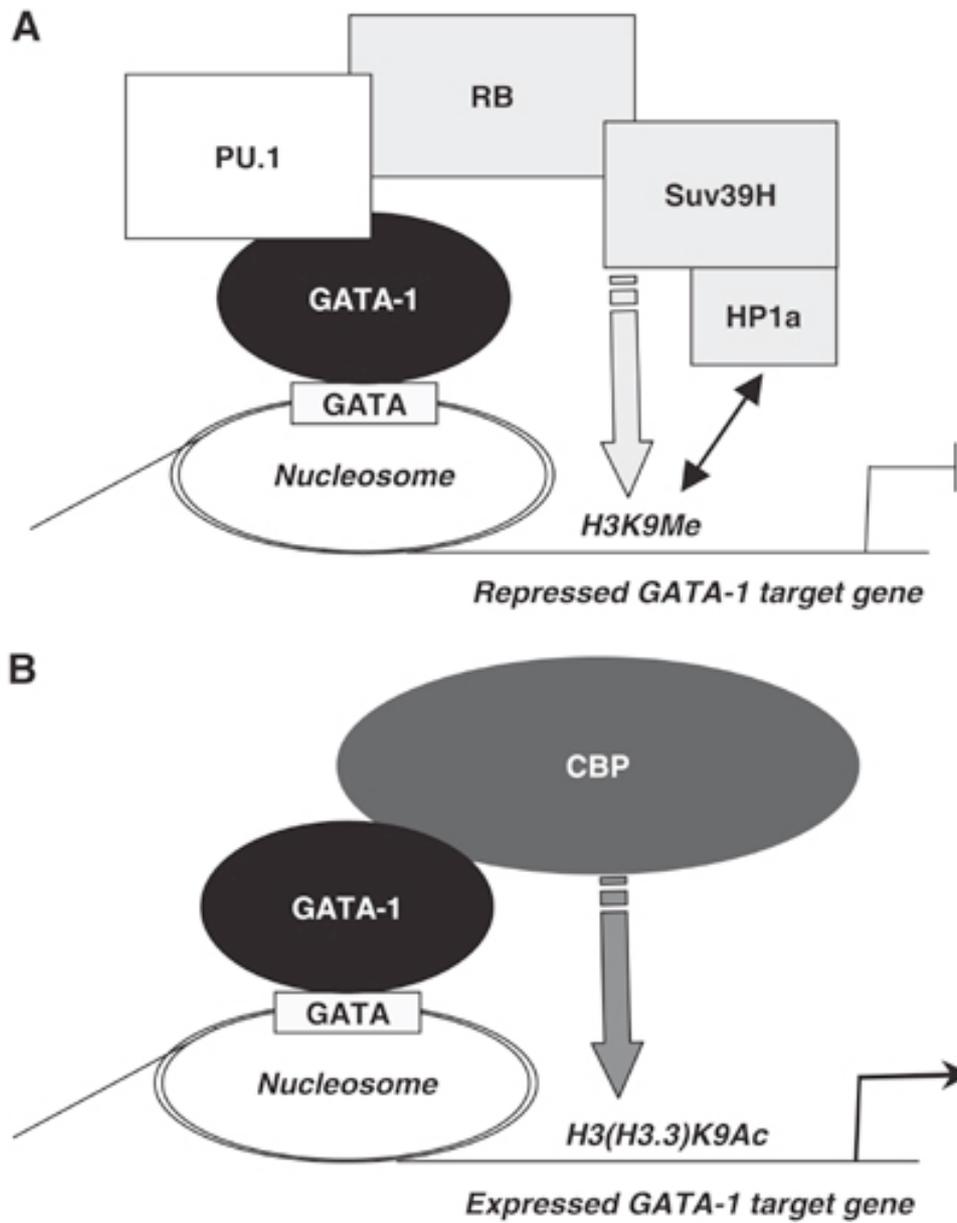
a) Via l'interaction avec la protéine RB

Il a été observé que l'activation par GATA-1 d'un gène rapporteur placé sous contrôle du promoteur du gène de *globine α* peut être réprimée par la co-expression de SPI-1 / PU.1 dans des cellules (Rekhtman et al., 1999). Cette répression est strictement dépendante de l'intégrité du domaine transactivateur de SPI-1 / PU.1 situé dans la région N-terminale. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, réalisées sur ce même gène rapporteur, ont montré que SPI-1 / PU.1 peut se fixer sur le promoteur du gène de *globine α* (Rekhtman et al., 2003). Cette fixation de SPI-1 / PU.1 n'est observée que lorsque GATA-1 est co-exprimé et elle est abolie par la mutation des sites de liaison à l'ADN de GATA-1. De plus, cette fixation est strictement dépendante de l'intégrité du domaine ETS de SPI-1 / PU.1 qui est nécessaire pour l'interaction avec GATA-1. Ces résultats suggèrent que SPI-1 / PU.1 pourrait donc se fixer de manière indirecte, via son interaction avec GATA-1, sur les gènes activés par GATA-1 et inhiber son activité.

Le domaine transactivateur situé en N-terminal de la protéine SPI-1 / PU.1 n'est pas nécessaire à la fixation de SPI-1 / PU.1 sur le promoteur du gène *globine α* (Rekhtman et al., 2003). En revanche, ce domaine est indispensable pour inhiber l'activité de GATA-1 (Rekhtman et al., 1999). Ceci suggère que la fixation indirecte de SPI-1 / PU.1 à elle seule n'est pas suffisante pour réprimer l'expression des gènes cibles de GATA-1, et qu'elle pourrait nécessiter le recrutement, via le domaine N-terminal de SPI-1 / PU.1, d'un co-répresseur. Il a été mis en évidence une interaction *in vitro* entre le domaine N-terminal de SPI-1 / PU.1 et le domaine C de la protéine RB (Hagemeier et al., 1993; Konishi et al., 1999; Rekhtman et al., 2003). Cette interaction a également été observée *in vivo* par co-immunoprécipitation dans des cellules érythroleucémiques induite par le virus SFFV (Rekhtman et al., 2003). De plus,

des expériences d'immunoprécipitation de chromatine réalisées sur ces cellules montrent que la protéine RB est colocalisée avec les protéines SPI-1 / PU.1 et GATA-1 au niveau de plusieurs sites de liaison à l'ADN de GATA-1 (Rekhtman et al., 2003; Stopka et al., 2005). La différenciation de ces cellules, induite par le DMSO ou par une protéine GATA-1 inducible, est associée à une réduction de ce recrutement de SPI-1 / PU.1 et RB ce qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes activés par GATA-1 (Stopka et al., 2005). La protéine RB semble indispensable pour la répression par SPI-1 / PU.1 de l'activité de GATA-1. En effet, SPI-1 / PU.1 n'est pas capable de réprimer l'activité de GATA-1 dans des cellules déficientes en protéine RB (lignée SAOS2 ou C33) ou dans des cellules où la protéine RB est inactive (lignée 293T) (Rekhtman et al., 2003). L'expression de *rb* dans les cellules SAOS2 restaure la capacité de SPI-1 / PU.1 d'inhiber l'activité de GATA-1. Enfin, une protéine de fusion, associant une protéine SPI-1 / PU.1 déletée de son domaine N-terminal (domaine indispensable au blocage de la différenciation érythroïde) et la protéine RB, est capable de bloquer la différenciation érythroïde de cellules érythroleucémiques induites par le virus SFFV.

Des résultats obtenus plus récemment montrent, par immunoprécipitation de chromatine sur des cellules érythroleucémiques de Friend, que le recrutement de SPI-1 / PU.1 et RB sur les séquences reconnues par GATA-1 est associé à la méthylation de la lysine K9 de l'histone H3 dans ces régions, ce qui est une marque de répression de la transcription (Stopka et al., 2005). Les auteurs mettent également en évidence la présence, au niveau des sites reconnus par GATA-1, de la protéine HP1 α associée à l'histone méthyltransférase Suv39h. La formation de ce complexe protéique est strictement dépendant de la présence de GATA-1 puisqu'il n'est plus observé après mutation des sites de fixation de GATA-1 à l'ADN. La différenciation érythroïde des cellules est associée à la dissociation de ce complexe et SPI-1 / PU.1-RB-Suv39h-HP1 α et au remplacement des histones H3 méthylées par le variant histone



D'après Stopka et al., 2005

Figure 9 : Modèle de l'inhibition de l'activité de GATA-1 par SPI-1.

H3.3. Il est également observé un recrutement de l'histone acétyltransférase CBP et l'acétylation des histones sur la lysine K9, ce qui est une marque d'une chromatine transcriptionnellement active. Les mêmes résultats sont obtenus par la réduction du taux de protéine SPI-1 / PU.1 grâce à l'utilisation de siRNA dirigés contre *spi-1*.

L'ensemble de ces résultats conduit à un modèle (Figure 9) selon lequel SPI-1 / PU.1, via son interaction avec GATA-1 et RB, permettrait la formation d'un complexe responsable de la méthylation de la lysine K9 de l'histone H3 au niveau des sites reconnus par GATA-1, induisant ainsi la répression transcriptionnelle de ces gènes. Au cours de la différenciation des cellules érythroleucémiques, ce complexe répresseur serait remplacé par CBP, induisant l'acétylation de la lysine K9 de l'histone H3 et permettant la transcription.

b) Via la fixation au niveau de l'intron 2 du gène globine β

La purification de partenaires protéiques de SPI-1 / PU.1 à partir d'extraits de cellules érythroleucémiques de Friend a permis l'identification de la protéine MeCP2 (Suzuki et al., 2003). MeCP2 est un corépresseur transcriptionnel formant des complexes répresseurs avec les protéines mSin3A et HDAC1 au niveau de promoteurs riches en îlots CpG méthylés (Jones et al., 1998; Meehan et al., 1992; Nan et al., 1998). L'interaction entre SPI-1 / PU.1 et MeCP2 a été observée *in vitro* et *in vivo*. Elle se fait entre le domaine de liaison à l'ADN de SPI-1 / PU.1 et le domaine N-terminal ou le domaine de trans-répression de MeCP2 (Suzuki et al., 2003). MeCP2 inhibe l'activation par SPI-1 / PU.1 d'un gène rapporteur placé sous contrôle de sites de liaison à l'ADN de SPI-1 / PU.1. Cet effet inhibiteur de MeCP2 est aboli par la TSA, un inhibiteur des protéines HDAC, suggérant l'implication possible d'un complexe mSin3A-HDAC1. Or SPI-1 / PU.1 est capable d'interagir avec la protéine mSin3a et de former un complexe répresseur de la transcription avec les protéines mSin3A et HDAC1 (Kihara-Negishi et al., 2001), la présence de MeCP2 semblant favoriser la formation de ce

complexe (Suzuki et al., 2003). Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, réalisées sur un gène rapporteur placé sous contrôle de sites de fixation à l'ADN de SPI-1 / PU.1, montrent un recrutement de MeCP2 sur les sites reconnus par SPI-1 / PU.1. Ce recrutement est strictement dépendant de l'intégrité des sites de fixation à l'ADN de SPI-1 / PU.1 et de la présence d'au moins un des deux domaines de MeCP2 interagissant avec SPI-1 / PU.1.

Il a été décrit que SPI-1 / PU.1 est capable de se fixer dans l'intron 2 des gènes de *globine β* dans des cellules érythroleucémiques de Friend (Galson et al., 1993; Galson & Housman, 1988). Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine réalisées sur ces cellules montrent une colocalisation de SPI-1 / PU.1 et MeCP2 au niveau de la région IVS2 (Suzuki et al., 2003). En revanche, SPI-1 / PU.1 et MeCP2 ne sont plus retrouvées sur cette région après la différenciation érythroïde induite par le DMSO.

Ces résultats suggèrent donc que le recrutement de MeCP2 par SPI-1 / PU.1 au niveau de l'intron 2 du gène *globine β* pourrait contribuer au blocage de la différenciation érythroïde induit par SPI-1 / PU.1.

1.2) Inhibition réciproque de l'activité de SPI-1 / PU.1 par GATA-1

Il a également été décrit que GATA-1 inhibe la transcription d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur myéloïde normalement activé par SPI-1 / PU.1 (Matsumura et al., 2000; Nerlov et al., 2000; Zhang et al., 1999). Des résultats suggèrent que l'interaction entre SPI-1 / PU.1 et GATA-1 empêcherait l'interaction entre SPI-1 / PU.1 et son cofacteur c-JUN, inhibant ainsi l'activité transactivatrice de SPI-1 / PU.1 (Liew et al., 2006; Zhang et al., 1999).

1.3) SPI-1 / PU.1 régule l'épissage

Il a été mis en évidence une interaction entre SPI-1 / PU.1 et des facteurs impliqués dans l'épissage des ARN pré-messagers comme les protéines p54nrb (nuclear RNA binding protein) (Hallier et al., 1996) et TLS (translocated in liposarcoma) (Hallier et al., 1998). En effet, le domaine de liaison à l'ADN de SPI-1 / PU.1 est capable d'interagir *in vitro* avec le domaine de liaison à l'ARN de ces deux protéines et d'interférer avec leur fonction dans l'épissage. SPI-1 / PU.1 et TLS ont un effet opposé sur le choix du site 5' d'épissage de l'ARN pré-messager viral E1A (Hallier et al., 1998). L'inhibition de l'activité de TLS par SPI-1 / PU.1 passe par l'association de son domaine de liaison à l'ADN à son domaine transactivateur ou à son domaine PEST (Delva et al., 2004).

Plusieurs arguments suggèrent que cette capacité de SPI-1 / PU.1 d'interférer avec l'épissage des ARN pré-messagers pourrait participer à la transformation du lignage érythrocytaire. D'abord, SPI-1 / PU.1 est capable d'interférer *in vitro* avec l'épissage du gène de *globine β* (Hallier et al., 1996). Ensuite, l'interaction entre SPI-1 / PU.1 et TLS a également été observée par co-immunoprécipitation d'extraits nucléaires de cellules érythroleucémiques induites par le virus SFFV (Hallier et al., 1998). La surexpression de *spi-1* dans des cellules érythroleucémiques induit une perte de l'activité d'épissage de TLS mesurée sur l'ARN pré-messager viral E1A (Delva et al., 2004; Hallier et al., 1998). Enfin, SPI-1 / PU.1 inhibe l'épissage alternatif érythroïde-spécifique, correspondant à l'exclusion de l'exon 16 de l'ARN pré-messager codant la protéine de structure 4.1R, normalement observé au cours de la différenciation des cellules érythroleucémiques induites par le virus SFFV (Theoleyre et al., 2004). Le mécanisme par lequel SPI-1 / PU.1 interfère avec l'épissage de cet exon 16 n'a pas été identifié.

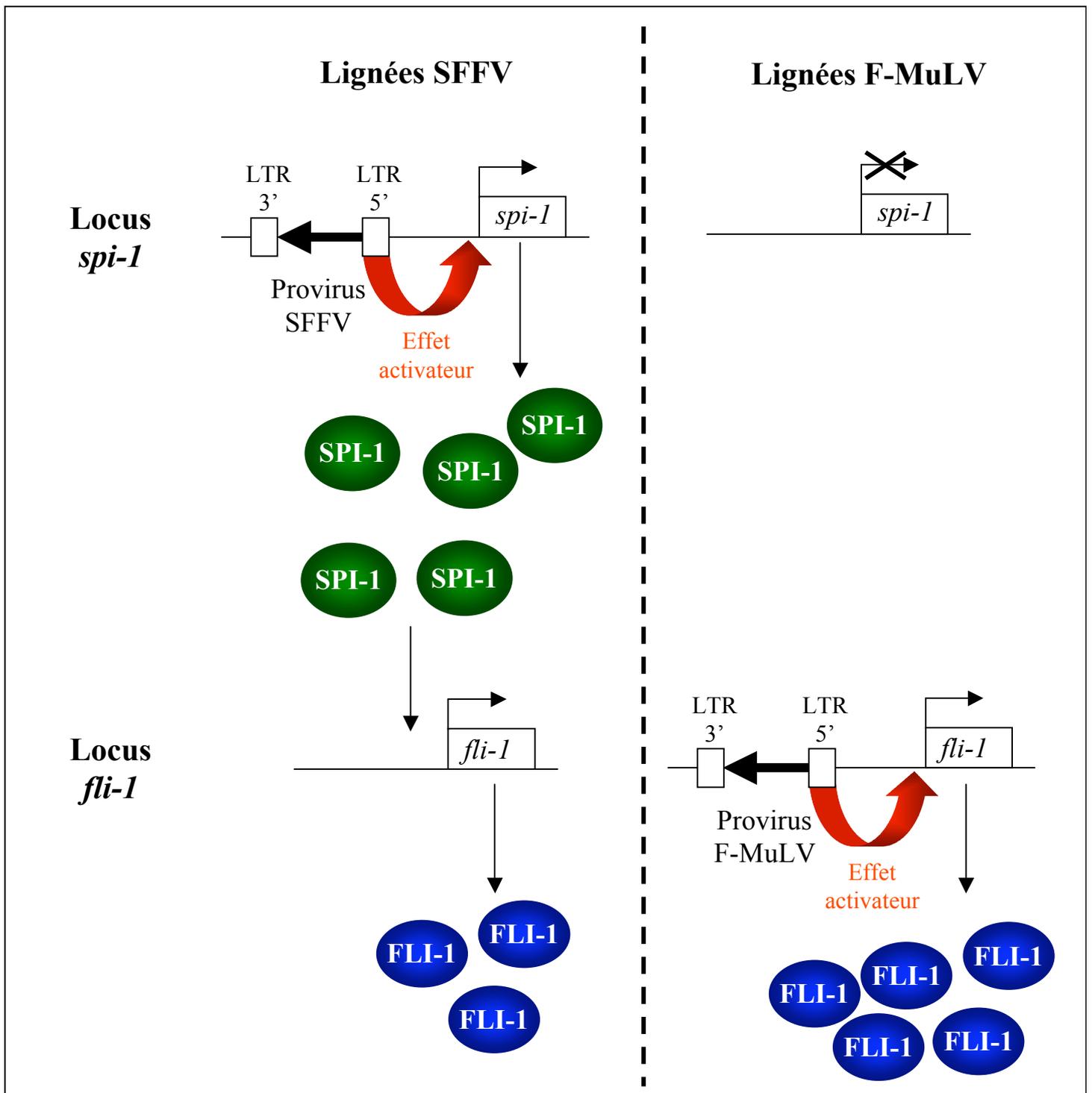


Figure 10 : Activation transcriptionnelle des gènes *spi-1* et *fli-1* dans les érythroleucémies de Friend.

Les lignées érythroleucémiques F-MuLV se caractérisent par une insertion provirale en 5' du gène *fli-1* conduisant, via un effet activateur de la LTR 5' du provirus, à la surproduction du facteur FLI-1. Dans le cas des lignées SFFV, l'insertion provirale a lieu en amont du gène *spi-1* et conduit à la surproduction du facteur SPI-1 qui active à son tour l'expression du gène *fli-1*.

2) Inhibition de l'arrêt de prolifération

La différenciation des cellules érythroleucémiques induites par le virus SFFV est caractérisée par un blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Ce blocage est associé à une réduction de la kinase CDK6, due à une diminution du taux d'ARNm *cdk6* (Matushansky et al., 2003). Cette réduction de l'activité de CDK6 semble nécessaire à la différenciation des cellules érythroleucémiques car la surexpression inducible de *cdk6* bloque la différenciation normalement induite par le DMSO. Le blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques provoqué par la surexpression de *spi-1* est caractérisé par un maintien du taux de protéine et de l'activité de CDK6. Afin d'exclure la possibilité que ce maintien du taux de protéine CDK6 soit une conséquence du blocage de la différenciation, les auteurs ont dérivé une lignée produisant une protéine SPI-1 / PU.1 fusionnée au domaine de liaison à l'hormone du récepteur aux oestrogènes. En absence d'oestrogènes, la protéine SPI-1 / PU.1 est localisée dans le cytoplasme et ne peut pas assurer ses fonctions dans le noyau. En présence d'oestrogènes, la protéine fusion migre dans le noyau. Après une induction de 24 heures par le DMSO pour induire la différenciation des cellules, la présence d'oestrogènes induit une augmentation du taux d'ARNm *cdk6*. Cependant, le mécanisme par lequel SPI-1 / PU.1 pourrait augmenter le taux d'ARNm *cdk6* n'est pas connu.

Ces résultats suggèrent que SPI-1 / PU.1 pourrait inhiber l'arrêt de prolifération normalement observé au cours de la différenciation des cellules érythroleucémiques en inhibant la réduction de l'activité de CDK6.

3) SPI-1 / PU.1 active la transcription de *fli-1*

Notre équipe a mis en évidence une expression de *fli-1* dans les lignées érythroleucémiques induite par le virus SFFV, ce qui est dû à une activation transcriptionnelle directe par le facteur SPI-1 / PU.1 (Starck et al., 1999a). Ces résultats démontrent donc que

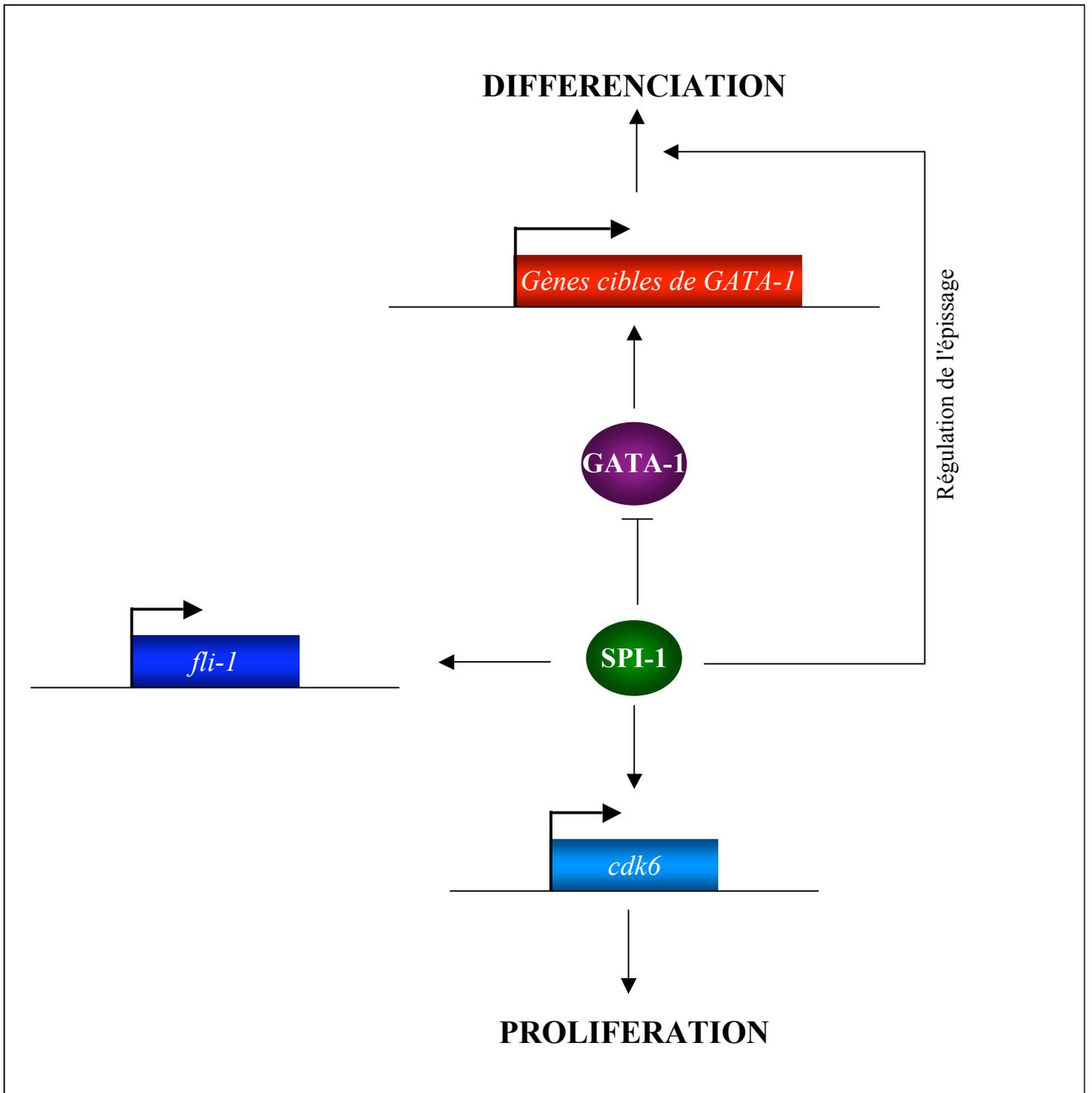


Figure 11 : Bilan des mécanismes d'action du facteur SPI-1.

l'activation transcriptionnelle du gène *fli-1* est un évènement commun aux érythroleucémies induites par le virus F-MuLV et SFFV (Figure 10). De plus, ils suggèrent que *fli-1* pourrait participer aux érythroleucémies induites par la surexpression de *spi-1*.

En conclusion (Figure 11), le mécanisme par lequel SPI-1 / PU.1 bloque la différenciation érythrocytaire semble principalement lié à l'inhibition de l'activité du facteur GATA-1, conduisant, entre autres, à la répression de l'expression des gènes spécifiques du lignage érythrocytaire, ainsi que la régulation de l'épissage. L'activation du gène codant la kinase CDK6 permettrait également de maintenir les cellules dans un état de prolifération. Enfin, l'activation du proto-oncogène *fli-1* pourrait également contribuer aux propriétés oncogéniques de SPI-1 / PU.1

B/ FLI-1

1) Inhibition de la différenciation

1.1) FLI-1 interagit avec GATA-1

Comme cela a été décrit pour SPI-1 / PU.1, FLI-1 interagit avec GATA-1. Cependant, cette interaction se fait uniquement par l'intermédiaire de leur domaine de liaison à l'ADN et elle n'aboutit pas à la répression de l'activité de GATA-1 (Eisbacher et al., 2003; Starck et al., 2003). Au contraire, l'activation transcriptionnelle par GATA-1 d'un gène rapporteur placé sous contrôle d'un promoteur mégacaryocytaire est stimulée en présence de FLI-1. De plus, cette stimulation de l'activité de GATA-1 par FLI-1 est due en partie à leur coopération pour la fixation sur le promoteur mégacaryocytaire étudié (Eisbacher et al., 2003).

1.2) FLI-1 inhibe l'activité de EKLF

L'un des facteurs de transcription ciblés par FLI-1 a été identifié. Une interaction entre FLI-1 et EKLF a été mise en évidence *in vitro* (Starck et al., 2003). Le domaine ETS de FLI-1 interagit à la fois avec le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation de EKLF alors que ses domaines N et C-terminaux interagissent seulement avec le domaine transactivateur de EKLF. FLI-1 réprime la transcription d'un gène rapporteur placé sous contrôle d'un promoteur érythrocytaire dans des cellules SFFV ou d'un promoteur artificiel normalement activé par EKLF dans des cellules 3T3. La répression de l'activité de EKLF requiert la présence du domaine ETS de FLI-1 et son association avec le domaine N ou C-terminal. L'utilisation de protéines FLI-1 chimériques fusionnées au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 a permis de mettre en évidence une activité répresseur autonome du domaine ETS de FLI-1. L'interaction des domaines N ou C-terminaux de FLI-1 avec le domaine transactivateur de EKLF pourrait servir à recruter le domaine ETS de FLI-1 au niveau du promoteur de *globine β* assurant ainsi la répression de son expression.

1.3) Inhibition réciproque de l'activité de FLI-1 par EKLF

L'activité stimulatrice de FLI-1 sur le promoteur du gène mégacaryocytaire *gpIX* ou sur un promoteur artificiel contenant des sites de liaison de FLI-1 est inhibée par la production conjointe de EKLF. Cette répression est dépendante du domaine de liaison à l'ADN de EKLF dont l'activité répresseur autonome a également été décrite. Des expériences réalisées *in vitro* ont permis d'envisager un modèle selon lequel l'inhibition de l'activité de FLI-1 par EKLF s'expliquerait par le recrutement indirect de EKLF par une interaction protéine-protéine avec FLI-1, ce qui permettrait de révéler l'activité répresseur de son domaine de liaison à l'ADN

(Starck et al., 2003). Des résultats obtenus plus récemment suggèrent également que EKLF est capable d'inhiber directement l'expression du gène *fli-1* (Frontelo et al., 2007).

1.4) Régulation de la signalisation induite par l'EPO-R

1.4.1) Activation de la voie shc/ras

La lignée HB60-5 est une lignée érythroleucémique infectée par le virus F-MuLV, mais qui possède un locus *fli-1* intact et une activation par insertion provirale du gène *spi-1*. Ces cellules prolifèrent en présence d'EPO et de SCF. Cette prolifération est associée à une phosphorylation des protéines STAT5 et SHC (Zochodne et al., 2000). La suppression du SCF induit leur différenciation érythrocytaire en présence d'EPO seule, ce qui est associé à une forte réduction de l'expression de *fli-1* et à une phosphorylation seulement de STAT5. L'expression forcée de *fli-1* dans ces cellules bloque la différenciation normalement observée en présence d'EPO seule et maintient les cellules en état de prolifération, ce qui est associé à la phosphorylation à la fois de STAT5 et SHC. Ces résultats suggèrent que FLI-1 pourrait mimer la présence du SCF et modifier la signalisation de l'EPO-R en réponse à l'EPO, transformant ainsi un signal de différenciation en signal de prolifération. Cependant, le mécanisme précis par lequel FLI-1 induit l'activation de SHC n'est pas connu.

1.4.2) Activation de slap

L'expression forcée de *fli-1* bloque la différenciation d'érythroblastes primaires aviaires induite en présence d'EPO seule et maintient les cellules dans un état d'autorenouvellement. La surexpression de *fli-1* inhibe également la mort par apoptose de ces érythroblastes normalement observée en absence d'EPO (Pereira et al., 1999).

Une analyse différentielle de transcrits (RDA pour Representational Difference Analysis) a permis d'identifier le gène *slap* (Src-Like Adapter Protein) comme un gène activé par la surexpression de *fli-1* dans ces érythroblastes aviaires (Lebigot et al., 2003). Cependant, aucune expérience n'a été réalisée afin de rechercher si le gène *slap* est une cible directe de FLI-1. Le gène *slap* code une protéine adaptatrice capable d'interférer avec la signalisation induite par le TCR (T Cell Receptor) lorsqu'il est surexprimé dans la lignée leucémique T Jurkat (Sosinowski et al., 2000).

La surexpression de *slap* dans les érythroblastes aviaires produisant l'EPO-R murin provoque un blocage de la différenciation normalement observée en présence d'EPO. Elle induit également une mort des cellules par apoptose associée à une réduction de l'expression du gène anti-apoptotique *bcl-x_l* normalement activé au cours de la différenciation induite par l'EPO. SLAP ne semble pas inhiber directement le programme de différenciation mais plutôt interférer avec la voie de signalisation activée par l'EPO-R. En effet, l'expression forcée du gène *bcl-2* permet de contourner la voie de signalisation de l'EPO-R favorisant la survie et d'induire la différenciation des érythroblastes aviaires en absence d'EPO. Or, la surexpression de *slap* ne bloque pas cette différenciation induite en absence d'EPO.

La perturbation de la voie de signalisation de l'EPO-R par SLAP a également été mise en évidence dans les érythroblastes murins EI-11. Ces érythroblastes prolifèrent en présence d'EPO, de SCF et de Dexaméthasone alors qu'ils se différencient en présence d'EPO seule. L'expression forcée de *slap* bloque cette différenciation et induit la mort des cellules par apoptose, ce qui est associé à une diminution de l'expression de *bcl-x_l*. Des expériences de retard de migration sur gel montrent que ceci est corrélé à une réduction de la phosphorylation et de la liaison à l'ADN, normalement induite par l'EPO, de l'activateur transcriptionnel de *bcl-x_l* STAT5. Enfin, SLAP semble agir directement au niveau de l'EPO-R puisque des

expériences de co-immunoprécipitation réalisées dans les cellules EI-11 ou dans des cellules 293T montrent une interaction entre ces deux protéines.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le blocage de la différenciation érythroïde par FLI-1 pourrait passer par la régulation de gènes codant des molécules impliquées dans la voie de signalisation activée par l'EPO-R. L'absence d'activation de l'expression de *bcl-x_l* par cette voie de signalisation, normalement indispensable pour la survie des érythroblastes, pourrait être compensée par l'activation du gène *bcl-2* par FLI-1.

1.5) Activation du gène *lmo2*

Une comparaison bioinformatique de la séquence promotrice du gène *lmo2* de 7 espèces de vertébrés a permis de mettre en évidence une haute conservation du promoteur proximal (Landry et al., 2005). La majorité des ARNm *lmo2* sont issus de l'activité de ce promoteur. A l'intérieur de ce promoteur proximal, 3 sites ETS ont été identifiés. Parmi ces sites ETS, deux semblent indispensables au fonctionnement du promoteur proximal puisque leur mutation provoque une chute de l'expression d'un gène rapporteur placé sous contrôle de ce promoteur dans des cellules hématopoïétiques 416B et endothéliales MS1. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine réalisées sur ces cellules montrent que plusieurs facteurs de la famille ETS, parmi lesquels FLI-1, se fixent sur le promoteur proximal du gène *lmo2*.

Le gène *lmo2* code une protéine jouant un rôle essentiel dans l'érythropoïèse (Warren et al., 1994). LMO2 a été identifiée comme un composant d'un complexe multiprotéique incluant entre autre les facteurs de transcription GATA-1 et TAL1 et régulant la transcription de gènes érythrocytaires comme le gène *glycophorine A* (Lahlil et al., 2004). Des résultats obtenus plus récemment suggèrent un rôle de LMO2 dans l'activation du gène de *globine β* au cours de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend (Song et al., 2007). En

revanche, la surexpression de *lmo2* dans une lignée d'érythroblastes murins déficients pour *gata-1* bloque leur différenciation normalement induite par l'expression de *gata-1* (Visvader et al., 1997). La surexpression de *lmo2* bloque également la différenciation de cellules érythroleucémiques de Friend normalement induite par le DMSO (Terano et al., 2005).

Ces résultats suggèrent donc que, malgré un rôle positif de LMO2 dans l'érythropoïèse normale, sa surexpression induit un blocage de la différenciation érythrocytaire. Il est donc envisageable que l'activation de l'expression du gène *lmo2* par FLI-1 pourrait contribuer à ses propriétés oncogéniques.

2) Inhibition de l'arrêt de prolifération

Le blocage par FLI-1 de la différenciation érythroïde des cellules érythroleucémiques HB60-5 normalement induite en présence d'EPO seule est corrélée à une réduction du taux d'ARNm et du taux de protéine RB (Tamir et al., 1999). Or, cette protéine semble jouer un rôle dans la différenciation érythroïde, induite par l'HMBA, de lignées érythroleucémiques SFFV en induisant un allongement de la phase G1 du cycle cellulaire (Zhuo et al., 1995). Un site consensus EBS a été identifié dans le promoteur du gène *rb* (Tamir et al., 1999). Des expériences de retard de migration sur gel réalisées avec des extraits nucléaires de lignées F-MuLV ainsi que des expériences d'immunoprécipitation de chromatine réalisées sur une lignée SFFV ont montré que FLI-1 est capable de fixer ce site EBS *in vitro* et *in vivo*. La transfection d'un vecteur d'expression de *fli-1* dans une lignée n'exprimant ni *fli-1* ni *rb* inhibe l'expression d'un gène rapporteur placé sous contrôle du promoteur du gène *rb*, ce qui est dépendant de l'intégrité du domaine de liaison à l'ADN de FLI-1. La surexpression de *fli-1* induit également une réduction du taux d'ARNm *rb* dans la lignée 3T3. Enfin, l'expression forcée de *fli-1* inhibe le blocage du cycle cellulaire de la lignée SAOS-2 normalement provoqué par surexpression du gène *rb*.

Ces résultats suggèrent donc que FLI-1 pourrait, via la répression transcriptionnelle du gène *rb*, maintenir les cellules érythroïdes dans un état de prolifération en inhibant l'allongement du cycle cellulaire normalement induit par la protéine RB.

3) Inhibition de l'apoptose

3.1) Activation du gène *bcl2*

La surexpression de *fli-1* inhibe la mort par apoptose d'érythroblastes aviaires normalement observée en absence d'EPO, ce qui est associé à une augmentation du taux d'ARNm correspondant au gène anti-apoptotique *bcl2* (Pereira et al., 1999). Lesault et coll. ont montré par des expériences de "run-on" *in vitro* que cette augmentation était transcriptionnelle (Lesault et al., 2002). De plus, FLI-1 active l'expression d'un gène rapporteur placé sous contrôle du promoteur du gène *bcl2*, ce qui est strictement dépendant de l'intégrité des sites EBS et des domaines transactivateurs de la protéine FLI-1. Les auteurs montrent également, par immunoprécipitation de chromatine d'érythroblastes aviaires surexprimant *fli-1*, que la protéine FLI-1 se fixe *in vivo* sur les séquences promotrices du gène *bcl2* portant des sites EBS.

Plusieurs arguments suggèrent que l'activation transcriptionnelle de *bcl2* joue un rôle important dans le développement des érythroleucémies induites par le virus F-MuLV. Contrairement aux lignées érythroleucémiques induites par le virus SFFV où il est peu ou pas exprimé, le gène *bcl2* est fortement exprimé dans les lignées induites par le virus F-MuLV (Howard et al., 2001). La surexpression de *bcl2* dans la lignée érythroleucémique DP16-1, induite par le virus SFFV, inhibe l'arrêt de prolifération et l'apoptose normalement provoquée par la restauration de l'activité de P53 (Ryan et al., 1994). Cette surexpression de *bcl2* protège également les lignées induites par le virus SFFV de l'apoptose induite par divers stimuli

comme la culture en présence de faible quantité de sérum ou un traitement par l'étoposide (Howard et al., 2001). En revanche, la lignée CB3, induite par le virus F-MuLV et produisant un haut niveau de protéine BCL2, est résistante à l'apoptose induite par P53 (Howard et al., 2001; Lin & Benchimol, 1995).

Tous ces résultats suggèrent donc que, pendant les premiers stades de l'infection par le virus F-MuLV, FLI-1 pourrait, via l'activation transcriptionnelle de *bcl2*, protéger les cellules infectées de l'apoptose induite par le suppresseur de tumeur P53 avant qu'il ne soit inactivé par des mutations génétiques dans les phases tardives.

3.2) Activation du gène *mdm2*

L'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 est un évènement génétique observé dans la phase tardive de l'érythroleucémie de Friend induite par le virus F-MuLV. L'oncogène *mdm2* code une E3 ubiquitine ligase induisant la dégradation de P53 par le protéasome (Fang et al., 2000).

Deux sites EBS, dont un étant un site consensus reconnu par FLI-1, ont été identifiés dans la séquence promotrice du gène *mdm2* (Truong et al., 2005). La fixation de la protéine FLI-1 sur ce site a été mise en évidence *in vitro* par des expériences de retard de migration sur gel et *in vivo* par immunoprécipitation de chromatine de cellules érythroleucémiques HB60-5 et CB3. L'expression d'un gène rapporteur, placé sous contrôle du promoteur du gène *mdm2*, est activé de manière dose-dépendante par FLI-1 dans des cellules 293T. De plus, la surexpression de *fli-1* dans la lignée érythroleucémique HB60-5 entraîne une augmentation du taux d'ARNm et de protéine MDM2. Enfin, l'augmentation de l'expression de *fli-1*, observée dans des cellules issues de la rate de souris infectées par le virus F-MuLV, est corrélée à une augmentation du taux de protéine MDM2, ainsi qu'à une chute du taux de protéine P53.

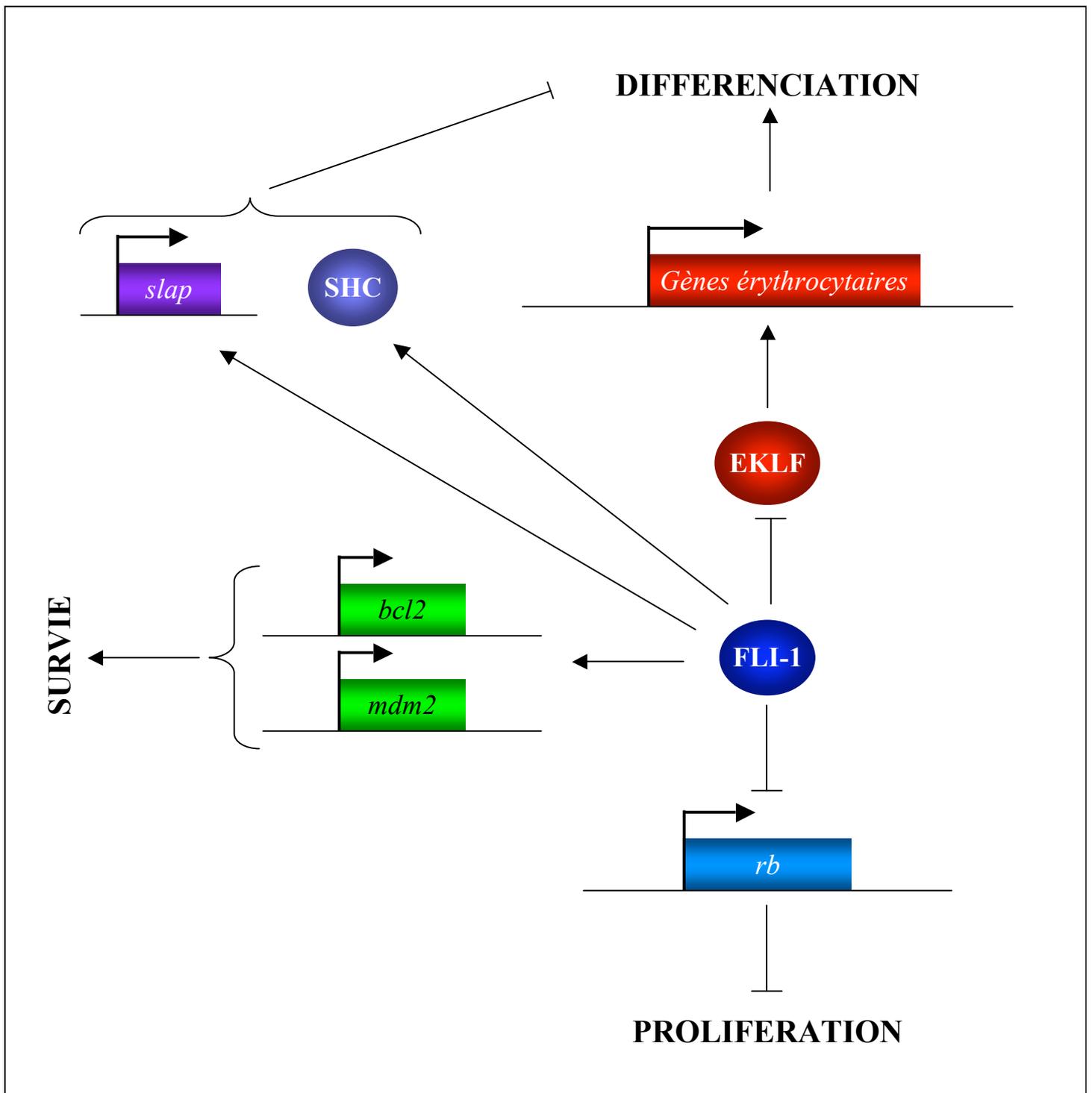


Figure 12 : Bilan des mécanismes d'action du facteur FLI-1.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que, pendant les premiers stade de l'infection par le virus F-MuLV, FLI-1 pourrait via l'activation transcriptionnelle de *mdm2*, inhiber la fonction de la protéine P53 avant qu'elle ne soit inactivée par des mutations génétiques dans les phases tardives.

4) Activation du gène *inpp5p*

Le gène *inpp5p* (inositol polyphosphate 5' phosphatase), qui code pour une enzyme impliquée dans la déphosphorylation de l'inositol, a été identifié comme étant un gène activé lors de la transformation par FLI-1 d'érythroblastes aviaires (Ano et al., 2004). Cependant, il n'existe aucune donnée permettant d'établir un lien entre la protéine INPP5P et la transformation du lignage érythrocytaire par FLI-1.

En conclusion (Figure 12), les mécanismes décrits par lesquels FLI-1 inhibe la différenciation semblent liés à la répression de la transcription des gènes érythrocytaires, via l'inhibition de l'activité du facteur EKLF, ainsi qu'à la régulation de molécules interférant avec la signalisation de l'EPO-R. La répression de l'expression du gène anti-prolifératif *rb* pourrait contribuer au maintien des cellules érythroleucémiques en état de prolifération. Enfin, l'activation de gènes anti-apoptotiques permettrait d'assurer leur survie.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Les gènes *spi-1* et *fli-1* sont activés de manière récurrente dans les érythroleucémies induites respectivement par les virus SFFV et F-MuLV du complexe viral de Friend. De nombreux travaux ont permis de montrer l'importance de l'activation transcriptionnelle des gènes *spi-1* et *fli-1* au cours des érythroleucémies de Friend. Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe a montré que le facteur SPI-1 / PU.1 était un activateur transcriptionnel du gène *fli-1* dans les lignées érythroleucémiques induites par le virus SFFV. Elle a également montré que la surexpression de *fli-1* dans une lignée érythroleucémique induite par le virus SFFV bloque la différenciation érythroïde normalement induite par un inducteur chimique. Ces résultats ont conduit à l'hypothèse selon laquelle l'activation transcriptionnelle du gène *fli-1* pouvait participer aux propriétés oncogéniques de SPI-1 / PU.1.

L'objectif principal de ma thèse a été de rechercher la fonction du facteur FLI-1 endogène dans les cellules érythroleucémiques induites par le virus SFFV. Pour cela, j'ai réalisé une répression conditionnelle de l'expression du gène *fli-1* dans la lignée érythroleucémique induite par le virus SFFV 745-A, ceci grâce à une stratégie basée sur l'expression inductible de shRNA.

La première partie de mon travail a consisté en la mise au point de lignées de cellules érythroleucémiques 745-A présentant une répression inductible de l'expression de *fli-1*. J'ai alors utilisé ces lignées afin de rechercher le rôle du facteur FLI-1 endogène dans la prolifération, la survie et le blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques 745-A. Afin de comprendre le mode d'action du facteur FLI-1, j'ai ensuite recherché, notamment via une analyse globale du transcriptome, des gènes dont l'expression ou la fonction était

modifiée par FLI-1 dans les cellules 745-A. Enfin, je me suis intéressé au mécanisme par lequel le facteur FLI-1 pouvait réguler l'expression de ces gènes.

Un des objectifs de l'équipe est d'étudier le rôle du facteur FLI-1 *in vivo* chez la souris. L'inactivation constitutive du gène *fli-1* étant létale au stade embryonnaire, l'équipe a développé un modèle de souris transgéniques présentant une inactivation conditionnelle du gène *fli-1*, ceci via l'utilisation du système cre/lox. Cependant, cette stratégie restant très lourde à mettre en oeuvre, j'ai tenté de mettre au point des systèmes alternatifs de production inductibles de shRNA pouvant être applicable à la transgénèse conditionnelle et tissu-spécifique.

RESULTATS

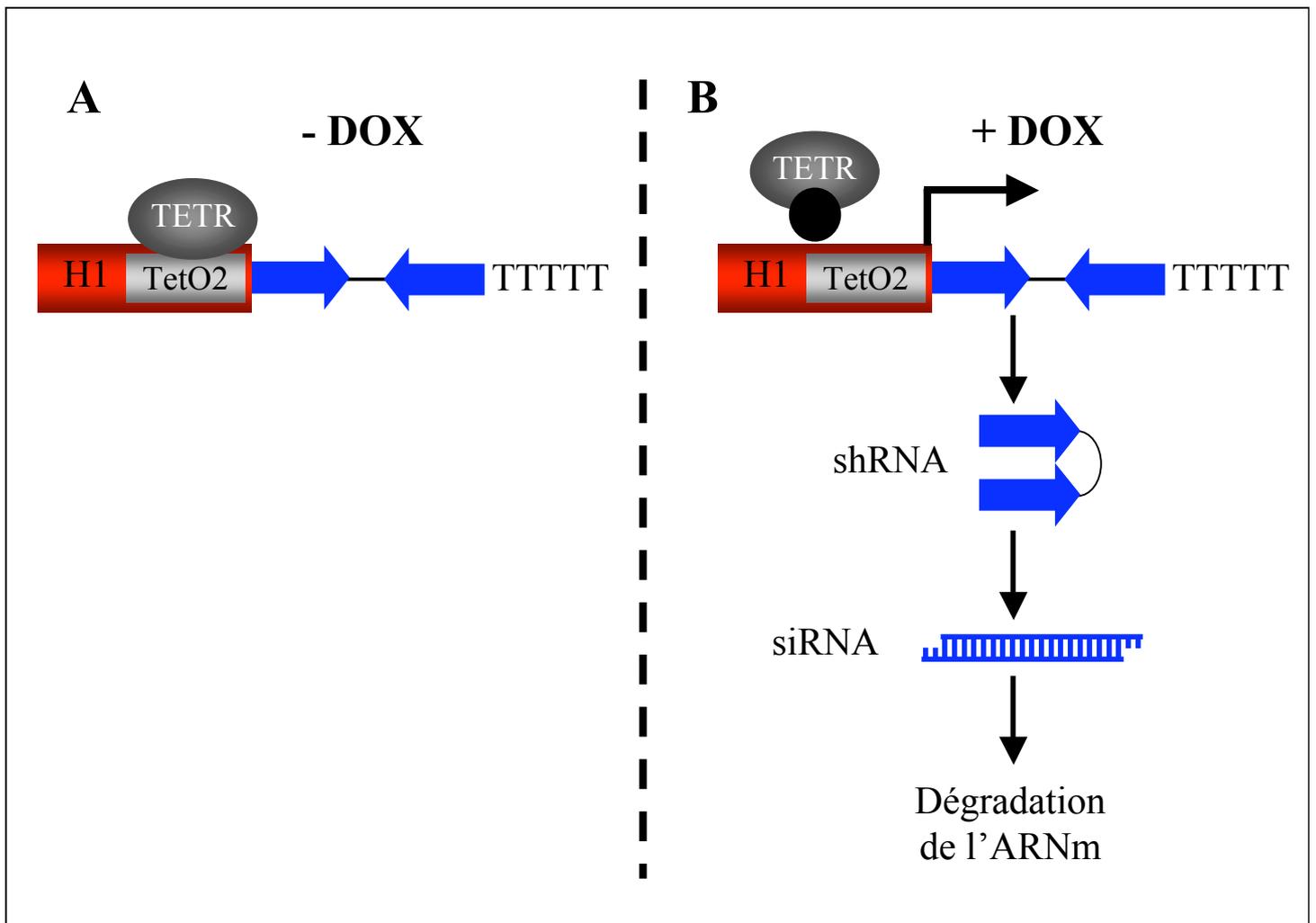


Figure 13 : Représentation schématique du principe de production inducible de shRNA

Représentation schématique du système d'expression inducible de shRNA. En absence de doxycycline (A), la protéine TETR se fixe sur la séquence TetO2 introduite dans le promoteur H1, réprimant ainsi son activité. En présence de doxycycline (B), celle-ci interagit avec la protéine TETR, l'empêchant de se fixer sur la séquence TetO2, ce qui permet la production des shRNA.

RESULTATS

Première partie : Etude du rôle et du mode d'action de FLI-1 dans les érythroleucémies induites par le virus SFFV

I- Etude du rôle du facteur FLI-1 endogène dans les cellules érythroleucémiques 745-A

A/ Développement de lignées érythroleucémiques de Friend présentant une répression inductible de l'expression de *fli-1*

Afin d'étudier le rôle du facteur FLI-1 endogène dans les cellules érythroleucémiques de Friend, j'ai dérivé une lignée de cellules 745-A présentant une répression conditionnelle de l'expression de *fli-1*. Pour cela, j'ai choisi de produire de manière inductible des shRNA dirigés contre *fli-1* à partir d'un promoteur H1 modifié (van de Wetering et al., 2003) dont le principe de fonctionnement est décrit sur la Figure 13. En absence de doxycycline, la protéine TETR se fixe sur la séquence TetO2 réprimant ainsi l'activité du promoteur H1. En présence de doxycycline, celle-ci interagit avec la protéine TETR l'empêchant de lier la séquence TetO2 et permettant la production des shRNA.

1) Validation de 2 séquences shRNA dirigées contre *fli-1*

J'ai tout d'abord développé les vecteurs pGJ8/shfli-1 et pGJ8/shfli-2. Ces vecteurs permettent l'expression, à partir d'un promoteur H1 modifié, de 2 séquences shRNA différentes dirigées contre *fli-1*. Comme le montre la Figure 14A, la transfection de ces vecteurs dans des cellules 745-A induit une réduction du taux de protéine FLI-1 d'environ 70%, après sélection transitoire par la blasticidine, par rapport à des cellules transfectées par le vecteur pGJ8 vide. J'ai donc décidé d'utiliser ces 2 vecteurs d'expression de shRNA afin de

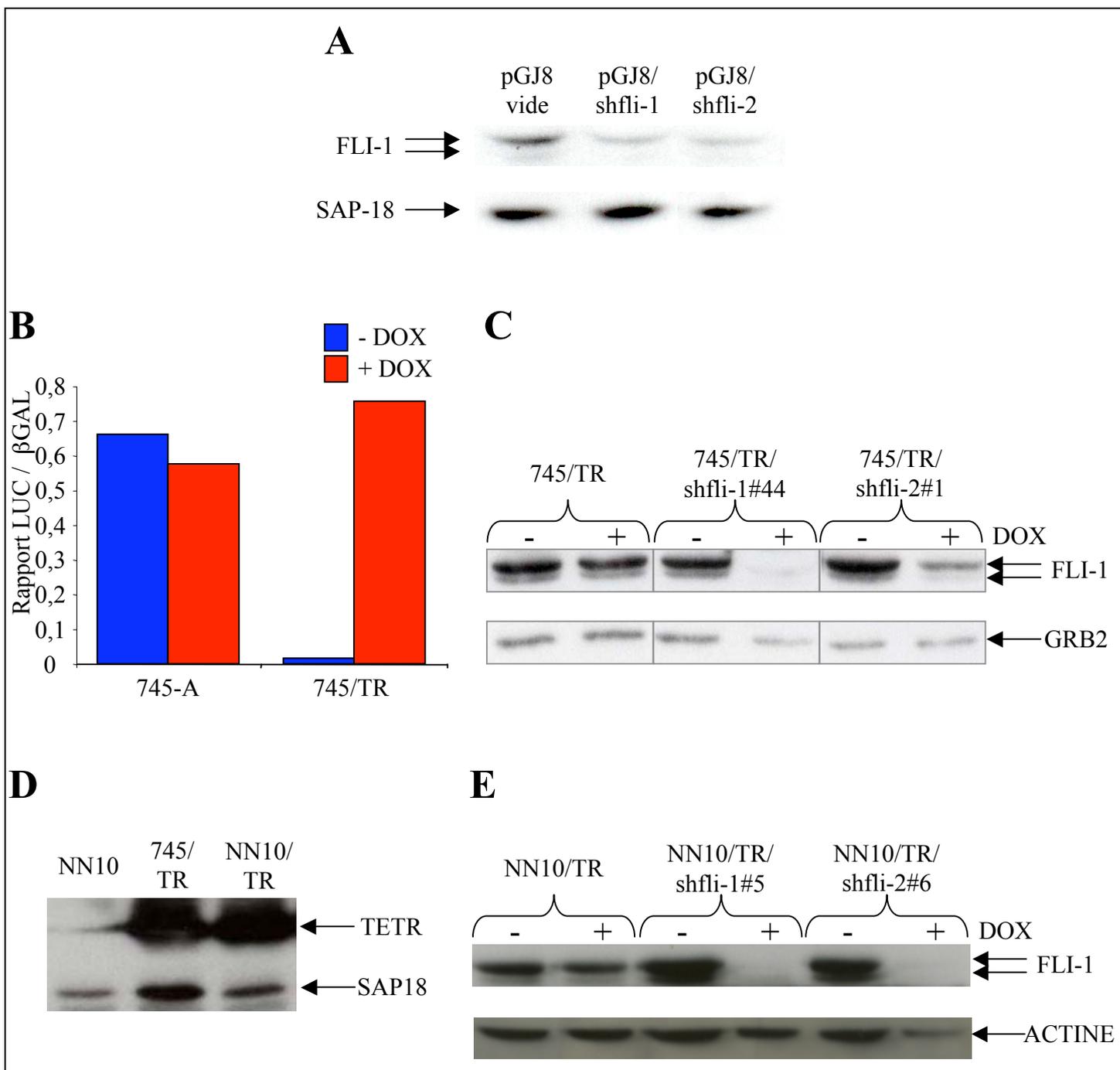


Figure 14 : Répression inducible de l'expression de *fli-1* dans les cellules érythroleucémiques de Friend

(A) Analyse en western blot du taux de protéine FLI-1 de cellules 745-A transfectées par les vecteurs pGJ8, pGJ8/shfli-1 ou pGJ8/shfli-2 puis sélectionnées par la blasticidine pendant 4 jours. Les 2 bandes correspondent aux 2 isoformes de 48 et 51 kDa de la protéine FLI-1. L'analyse du taux de protéine SAP-18 est présentée comme contrôle de charge.

(B) Des cellules 745-A et 745/TR ont été cotransfectées par les vecteurs pcDNA4/TO-LUC et CMV-βGAL puis cultivées en présence ou en absence de doxycycline pendant 2 jours. L'activité luciférase a alors été mesurée et standardisée par rapport à l'activité β-galactosidase.

(C) Analyse en western blot du taux de protéine FLI-1 de cellules 745/TR, shfli-1#44 et shfli-2#1 cultivées pendant 2 jours en absence ou en présence de doxycycline. L'analyse du taux de protéine GRB2 est présentée comme contrôle de charge.

(D) Analyse en western blot du taux de protéine TETR de cellules NN10, 745/TR et NN10/TR. L'analyse du taux de protéine SAP18 est présentée comme contrôle de charge.

(E) Analyse en western blot du taux de protéine FLI-1 de cellules NN10/TR, NN10/TR/shfli-1#5 et NN10/TR/shfli-2#6 cultivées pendant 2 jours en absence ou en présence de doxycycline. L'analyse du taux de protéine ACTINE est présentée comme contrôle de charge.

dériver plusieurs lignées 745-A présentant une réduction conditionnelle de l'expression de *fli-1*.

2) Lignée 745-A

2.1) Lignée 745/TR

J'ai d'abord dérivé une lignée de cellules 745-A produisant de manière stable la protéine bactérienne TETR. Après transfection par le vecteur pcDNA6/TR-EF1 α (Rimmele et al., 2007), des cellules 745-A ont été sélectionnées par la blasticidine. Afin de mesurer indirectement le taux de protéine TETR produite par différents clones isolés, je les ai transfectées par le vecteur pcDNA4/TO-LUC, portant un gène rapporteur *luciférase* sous contrôle d'un promoteur dont l'activité est inhibée par la protéine TETR. Plusieurs clones isolés, ainsi que des cellules 745-A, ont été cotransfectés par les vecteurs pcDNA4/TO-LUC et CMV- β GAL puis cultivés 2 jours en présence ou en absence de doxycycline. L'activité luciférase des cellules a alors été mesurée et rapportée à l'activité β -galactosidase. J'ai ainsi pu identifier plusieurs clones (dont un est représenté sur la Figure 14B) présentant une activité luciférase très fortement réduite par rapport aux cellules 745-A en absence de doxycycline, mais pouvant atteindre un niveau équivalent à celui des cellules 745-A en présence de doxycycline. J'ai donc utilisé ce clone de cellules 745/TR pour établir une lignée de cellules 745-A présentant une répression inductible de l'expression de *fli-1*.

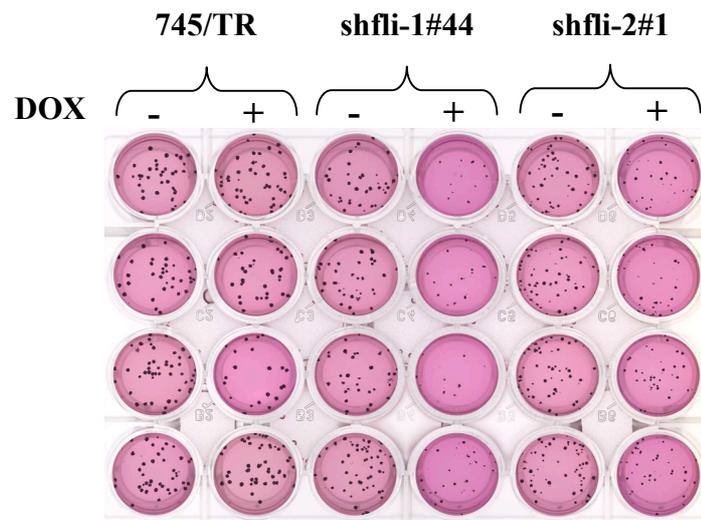
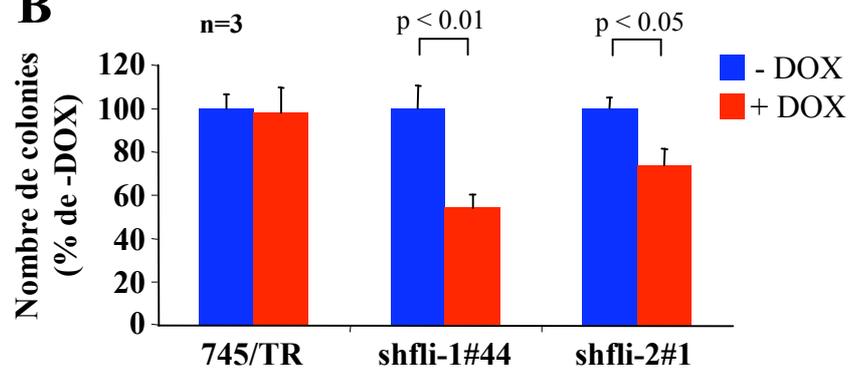
2.2) Lignée 745/TR/shfli-1

Des cellules 745/TR ont été transfectées par les vecteurs pGJ10/shfli-1 et pGJ10/shfli-2 puis sélectionnées par le G418. Afin d'identifier des clones cellulaires présentant une réduction par la doxycycline du taux de protéine de FLI-1, j'ai analysé le taux de protéine FLI-1 après 2 jours de culture en absence ou en présence de doxycycline. Sur un total de 27 clones analysés, 7 clones ne présentent pas de réduction par la doxycycline du taux de

protéine FLI-1, 9 clones présentent une réduction du taux de protéine FLI-1 d'environ 50 %, et 11 clones présentent une réduction du taux de protéine FLI-1 supérieure à 50 %. La Figure 14C montre l'analyse en western blot du taux de protéine FLI-1 d'un clone obtenu avec le vecteur pGJ10/shfli-1, le clone shfli-1#44, et un clone obtenu avec le vecteur pGJ10/shfli-2, le clone shfli-2#1. Comme cela est présenté sur la Figure 14C, la doxycycline n'induit pas de modification du taux de protéine FLI-1 dans les cellules 745/TR. En revanche, elle provoque une réduction du taux de protéine FLI-1 dans les cellules shfli-1#44 et shfli-2#1 d'environ 90 et 75%, respectivement. Ces résultats montrent donc que les lignées shfli-1#44 et shfli-2#1 représentent de bons modèles afin d'étudier le phénotype induit par une réduction du taux de protéine FLI-1 dans les cellules 745-A.

3) Lignée NN10

Selon la même stratégie, j'ai développé 2 lignées de cellules NN10 présentant une répression inductible par la doxycycline de l'expression de *fli-1*. La lignée NN10 est une lignée érythroleucémique de Friend induite par le virus F-MuLV et présentant une activation transcriptionnelle directe de *fli-1* par insertion provirale. J'ai d'abord dérivé une lignée de cellules NN10 présentant un taux de protéine TETR équivalent à celui observé dans les cellules 745/TR, comme le montre l'analyse en western blot présentée sur la Figure 14D. Les cellules NN10/TR ont alors été transfectées par les vecteurs pGJ10/shfli-1 et pGJ10/shfli-2 puis sélectionnées par le G418. Une analyse par western blot du taux de protéine FLI-1 après 2 jours de culture en absence ou en présence de doxycycline a permis d'identifier plusieurs clones présentant une réduction par la doxycycline du taux de protéine FLI-1. La Figure 14E montre l'analyse en western blot du taux de protéine FLI-1 d'un clone obtenu avec le vecteur pGJ10/shfli-1, le clone NN10/TR/shfli-1#5, et un clone obtenu avec le vecteur pGJ10/shfli-2, le clone NN10/TR/shfli-2#6. Ces 2 clones présentent une réduction du taux de protéine FLI-1

A**B****Figure 15 : La répression de l'expression de FLI-1 réduit la clonogénicité des cellules 745-A**

Des cellules 745/TR, shfli-1#44 et shfli-2#1 ont été cultivées pendant 2 jours en absence ou en présence de doxycycline puis 4 lots de 50 cellules ont été cultivées en milieu semi-solide en absence ou en présence de doxycycline pendant 5 jours.

(A) Les colonies ont été colorées par du MTT puis photographiées.

(B) Les colonies ont ensuite été comptées et représentées en % du nombre de colonies obtenues en absence de doxycycline

de plus de 90% en présence de doxycycline. Ils ont été utilisés par Guillaume Giraud afin de rechercher le rôle de la protéine FLI-1 endogène dans les cellules NN10.

B/ Analyse du phénotype induit par la répression de l'expression de *fli-1*

1) La réduction du taux de protéine FLI-1 réduit la clonogénicité des cellules 745-A

Afin d'étudier l'effet de la réduction de l'expression de *fli-1* sur la clonogénicité des cellules 745-A, des cellules 745/TR, shfli-1#44 et shfli-2#1 ont été cultivées en absence ou en présence de doxycycline pendant 2 jours, puis elles ont étéensemencées en milieu semi-solide, toujours en absence ou en présence de doxycycline. Après 5 jours, les colonies ont été colorées par du MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) et elles ont été photographiées (Figure 15A) puis comptées (Figure 15B).

Nous pouvons voir que la doxycycline n'a pas d'effet sur le nombre de colonies formées par les cellules 745/TR. En revanche, la doxycycline induit une réduction du nombre de colonies formées par les cellules shfli-1#44 et shfli-2#1 d'environ 50% et 25%, respectivement. De manière intéressante, l'effet plus faible de la doxycycline sur les cellules shfli-2#1 est associé à une réduction plus faible du taux de protéine FLI-1 comparé aux cellules shfli-1#44 (Figure 14C).

Ces résultats suggèrent donc que la réduction de l'expression de *fli-1* induit une réduction de la clonogénicité des cellules 745-A de manière dose-dépendante.

2) La réduction du taux de protéine FLI-1 accélère la différenciation induite par l'HMBA

Afin de rechercher le rôle du facteur FLI-1 endogène dans le blocage de la différenciation des cellules 745-A, des cellules 745/TR, shfli-1#44 et shfli-2#1 ont été cultivées en absence ou en présence de doxycycline pendant 2 jours, puis elles ont été induites

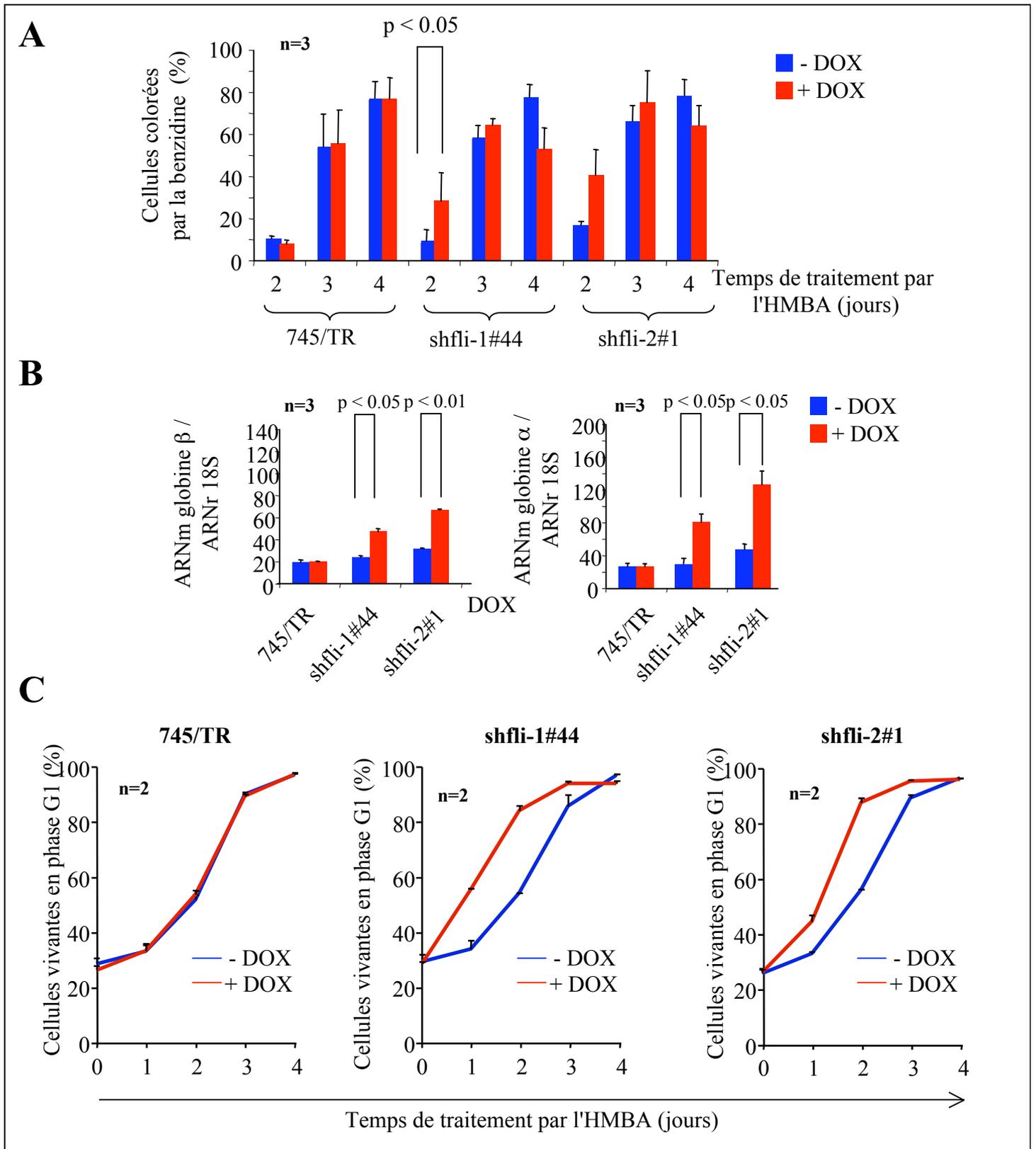


Figure 16 : La répression de l'expression de *fli-1* accélère la différenciation induite par l'HMBA

(A) Pourcentage de cellules 745/TR, shfli-1#44 et shfli-2#1 colorées par la benzidine après 2, 3 et 4 jours de traitement par l'HMBA en absence ou en présence de doxycycline.

(B) Analyse par RT-PCR quantitative du taux d'ARNm globine β (partie gauche) et globine α (partie droite), rapporté au taux d'ARNr 18S, de cellules 745/TR, shfli-1#44 et shfli-2#1 après 2 jours de culture en absence ou en présence d'HMBA.

(C) Pourcentage de cellules vivantes 745/TR (partie gauche), shfli-1#44 (partie centrale) et shfli-2#1 (partie droite) en phase G1 du cycle cellulaire au cours d'un traitement de 4 jours par l'HMBA en absence ou en présence de doxycycline.

à se différencier par un traitement par l'HMBA. Le taux de cellules différenciées produisant de l'hémoglobine a été mesuré chaque jour pendant 4 jours grâce à un comptage réalisé en présence de benzidine. Comme le montre la Figure 16A, la doxycycline ne modifie pas l'augmentation du taux de cellules 745/TR colorées par la benzidine induite par l'HMBA. En revanche, le taux de cellules shfli-1#44 et shfli-2#1 colorées par la benzidine est augmenté par la doxycycline de 3 et 2 fois, respectivement. Cette augmentation du taux de cellules shfli-1#44 et shfli-2#1 colorées par la benzidine en présence de doxycycline, après 2 jours de traitement par l'HMBA, est associée à une augmentation du taux d'ARNm globine β et globine α (Figure 16B). Après 3 jours de traitement par l'HMBA, l'effet positif de la doxycycline sur le taux de cellules shfli-1#44 et shfli-2#1 colorées par la benzidine n'est plus observé (Figure 16A), ce qui est probablement dû à l'apparition d'une mort cellulaire par apoptose (voir plus bas).

Une des caractéristiques de la différenciation érythrocytaire, en plus de l'hémoglobination des cellules, est un arrêt de prolifération caractérisé par un blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Afin de rechercher le rôle du facteur FLI-1 endogène dans l'inhibition du blocage en phase G1 du cycle cellulaire, des cellules 745/TR, shfli-1#44 et shfli-2#1 ont été cultivées en absence ou en présence de doxycycline pendant 2 jours, puis elles ont été induites à se différencier par un traitement par l'HMBA. Chaque jour pendant 4 jours, le pourcentage de cellules vivantes en phase G1 du cycle cellulaire a été mesuré par FACS après un marquage à l'iodure de propidium (Figure 16C). Comme cela était attendu, en absence de doxycycline, l'HMBA induit une augmentation du pourcentage de cellules 745/TR, shfli-1#44 et shfli-2#1 en phase G1 du cycle cellulaire. La doxycycline ne modifie pas la cinétique de blocage en phase G1 du cycle des cellules 745/TR (Figure 16C, partie gauche). En revanche, la doxycycline induit une accélération du blocage en phase G1 des cellules shfli-1#44 (Figure 16C, partie centrale) et shfli-2#1 (Figure 16C, partie droite).

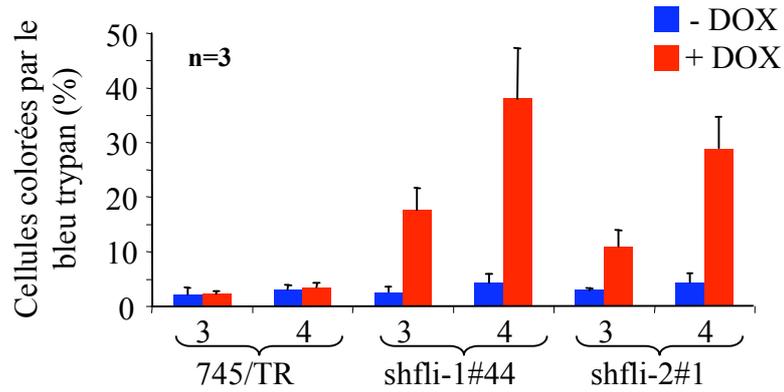
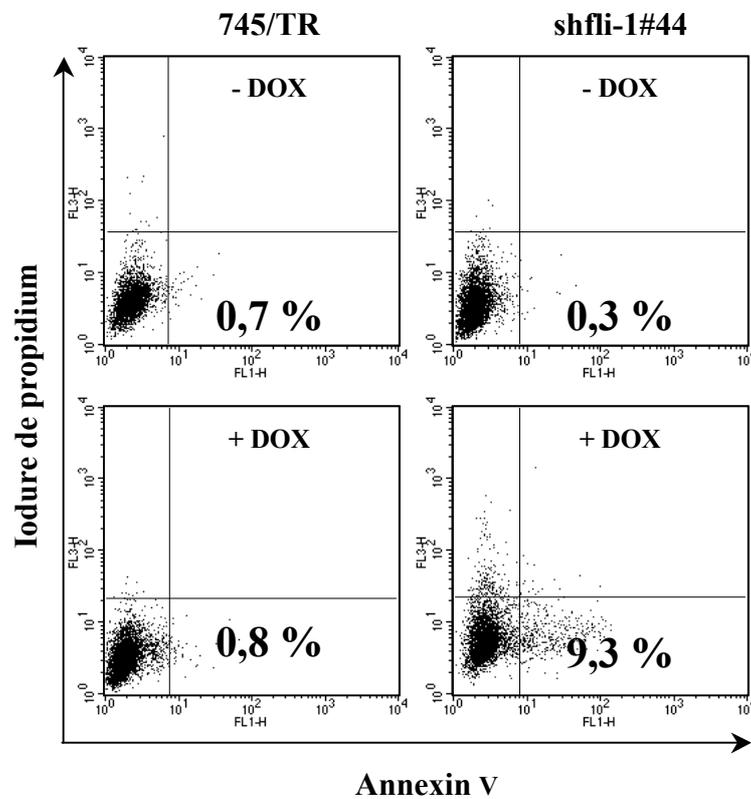
A**B**

Figure 17 : La réduction du taux de protéine FLI-1 induit une mort par apoptose aux temps tardifs de différenciation

(A) Pourcentages de cellules 745/TR, shfli-1#44 et shfli-2#1 colorées par le bleu trypan après 3 et 4 jours de traitement par l'HMBA en absence ou en présence de doxycycline.

(B) Analyse par FACS de cellules 745/TR et shfli-1#44 marquées par l'iodure de propidium et l'Annexin V après 3 jours de traitement par l'HMBA en absence ou en présence de doxycycline.

L'ensemble de ces résultats montrent donc que la réduction de l'expression de *fli-1* est associée à une accélération à la fois de l'hémoglobinisation et du blocage en phase G1 du cycle induits par l'HMBA dans les cellules 745-A. Ils suggèrent donc que le facteur FLI-1 endogène pourrait participer au blocage de la différenciation des cellules 745-A.

3) La réduction du taux de protéine FLI-1 provoque une mort cellulaire par apoptose aux temps tardifs de différenciation

Afin de rechercher l'effet de la répression de l'expression de *fli-1* sur la survie des cellules 745-A, des cellules 745/TR, shfli-1#44 et shfli-2#1 ont été cultivées en absence ou en présence de doxycycline pendant 2 jours, puis elles ont été induites à se différencier par un traitement par l'HMBA. Après 3 et 4 jours de différenciation, le pourcentage de cellules mortes a été déterminé grâce à une numération en présence de bleu trypan (Figure 17A). Nous pouvons voir que moins de 5 % des cellules 745/TR sont colorées par le bleu trypan après 3 et 4 jours de traitement par l'HMBA et la doxycycline ne modifie pas ce pourcentage. De la même manière, moins de 5 % des cellules shfli-1#44 et shfli-2#1 sont colorées par le bleu trypan après 3 et 4 jours de traitement par l'HMBA, en absence de doxycycline. En revanche, la doxycycline induit une forte augmentation du pourcentage de cellules shfli-1#44 (environ 18% et 38% après 3 et 4 jours de traitement par l'HMBA, respectivement) et shfli-2#1 (environ 12% et 30% après 3 et 4 jours de traitement par l'HMBA, respectivement) colorées par le bleu trypan. Ces résultats suggèrent donc que la réduction de l'expression de *fli-1* induit une mort des cellules après 3 jours de différenciation par l'HMBA.

J'ai ensuite recherché si cette mort cellulaire associée à la répression de l'expression de *fli-1* correspondait à de l'apoptose. Pour cela, des cellules 745/TR et shfli-1#44 ont été cultivées en absence ou en présence de doxycycline pendant 2 jours, puis elles ont été induites à se différencier par un traitement par l'HMBA. Après 2 jours de traitement, les cellules ont été marquées par de l'iodure de propidium et de l'Annexine V et analysées par FACS. Comme

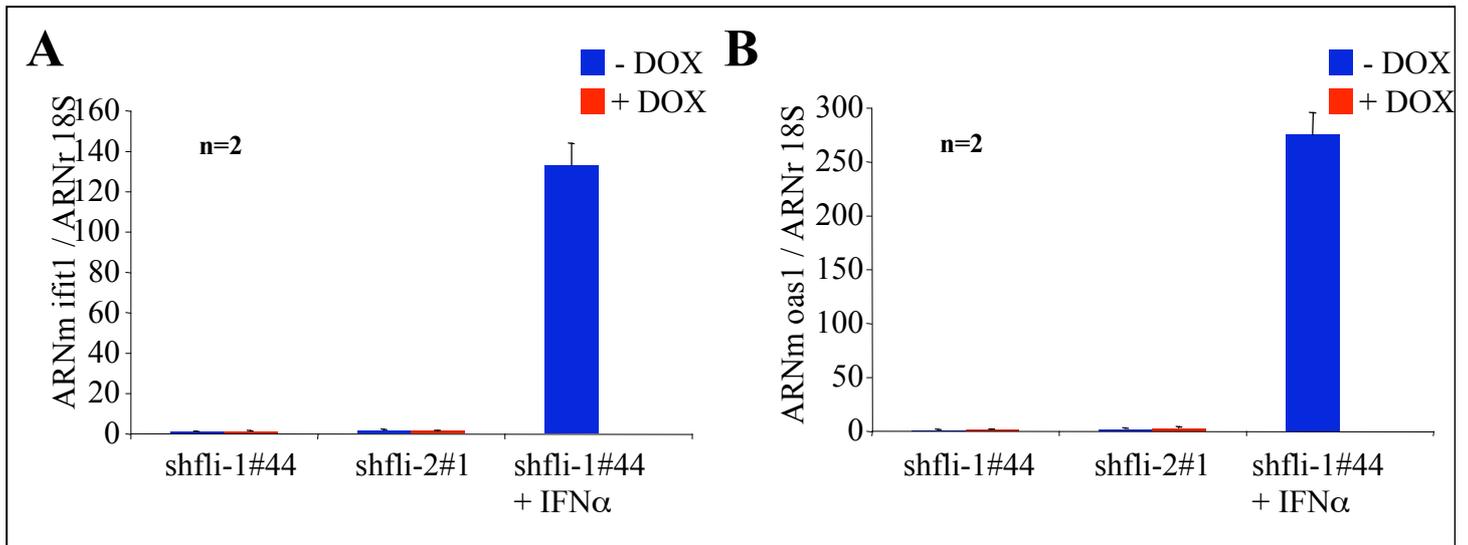


Figure 18 : Les shRNA shfli-1 et shfli-2 n'activent pas l'expression des gènes *ifit1* et *oas1*

Analyse par RT-PCR quantitative du taux d'ARNm *ifit1* (A) et *oas1* (B), rapporté au taux d'ARNr 18S, de cellules shfli-1#44 et shfli-2#1 après 2 jours de culture en absence ou en présence de doxycycline, ou de cellules shfli-1#44 traitées pendant 24 heures par de l'interféron α (IFN α).

le montre la Figure 17B, le pourcentage de cellules 745/TR marquées simplement par l'Annexine V, correspondant à des cellules en apoptose précoce, est inférieur à 1% et il n'est pas modifié par la doxycycline. De la même manière, le pourcentage de cellules shfli-1#44 marquées simplement par l'Annexine V est inférieur à 1%. En revanche, en présence de doxycycline, le pourcentage de cellules shfli-1#44 marquées simplement par l'Annexine V passe à plus de 9%.

Ces résultats suggèrent donc que la répression de l'expression de *fli-1* induit une mort des cellules 745-A par apoptose aux temps tardifs de différenciation.

C/ Contrôle de la spécificité des phénotypes observés

Il a été décrit que certains shRNA pouvaient induire un effet non spécifique via l'activation de l'expression de gènes normalement activés par l'interféron, parmi lesquels les gènes *oas1* et *ifit1* (Bridge et al., 2003; Jackson et al., 2003; Pebernard & Iggo, 2004; Sledz et al., 2003). J'ai donc mesuré le taux d'ARNm *oas1* et *ifit1* dans les cellules shfli-1#44 et shfli-2#1 après 2 jours de culture en absence ou en présence de doxycycline. Comme le montre la Figure 18, la doxycycline n'induit pas d'augmentation du taux d'ARNm *oas1* et *ifit1* dans ces 2 lignées, contrairement au traitement des cellules par l'interféron α . Ces résultats montrent que les phénotypes associés à la réduction du taux de protéine FLI-1 ne sont pas associés à l'activation des gènes de réponse à l'interféron *oas1* et *ifit1*.

Afin de confirmer que les phénotypes observés étaient bien spécifiques de la réduction du taux de protéine FLI-1, j'ai recherché si la ré-expression de *fli-1* dans les cellules shfli-1#44 en présence de doxycycline pouvait restaurer le phénotype des cellules. Pour cela, j'ai construit le vecteur pcDNA4/TO/flihm1. Ce vecteur contient un transgène *fli-1*, possédant 2 mutations silencieuses dans la séquence reconnue par le shRNA shfli-1, sous contrôle d'un promoteur CMV dont l'activité peut-être réprimée par la protéine TETR. La transfection de ce

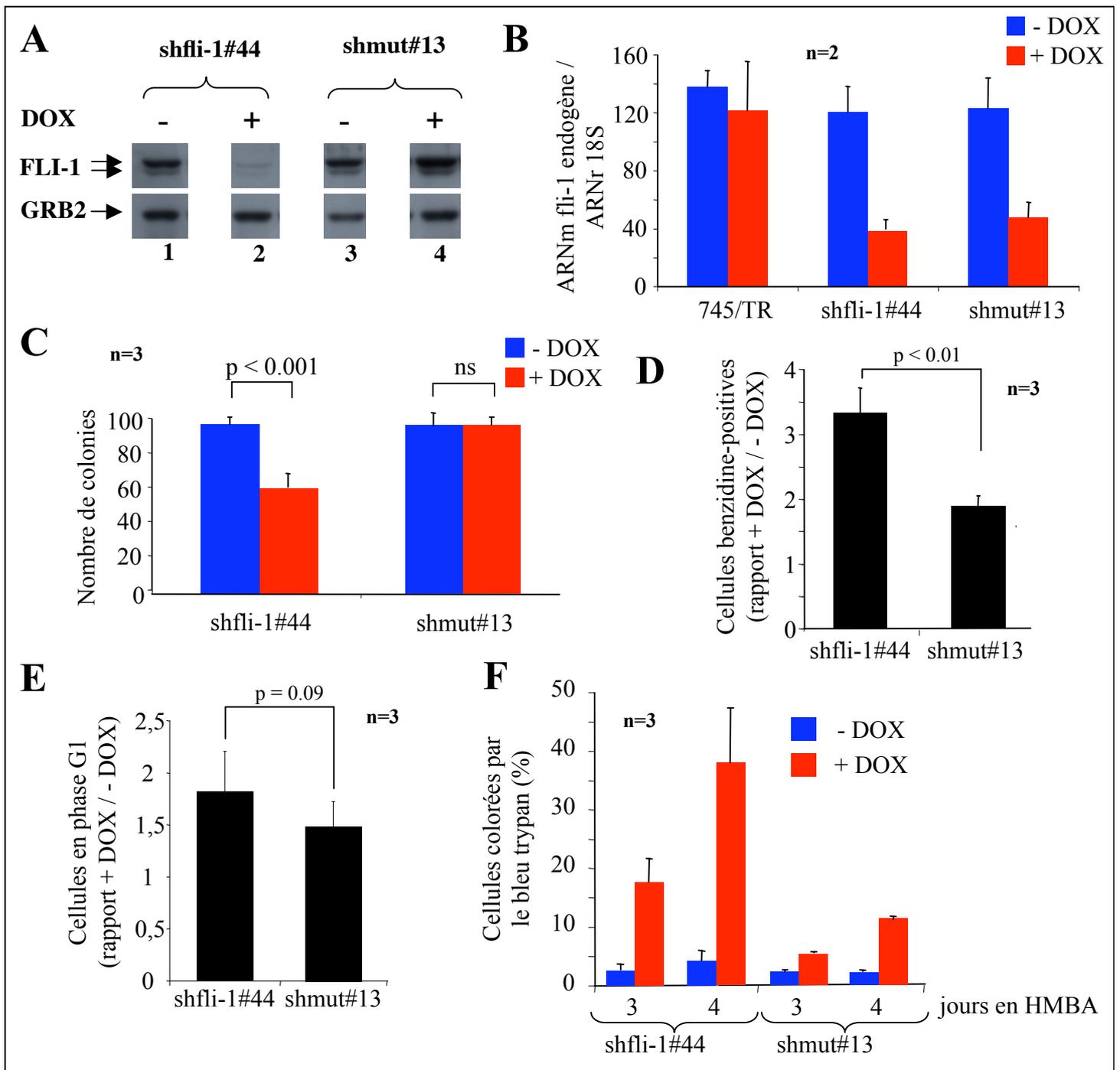


Figure 19 : Analyse de la spécificité des phénotypes induits par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44 et shfli-2#1

(A) Analyse en western blot du taux de protéine FLI-1 de cellules shfli-1#44 et 745/TR cultivées pendant 2 jours en absence ou en présence de doxycycline. L'analyse du taux de protéine GRB2 est présentée comme contrôle de charge.

(B) Analyse par RT-PCR quantitative du taux d'ARNm fli-1 endogène, rapporté au taux d'ARNr 18S, de cellules 745/TR, shfli-1#44 et shmut#13 après 2 jours de culture en absence ou en présence de doxycycline.

(C) Nombre de colonies obtenues après 5 jours de cultures de cellules shfli-1#44 et shmut#13 en milieu semi-solide en absence ou en présence de doxycycline, exprimé en % du nombre de colonies obtenues en absence de doxycycline.

(D) Taux de cellules shfli-1#44 et shmut#13 colorées par la benzidine après 2 jours de traitement par l'HMBA. Est représenté le rapport entre le taux de cellules colorées par la benzidine en présence de doxycycline et le taux de cellules colorées par la benzidine en absence de doxycycline.

(E) Taux de cellules shfli-1#44 et shmut#13 en phase G1 après 2 jours de traitement par l'HMBA. Est représenté le rapport entre le taux de cellules en phase G1 en présence de doxycycline et le taux de cellules en phase G1 en absence de doxycycline.

(F) Pourcentage de cellules shfli-1#44 et shmut#13 colorées par le bleu trypan après 3 et 4 jours de traitement par l'HMBA en absence ou en présence de doxycycline.

vecteur dans les cellules shfli-1#44 puis la sélection par la zéocyne m'a permis de dériver plusieurs clones isolés dont le clone shmut#13. Le traitement de ce clone par la doxycycline induit toujours une réduction de l'expression du gène *fli-1* endogène, comme dans le clone shfli-1#44 (Figure 19B). En revanche, il induit également la production d'une protéine FLI-1 exogène, à un niveau équivalent au niveau de protéine FLI-1 endogène présent en absence de doxycycline (Figure 19A). J'ai observé que l'expression, en présence de doxycycline, du transgène *fli-1* dans les cellules shmut#13 permet de restaurer la clonogénicité des cellules (Figure 19C). Ensuite, j'ai observé que la doxycycline induit une augmentation du pourcentage de cellules shmut#13 différenciées après 2 jours de traitement par l'HMBA (Figure 19D). Cependant, cette augmentation est plus faible que dans le cas des cellules shfli-1#44 (le rapport du taux de cellules différenciées en présence de doxycycline sur leur taux en absence de doxycycline est d'environ 3,3 pour les cellules shfli-1#44 contre seulement 1,8 pour les cellules shmut#13). Ensuite, la doxycycline induit une augmentation du taux de cellules shmut#13 en phase G1 du cycle cellulaire après un jour de traitement par l'HMBA, mais ceci de manière moins importante que dans le cas des cellules shfli-1#44 (Figure 19E : le rapport du taux de cellules en phase G1 en présence de doxycycline sur leur taux en absence de doxycycline est d'environ 1,82 pour les cellules shfli-1#44 contre seulement 1,49 pour les cellules shmut#13). Cependant, cette différence d'augmentation du nombre de cellules en phase G1 du cycle cellulaire n'est pas statistiquement significative.

Enfin, la doxycycline induit une mort des cellules shmut#13 à partir du 3ème jour de traitement par l'HMBA, mais ceci de façon beaucoup moins importante que pour les cellules shfli-1#44 (Figure 19F : 38 % des cellules shfli-1#44 sont colorées par le bleu trypan après 4 jours de traitement par l'HMBA en présence de doxycycline, contre 12 % pour les cellules shmut#13).

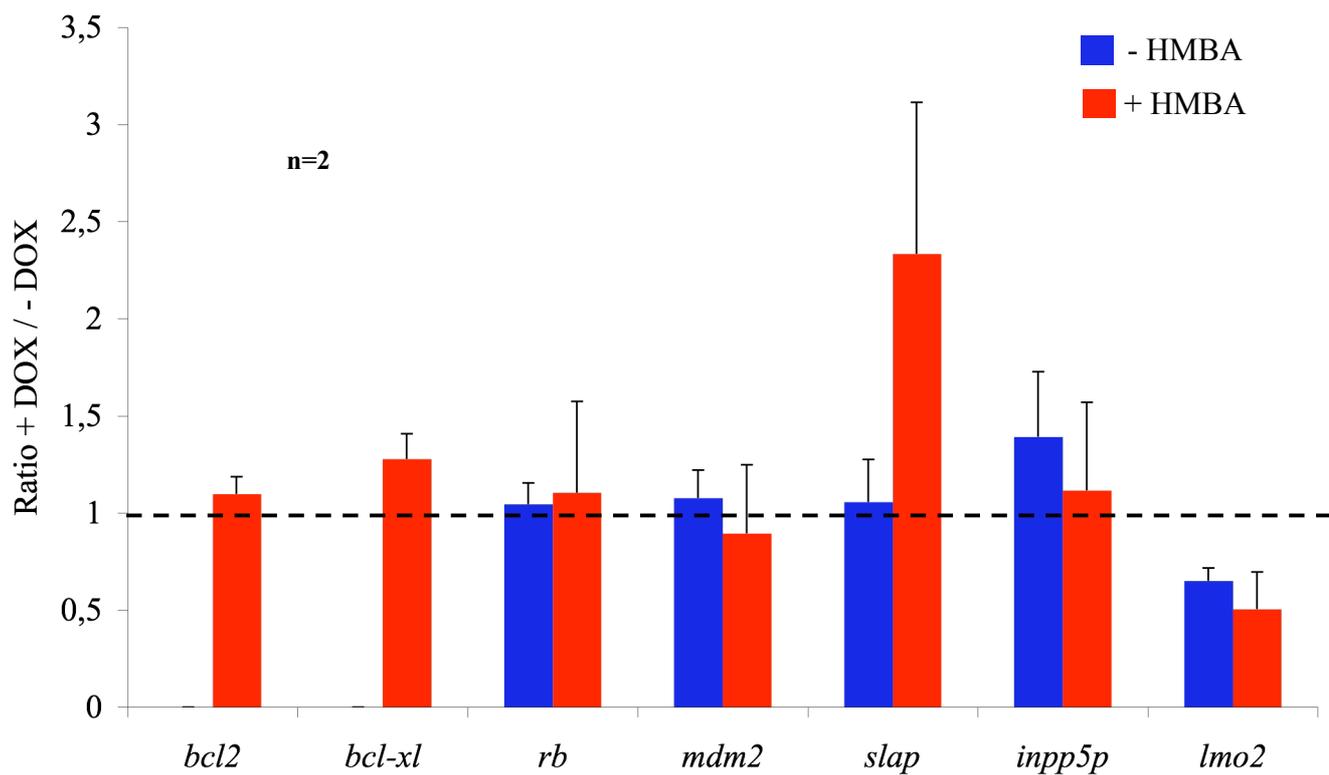


Figure 20 : Analyse de l'expression des gènes cibles connus de FLI-1

Analyse par RT-PCR quantitative du taux d'ARNm *bcl2*, *bcl-x_l*, *rb*, *mdm2*, *slap*, *inpp5p* et *lmo2*, rapporté au taux d'ARNr 18S, dans des cellules shfli-1#44 en absence ou après 2 jours de traitement par l'HMBA. La figure représente le rapport entre le signal obtenu en présence de doxycycline et celui obtenu en absence de doxycycline.

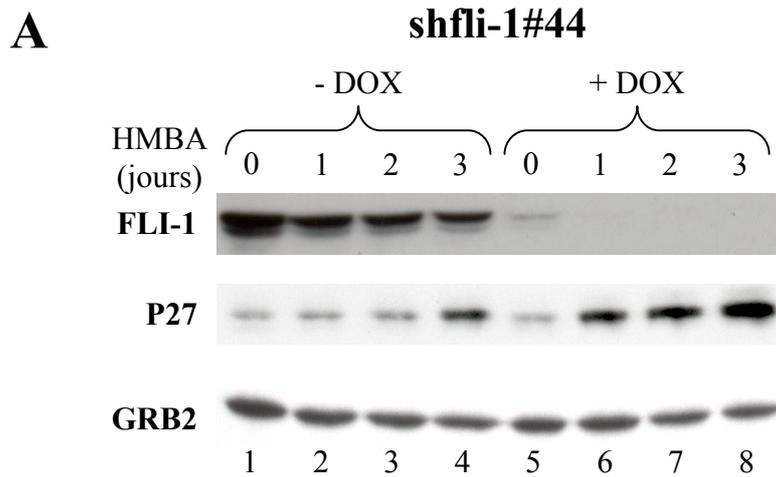
Ces résultats montrent donc que la ré-expression de *fli-1* dans les cellules shfli-1#44 en présence de doxycycline permet de restaurer la clonogénicité des cellules. De plus, elle compense partiellement l'augmentation du taux de cellules différenciées après 2 jours de traitement par l'HMBA, ainsi que la mort cellulaire observée à partir du 3ème jour de traitement par l'HMBA. Enfin, l'expression de *fli-1* compense partiellement, mais de façon statistiquement non significative l'augmentation du pourcentage de cellules shmut#13 en phase G1 du cycle cellulaire. En conclusion, ces résultats suggèrent que la réduction de la clonogénicité, l'accélération de la différenciation et la mort cellulaire par apoptose induites par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44 sont, au moins en partie, spécifiques de la réduction du taux de protéine FLI-1.

II- Recherche du mode d'action de FLI-1

A/ Analyse des gènes cibles connus de FLI-1

J'ai tout d'abord recherché si plusieurs gènes, décrits comme étant des cibles activées par FLI-1 dans différents modèles cellulaires, pouvaient être régulés par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44. Les lignées érythroleucémiques induites par le virus SFFV exprimant plutôt le gène *bcl-x_l* que *bcl2* (Howard et al., 2001), j'ai également mesuré son expression. De plus, FLI-1 est capable d'activer l'expression d'un gène rapporteur placé sous contrôle du promoteur du gène *bcl-x_l* (Sarrazin, Résultats non publiés). La Figure 20 montre l'effet de la doxycycline sur le taux d'ARNm de ces gènes, en absence ou après 2 jours de traitement par l'HMBA, dans les cellules shfli-1#44.

Tout d'abord, nous pouvons voir que la doxycycline n'a pas d'effet sur le taux d'ARNm des gènes *bcl2* (Lesault et al., 2002) et *bcl-x_l* après 2 jours de traitement par l'HMBA. De même, la doxycycline n'a pas d'effet sur le taux d'ARNm des gènes *inpp5p* (Ano et al., 2004), *rb* (Tamir et al., 1999), *mdm2* (Truong et al., 2005). De manière surprenante, nous



B

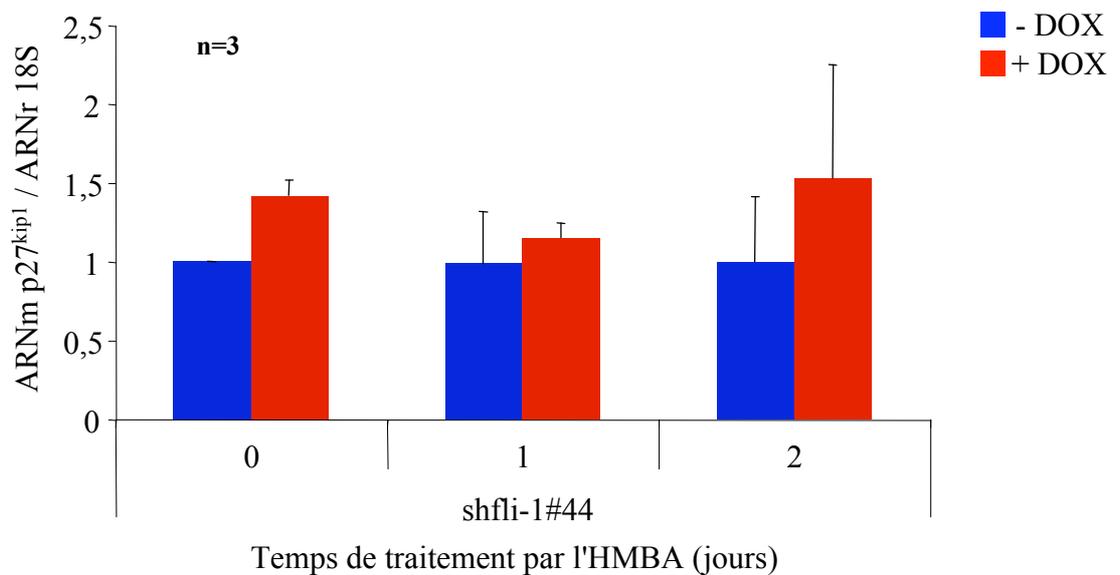


Figure 21 : FLI-1 réduit le taux de protéine P27^{KIP1} de manière post-transcriptionnelle

(A) Analyse en western blot du taux de protéine FLI-1 et P27^{KIP1} au cours de la différenciation induite par l'HMBA de cellules shfli-1#44 en absence ou en présence de doxycycline. L'analyse du taux de protéine GRB2 est présentée comme contrôle de charge.

(B) Analyse par RT-PCR quantitative du taux d'ARNm p27^{k^{ip}1}, rapporté au taux d'ARNr 18S, au cours de la différenciation induite par l'HMBA de cellules shfli-1#44 en absence ou en présence de doxycycline.

observons une augmentation par la doxycycline du taux d'ARNm *slap* après traitement par l'HMBA, *slap* étant décrit comme un gène activé par FLI-1 (Lebigot et al., 2003). Enfin, nous pouvons noter une réduction par la doxycycline du taux d'ARNm *lmo2* (Landry et al., 2005) que ce soit en absence ou après 2 jours de traitement par l'HMBA.

Ces résultats montrent donc que, parmi les gènes décrits comme étant des cibles activées par FLI-1 dans différents modèles cellulaires, seul le gène *lmo2* semble être activé par FLI-1 dans les cellules shfli-1#44.

B/ FLI-1 inhibe la synthèse de l'inhibiteur de cycline kinase P27^{KIP1}

1) FLI-1 réduit le taux de protéine P27^{KIP1} de manière post-transcriptionnelle

Plusieurs données de la littérature suggèrent que le facteur P27^{kip1} est un facteur important dans le blocage des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation érythrocytaire. Afin de rechercher l'effet de la réduction de l'expression de *fli-1* sur le taux de protéine P27^{KIP1}, des cellules shfli-1#44 ont été cultivées pendant 2 jours en absence ou en présence de doxycycline puis induites à se différencier par un traitement par l'HMBA. Chaque jour pendant 3 jours, les protéines totales ont été extraites et le taux de protéine P27^{KIP1} a été analysé par western blot (Figure 21A). Comme cela était attendu, l'HMBA induit une augmentation du taux de protéine P27^{KIP1} dans les cellules shfli-1#44 en absence de doxycycline, qui est fortement visible après 3 jours de traitement. En présence de doxycycline, nous pouvons voir que cette augmentation du taux de protéine P27^{KIP1} est fortement accélérée, puisqu'elle est déjà très marquée après seulement un jour de traitement par l'HMBA (Figure 21A, comparer les puits 2 et 6).

Afin de rechercher si cette accélération de l'accumulation de P27^{KIP1} était due à une augmentation de la transcription du gène *p27^{kip1}*, j'ai mesuré par RT-PCR quantitative l'effet de la réduction de l'expression de *fli-1* sur le taux d'ARNm *p27^{kip1}* au cours du traitement par

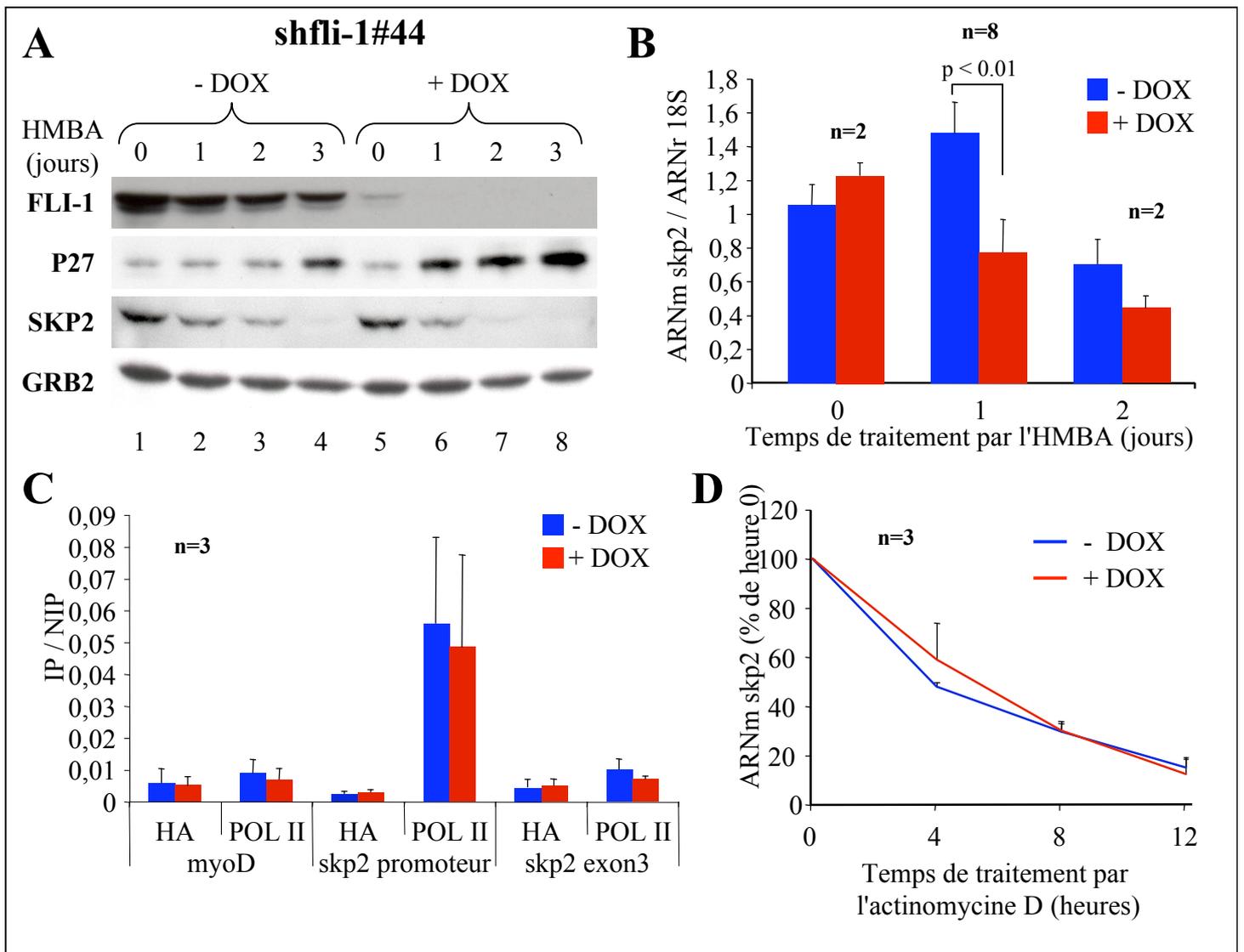


Figure 22 : FLI-1 active la transcription du gène *skp2*

Des cellules shfli-1#44 ont été traitées pendant 2 jours par la doxycycline puis leur différenciation a été induite par traitement par l'HMBA.

(A) Tous les jours pendant 3 jours, le taux de protéine FLI-1, P27 et SKP2 a été analysé par western blot. L'analyse du taux de protéine GRB2 est présentée comme contrôlé de charge.

(B) Tous les jours pendant 2 jours, le taux d'ARNm *skp2* a été mesuré par RT-PCR quantitative et rapporté aux taux d'ARNr 18S.

(C) Après un jour de différenciation, la chromatine des des cellules a été analysée par PCR quantitative après immunoprécipitation par un anticorps anti-HA ou anti-ARN polymérase II. Est représenté le rapport entre le signal obtenu après immunoprécipitation par un anticorps anti-HA ou anti-ARN polymérase II (IP) et le signal obtenu avant immunoprécipitation (NIP).

(D) Après un jour de différenciation, les cellules ont été traitées par de l'actinomycine D pendant 12 heures et le taux d'ARNm *skp2* a été mesuré par RT-PCR quantitative toutes les 4 heures et exprimé en pourcentage du taux d'ARNm *skp2* présent dans les cellules avant le traitement par l'actinomycine D.

l'HMBA. Comme le montre la Figure 21B, la doxycycline induit une augmentation du taux d'ARNm $p27^{kip1}$ en absence d'HMBA, ce qui n'est pas corrélé à une augmentation du taux de protéine $P27^{KIP1}$ (Figure 21A, comparer puits 1 et 5). En revanche, la doxycycline n'induit pas d'augmentation du taux d'ARNm $p27^{kip1}$ après un jour de traitement par l'HMBA (Figure 21B), alors que le taux de protéine $P27^{KIP1}$ est fortement augmenté (Figure 21A, comparer puits 2 et 6).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que la répression de l'expression de *fli-1* induit une accélération de l'accumulation du taux de protéine $P27^{KIP1}$ qui est due à une régulation post-transcriptionnelle du gène *p27^{kip1}*.

2) FLI-1 active la transcription du gène *skp2*

L'un des mécanismes principaux de régulation du niveau de la protéine $P27^{KIP1}$ passe par la régulation de sa stabilité via son ubiquitination par un complexe protéique contenant le facteur SKP2 (Carrano et al., 1999). J'ai donc recherché si le taux de facteur SKP2 était modifié après réduction du taux de protéine FLI-1. La Figure 22A montre une analyse en western blot du taux de protéine $P27^{KIP1}$ et SKP2 au cours de la différenciation induite par l'HMBA des cellules shfli-1#44 en absence ou en présence de doxycycline. Nous pouvons voir que, parallèlement à l'augmentation du taux de protéine $P27^{KIP1}$, le taux de protéine SKP2 diminue au cours de la différenciation des cellules shfli-1#44, ce aussi bien en absence qu'en présence de doxycycline. Ensuite, la réduction par la doxycycline du taux de protéine FLI-1, qui entraîne une accélération de l'accumulation de $P27^{KIP1}$, est associée à une réduction plus rapide du taux de protéine SKP2 (Figure 22A, comparer les puits 2 et 6, et les puits 3 et 7). De plus, cette réduction accélérée du taux de protéine SKP2 se retrouve au niveau de l'ARNm puisque le taux d'ARNm *skp2* est diminué d'environ 50 % dans les cellules shfli-1#44 en présence de doxycycline après un jour de différenciation (Figure 22B).

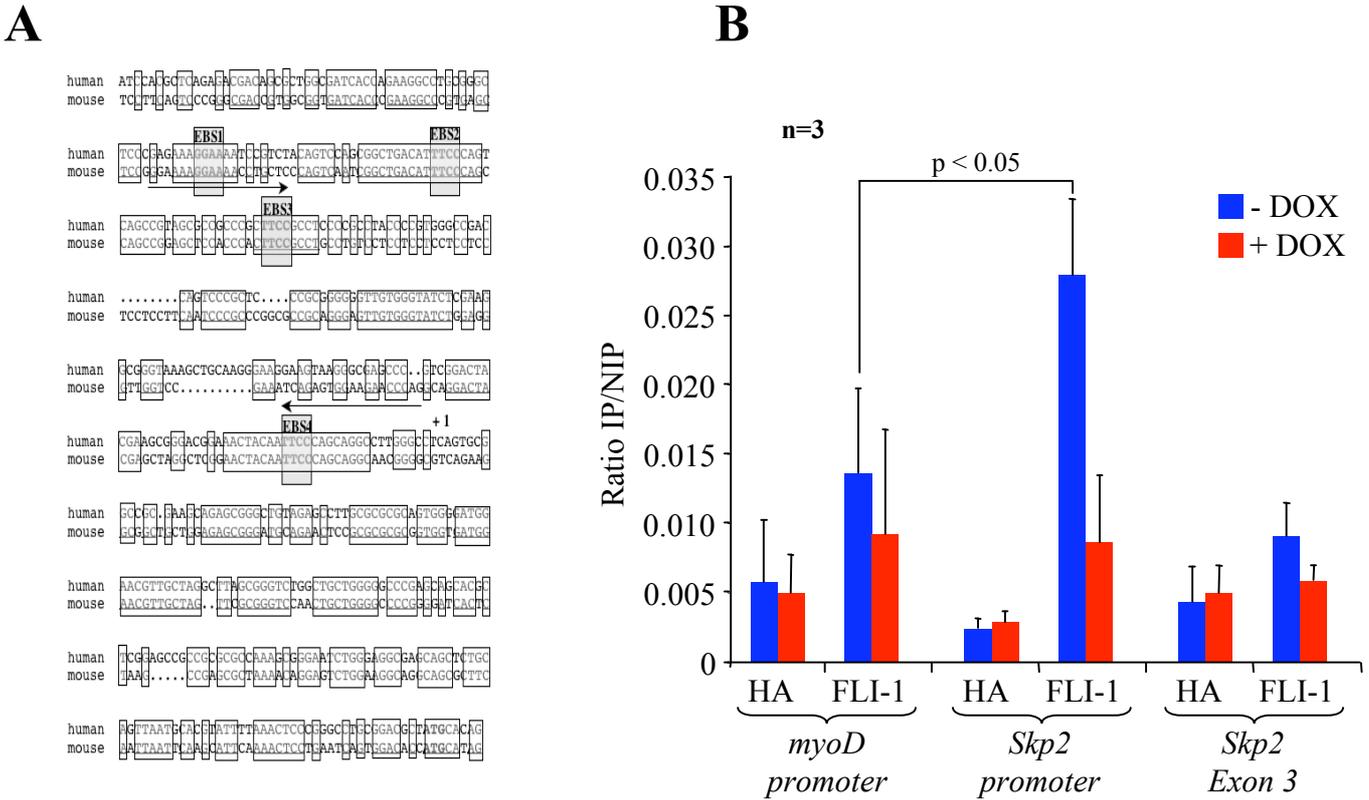


Figure 23 : FLI-1 fixe le promoteur du gène *skp2* in vivo

(A) Alignement des séquences nucléotidiques des promoteurs des gènes *skp2* humain et murin, les séquences conservées entre les 2 espèces étant encadrées. Les sites putatifs de liaison à l'ADN de FLI-1 sont représentés par les cadres foncés et notés EBS (ETS Binding Site). Les flèches représentent la position et l'orientation des amorces utilisées en PCR quantitative lors des expériences d'immunoprécipitation de chromatine.

(B) Analyse par PCR quantitative de la chromatine de cellules *shfli-1#44* induites à se différencier pendant 1 jour en absence ou en présence de doxycycline. Est représenté le rapport entre le signal obtenu après immunoprécipitation par un anticorps anti-HA ou anti-FLI-1 (IP) et le signal obtenu avant immunoprécipitation (NIP).

Afin de rechercher si cette réduction du taux d'ARNm *skp2* était due à une régulation transcriptionnelle du gène *skp2*, j'ai réalisé une immunoprécipitation de chromatine avec un anticorps dirigé contre l'ARN polymérase II sur des cellules shfli-1#44 après un jour de différenciation. Comme le montre la Figure 22C, je n'ai malheureusement pas réussi à mettre en évidence la présence de l'ARN polymérase II sur la séquence codante du gène *skp2*, que ce soit en absence ou en présence de doxycycline. La transcription de certains gènes, comme le gène *globine α* , est associée à une augmentation du recrutement de l'ARN polymérase II sur leur promoteur. J'ai donc recherché si la réduction du taux d'ARNm *skp2* était associée à une réduction du recrutement de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène *skp2*. Comme le montre la Figure 22C, j'ai observé un recrutement de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène *skp2*, ce recrutement n'étant pas modifié par la doxycycline. Cependant, les l'ARN polymérase II présentes sur le promoteur d'un gène ne permettent pas de mesurer la transcription justement car elles ne sont pas engagées dans la transcription du gène.

Afin de rechercher si la réduction du taux d'ARNm *skp2* observé en présence de doxycycline était due à une régulation post-transcriptionnelle, j'ai mesuré la demi-vie de l'ARNm *skp2* grâce à une cinétique de dégradation de l'ARNm *skp2* par un traitement par l'Actinomycine D, un inhibiteur de la transcription. Pour cela, des cellules shfli-1#44 ont été cultivées pendant 2 jours en présence ou en absence de doxycycline puis induites à se différencier par traitement par l'HMBA. Après un jour de différenciation, les cellules ont été mises en présence d'Actinomycine D et le taux d'ARNm *skp2* a été mesuré après 0, 4, 8 et 12 heures de traitement, ce qui est représenté sur la Figure 22D. Nous pouvons voir que la cinétique de dégradation de l'ARNm *skp2* est similaire en présence ou en absence de doxycycline, indiquant que la réduction du taux d'ARNm *skp2* en présence de doxycycline n'est pas due à une réduction de sa stabilité.

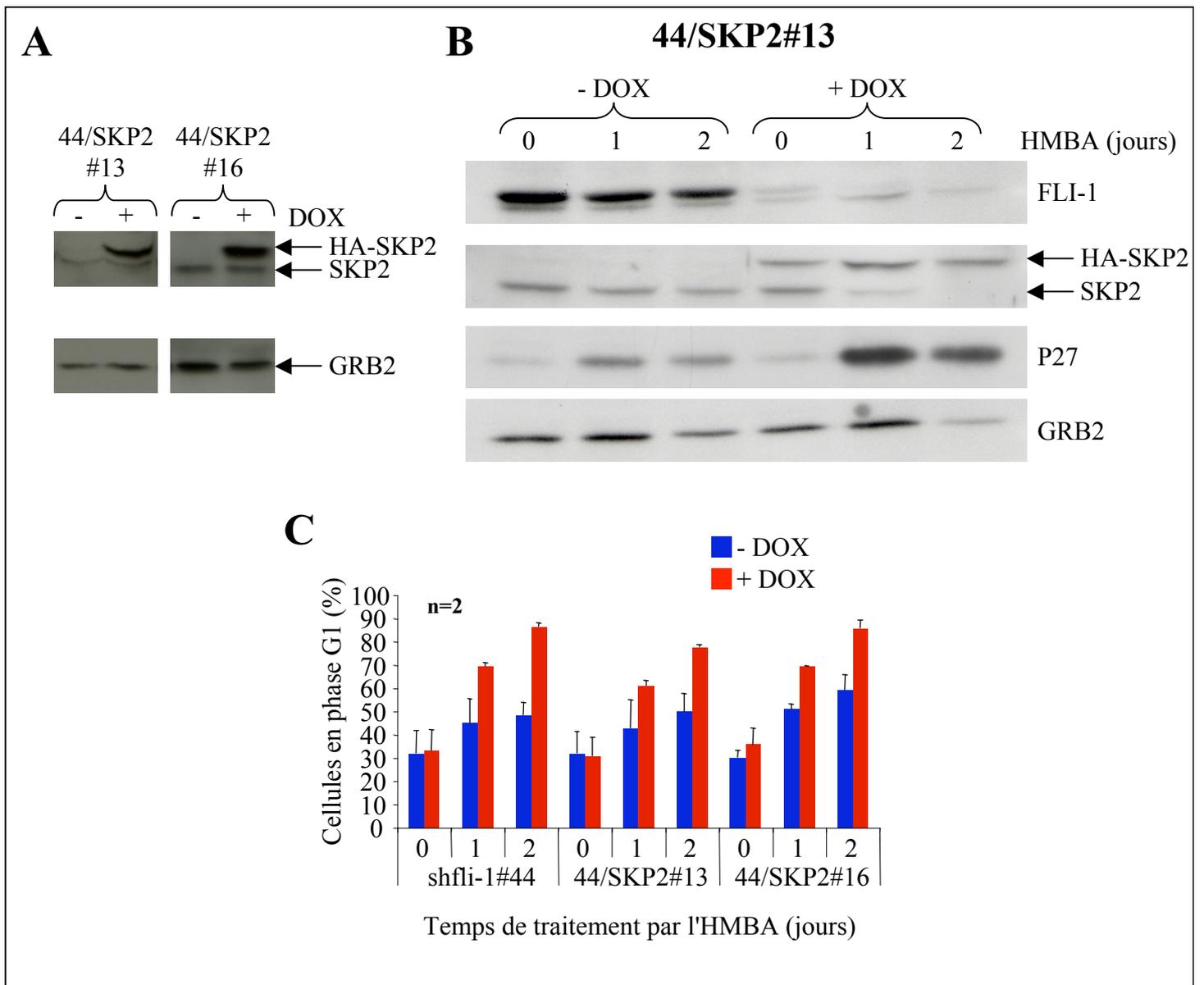


Figure 24 : Surexpression inducible de *skp2* dans la lignée *shfli-1#44*

(A) Analyse en western blot du taux de protéine SKP2 de cellules 44/SKP2#13 et 44/SKP2#16 traitées par la doxycycline pendant 2 jours. L'analyse du taux de protéine GRB2 est présentée comme contrôle de charge.

(B) Analyse en western blot du taux de protéine FLI-1, SKP2 et P27 de cellules 44/SKP2#13 traitées pendant 2 jours par la doxycycline puis induites à se différencier par l'HMBA. L'analyse du taux de protéine GRB2 est présentée comme contrôle de charge.

(C) Evolution du pourcentage de cellules en phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation induite par l'HMBA de cellules *shfli-1#44*, 44/SKP2#13 et 44/SKP2#16 en absence ou en présence de doxycycline.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc par défaut que la réduction de l'expression de *fli-1* induit une augmentation de la transcription du gène *skp2*.

Une analyse de la séquence du promoteur a permis de mettre en évidence 4 sites potentiels de liaison à l'ADN de FLI-1 conservés entre la séquence humaine et murine (Figure 23A, sites EBS 1 à 4). J'ai donc envisagé l'hypothèse d'une régulation directe de la transcription du gène *skp2*, via une fixation de FLI-1 sur son promoteur. Pour tester cette hypothèse, une immunoprécipitation de chromatine avec un anticorps dirigé contre FLI-1 a été réalisée sur des cellules shfli-1#44 après un jour de différenciation (Figure 23B). Nous pouvons observer, en absence de doxycycline, un enrichissement significatif en facteur FLI-1 sur le promoteur du gène *skp2* par rapport à 2 régions contrôles représentées par l'exon 3 du gène *skp2* et le promoteur du gène *myoD*. De plus, cet enrichissement est bien spécifique de la protéine FLI-1 car il n'est pas observé en présence de doxycycline.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que FLI-1 pourrait être un activateur transcriptionnel direct du gène *skp2*. Cette activation du gène *skp2* par FLI-1 pourrait expliquer la réduction par FLI-1 du taux de protéine P27^{KIP} et l'inhibition du blocage en phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation des cellules érythroleucémiques.

3) L'expression forcée de *skp2* n'empêche pas l'accélération du blocage en phase G1 induit par la réduction du taux de protéine FLI-1

Afin de rechercher l'implication de la réduction du taux de protéine SKP2 dans l'accélération du blocage en phase G1 des cellules shfli-1#44, j'ai restauré l'expression de *skp2* dans les cellules shfli-1#44 en présence de doxycycline. Pour cela, des cellules shfli-1#44 ont été transfectées par le vecteur pcDNA4/TO-*skp2* puis sélectionnées par la zéocine. Une analyse en western blot après 2 jours de traitement par la doxycycline a permis d'identifier plusieurs clones isolés dont les clones 44/SKP2#13 et 44/SKP2#16. Ces clones présentent toujours une réduction inductible du taux de protéine FLI-1, mais également une

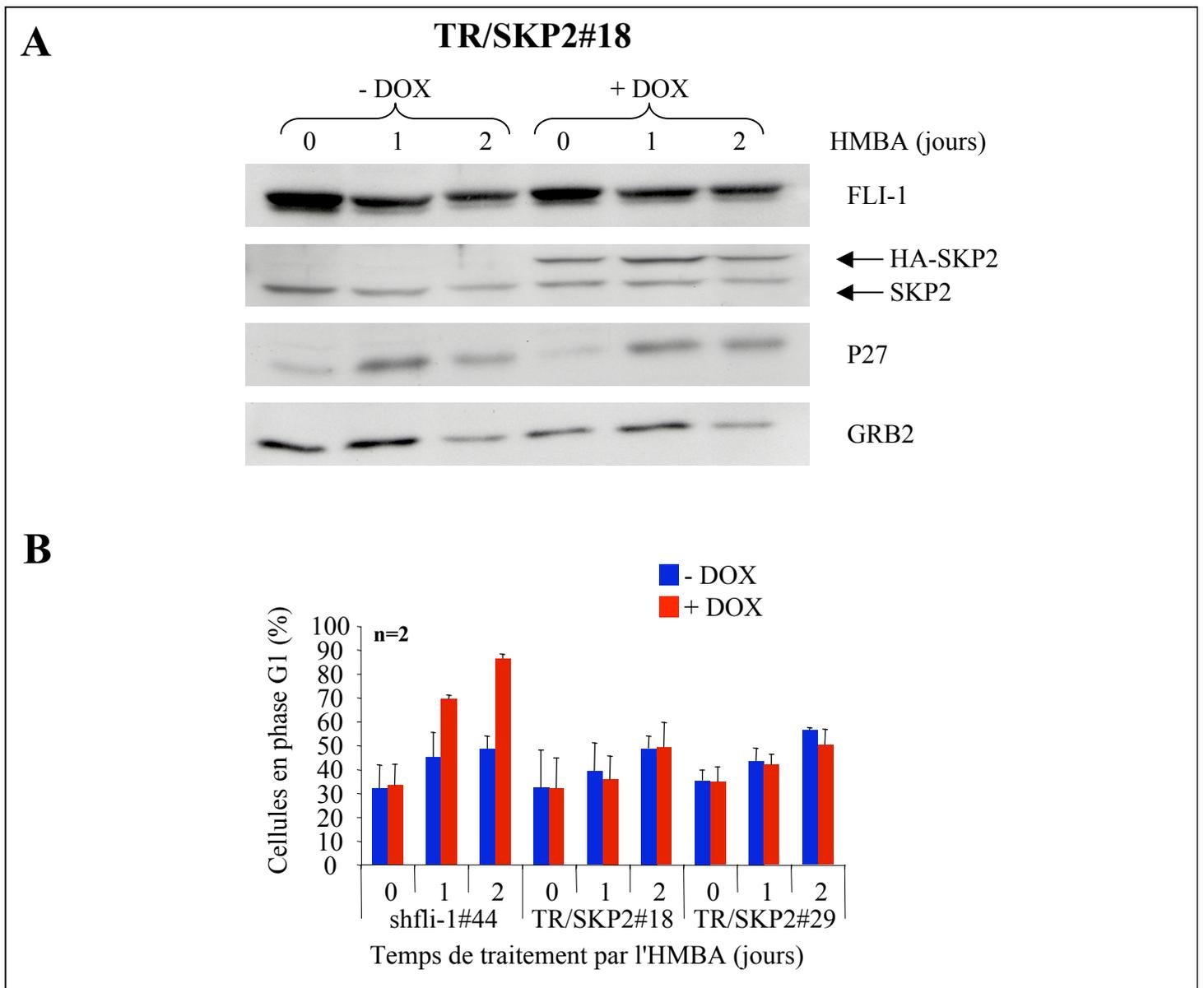


Figure 25 : Surexpression inducible de *skp2* dans la lignée 745/TR

(A) Analyse en western blot du taux de protéine FLI-1, SKP2 et P27 de cellules TR/SKP2#18 traitées pendant 2 jours par la doxycycline puis induites à se différencier par l'HMBA. L'analyse du taux de protéine GRB2 est présentée comme contrôle de charge.

(B) Evolution du pourcentage de cellules en phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation induite par l'HMBA de cellules shfli-1#44, TR/SKP2#18 et TR/SKP2#29 en absence ou en présence de doxycycline.

production inductible par la doxycycline d'une protéine HA-SKP2 exogène à un niveau supérieur au niveau de SKP2 endogène (Figure 24A). J'ai utilisé ces 2 clones pour rechercher l'effet de la surexpression de *HA-skp2* sur la cinétique de blocage en phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation des cellules shfli-1#44. Nous pouvons voir que malgré l'expression de *HA-skp2* dans les cellules 44/SKP2#13, il y a toujours une accélération de l'accumulation de la protéine P27^{KIP1} (Figure 24B). De plus, la doxycycline entraîne également une accélération du blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation des cellules 44/SKP2#13 et 44/SKP2#16.

Ces résultats montrent donc que la surexpression d'un transgène *HA-skp2* exogène dans les cellules shfli-1#44 n'empêche pas l'augmentation du taux de protéine P27^{KIP1} ni l'accélération du blocage en phase G1 du cycle cellulaire observé après réduction du taux de protéine FLI-1.

Indépendamment du rôle de SKP2 dans le phénotype induit par la réduction du taux de protéine FLI-1, j'ai recherché si la réduction du taux de protéine SKP2 au cours de la différenciation des cellules 745-A pouvait avoir un rôle sur l'augmentation du taux de protéine P27^{KIP1} et le blocage en phase G1 du cycle cellulaire. Pour cela, des cellules 745/TR ont été transfectées par le vecteur pcDNA4/TO-skp2 puis sélectionnées par la zéocine. Une analyse en western blot après 2 jours de traitement par la doxycycline a permis d'identifier plusieurs clones isolés présentant une production inductible par la doxycycline d'une protéine HA-SKP2 exogène dont les clones TR/SKP2#18 et TR/SKP2#29. A titre d'exemple, la Figure 25A montre l'induction par la doxycycline de la production de la protéine HA-SKP2 dans les cellules TR/SKP2#18. J'ai utilisé ces 2 clones pour rechercher l'effet de la surexpression de *HA-skp2* sur la cinétique de blocage en phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation des cellules 745/TR. Comme le montre la Figure 25A, la surexpression de *HA-skp2* n'a pas d'effet sur l'accumulation du taux de protéine P27^{KIP1} au cours de la

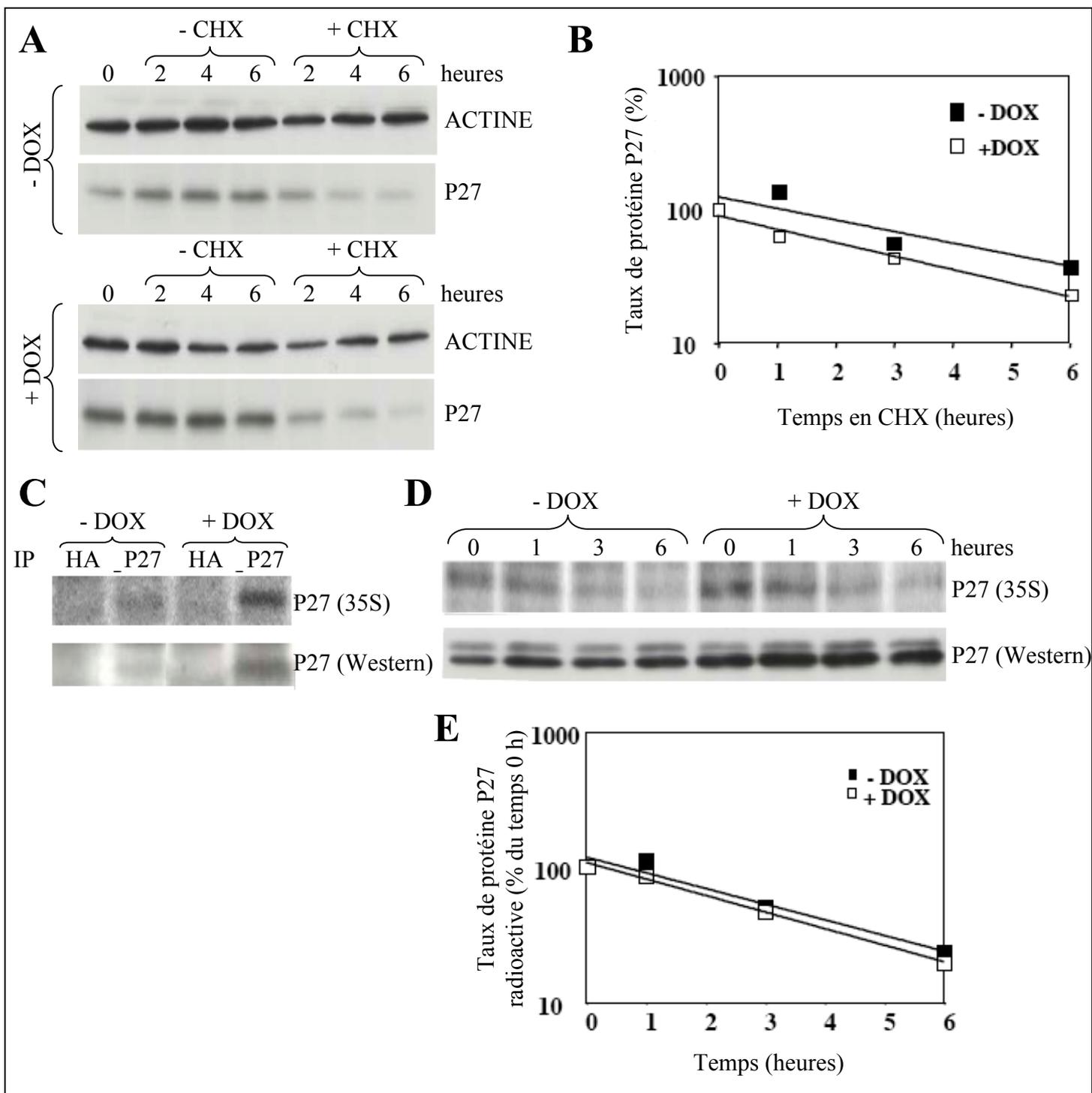


Figure 26 : FLI-1 inhibe la synthèse de P27^{KIP1}

(A) Analyse en western blot du taux de protéine P27 et ACTINE de cellules shfli-1#44 traitées pendant 2 jours par la doxycycline, induites à se différencier par l'HMBA pendant 24 h puis cultivées en absence ou en présence de 100 μ M cycloheximide (CHX).

(B) Quantification du taux de protéine P27 au cours du traitement par le CHX présenté en (A), rapporté au taux de protéine ACTINE.

(C) Analyse du taux de protéine P27 radioactive (partie supérieure) et totale (partie inférieure) de cellules shfli-1#44 différenciées pendant 1 jour en absence ou en présence de doxycycline puis marquée pendant 1 heure par de la méthionine radioactive.

(D) Analyse du taux de protéine P27 radioactive (partie supérieure) et totale (partie inférieure) de cellules shfli-1#44 différenciées pendant 1 jour en absence ou en présence de doxycycline, marquée pendant 2 heures par de la méthionine radioactive, puis incubées en présence de méthionine non radioactive pendant 1, 3 et 6 heures.

(E) Quantification de la quantité de protéine P27 radioactive présentée en (D) et représenté en % de la quantité présente avant incubation avec la méthionine non radioactive.

différenciation des cellules TR/SKP2#18. De plus, la doxycycline n'induit pas de modification dans la cinétique de blocage en phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation des cellules TR/SKP2#18 et TR/SKP2#29 (Figure 25B). Ceci n'est pas dû à une absence d'effet de la doxycycline car il est observé l'accélération du blocage en phase G1 du cycle des cellules shfli-1#44.

Ces résultats suggèrent que l'accumulation du taux de protéine P27^{KIP1} observée au cours de la différenciation des cellules 745-A n'est pas liée à une réduction de sa dégradation par SKP2.

4) FLI-1 inhibe la synthèse de P27^{KIP1}

Suite à l'absence d'effet de la surexpression de *HA-skp2* sur la cinétique d'accumulation du taux de protéine P27^{KIP1} au cours de la différenciation des cellules shfli-1#44, j'ai voulu vérifier si l'augmentation du taux de protéine P27^{KIP1} induit par la doxycycline après un jour de traitement par l'HMBA était dû à une augmentation de sa stabilité.

Tout d'abord, des cellules shfli-1#44 ont été cultivées pendant 2 jours en absence ou en présence de doxycycline puis induites à se différencier par un traitement par l'HMBA. Après un jour de différenciation, les cellules ont été cultivées en absence ou en présence de Cycloheximide, un inhibiteur de la traduction, et le taux de protéine P27^{KIP1} a été analysé par western blot après 2, 4 et 6 heures (Figure 26A) puis quantifié et rapporté au taux de protéine ACTINE. La Figure 26B représente l'évolution du taux de protéine P27^{KIP1} en fonction du temps de traitement par le cycloheximide. Nous pouvons voir que la vitesse de dégradation de la protéine P27^{KIP1} est similaire en absence ou en présence de doxycycline, suggérant que la réduction de l'expression de *fli-1* n'augmente pas la stabilité de la protéine P27^{KIP1}.

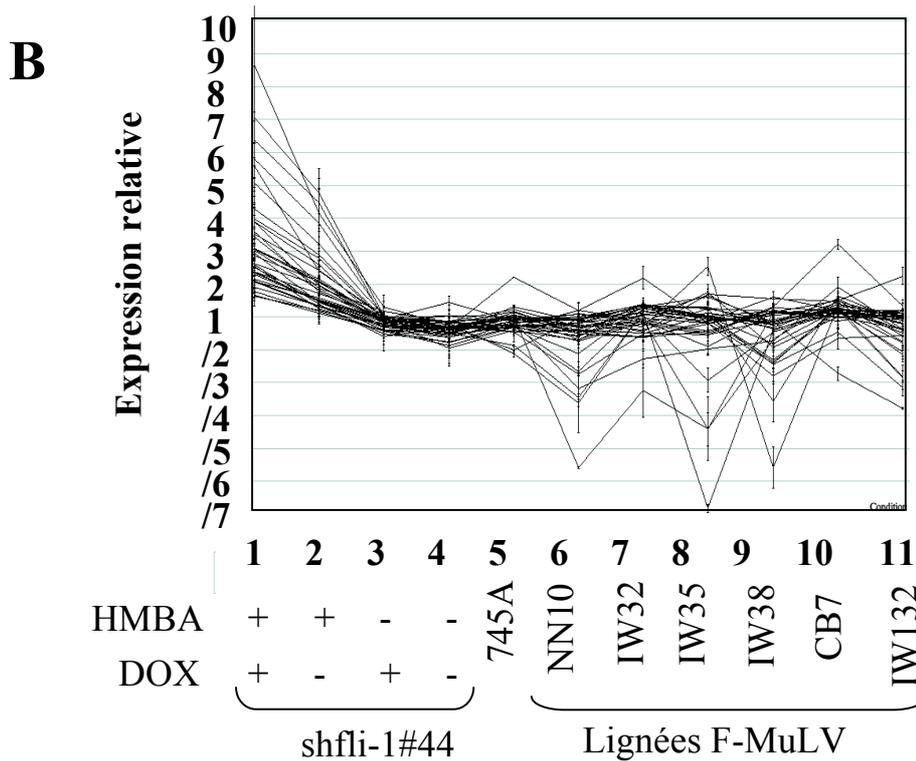
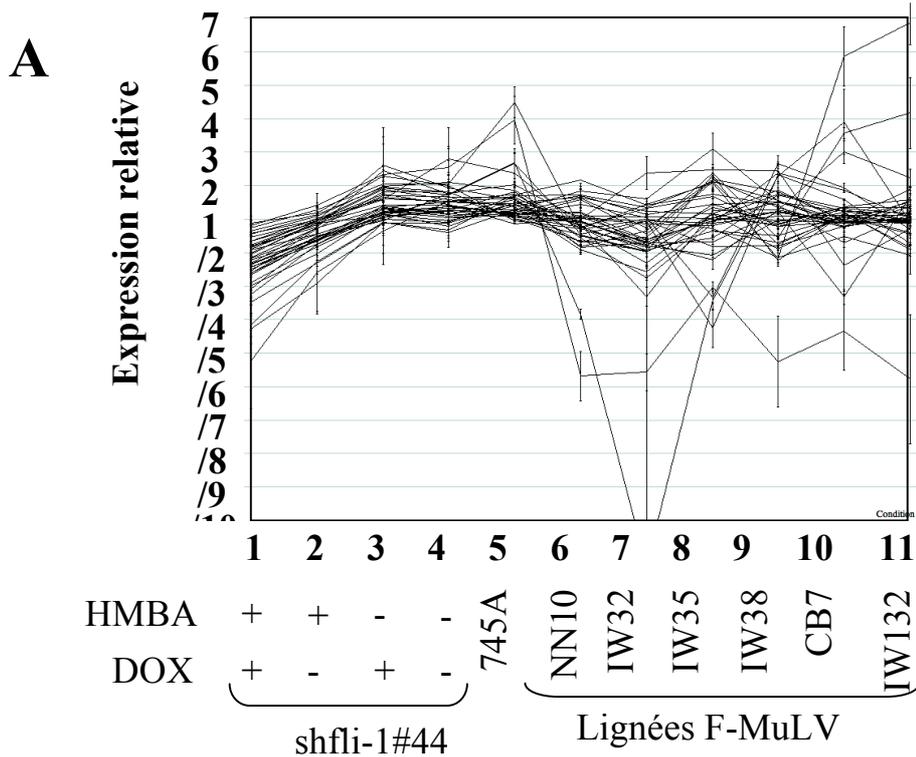


Figure 27 : Expression relative des gènes régulés par FLI-1 dans les cellules shfli-1#44

Expression relative du taux d'ARNm de l'ensemble des gènes dont le taux est modifié par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44 en présence d'HMBA. Est également représenté leur niveau d'expression relatif dans la lignée 745-A ainsi que dans 6 lignées F-MuLV.

- (A) Niveau d'expression relatif des gènes activés par FLI-1
- (B) Niveau d'expression relatif des gènes réprimés par FLI-1

Afin de confirmer ces résultats, j'ai mesuré la demi-vie de la protéine P27^{KIP1} dans les cellules shfli-1#44 après un jour de différenciation grâce à un marquage à la méthionine radioactive suivi d'une chasse par de la méthionine non radioactive. Pour cela, des cellules shfli-1#44 ont été cultivées pendant 2 jours en absence ou en présence de doxycycline puis induites à se différencier par un traitement par l'HMBA. Après un jour de différenciation, les cellules ont été marquées pendant 2 heures par de la méthionine radioactive puis mises en présence de méthionine non radioactive. Après 0, 1, 3 et 6 heures la protéine P27^{KIP1} a été immunoprécipitée, déposée sur un gel SDS-PAGE, et la radioactivité mesurée (Figure 26D) puis quantifiée. Comme le montre la Figure 26E, la doxycycline ne modifie pas la demi-vie de la protéine P27^{KIP1} dans les cellules shfli-1#44 après un jour de différenciation, ce qui suggère que l'augmentation du taux de protéine P27^{KIP1} n'est pas due à une augmentation de sa stabilité.

Afin de comparer le taux de synthèse de la protéine P27^{KIP1} dans les cellules shfli-1#44 après un jour de différenciation en absence ou en présence de doxycycline, j'ai mesuré la quantité de protéine P27^{KIP1} radioactive suite à un marquage court de une heure par de la méthionine radioactive. Comme le montre la Figure 26C, le taux de protéine P27^{KIP1} marqué par la méthionine radioactive est environ 3 fois plus important en présence de doxycycline.

L'ensemble de ces résultats montrent donc l'accélération de l'accumulation de la protéine P27^{KIP1} dans les cellules shfli-1#44 observée après réduction de l'expression de *fli-1* n'est pas due à une augmentation de sa stabilité mais à une augmentation de son taux de synthèse.

C/ Analyse globale du transcriptome

Afin de rechercher de nouveaux gènes cibles dont l'expression est régulée par FLI-1, nous avons effectué une analyse globale du transcriptome des cellules shfli-1#44. Pour cela,

Gene Name	Fold change	Common	Genbank	UniGene Cluster ID	Nom complet
s07256	0,677	sep-09	AK164581	Mm.38450	Septin 9
s18756	0,679	sep-09	AK164581	Mm.38450	Septin 9
s17022	0,624	5033413D16Rik	AK053349	Mm.34859	Inconnu
s10143	0,639	Cct6a	AK149757	Mm.153159	Chaperonin subunit 6a (zeta)
s10168	0,589	Ddx21	NM_019553	Mm.25264	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21(RNAhelicase rRNA maturation)
s04920	0,598	Ddx21	NM_019553	Mm.25264	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21(RNAhelicase rRNA maturation)
s03916	0,543	Eif4b	BC036293	Mm.290022	Eukaryotic translation initiation factor 4B
s05505	0,668	Fyttl1	AK029785	Mm.12831	Forty-two-three domain containing 1
s00614	0,722	Gnb2l1/RACK1	AK163811	Mm.5305	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2 like 1
s20350	0,511	Hif3a	AF060194	Mm.135110	Hypoxia inducible factor 3, alpha subunit (induit par l'hypoxie...)
s19464	0,662	Hist1h2ao	CA480022	Mm.250564	Histone H2a
s17541	0,49	Hprt1	AK146626	Mm.299381	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
s15633	0,761	Hrc	AF132218	Mm.39968	Histidine rich calcium binding protein
s09639	0,751	Hspa8	NM_031165	Mm.290774	Heat shock protein 8
s02161	0,546	Igf2	AB030734	Mm.3862	Insulin-like growth factor 2
s11049	0,504	Imp4	AK170043	Mm.291745	IMP4, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)
s15194	0,647	Impdh2	BC060585	Rn.8093	Inosine 5-monophosphate dehydrogenase 2
s03828	0,494	Kcnn4	AK038253	Mm.9911	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4
s03071	0,678	Ldha	U13687	Mm.29324	Lactate dehydrogenase A
s03437	0,683	Mif	CA469091	Mm.2326	Macrophage migration inhibitory factor
s04256	0,626	Myc	NM_010849	Mm.2444	Myelocytomatosis oncogene
s21577	0,664	Myc	NM_010849	Mm.2444	Myelocytomatosis oncogene
s07378	0,539	Nfya	AK004729	Mm.4929	Nuclear transcription factor-Y alpha
s15890	0,584	Nhp2l1	AK134943	Mm.299312	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S. cerevisiae)
s04554	0,661	Nip7	AK003739	Mm.334789	Nuclear import 7 homolog (S. cerevisiae)
s08319	0,595	Pde4dip	NM_001039376	Mm.129840	Phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin) Glogi-centrosome
s03449	0,694	Phlda2	CF615806	Mm.334344	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2 (reprimé par l'hypoxie)
s00347	0,662	Ppp1r14b	X97490	Mm.140	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B
s20361	0,571	Ptgir	BC094386	Mm.287572	Prostaglandin I receptor (IP)
s13572	0,724	Rcc2	BC060624	Mm.253	Regulator of chromosome condensation 2
s18404	0,64	Rpo1-3	CB588751	Mm.317557	RNA polymerase 1-3 (rRNA transcription)
s06458	0,575	Sdccag1	AK034885	Mm.46705	Serologically defined colon cancer antigen 1
s15045	0,558	Snrpb	AK144424	Mm.88216	Small nuclear ribonucleoprotein B
s06455	0,598	sp	BC042648	Mm.257181	Nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)
s20921	0,722	Syncrip	AK083398	Mm.260545	Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein (NSAP1-augmente activite IRES)
s20718	0,639	Tpi1	NM_009415	Mm.4222	Triosephosphate isomerase 1
s10665	0,626	Tubb5	AK161575	Mm.422888	Tubulin, beta 5
s19732	0,61	Wdr4	AK164160	Mm.143771	WD repeat domain 4

Tableau 2 : Liste des gènes dont la réduction de l'expression par l'HMBA dans les cellules shfli-1#44 est amplifiée en présence de doxycycline

Sont représentés en vert les gènes impliqués dans la transcription et/ou la maturation des ARN ribosomiques

des cellules shfli-1#44 ont été traitées pendant 2 jours en absence ou en présence de doxycycline puis leur différenciation a été induite par traitement par l'HMBA. Après 0 et 1 jour de différenciation, les ARN totaux des cellules ont été extraits et le transcriptome des cellules a été analysé (projet CIT de La Ligue Nationale Contre le Cancer). Nous avons également joint à l'analyse les ARN totaux de plusieurs lignées induites par le virus F-MuLV, qui n'expriment pas *spi-1* et qui expriment différents niveaux de *fli-1* (Starck et al., 1999a).

L'effet majeur de la répression de l'expression de *fli-1* dans les cellules 745-A est une accélération des phénotypes induits par l'HMBA (accélération de l'hémoglobinisatation et de l'arrêt de prolifération induit par l'HMBA, voir partie I-B/ des résultats). Un des effets de l'HMBA étant une réduction de l'expression de *spi-1*, ceci suggère une coopération entre les facteurs SPI-1 / PU.1 et FLI-1 dans le blocage de la différenciation des cellules 745-A qui pourrait passer par la régulation de gènes communs. Afin d'identifier des gènes co-régulés à la fois par *spi-1* et *fli-1*, nous avons recherché des gènes dont l'expression était modifiée par l'HMBA (donc potentiellement régulés par *spi-1*) et pour lesquels cette modification était amplifiée par la doxycycline. Ceci nous a permis d'identifier 2 groupes de gènes : un premier groupe dont l'expression diminue au cours de la différenciation et ceci de manière plus importante en présence de doxycycline (Figure 27A); et un deuxième groupe dont l'expression augmente au cours de la différenciation, ce qui est amplifié par la doxycycline (Figure 27B).

1) Gènes activés par FLI-1

La liste des gènes dont l'expression est réduite par la doxycycline après un traitement par l'HMBA, correspondant donc à des gènes étant activés par FLI-1, est présentée dans le Tableau 2. Parmi ces gènes, nous pouvons remarquer la présence de plusieurs gènes impliqués dans la transcription et/ou la maturation des ARN ribosomiques. Une analyse par

Gene Name	Fold change	Common	Genbank	UniGene Cluster ID	Nom complet
s12904	1,863	2310021P13Rik	AK147398	Mm.275082	protéine hypothétique
s20223	1,435	5330420D20Rik	AK165344	Mm.252862	D-aspartate oxydase
s05914	1,558	Acot2	BQ964282	Mm.371675	Acetyl coA thioestérase
s04479	1,304	Add1	NM_016990	Rn.5788	Adducine 1(a)
s15072	1,564	Add3	AK144174	Mm.44106	Adducine 3(g)
s16701	2,096	Alas2	AK165262	Mm.302724	Ala synthétatse 2
s21257	1,421	AU045094	AU043288	Mm.17836	Protéine inconnue
s16934	1,446	AW549542	AK035112	Mm.381453	Protéine inconnue
s04044	2,346	Btg2	NM_007570	Mm.239605	B-cell translocation gene 2 (antiprolifératif)
s16262	1,415	C630007C17Rik	XM_485015	Mm.119383	Zfp804a (protéine à doigt de zinc)
s18395	1,427	Cd200	AK163094	Mm.245851	Antigène CD200
s17665	1,32	Cul7	NM_025611	Mm.329078	Culine 7
s00430	1,38	Dgkg	AK085470	Mm.194986	Diacylglycérol kinase
s19188	1,501	Disp1	AK138276	Mm.358721	Dispatched homologue 1
s12358	1,673	Fech	AK083560	Mm.1070	Ferrochelatse
s13658	1,616	Fech	AK083560	Mm.1070	Ferrochelatase
s05718	2,017	Figl1	AK143850	Mm.236114	Figtine like 1 (famille AAA)
s18361	1,656	Ftl1	BU514988	Mm.30357	Chaîne légère ferritine
s25082	1,483	Hba-a1	CA461544	Mm.196110	Globine a
s17354	1,426	Hba-a1	CA461544	Mm.196110	Globine a
s05980	1,537	Hiatl1	NM_133680	Mm.239196	Hippocampus abundant protein like 1
s07675	1,831	Hist1h4h	BC057955	Mm.227295	Histone H4
s20951	1,432	Mknk2	NM_021462	Mm.42126	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2 (eiF4E)
s21212	1,509	Phtf1	AK131629	Mm.385178	Putative homeodomain transcription factor 1
s12332	1,494	Prr13	BC016234	Mm.29865	Proline rich 13
s14963	1,487	Setd5	AK122551	Mm.367159	SET domain containing 5 (SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax) domain)
s19502	1,591	Sh3d19	D89677	Mm.2454	SH3 domain protein D19
s12594	1,497	Slc2a4	AK160882	Mm.10661	GLUT4 :solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
s21277	1,376	Smyd3	BC052431	Mm.222338	SET and MYND domain containing 3
s14414	1,477	Stam2	AK035789	Mm.263639	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 2
s23284	2,005	Tnrc6b	NM_144812	Mm.131328	Trinucleotide repeat containing 6b
s20127	1,987	Tsc22d1	AK173322	Mm.153272	TSC22 domain family, member 1 (TGFb induced)
s12828	1,451	Tsc22d1	AK173322	Mm.153272	TSC22 domain family, member 1 (TGFb induced)
s11299	1,607	Usp11	AK220478	Mm.34489	Ubiquitin specific peptidase 11
s17341	1,38	VeZF1	AF104410	Mm.46628	Vascular endothelial zinc finger 1
s22272	2,033	Wbp1	AK170907	Mm.1109	WW domain binding protein 1
s22565	1,581	Wwp1	AK153640	Mm.78312	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (dégrade KLF5)
s05151	2,233		XM_486478	Mm.291555	Similar to Ferritin light chain 1 (Ferritin L subunit 1)

Tableau 3 : Liste des gènes dont l'augmentation de l'expression par l'HMBA dans les cellules shfli-1#44 est amplifiée en présence de doxycycline

Sont représentés en rouge les gènes spécifiques du lignage érythrocytaire, en jaune ceux impliqués dans la dégradation protéique et en bleu ceux impliqués dans la régulation de protéines méthylases

RT-PCR quantitative a permis de confirmer la réduction de l'expression de ces gènes par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44 au cours de la différenciation (Boris Guyot, résultats non présentés). La réduction de l'expression de ces gènes a également été observée dans les cellules NN10/TR/shfli-1#5 (la lignée érythroleucémique NN10 présente une activation transcriptionnelle directe de *fli-1* par insertion provirale) après un traitement de 2 jours par la doxycycline (Boris Guyot, résultats non présentés). De plus, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont mis en évidence la présence du facteur FLI-1 sur les régions régulatrices de ces gènes dans les cellules shfli-1#44 (Boris Guyot, résultats non présentés).

Ces résultats suggèrent donc que FLI-1 pourrait être un activateur transcriptionnel d'un groupe de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes.

2) Gènes réprimés par FLI-1

La liste des gènes dont l'expression est augmentée par la doxycycline, correspondant donc à des gènes étant réprimés par FLI-1, est présentée dans le Tableau 3. Comme cela était attendu, nous retrouvons des gènes spécifiques du lignage érythrocytaire comme des gènes codant pour l'hémoglobine (*globine α*), des gènes impliqués dans la synthèse de l'hème (*alas2*), ou encore des gènes impliqués dans le métabolisme du fer (*fech* et *ftl1*).

Une analyse du taux d'ARNm *alas2* et *globine α* par RT-PCR quantitative au cours de la différenciation des cellules shfli-1#44 en absence et en présence de doxycycline (Figure 28A) a permis de confirmer cette augmentation. J'ai également mis en évidence une augmentation par la doxycycline du taux d'ARNm du gène *ahsp*, un autre gène érythrocytaire dont l'expression dépend des facteurs GATA-1 et EKLF (Gallagher et al., 2005; Keys et al., 2007), au cours de la différenciation des cellules shfli-1#44. J'ai ensuite recherché si cette régulation du taux d'ARNm *alas2*, *ahsp* et *globine α* par FLI-1 était retrouvée dans la lignée

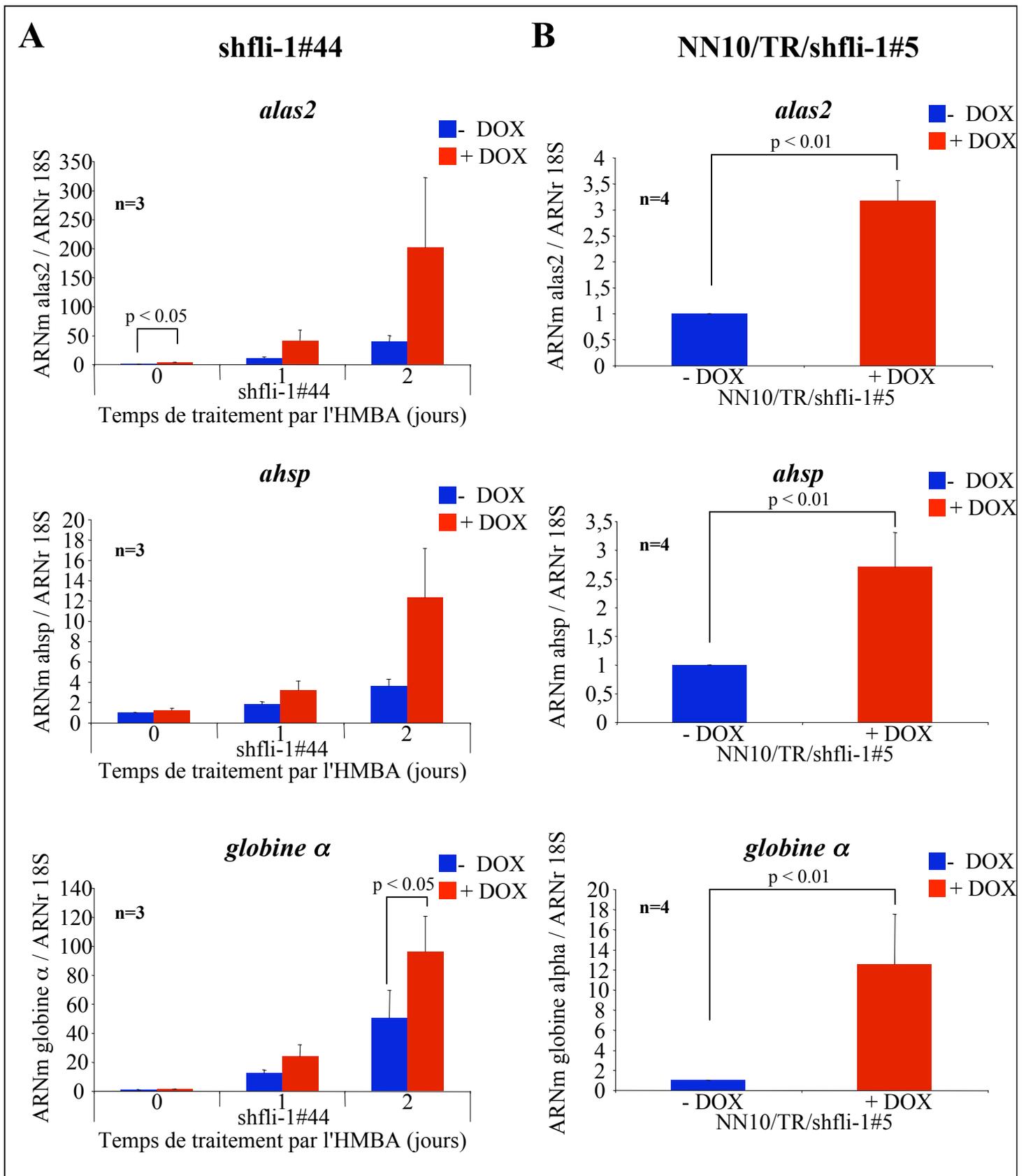


Figure 28 : FLI-1 inhibe l'expression des gènes érythrocytaires dans les cellules érythroleucémiques

(A) Analyse par RT-PCR quantitative du taux d'ARNm *alas2*, *ahsp* et globine alpha, rapporté au taux d'ARNr 18S, au cours de la différenciation de cellules shfli-1#44 en absence ou en présence de doxycycline.

(B) Analyse par RT-PCR quantitative du taux d'ARNm *alas2*, *ahsp* et globine alpha, rapporté au taux d'ARNr 18S, de cellules NN10/TR/shfli-1#5 cultivées en absence ou en présence de doxycycline pendant 2 jours.

érythroleucémique NN10 qui présente une activation transcriptionnelle directe de *fli-1* par insertion provirale. Pour cela, des cellules NN10/TR/shfli-1#5 ont été cultivées en absence ou en présence de doxycycline pendant 2 jours et le taux d'ARNm *alas2*, *ahsp* et globine α a été mesuré par RT-PCR quantitative (Figure 28B). Nous pouvons voir que la réduction du taux de protéine FLI-1 par la doxycycline dans les cellules NN10/TR/shfli-1#5 induit également une augmentation du taux d'ARNm *alas2*, *ahsp* et globine α .

En plus des gènes érythrocytaires, nous pouvons noter la présence de gènes impliqués dans la dégradation protéique (*cul7*, *usp11*, *wbp1* et *wwp1*), ainsi que 2 gènes codant des protéines méthylases (*setd5* et *smyd3*) et un gène impliqué dans la régulation de protéines méthylases (*btg2*).

La surexpression de *btg2* dans différents modèles cellulaires induit un blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Guardavaccaro et al., 2000; Kawakubo et al., 2004; Lim et al., 1998). La lignée G1E-ER est une lignée érythroïde immortalisée issue de cellules souches embryonnaires déficientes pour le gène *gata-1*, et qui produisent une protéine de fusion associant la protéine GATA-1 au domaine de liaison à l'hormone du récepteur aux oestrogènes. L'activation par le β -oestradiol de cette protéine provoque la différenciation érythrocytaire des cellules G1E-ER, ce qui est associé à une augmentation du taux d'ARNm *btg2* (Rylski et al., 2003). La réduction de l'expression de *fli-1* étant associée à une augmentation du taux d'ARNm *btg2*, ces résultats font du gène *btg2* un bon candidat permettant d'expliquer le mode d'action par lequel FLI-1 pourrait participer au blocage de la différenciation des cellules 745-A, et notamment à l'inhibition du blocage en phase G1 du cycle cellulaire. Par conséquent, je me suis plus particulièrement intéressé au gène *btg2*.

La Figure 29A représente le niveau d'expression relatif de *fli-1* et de *btg2* dans les cellules shfli-1#44 et dans plusieurs lignées érythroleucémiques induites par le virus F-MuLV. Nous pouvons remarquer une corrélation inverse entre le niveau d'expression de *fli-1*

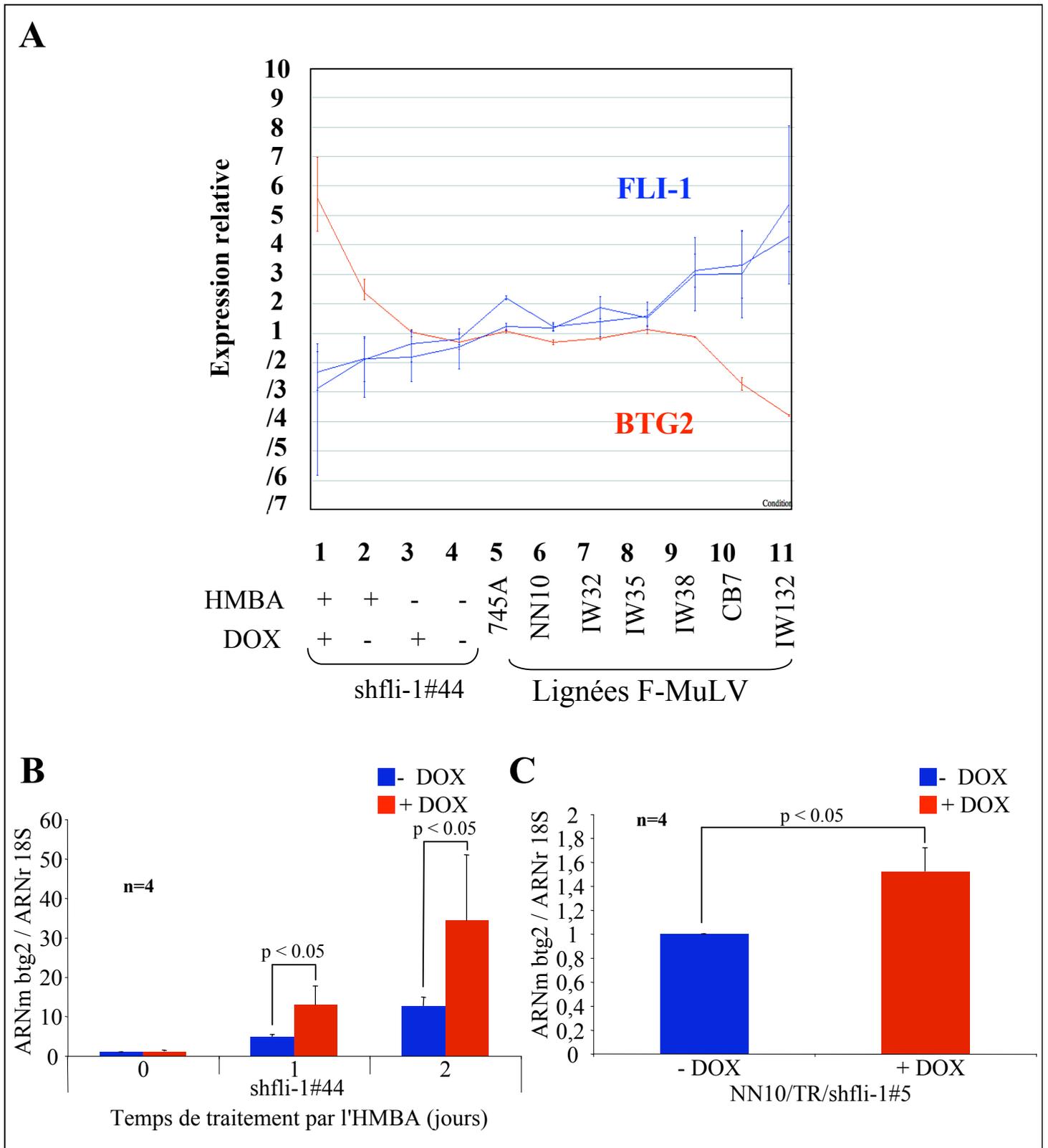


Figure 29 : La réduction du taux de protéine FLI-1 augmente le taux d'ARNm btg2 dans les cellules érythroleucémiques de Friend

(A) Expression relative du taux d'ARNm des gènes *fli-1* et *btg2* dans les cellules shfli-1#44, 745A ainsi que dans 6 lignées F-MuLV.

(B) Analyse par RT-PCR quantitative du taux d'ARNm *btg2*, rapporté au taux d'ARNr 18S, au cours de la différenciation de cellules shfli-1#44 en absence ou en présence de doxycycline.

(C) Analyse par RT-PCR quantitative du taux d'ARNm *btg2*, rapporté au taux d'ARNr 18S, de cellules NN10/TR/shfli-1#5 cultivées en absence ou en présence de doxycycline pendant 2 jours.

et de *btg2*. L'augmentation du taux d'ARNm *btg2* par la doxycycline a été confirmée par une analyse par RT-PCR quantitative dans les cellules shfli-1#44 au cours de la différenciation induite par l'HMBA (Figure 29B) et dans les cellules NN10/TR/shfli-1#5 (Figure 29C).

L'ensemble de ces résultats montrent donc que la réduction du taux de protéine FLI-1 dans les cellules shfli-1#44 et NN10/TR/shfli-1#5 est associée à une augmentation du taux d'ARNm de plusieurs gènes érythrocytaires comme les gènes *alas2*, *ahsp* et *globine α* et du gène antiprolifératif *btg2*.

D/ Recherche de la fonction et du mécanisme de la régulation de *btg2* par FLI-1

1) Expression forcée de *btg2* dans les cellules shfli-1#44

Afin de déterminer le rôle de l'augmentation du taux d'ARNm *btg2* dans l'accélération de la différenciation des cellules shfli-1#44 induite par la répression de l'expression de *fli-1*, j'ai recherché si la surexpression de *btg2* dans les cellules 745-A pouvait reproduire cette accélération de différenciation. Des cellules 745/TR ont été transfectées par le vecteur pcDNA4/TO-*btg2* puis sélectionnées par la zéocine. Une analyse en western blot après 2 jours de traitement par la doxycycline a permis d'identifier les clones BTG2#12 et BTG2#14 qui présentent une production inductible d'une protéine FLAG-BTG2 (Figure 30A). J'ai utilisé ces 2 clones pour rechercher l'effet de la surexpression de *btg2* sur la cinétique de différenciation des cellules 745-A. La Figure 30B montre que la doxycycline n'a pas d'effet sur la cinétique de blocage en phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation des cellules BTG2#12 et BTG2#14 alors qu'elle accélère cette cinétique dans le cas des cellules shfli-1#44. Enfin, la doxycycline n'a pas d'effet sur le pourcentage de cellules BTG2#12 et BTG2#14 colorées par la benzidine après 2 jours de différenciation, alors qu'elle l'augmente d'environ 3 fois dans le cas des cellules shfli-1#44 (Figure 30C).

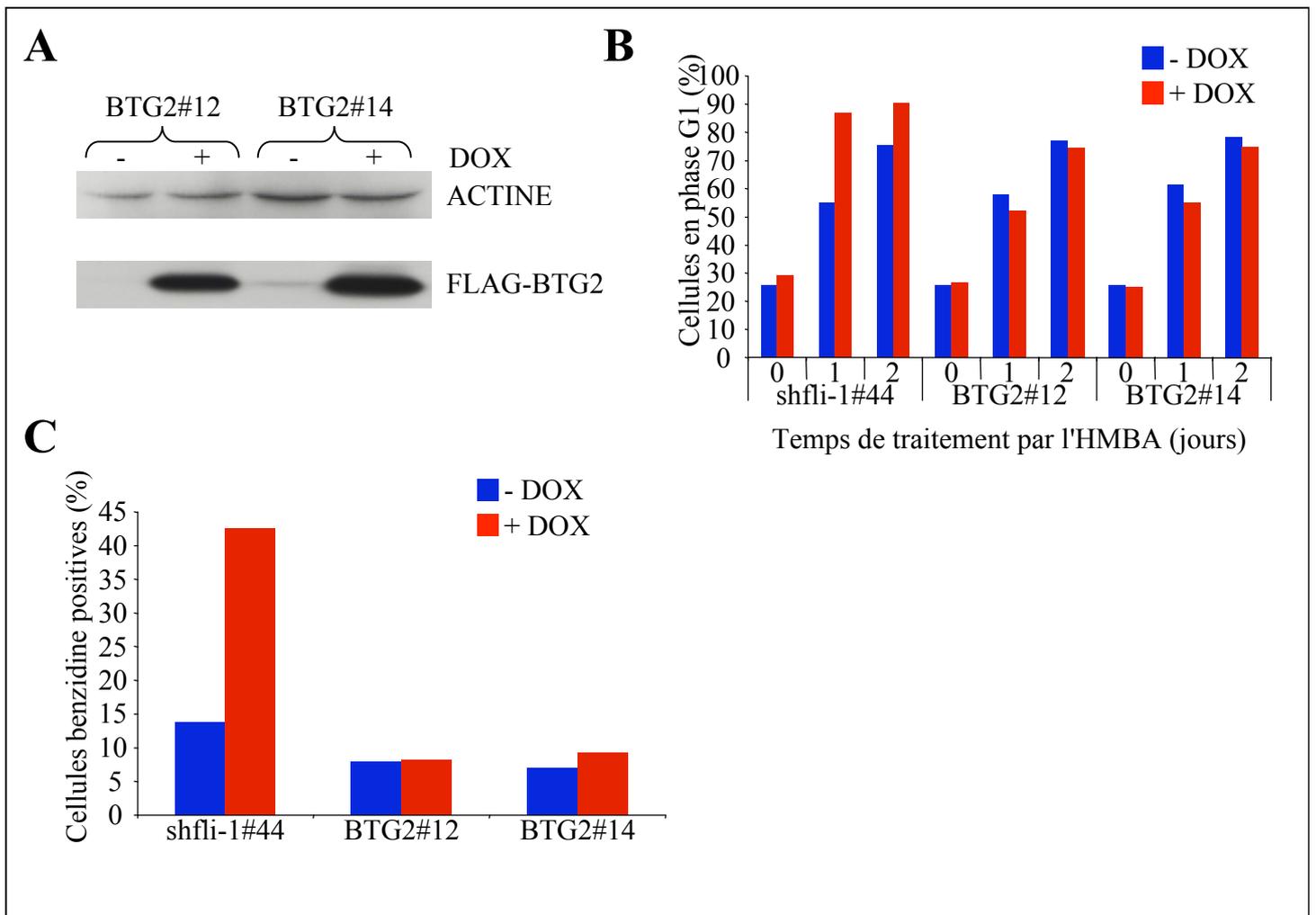


Figure 30 : Surexpression inducible de *btg2* dans les cellules 745-A

(A) Analyse en western blot du taux de protéine BTG2 de cellules BTG2#12 et BTG2#14 traitées par la doxycycline pendant 2 jours. L'analyse du taux de protéine ACTINE est présentée comme contrôle de charge.

(B) Evolution du pourcentage de cellules en phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation induite par l'HMBA de cellules shfli-1#44, BTG2#12 et BTG2#14 en absence ou en présence de doxycycline.

(C) Pourcentage de cellules shfli-1#44, BTG2#12 et BTG2#14 colorées par la benzidine après 2 jours de différenciation induite par l'HMBA en absence ou en présence de doxycycline.

Ces résultats montrent donc que la surexpression d'un transgène *FLAG-btg2* n'a pas d'effet sur la cinétique de blocage en phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation et l'hémoglobinisation des cellules 745-A.

2) Recherche du mécanisme de régulation de *btg2* par FLI-1

2.1) *FLI-1* inhibe la transcription du gène *btg2*

J'ai ensuite recherché si l'augmentation du taux d'ARNm *btg2*, observée lors de la réduction du taux de protéine FLI-1, était due à une augmentation de la transcription du gène *btg2*. Pour cela, une immunoprécipitation de chromatine avec un anticorps dirigé contre l'ARN polymérase II a été réalisée sur des cellules *shfli-1#44* après un jour de différenciation (Figure 31A). Nous pouvons observer un enrichissement de la séquence correspondant à l'exon 2 du gène *btg2* après immunoprécipitation par l'anticorps anti-ARN polymérase II par rapport au gène contrôle *myoD*, cet enrichissement étant plus important en présence de doxycycline.

Cette augmentation par la doxycycline du recrutement de l'ARN polymérase II sur la séquence codante du gène *btg2* montre que la réduction du taux de protéine FLI-1 entraîne une activation de la transcription du gène *btg2*.

2.2) *FLI-1* n'est pas présent sur les régions régulatrices du gène *btg2*

J'ai ensuite recherché si FLI-1 pouvait se fixer sur les régions régulatrices des gènes *btg2* et *globine α* , un autre gène dont le taux d'ARNm augmente après répression de l'expression de FLI-1. Pour cela, des cellules *shfli-1#44* ont été traitées par la doxycycline pendant 2 jours puis leur différenciation a été induite par l'HMBA. Après 1 jour de différenciation, la chromatine des cellules a été immunoprécipitée par un anticorps anti-HA

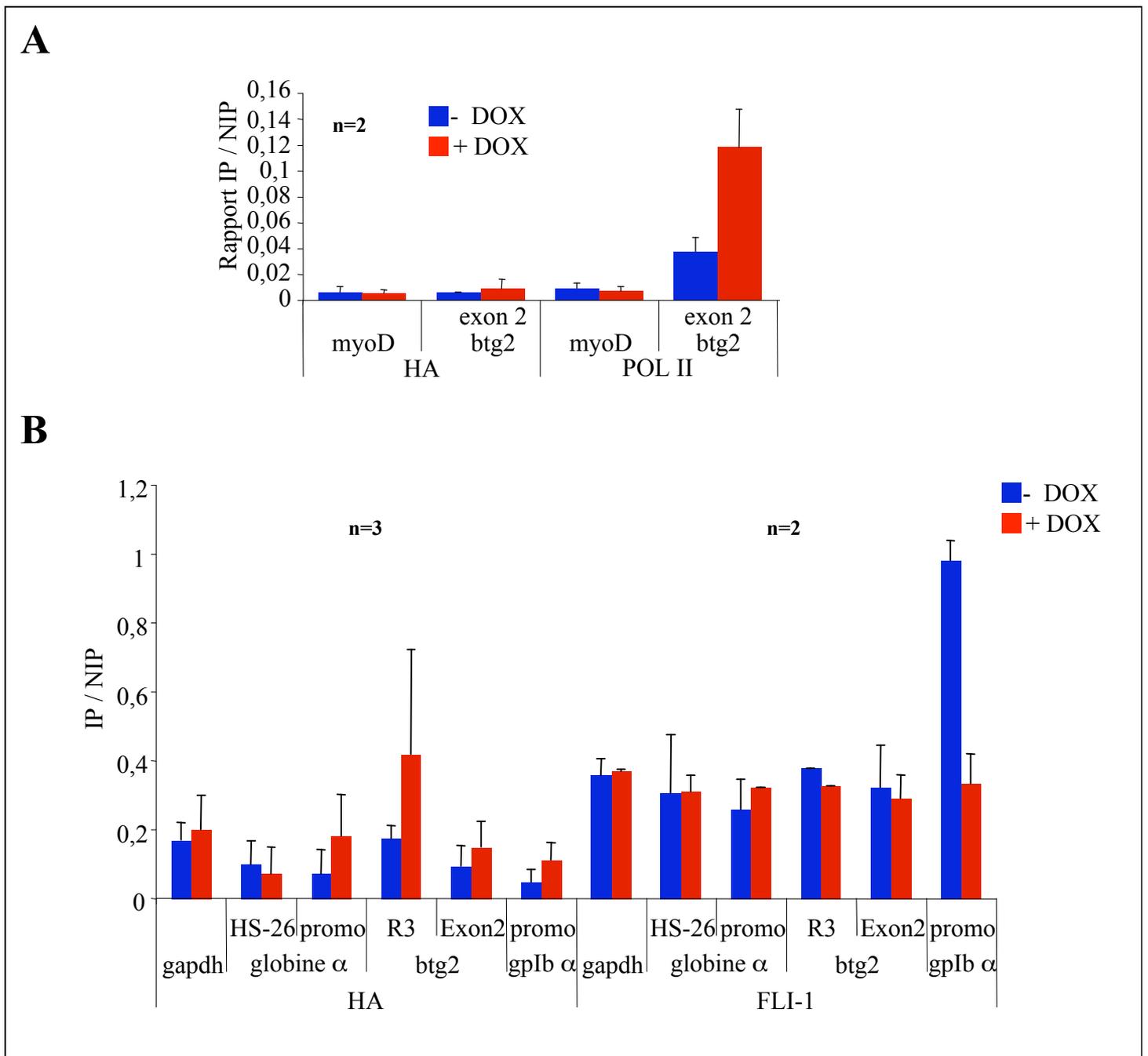


Figure 31 : FLI-1 inhibe la transcription du gène *btg2*

Analyse par PCR quantitative de la chromatine de cellules shfli-1#44 induites à se différencier pendant 1 jour en absence ou en présence de doxycycline.

(A) Est représenté le rapport entre le signal obtenu après immunoprécipitation par un anticorps anti-HA ou anti-ARN Polymérase II et le signal obtenu avant immunoprécipitation.

(B) Est représenté le rapport entre le signal obtenu après immunoprécipitation par un anticorps anti-HA ou anti-FLI-1 et le signal obtenu avant immunoprécipitation.

ou anti-FLI-1 et la présence des régions régulatrices des gènes *globine α* , *btg2* ainsi que le gène contrôle *gapdh* a été mesurée par PCR quantitative.

Comme le montre la Figure 31B, je n'ai pas pu mettre en évidence la présence de FLI-1 sur les régions régulatrices des gènes *globine α* et *btg2* puisque l'immunoprécipitation par l'anticorps anti-FLI-1 n'induit pas d'enrichissement de ces régions par rapport au gène contrôle *gapdh* et à l'exon 2 du gène *btg2*. En revanche, l'immunoprécipitation par l'anticorps anti-FLI-1 induit un enrichissement du promoteur du gène *gplb α* (promoteur connu pour fixer le facteur FLI-1) en absence de doxycycline, qui n'est plus observé en présence de doxycycline.

Ces résultats montrent donc que la régulation par FLI-1 de l'expression des gènes *globine α* et *btg2* n'est pas associée à une fixation de FLI-1 sur les régions régulatrices de ces gènes.

2.3) FLI-1 inhibe le recrutement de GATA-1 sur la région R3 du gène *btg2*

Le gène *btg2* a été décrit comme étant une cible directe activée par le facteur GATA-1 (Wang et al., 2006). J'ai donc recherché si l'activation du gène *btg2* induite par la réduction du taux de protéine FLI-1 pouvait être associée à une augmentation du recrutement de GATA-1 sur ses régions régulatrices. Parmi ces régions régulatrices, je me suis intéressé à la région R3, située en 3' du gène (Figure 32A), qui contient un site consensus de liaison à l'ADN de GATA-1 et qui a été décrite comme fixant le facteur GATA-1 (Wang et al., 2006).

Pour cela, des cellules shfli-1#44 ont été traitées par la doxycycline pendant 2 jours puis leur différenciation a été induite par l'HMBA. Après 1 jour de différenciation, la chromatine des cellules a été immunoprécipitée par un anticorps anti-HA ou anti-GATA-1 et la présence des régions régulatrices des gènes *btg2*, *gplb α* ainsi que le gène contrôle *gapdh* a été mesurée par PCR quantitative.

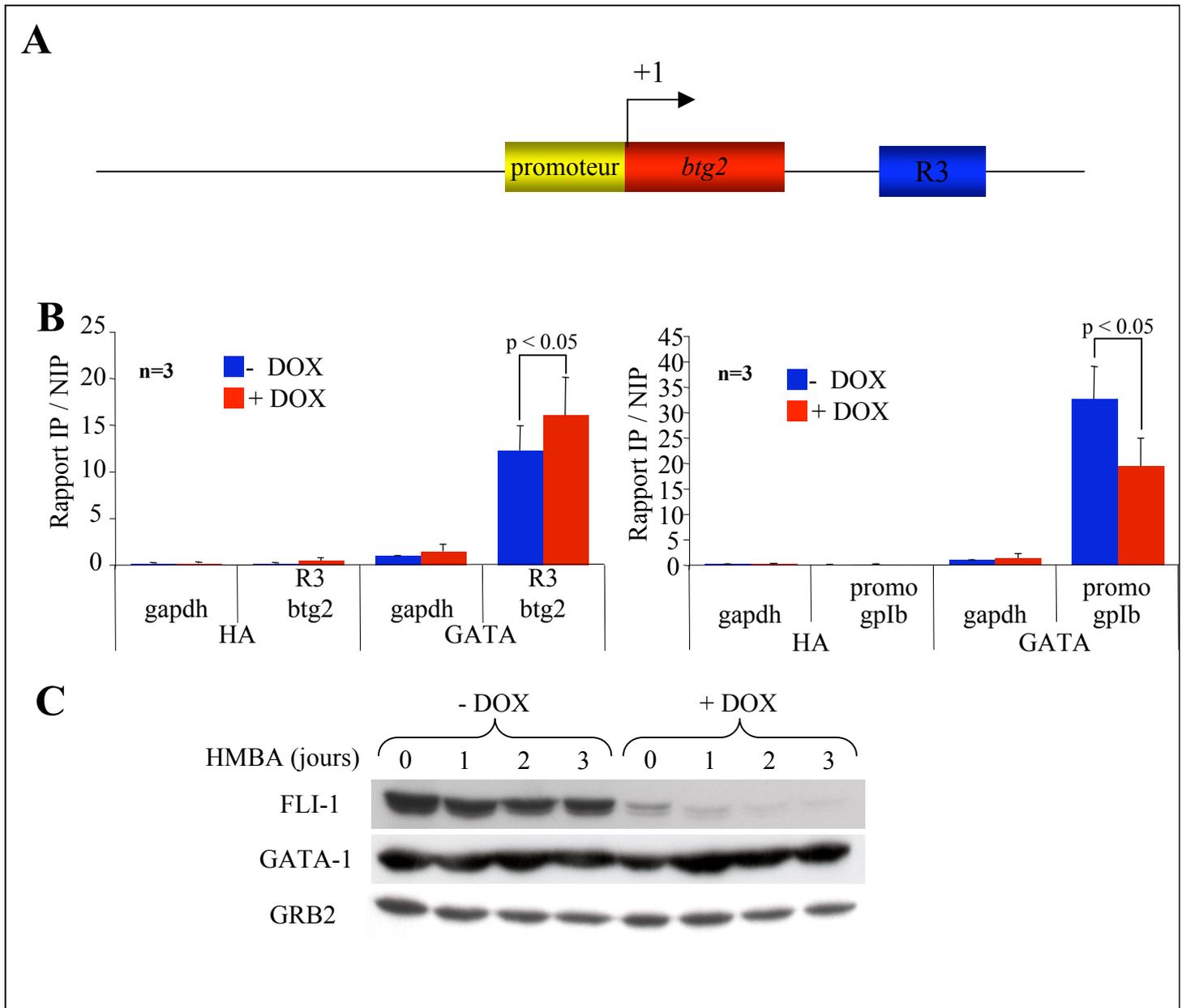


Figure 32 : FLI-1 inhibe le recrutement de GATA-1 sur la région R3 du gène *btg2*

(A) Représentation schématique de la position de la région régulatrice R3 du gène *btg2*

(B) Analyse par PCR quantitative de la chromatine de cellules shfli-1#44 induites à se différencier pendant 1 jour en absence ou en présence de doxycycline. La figure représente le rapport entre le signal obtenu après immunoprécipitation par un anticorps anti-HA ou anti-GATA-1 et le signal obtenu avant immunoprécipitation.

(C) Analyse par western blot du taux de protéine FLI-1 et GATA-1 de cellules shfli-1#44 au cours de leur différenciation induite par l'HMBA en absence ou en présence de doxycycline. L'analyse du taux de protéine GRB2 est présentée comme contrôle de charge.

Comme cela était attendu, l'immunoprécipitation de la chromatine des cellules cultivées en absence de doxycycline par un anticorps anti-GATA-1 induit un enrichissement de la région R3 du gène *btg2* (Figure 32B, partie gauche) par rapport au gène contrôle *gapdh*, ainsi que sur le promoteur du gène *gplb α* (Figure 32B, partie droite), confirmant ainsi la fixation de GATA-1 sur ces régions. La doxycycline induit une augmentation significative de l'enrichissement par l'anticorps anti-GATA-1 de la région R3 du gène *btg2* alors qu'elle n'a pas d'effet significatif dans le cas du gène *gapdh* et de l'exon 2 du gène *btg2* (Figure 32B, partie gauche). Dans les mêmes expériences, la doxycycline induit une réduction du recrutement de GATA-1 sur le promoteur du gène *gplb α* (Figure 32B, partie droite), qui est un gène co-activé par FLI-1 et GATA-1. Comme en témoigne la Figure 32C, cette modification du recrutement de GATA-1 ne semble pas associée à une modification par la doxycycline du taux de protéine GATA-1.

Ces résultats suggèrent donc que la réduction du taux de protéine FLI-1 est associée à une augmentation du recrutement du facteur GATA-1 sur la région régulatrice R3 du gène *btg2*, corrélée à une diminution de son recrutement sur le promoteur du gène *gplb α* .

2.4) Recherche de l'effet de FLI-1 sur le recrutement de GATA-1 sur les régions régulatrices du gène globine α

Afin de rechercher si l'inhibition du recrutement de GATA-1 pouvait constituer un mécanisme général d'inhibition de la transcription par FLI-1, j'ai ensuite recherché si l'augmentation du recrutement de GATA-1 après réduction du taux de protéine FLI-1 pouvait être retrouvée dans le cas du gène *globine α* , un autre gène dont le taux d'ARNm augmente après réduction du taux de protéine FLI-1 (Figure 33B). Pour cela, des cellules *shfli-1#44* ont été traitées par la doxycycline pendant 2 jours puis leur différenciation a été induite par l'HMBA. Avant ou après 1 jour de différenciation, la chromatine des cellules a été immunoprécipitée par un anticorps anti-HA, anti-GATA-1 ou anti-ARN polymérase II et la

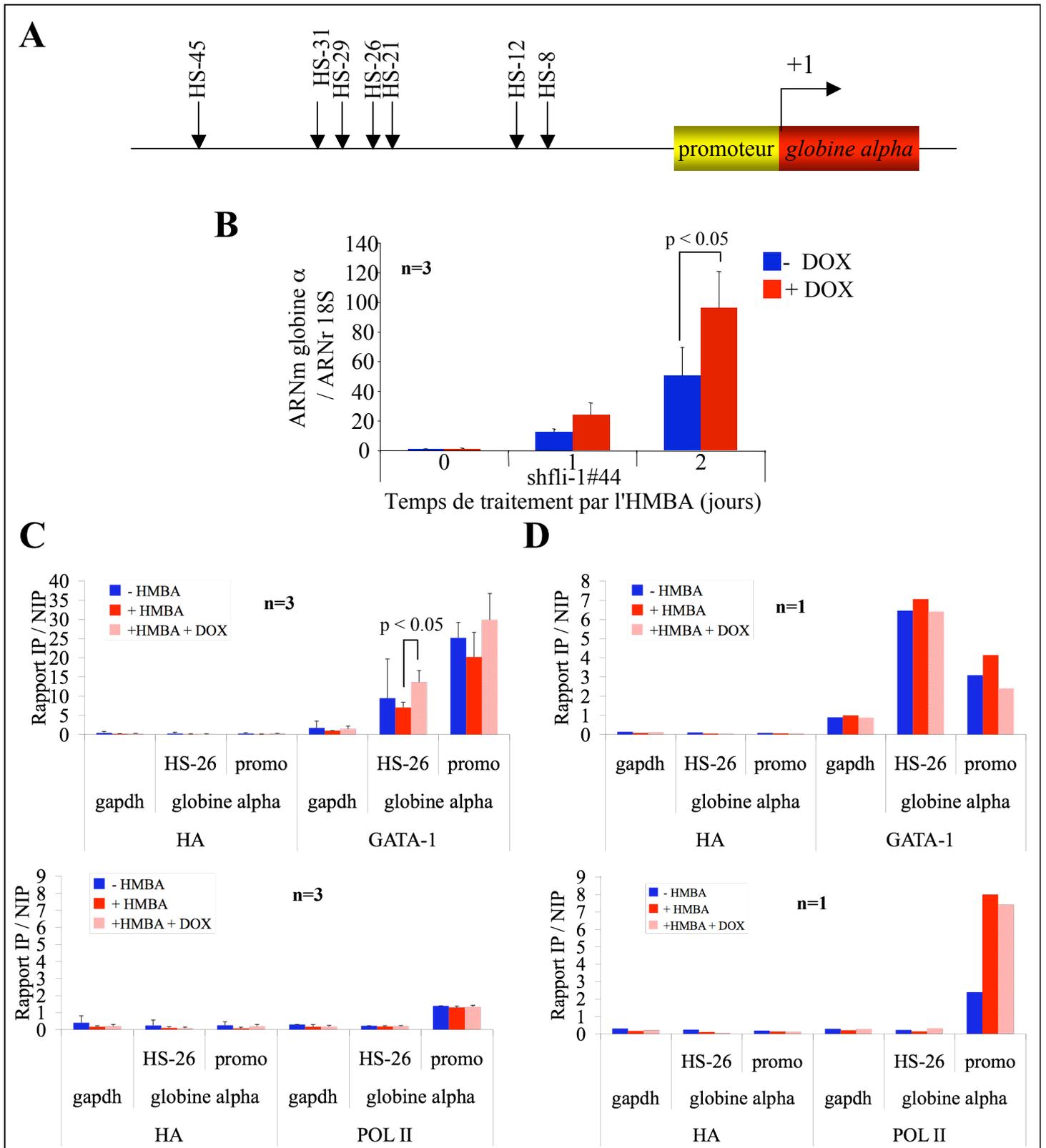


Figure 33 : L'augmentation du taux d'ARNm globine alpha après réduction du taux de FLI-1 est elle transcriptionnelle?

(A) Représentation schématique des régions régulatrices du gène *globine alpha*

(B) Analyse par RT-PCR quantitative du taux d'ARNm globine alpha, rapporté au taux d'ARNr 18S, au cours de la différenciation de cellules shfli-1#44 en absence ou en présence de doxycycline.

(C) et (D) Analyse par PCR quantitative de la chromatine de cellulules shfli-1#44 induites à se différencier pendant 1 jour (C) ou 2 jours (D) en absence ou en présence de doxycycline. La figure représente le rapport entre le signal obtenu après immunoprécipitation par un anticorps anti-HA, anti-GATA-1 ou anti-ARN polymérase II et le signal obtenu avant immunoprécipitation.

présence du promoteur du gène *globine α* , de la région régulatrice du gène *globine α* HS-26, ainsi que le gène contrôle *gapdh* a été mesurée par PCR quantitative (Figure 33C).

Nous pouvons voir que la doxycycline induit une augmentation du recrutement de GATA-1 sur la région régulatrice HS-26 du gène *globine α* après un jour de différenciation (Figure 33C, partie supérieure). L'activation transcriptionnelle du gène *globine α* au cours de la différenciation des cellules MEL est associée à une augmentation du recrutement de l'ARN polymérase II sur le promoteur de ce gène (Anguita et al., 2004). De manière surprenante, je n'ai pas observé d'augmentation du recrutement de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène *globine α* dans les cellules *shfli-1#44* après un jour de traitement par l'HMBA que ce soit en absence ou en présence de doxycycline (Figure 33C, partie inférieure), bien qu'à ce stade j'ai observé une augmentation du taux d'ARNm *globine α* , elle-même amplifiée par la doxycycline (Figure 33B).

Les expériences décrivant une augmentation du recrutement de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène *globine α* ont été réalisées plus tardivement au cours de la différenciation (Anguita et al., 2004). J'ai donc répété les expériences d'immunoprécipitation de chromatine présentées sur la Figure 33C, mais après 2 jours de traitement par l'HMBA au lieu d'un seul (Figure 33D). Nous pouvons voir qu'après 2 jours de traitement, l'HMBA induit une augmentation du recrutement de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène *globine α* , recrutement qui n'est pas modifié par la doxycycline (Figure 33D, partie inférieure). Dans ces conditions, l'augmentation du recrutement de GATA-1 sur la région HS-26 en présence de doxycycline n'est plus observé (Figure 33D, partie supérieure). Cependant, il reste très difficile de prendre en compte ce résultat étant donné la faible efficacité d'immunoprécipitation obtenue avec l'anticorps anti-GATA-1 lors de cette expérience (enrichissement de seulement 3 fois par rapport au gène contrôle *gapdh* en absence d'HMBA

alors que cet enrichissement est en moyenne de 25 fois sur les expériences présentées sur la Figure 33C).

Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation du taux d'ARNm globine α observé après un jour de différenciation n'est pas due à une activation transcriptionnelle du gène *globine α* et que la réduction du taux de protéine FLI-1 induit une augmentation du taux d'ARNm globine α indépendamment de sa transcription. Enfin, ils ne permettent pas de conclure quant au rôle de l'augmentation du recrutement de GATA-1 sur la région HS-26 observé après un jour de différenciation.

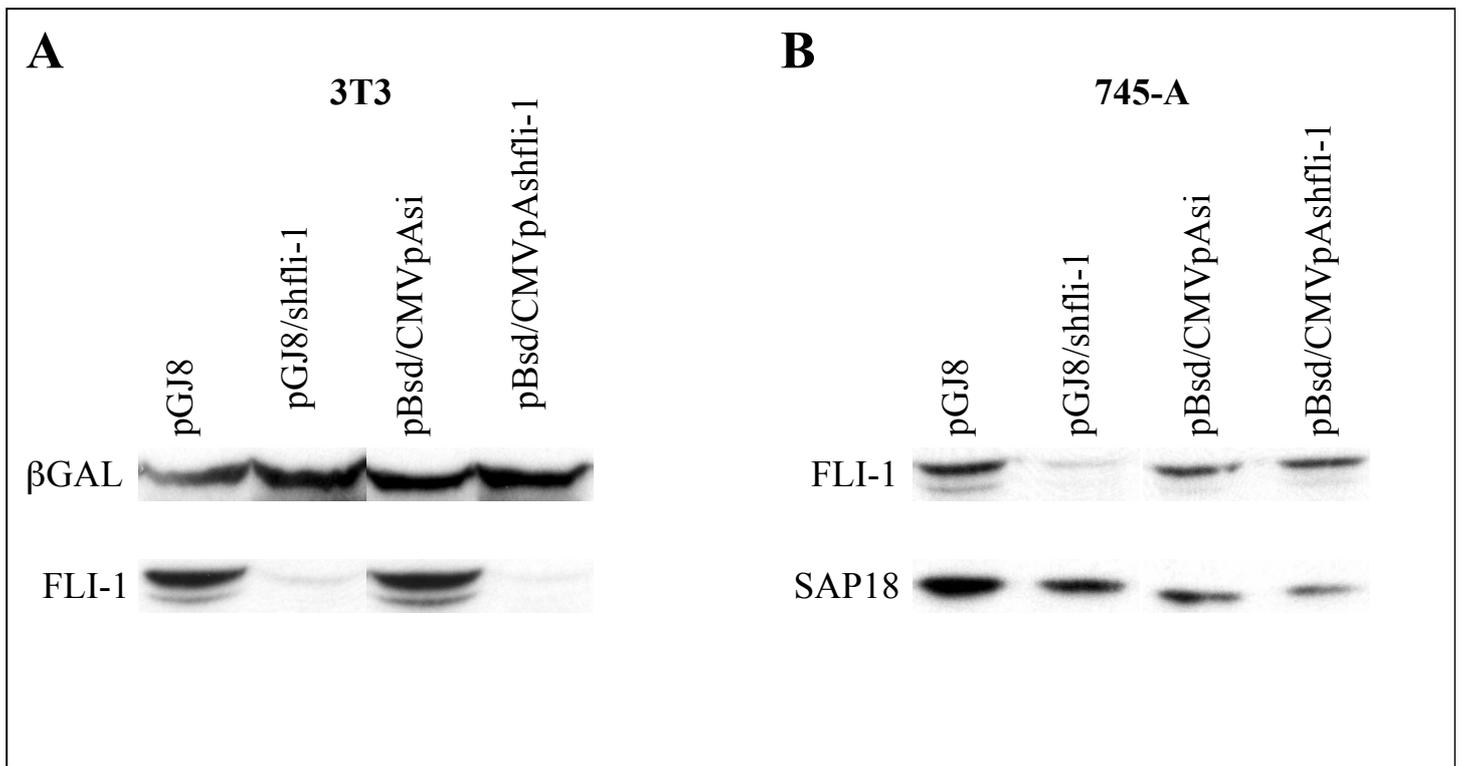


Figure 34 : Le vecteur pBsd/CMVpAshfli-1 ne réduit pas le taux de protéine FLI-1 endogène de cellules 745-A

(A) Analyse en western blot du taux de protéine FLI-1 de cellules 3T3 cotransfectées par les vecteurs pEF-FLI, CMV-BGAL et pGJ8, pGJ8/shfli-1, pBsd/CMVpAsi ou pBsd/CMVpAshfli-1. L'analyse du taux de protéine βGAL est présentée comme contrôle de charge.

(B) Analyse en western blot du taux de protéine FLI-1 de cellules 745-A transfectées par le vecteur pGJ8, pGJ8/shfli-1, pBsd/CMVpAsi ou pBsd/CMVpAshfli-1 puis sélectionnées pendant 4 jours par la blasticidine. L'analyse du taux de protéine SAP18 est présentée comme contrôle de charge.

Deuxième partie : Mise au point de nouveaux systèmes inductibles de production de shRNA

Un des objectifs de ma thèse a été de tenter de mettre au point un système de production inductible et tissu-spécifique de shRNA applicable à la transgénèse de manière à offrir une alternative à l'utilisation de la recombinaison homologue pour l'inactivation conditionnelle des gènes. Au début de ma thèse, les systèmes de production inductibles de shRNA disponibles étaient tous basés sur la répression d'un promoteur spécifique de l'ARN polymérase III par un facteur exogène, et de sa dérégulation inductible par la doxycycline. Par conséquent, ces systèmes n'étaient pas applicables à la répression tissu-spécifique de l'expression de gènes car ils nécessitaient la production du facteur répresseur exogène dans tous les tissus. Nous avons donc tenté de développer 2 nouveaux systèmes de production inductible de shRNA, le premier étant basé sur l'utilisation d'un promoteur CMV et le second sur la création d'un nouveau promoteur U6.

I- Production de shRNA à partir d'un promoteur CMV

Il a été démontré la possibilité de produire des shRNA à partir d'un promoteur CMV (Xia et al., 2002). Nous avons donc envisagé la possibilité d'appliquer le système "Tet-on" à la production de shRNA. Ce système repose sur l'utilisation d'un promoteur CMV inactif associé à une séquence TRE (Tetracycline Responsive Element). Ce promoteur peut être activé spécifiquement en présence de doxycycline par une protéine fusion rtTA associant le domaine de liaison à l'ADN de la protéine bactérienne rTETR et le domaine transactivateur de la protéine virale VP16. Nous avons d'abord souhaité reproduire les résultats précédemment publiés par Xia et al. (2002). Le vecteur pBsd/CMVpAsi a été construit en collaboration avec la société Transat. Une séquence shRNA dirigée contre *fli-1* (séquence shfli-1) a été placée sous contrôle du promoteur CMV dans le vecteur pBsd/CMVpAsi.

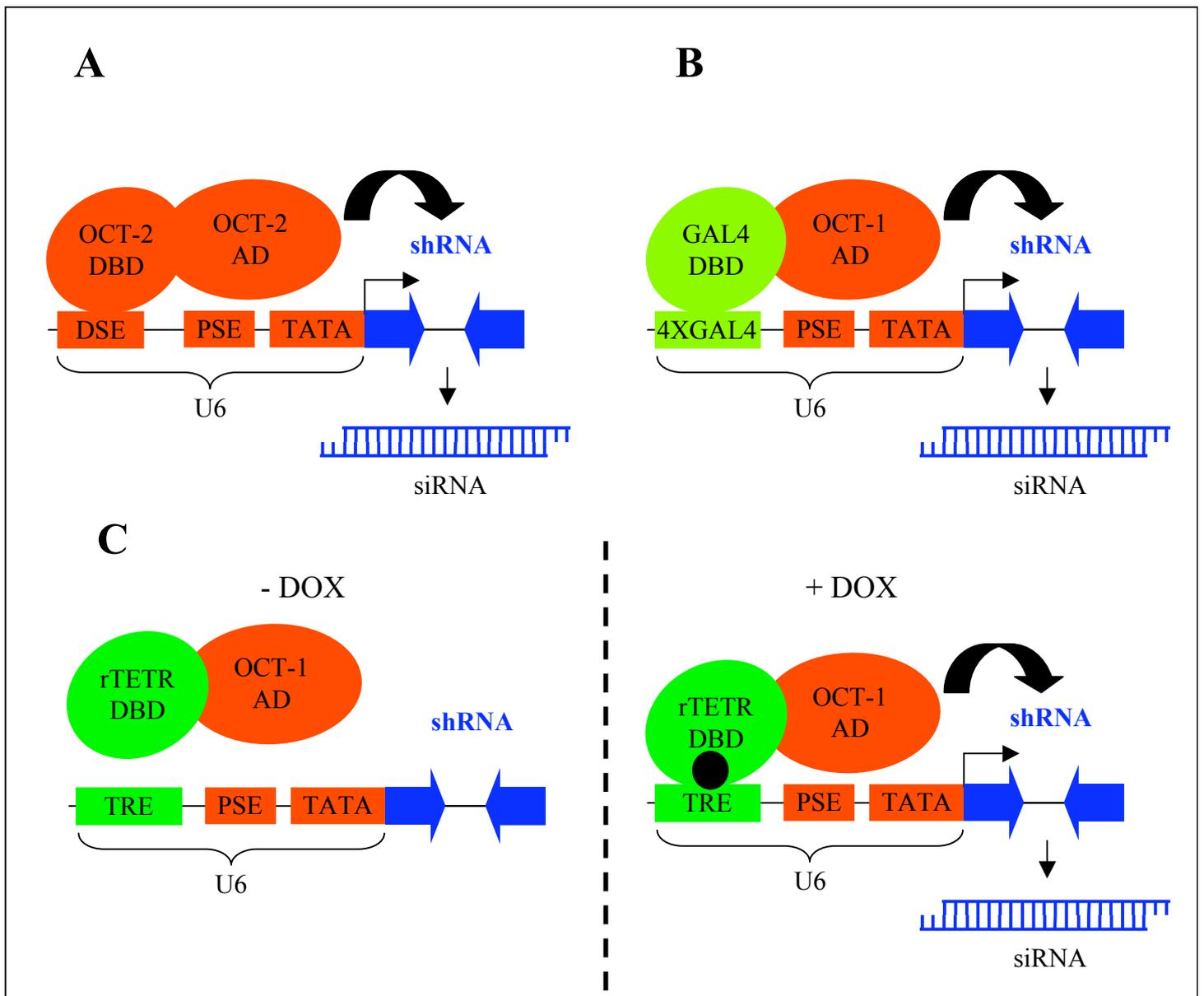


Figure 35 : Représentation schématique du fonctionnement du promoteur TREU6

(A) Représentation schématique de la production de shRNA à partir d'un promoteur U6 natif. Le promoteur U6 est normalement composé de 3 éléments essentiels : un élément distal (DES), un élément proximal (PSE) et la boîte TATA (TATA). Le facteur OCT-2 se fixe sur le DSE

(B) Représentation schématique du fonctionnement du promoteur GAL4-U6. L'élément DSE a été remplacé par 4 sites de fixation au facteur GAL4 rendant l'activité du promoteur dépendante d'une protéine fusion associant le domaine de liaison du facteur GAL4 et le domaine d'activation du facteur OCT-1.

(C) Représentation schématique du fonctionnement du promoteur TREU6. Ici, l'élément DSE a été remplacé par l'élément TRE permettant la fixation de la protéine rTETR en présence de doxycycline. Ainsi, le promoteur TREU6 devrait pouvoir être activé par une protéine fusion associant le domaine de liaison à l'ADN de la protéine rTETR et le domaine transactivateur du facteur OCT-1 spécifiquement en présence de doxycycline.

Afin de valider la capacité du vecteur pBsd/CMVpAshfli-1 de réduire l'expression du gène *fli-1*, des cellules 3T3 ont été cotransfectées par les vecteurs pEF-FLI, CMV-βGAL et pGJ8/shfli-1 ou pBsd/CMVpAshfli-1 et le taux de protéine FLI-1 et βGAL a été analysé par western blot 2 jours plus tard (Figure 34A). Comme attendu, la transfection du vecteur pGJ8/shfli-1 induit une forte réduction du taux de protéine FLI-1 comparé au vecteur vide pGJ8. De la même manière, la transfection du vecteur pBsd/CMVpAshfli-1 induit une réduction du taux de protéine FLI-1 comparé au vecteur vide pBsd/CMVpAsi.

Nous avons ensuite recherché la capacité du vecteur pBsd/CMVpAshfli-1 de réduire l'expression du gène *fli-1* endogène dans les cellules 745-A. Pour cela, des cellules 745-A ont été transfectées par le vecteur pGJ8/shfli-1 ou pBsd/CMVpAshfli-1 et le taux de protéine FLI-1 et SAP18 a été analysé par western blot après 4 jours de sélection par la blasticidine (Figure 34B). Comme nous l'avons déjà observé, la transfection du vecteur pGJ8/shfli-1 induit une forte réduction du taux de protéine FLI-1 comparé au vecteur vide pGJ8. En revanche, la transfection du vecteur pBsd/CMVpAshfli-1, comme le vecteur pBsd/CMVpAsi, n'a aucun effet sur le taux de protéine FLI-1.

Ces résultats montrent donc que le vecteur pBsd/CMVpAshfli-1 permet la répression de l'expression d'un transgène *fli-1* exprimé de manière transitoire dans les cellules 3T3, mais il ne permet pas la répression de l'expression du gène *fli-1* endogène dans les cellules 745-A.

II- Mise au point d'un nouveau promoteur U6

Au cours de ma thèse, un nouveau principe de production inductible de shRNA à partir d'un promoteur U6 a été décrit (Gupta et al., 2004). Le principe de ce système (Figure 35B) consiste à rendre l'activité du promoteur U6 dépendante d'une protéine de fusion exogène. Cela a été fait en remplaçant, dans le promoteur U6, le site de fixation du facteur de transcription OCT-2 (facteur déterminant pour l'activité normale du promoteur U6 d'après les

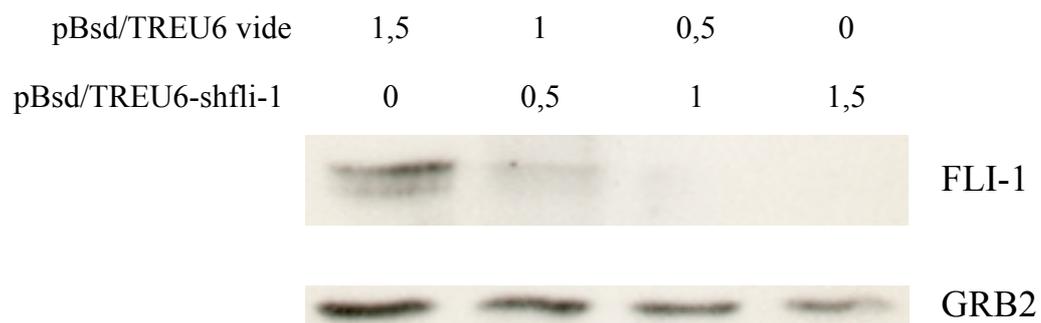


Figure 36 : Fuite d'expression du promoteur TREU6 dans les cellules 745-A

Analyse du taux de protéine FLI-1 de cellules 745-A transfectées par différentes quantités (en μg) de vecteur pBsd/TREU6 et pBsd/TREU6-shfli-1 puis sélectionnées par la blasticidine pendant 4 jours. L'analyse du taux de protéine GRB2 est présentée comme contrôle de charge.

auteurs) par un site de fixation du facteur GAL4. Ainsi, ce promoteur peut être activé par une protéine de fusion regroupant le domaine de liaison à l'ADN du facteur GAL4 et le domaine transactivateur du facteur OCT-1. Il suffit donc de produire cette protéine de fusion de manière inductible et tissu-spécifique pour obtenir une répression conditionnelle et tissu-spécifique de l'expression du gène ciblé. Cependant, ce système reste très lourd à mettre en oeuvre puisqu'il nécessite l'utilisation de 3 vecteurs rétroviraux différents.

En collaboration avec J. Thérier, nous avons pensé à simplifier ce système (Figure 35C), l'idée étant de remplacer, dans le promoteur U6, le site de fixation au facteur GAL4 par une séquence TRE (Tetracycline Responsive Element). Ainsi, ce promoteur inactif devrait être activé, spécifiquement en présence de doxycycline, par une protéine de fusion associant le domaine transactivateur du facteur OCT-1 au domaine de liaison à l'ADN rTETR.

Afin de vérifier que le promoteur modifié TREU6 est bien inactif en absence de la protéine de fusion et de doxycycline, des cellules 745-A ont été transfectées par des quantités croissantes de vecteur pBsd/TREU6-shfli-1, cultivées en présence de blasticidine pendant 4 jours. L'analyse du taux de protéine FLI-1 réalisée par western blot (Figure 36) montre une réduction systématique du taux de protéine FLI-1 dans les cellules transfectées par le vecteur pBsd/TREU6-shfli-1 comparé aux cellules transfectées par le vecteur vide, et ceci même lors de la transfection d'une faible dose de vecteur pBsd/TREU6-shfli-1.

Ces résultats montrent donc que le promoteur TRE-U6 est actif dans les cellules 745-A malgré l'absence de la protéine fusion rTETR-OCT2 et de doxycycline. Par conséquent, ces résultats excluent la possibilité d'application de ce promoteur TREU6 pour la transgénèse tissu-spécifique et inductible.

<i>III- Transfection et mesure de l'activité de gènes rapporteurs</i>	<i>124</i>
<i>IV- Western blot</i>	<i>125</i>
<i>V- RT-PCR quantitative</i>	<i>126</i>
<i>VI- Immunoprécipitation de chromatine.....</i>	<i>127</i>
<i>VII- Mesure de la demi-vie de P27.....</i>	<i>129</i>
<i>VIII- Analyse globale du transcriptome</i>	<i>130</i>
<i>ANNEXES.....</i>	<i>132</i>
<i>Article 1</i>	<i>132</i>
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	<i>133</i>

DISCUSSION

DISCUSSION

I- Coopération entre SPI-1 / PU.1 et FLI-1

Afin de déterminer le rôle du facteur FLI-1 endogène dans les cellules érythroleucémiques de Friend induites par le virus SFFV, j'ai choisi une stratégie de répression inductible de l'expression de *fli-1* via l'utilisation de shRNA.

Les résultats obtenus suite à la réduction du taux de protéine FLI-1 dans les cellules érythroleucémiques 745-A suggèrent une implication du facteur FLI-1 endogène dans la clonogénicité, le blocage de la différenciation et la survie des cellules érythroleucémiques présentant une activation transcriptionnelle du gène *spi-1*. La réduction du taux de protéine FLI-1 dans les cellules 745A induit en effet une forte réduction de la prolifération des cellules en milieu semi-solide même en présence de SPI-1, une accélération de l'arrêt de prolifération et de la cinétique de différenciation induite par l'HMBA, ainsi qu'une mort des cellules par apoptose aux temps tardifs de différenciation. Bien que la réduction du taux de protéine FLI-1 induise une forte réduction de la prolifération, elle n'est pas suffisante pour provoquer la différenciation spontanée des cellules comme cela a été observé lors de la réduction de l'expression de *spi-1* (Atar & Levi, 2005; Papetti & Skoultchi, 2007). Ces résultats suggèrent que FLI-1 n'est pas le facteur limitant empêchant la différenciation des cellules 745A. Ceci n'est finalement pas très surprenant car le facteur SPI-1 est directement capable de bloquer la différenciation via notamment une répression transcriptionnelle directe de plusieurs gènes érythrocytaires comme les gènes *globine α* et *globine β* (Stopka et al., 2005). En revanche, lorsque la différenciation est induite par l'HMBA, le taux de protéine SPI-1 diminue et elle est plus rapide après réduction du taux de protéine FLI-1 comme en témoignent l'accélération du blocage en phase G1 du cycle cellulaire et l'accélération de l'hémoglobinisation des cellules.

Ces résultats montrent donc que le taux de protéine FLI-1 n'est pas le facteur limitant mais qu'il participe au blocage de la différenciation érythroïde des cellules 745A. Enfin, la réduction du taux de protéine FLI-1 est associée à une mort cellulaire par apoptose aux temps tardifs de différenciation, démontrant la participation du facteur FLI-1 endogène à la survie des cellules 745A. En accord avec ces résultats, la réduction du taux de protéine FLI-1 dans la lignée érythroleucémique NN10, présentant une activation transcriptionnelle du gène *fli-1* par insertion provirale et n'exprimant pas *spi-1*, induit un arrêt de la prolifération associé à l'hémoglobinisation des cellules et une mort par apoptose (Guillaume Giraud, résultats non présentés). Ces résultats mettent donc en évidence l'importance de l'activation transcriptionnelle par SPI-1 du gène *fli-1* dans les cellules érythroleucémiques présentant une activation de *spi-1*. Afin de confirmer directement cette coopération, il est envisagé de mesurer l'effet combiné de la réduction de l'expression à la fois de *spi-1* et de *fli-1* dans les cellules 745A en absence d'HMBA. En effet, la réduction de l'expression de *spi-1* dans des cellules érythroleucémiques induites par le virus SFFV est associée à une réduction de la prolifération et à une différenciation spontanée de certaines cellules (Atar & Levi, 2005; Papetti & Skoultschi, 2007; Stopka et al., 2005). Nous nous attendons donc à ce que la réduction de l'expression de *fli-1* accentue cette réduction de prolifération ainsi que la différenciation spontanée, et qu'elle induise également une mort des cellules par apoptose.

Plusieurs données dans la littérature ont montré que certains shRNA pouvaient induire des effets non spécifiques indépendants de la réduction de l'expression du gène ciblé. Par conséquent, une grosse partie de mon travail de thèse a été de vérifier que les phénotypes décrits ci-dessus étaient effectivement spécifiques de la réduction du taux de protéine FLI-1.

Tout d'abord, l'expression de certains shRNA peut activer l'expression de gènes tels que *oas1* et *ifit1* normalement activés par l'interféron (Bridge et al., 2003; Jackson et al.,

2003; Pebernard & Iggo, 2004; Sledz et al., 2003). Dans la majorité des études ayant recours à l'utilisation de l'interférence par l'ARN, les auteurs utilisent comme contrôle négatif un shRNA ayant une séquence aléatoire et n'induisant pas de phénotype comparés aux shRNA spécifiques. Ce contrôle permet théoriquement d'exclure un éventuel effet non spécifique des shRNA simplement dû à la présence d'ARN double brin dans les cellules. Cependant, il a été démontré que l'activation de l'expression du gène *oas1* pouvait dépendre de la séquence du shRNA. En effet, certains shRNA dirigés contre le gène *morf411* activent l'expression de *oas1* alors que d'autres ne l'activent pas (Bridge et al., 2003). Par conséquent, l'utilisation d'un shRNA de séquence aléatoire ne semblait pas un contrôle suffisant pour exclure un effet non spécifique de la réduction de l'expression de *fli-1*. Dans un premier temps, afin d'exclure l'induction d'une réponse de type interféron par les shRNA shfli-1 et shfli-2, j'ai mesuré leur effet sur l'expression des gènes *oas1* et *ifit1*. J'ai ainsi pu montrer par des analyses en RT-PCR quantitative que la doxycycline n'induit pas d'augmentation de l'expression de ces gènes dans les cellules shfli-1#44 et shfli-2#1, ce qui suggère que l'expression des shRNA shfli-1 et shfli-2 ne provoque pas de réponse de type interféron dans les cellules 745-A. L'analyse globale du transcriptome des cellules shfli-1#44 réalisée dans le cadre du programme CIT de La Ligue Nationale Contre Le Cancer a également montré l'absence d'effet de la doxycycline sur un groupe de plusieurs autres gènes connus pour être activés par l'interféron que ce soit en absence ou en présence d'HMBA (Résultats non présentés).

Le deuxième effet non spécifique envisageable lors de l'utilisation de l'interférence par l'ARN est la possibilité que le shRNA réprime l'expression d'un ou de plusieurs autres gènes en plus du gène ciblé. Cet effet non spécifique est appelé effet "off target". Afin de réduire la probabilité que les phénotypes induits par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44 soient dus à un effet "off-target", j'ai utilisé une deuxième séquence shRNA dirigée contre une autre région du gène *fli-1*. L'utilisation de cette deuxième séquence shRNA dans les cellules shfli-

2#1 a permis de reproduire les phénotypes induits par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44, à savoir une réduction de la clonogénicité, une accélération du blocage en phase G1 du cycle cellulaire et de la différenciation après traitement par l'HMBA, ainsi qu'une mort cellulaire par apoptose dans les temps tardifs de différenciation.

Afin d'assurer la spécificité de la réduction de l'expression de *fli-1*, j'ai recherché si la ré-expression d'un transgène *fli-1* pouvait empêcher ces phénotypes. Pour cela, j'ai construit le vecteur pcDNA4/TO/flishmut. Ce vecteur contient un transgène *fli-1*, possédant 2 mutations silencieuses dans la séquence reconnue par le shRNA shfli-1, sous contrôle d'un promoteur CMV dont l'activité peut-être réprimée par la protéine TETR. J'ai choisi une expression inductible afin d'éviter les biais de sélection pouvant être liés à la surexpression constitutive d'un proto-oncogène. La transfection du vecteur pcDNA4/TO/flishmut dans les cellules shfli-1#44 puis la sélection par la zéocine m'a permis de dériver plusieurs clones isolés dont le clone shmut#13. Le traitement de ce clone par la doxycycline induit toujours une réduction de l'expression du gène *fli-1* endogène, comme dans le clone shfli-1#44. En revanche, il induit également la production d'une protéine FLI-1 exogène, à un niveau équivalent au niveau de protéine FLI-1 endogène présent en absence de doxycycline. J'ai ainsi montré grâce à ce clone que la ré-expression de *fli-1* dans les cellules shfli-1#44 permet de rétablir la clonogénicité des cellules. En revanche, j'ai montré que cette ré-expression de *fli-1* n'annule que partiellement les phénotypes observés au cours du traitement par l'HMBA. En effet, elle n'empêche que très peu l'effet sur l'accélération du blocage en phase G1 du cycle cellulaire (observée dès le premier jour de traitement par l'HMBA) et elle annule seulement en partie l'accélération de l'hémoglobinisation (observée à partir du deuxième jour de traitement) et la mort cellulaire (observée à partir du troisième jour de traitement). Cette restauration seulement partielle des phénotypes induits par la doxycycline pourrait être expliquée par une différence de profil d'expression entre le gène endogène et le transgène *fli-1*. En effet, le

transgène *fli-1* est exprimé à partir d'un promoteur CMV inductible. L'activité du promoteur CMV n'est pas homogène dans toutes les phases du cycle cellulaire (de Boer et al., 2004), avec en particulier une activité plus faible en phase G1. Or, un des effets de l'HMBA sur les cellules est de les bloquer en phase G1 du cycle cellulaire. Il est donc envisageable que l'HMBA induise une réduction transitoire de l'expression du transgène *fli-1* dans les cellules shmut#13. Ceci pourrait expliquer la restauration seulement partielle des phénotypes induits par la doxycycline en présence d'HMBA. Pour tester cette hypothèse, il serait nécessaire de réaliser une cinétique d'expression précise du transgène *fli-1* dans les cellules shmut#13 en présence de doxycycline lors des temps précoces du traitement par l'HMBA. Ce problème pourrait être contourné par l'utilisation, à la place du promoteur CMV inductible, du promoteur endogène du gène *fli-1*, ceci afin que le transgène ait le même profil d'expression que le gène *fli-1* endogène. Ceci est d'autant plus intéressant que cela suggérerait la nécessité de la présence de FLI-1 spécifiquement à un moment précis du cycle cellulaire pour le blocage de la différenciation

Finalement, des résultats récents obtenus par Guillaume Giraud montrent que l'expression inductible d'un shRNA de séquence aléatoire dans les cellules 745/TR, n'induisant pas de réduction du taux de protéine FLI-1, n'a pas d'effet sur la clonogénicité des cellules, ni sur leur cinétique de différenciation (blocage en phase G1 du cycle cellulaire et hémoglobinisation) et elle ne provoque pas de mort cellulaire dans les temps tardifs de différenciation. Ces résultats montrent donc que les phénotypes induits par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44 et shfli-2#1 ne sont pas simplement dus à l'expression d'un shRNA quelconque.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggèrent donc très fortement que les phénotypes induits par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44 et shfli-2#1 sont spécifiques de la réduction de l'expression de *fli-1*.

II- Identification de réseaux de gènes régulés par FLI-1

Afin d'étudier les modes d'action par lesquels FLI-1 contribue à la transformation des cellules érythroleucémiques 745-A, j'ai recherché des gènes dont l'expression et/ou la fonction était modifiées après réduction du taux de protéine FLI-1.

J'ai tout d'abord recherché si l'expression de gènes, décrits comme étant des cibles activées par FLI-1 dans d'autres modèles cellulaires, était réduite dans les cellules 745-A après répression de l'expression de *fli-1*. La réduction de l'expression de *fli-1* est accompagnée d'une mort des cellules par apoptose au cours de la différenciation induite par un traitement par l'HMBA. Cependant, ceci n'est pas associé à une réduction de l'expression des gènes *bcl-2* et *bcl-xL*, qui sont connus pour être activés par FLI-1 (Lesault et al., 2002; Sarrazin, Résultats non publiés). De façon surprenante, j'ai mis en évidence une augmentation de l'expression du gène *slap*, qui a pourtant été décrit comme étant une cible activée par FLI-1 (Lebigot et al., 2003). J'ai également observé que la réduction du taux de protéine FLI-1 n'est pas associé à une diminution de l'expression des gènes *rb*, *mdm2* et *inpp5p* qui ont été décrits comme des gènes activés par FLI-1 (Ano et al., 2004; Tamir et al., 1999; Truong et al., 2005). Ces résultats a priori surprenants peuvent être expliqués par le fait que ces gènes ont été décrits comme activés par FLI-1 dans des modèles cellulaires différents des cellules 745-A et dans des contextes de surexpression de *fli-1*, ne garantissant pas leur régulation éventuelle par le facteur FLI-1 endogène. A titre d'exemple, l'identification des gènes régulés par la protéine de fusion EWS-FLI endogène suite à l'utilisation de vecteurs lentiviraux produisant des shRNA a montré des différences importantes comparé aux gènes préalablement décrits comme étant activés par la surexpression de cette protéine de fusion EWS-FLI (Owen & Lessnick, 2006). Ces observations conduisent donc à interpréter avec prudence les gènes cibles identifiés suite à la surexpression d'un facteur dans un système hétérologue. La concordance de résultats

obtenus dans des modèles hétérologues peut en revanche constituer un élément de robustesse lors de la recherche de gènes cibles.

Enfin, j'ai observé que la réduction de l'expression de *fli-1* s'accompagne d'une réduction de l'expression du gène *lmo2*, qui a été identifié comme une cible activée par FLI-1 (Landry et al., 2005). L'expression forcée de *lmo2* dans une lignée d'érythroblastes murins déficients pour *gata-1* bloque leur différenciation normalement induite par l'expression de *gata-1* (Visvader et al., 1997), suggérant un rôle inhibiteur de LMO2 sur la différenciation érythrocytaire tardive. La surexpression de *lmo2* bloque également la différenciation de cellules érythroleucémiques de Friend normalement induite par le DMSO (Hansson et al., 2007). En accord avec cet effet inhibiteur de LMO2 sur la différenciation érythrocytaire tardive, j'ai observé une réduction du taux d'ARNm *lmo2* d'environ 3 fois après un traitement de cellules 745-A de 2 jours par l'HMBA. L'expression réduite de *lmo2* observée après réduction du taux de protéine FLI-1 dans les cellules shfli-1#44 pourrait donc contribuer à l'accélération de la différenciation. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de rechercher si la réduction de l'expression de *lmo2* par l'utilisation de shRNA dans les cellules 745A reproduit, au moins en partie, l'accélération de la différenciation induite par la réduction du taux de protéine FLI-1.

Plusieurs données de la littérature suggèrent que le facteur P27^{kip1} est un facteur important dans le blocage dans la phase G1 du cycle cellulaire au cours de la différenciation érythrocytaire (Hsieh et al., 2000; Matushansky et al., 2000a; Matushansky et al., 2000b; Munoz-Alonso et al., 2005; Rylski et al., 2003; Tamir et al., 2000). J'ai montré que l'accumulation de la protéine P27^{KIP1} normalement observée au cours de la différenciation érythroïde des cellules shfli-1#44 est accélérée après réduction du taux de protéine FLI-1. La surexpression inductible de *p27^{kip1}* dans une lignée induite par le virus SFFV suffit à provoquer un blocage en phase G1 du cycle cellulaire (Matushansky et al., 2000a;

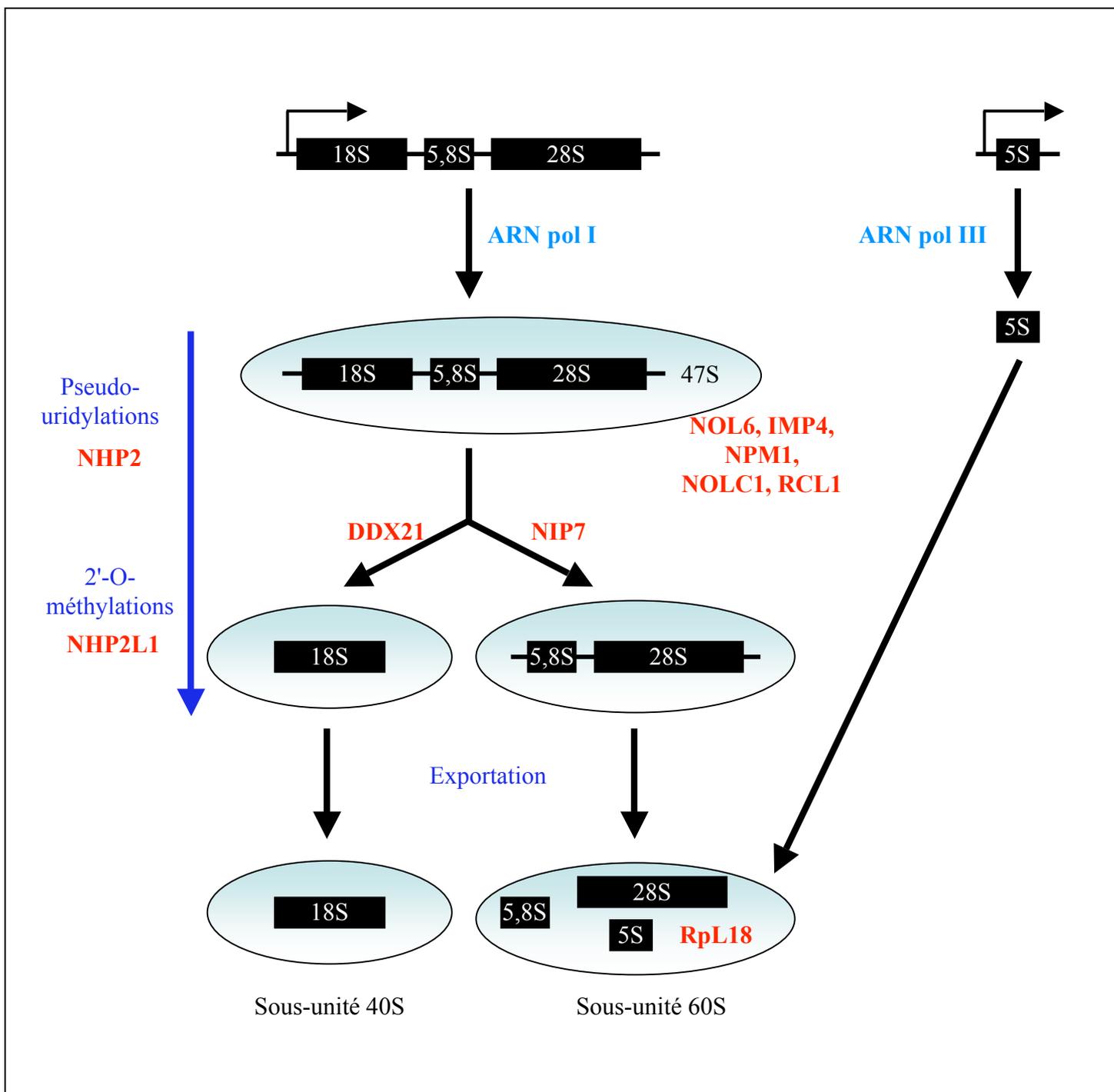


Figure 37 : Représentation schématique de la biogenèse des ribosomes.

Matushansky et al., 2000b). Nous pouvons donc penser que l'accélération de l'accumulation de P27^{KIP1} observée après réduction du taux de protéine FLI-1 participe au blocage plus rapide en phase G1 du cycle cellulaire. Une façon de confirmer cette hypothèse serait de produire de manière inductible un shRNA dirigé contre *p27^{kip1}* et de rechercher si la réduction du taux de protéine FLI-1 est toujours associée à une accélération du blocage en phase G1 du cycle cellulaire.

Afin de rechercher de nouveaux gènes cibles dont l'expression est régulée par FLI-1, nous avons effectué une analyse globale du transcriptome des cellules shfli-1#44. L'effet majeur de la répression de l'expression de *fli-1* dans les cellules 745-A est une accélération des phénotypes induits par l'HMBA (accélération de l'hémoglobinisation et de l'arrêt de prolifération induit par l'HMBA). Un des effets de l'HMBA étant une réduction de l'expression de *spi-1*, ceci suggère une coopération entre les facteurs SPI-1 / PU.1 et FLI-1 dans le blocage de la différenciation des cellules 745-A qui pourrait passer par la régulation de gènes communs. Afin d'identifier des gènes co-régulés à la fois par *spi-1* et *fli-1*, nous avons recherché des gènes dont l'expression était modifiée par l'HMBA (donc potentiellement régulés par *spi-1*) et pour lesquels cette modification était amplifiée par la doxycycline. Ceci a permis d'identifier un groupe de gènes dont l'expression diminue au cours de la différenciation et ceci de manière plus importante en présence de doxycycline et un autre groupe dont l'expression augmente au cours de la différenciation, ce qui est amplifié par la doxycycline.

Parmi les gènes dont la réduction de l'expression par l'HMBA est amplifiée par celle de *fli-1*, nous avons mis en évidence la présence de plusieurs gènes impliqués dans la transcription et/ou la maturation des ARN ribosomiques tels que les gènes *ddx21*, *imp4*, *myc*, *nhp211* et *nip7* (Figure 37). Une analyse par RT-PCR quantitative a permis de confirmer la réduction de l'expression de ces gènes par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44 au cours de la différenciation (Boris Guyot, résultats non présentés). La réduction de l'expression de

ces gènes a également été observée dans les cellules NN10/TR/shfli-1#5 (la lignée érythroleucémique NN10 présente une activation transcriptionnelle directe de *fli-1* par insertion provirale) après un traitement de 2 jours par la doxycycline (Boris Guyot, résultats non présentés). De plus, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont mis en évidence la présence du facteur FLI-1 sur les régions régulatrices de ces gènes dans les cellules shfli-1#44 (Boris Guyot, résultats non présentés), suggérant donc que FLI-1 pourrait être un activateur transcriptionnel d'un groupe de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes.

Parmi les gènes dont l'augmentation de l'expression par l'HMBA est amplifiée par la réduction de celle de *fli-1*, nous avons observé plusieurs gènes érythrocytaires dont les gènes *globine α* , *alas2* et *ahsp*, ainsi que le gène antiprolifératif *btg2*. Une analyse par RT-PCR quantitative a permis de confirmer l'augmentation de l'expression de ces gènes par la doxycycline dans les cellules shfli-1#44 au cours de la différenciation. Cette augmentation de l'expression de ces gènes a également été observée dans les cellules NN10/TR/shfli-1#5 après un traitement de 2 jours par la doxycycline. La surexpression de *btg2* dans différents modèles cellulaires induit un blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Guardavaccaro et al., 2000; Kawakubo et al., 2004; Lim et al., 1998). La lignée G1E-ER est une lignée érythroïde immortalisée issue de cellules souches embryonnaires déficientes pour le gène *gata-1*, et qui produisent une protéine de fusion associant la protéine GATA-1 au domaine de liaison à l'hormone du récepteur aux oestrogènes. L'activation par le β -oestradiol de cette protéine provoque la différenciation érythrocytaire des cellules G1E-ER, ce qui est associé à une augmentation du taux d'ARNm *btg2* (Rylski et al., 2003). Dans les cellules 745-A, le taux d'ARNm *btg2* augmente au cours de la différenciation induite par l'HMBA, et cette augmentation est amplifiée par la réduction du taux de protéine FLI-1. La régulation du gène *btg2* représentait donc une piste intéressante permettant d'expliquer l'accélération du blocage

des cellules 745-A en phase G1 du cycle cellulaire observée après réduction du taux de protéine FLI-1. J'ai montré que la réduction du taux de protéine FLI-1 augmente l'expression de *btg2*, comme en témoigne l'augmentation du recrutement de l'ARN polymérase II sur la séquence codante de ce gène. Cette augmentation de la transcription de *btg2* n'a pas pu être confirmée au niveau protéique car je n'ai pas réussi à détecter la protéine BTG2 endogène dans les cellules shfli-1#44 après 2 jours de traitement par l'HMBA. Ceci semble être lié au fait que l'anticorps que j'ai utilisé reconnaît la protéine BTG2 humaine avec plus d'efficacité que la protéine murine (Résultats non présentés). Afin de rechercher le rôle de l'augmentation de l'expression de *btg2* dans les propriétés oncogéniques de FLI-1, j'ai dérivé des lignées de cellules 745-A présentant l'expression inducible par la doxycycline d'un transgène *FLAG-btg2* humain. L'analyse de 2 clones isolés a montré que cette expression de *FLAG-btg2* n'a aucun effet sur la cinétique de différenciation des cellules 745-A (hémoglobinisation et blocage en phase G1 du cycle cellulaire). Cette absence d'effet n'est pas liée à un problème dû au vecteur d'expression car l'intégrité de la séquence du transgène *FLAG-btg2* a été vérifiée par séquençage. Il est peu probable que cette absence d'effet soit due à une différence de caractéristiques entre les protéines BTG2 humaine et murine car elles ont un taux d'identité de près de 96%. L'hypothèse que nous privilégions est liée au fait que le promoteur CMV inducible ne permet pas de reproduire l'expression du gène *btg2* endogène. Pour contourner ce problème, plutôt que de surexprimer *btg2*, j'ai tenté de réduire l'expression du gène *btg2* endogène dans les cellules shfli-1#44 grâce à l'expression constitutive de shRNA, et de rechercher si la réduction du taux de protéine FLI-1 induit toujours une accélération de la différenciation. Pour cela, j'ai utilisé 5 vecteurs commercialisés par SIGMA (MISSION shRNA, SHGLY-NM_007570, SIGMA) permettant la production de 5 shRNA différents contre le gène *btg2* murin à partir d'un promoteur U6. Parmi ces vecteurs, 2 ont permis de réduire l'expression d'un transgène *btg2* murin de plus de 90 % après co-transfection dans des

cellules HeLa (Résultats non présentés). J'ai dérivé plusieurs clones de cellules shfli-1#44 par transfection de chacun de ces 2 vecteurs. Cependant, les clones que j'ai testé présentent toujours une augmentation du taux d'ARNm *btg2* par l'HMBA qui est amplifiée par la doxycycline (Résultats non présentés). Je n'ai donc pas pu utiliser ces clones pour tester l'implication de l'augmentation du taux d'ARNm *btg2* dans l'accélération de la différenciation induite par la réduction de l'expression de *fli-1*.

III- Mise en évidence d'un rôle de FLI-1 dans la régulation de la traduction ?

L'un des mécanismes de régulation du niveau de protéine P27^{KIP1} le plus étudié est sa dégradation par le protéasome via son ubiquitination par un complexe protéique contenant le facteur SKP2 (Carrano et al., 1999). L'augmentation plus rapide du taux de protéine P27^{KIP1} induite par la réduction du taux de FLI-1 au cours de la différenciation étant post-transcriptionnelle, nous avons émis l'hypothèse que FLI-1 pourrait augmenter la dégradation de P27^{KIP1} via une activation de l'expression de *skp2*. En accord avec cette hypothèse, j'ai observé que la réduction du taux de FLI-1 provoque une diminution plus rapide du taux de protéine et d'ARNm *skp2* normalement observée au cours de la différenciation des cellules shfli-1#44. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine réalisées sur les cellules shfli-1#44 n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de l'ARN polymérase II sur la séquence codante du gène *skp2* même en absence de doxycycline. Cependant, la stabilité des ARNm *skp2* n'étant pas modifiée par la réduction du taux de protéine FLI-1, ceci suggère par défaut que la réduction du taux d'ARNm *skp2* est due à une diminution de la transcription du gène *skp2*. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont montré que FLI-1 est présent au niveau du promoteur du gène *skp2*, qui contient 4 sites potentiels de liaison à l'ADN

de FLI-1 conservés entre l'homme et la souris, suggérant une activation directe par FLI-1 de la transcription de *skp2*.

Afin de rechercher l'implication de la réduction du taux de protéine SKP2 dans le phénotype induit par la réduction de l'expression de *fli-1*, j'ai exprimé de manière inducible un transgène *HA-skp2* humain dans les cellules shfli-1#44. Cependant, l'expression de ce transgène n'a pas permis de sauver le phénotype induit par la réduction du taux de FLI-1. En effet, les clones dérivés à partir des cellules shfli-1#44 et exprimant ce transgène présentent toujours une accélération du blocage en phase G1 du cycle cellulaire associée à une accumulation plus rapide de P27^{KIP1}, ceci de manière équivalente aux cellules shfli-1#44. Ceci ne semble pas être lié au fait que le gène utilisé soit le gène *skp2* humain car la protéine SKP2 humaine est capable d'induire l'ubiquitination et la dégradation de la protéine P27^{KIP1} murine (M. Pagano, communication personnelle). Il ne s'agit pas non plus d'un problème dû au vecteur car j'ai vérifié par séquençage l'intégrité de la séquence du transgène *skp2*. En revanche, ceci pourrait être dû au fait que le promoteur CMV inducible ne reproduit pas l'expression du gène *skp2* endogène. Ainsi, pour contourner ce problème, plutôt que de surexprimer *skp2*, il pourrait être envisagé de rechercher si la réduction de l'expression du gène *skp2* endogène dans les cellules 745-A reproduit, au moins en partie, l'accélération de l'accumulation du taux de protéine P27^{KIP1} et du blocage en phase G1 du cycle cellulaire induit par la réduction du taux de protéine FLI-1. Il est également possible que la seule surexpression de *skp2* ne suffise pas à compenser l'ensemble des processus modifiés par la réduction du taux de protéine FLI-1. Enfin, il n'est pas à exclure que la régulation de l'expression de *skp2* par FLI-1 n'ait aucune fonction dans les cellules 745-A. Indépendamment du rôle de SKP2 dans les phénotypes induits par la réduction du taux de protéine FLI-1, j'ai observé que l'expression forcée de *HA-skp2* dans les cellules 745/TR n'induit pas de modification de la cinétique de blocage en phase G1 du cycle cellulaire ni de modification

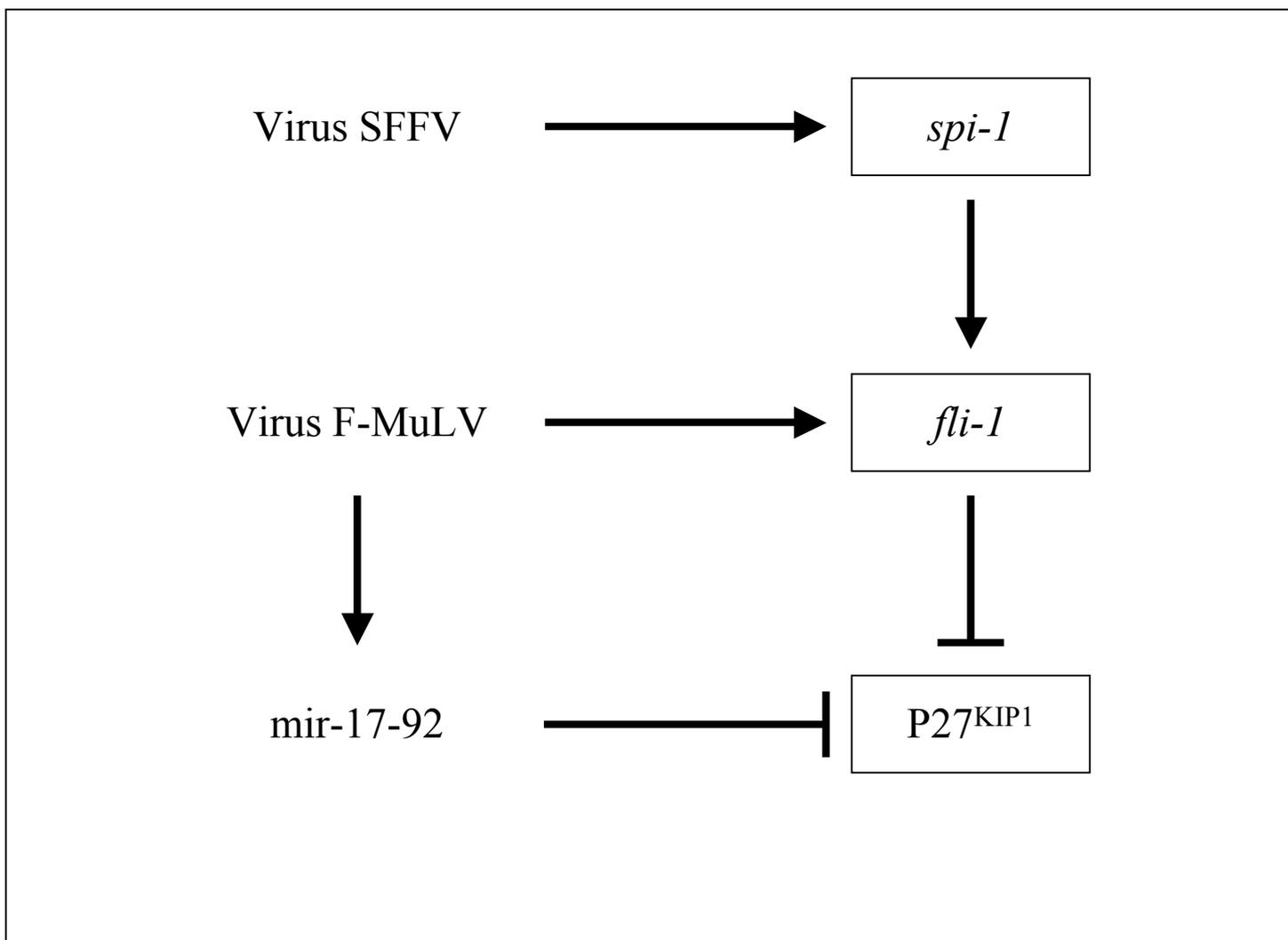


Figure 38 : Inhibition récurrente de la synthèse de P27^{KIP1} dans les érythroleucémies de Friend

dans la cinétique d'accumulation de la protéine P27^{KIP1} au cours de la différenciation induite par l'HMBA. Cette dernière observation pourrait suggérer que le taux de protéine P27^{KIP1} n'est pas régulé via sa dégradation par le facteur SKP2 dans les cellules érythroleucémiques de Friend. Cependant, avant de conclure définitivement, il serait là aussi nécessaire de vérifier si cette absence d'effet n'est pas simplement due au fait que le promoteur CMV inductible ne reproduit pas l'expression du gène *skp2* endogène.

J'ai ensuite montré que cette accélération de l'accumulation de P27^{KIP1} est corrélée à une augmentation de son taux de synthèse et non pas de sa stabilité. De plus, la réduction du taux de protéine FLI-1 n'a pas d'effet sur la synthèse protéique globale, ce qui suggère un rôle de FLI-1 spécifiquement sur la synthèse de P27^{KIP1}. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'un nouveau site d'insertion, appelé Fli-3, du virus F-MuLV a récemment été mis en évidence (Cui et al., 2007). L'insertion au niveau de ce locus conduit à la surexpression d'un cluster de microRNA, le mir-17-92, dont l'expression forcée dans la lignée érythroleucémique HB60 provoque une réduction de la synthèse de P27^{KIP1}. L'ensemble de ces résultats met donc en évidence le fait que la réduction de la synthèse de l'inhibiteur de cycline kinase P27^{KIP1} semble être un mécanisme commun permettant d'assurer la prolifération des cellules érythroleucémiques de Friend (Figure 38). Il pourrait même être envisageable que FLI-1 soit un activateur de l'expression du mir-17-92. Cependant, le fait qu'il n'y ait pas de corrélation entre le niveau d'expression de *fli-1* et le mir-17-92 dans différentes lignées érythroleucémiques ne va pas dans le sens d'une régulation du mir-17-92 par FLI-1.

Un des mécanismes de régulation de la traduction de P27^{KIP1} est associé à la présence d'une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) dans la région 5' UTR (5' Untranslated Region) de l'ARNm p27^{kip1} (Cho et al., 2005; Gopfert et al., 2003; Jiang et al., 2007; Millard et al., 2000). Afin de rechercher l'implication de cette séquence 5' UTR dans la régulation de la synthèse de P27^{KIP1} par FLI-1, celle-ci a été clonée en amont d'un gène rapporteur et des

expériences de transfection transitoire dans les cellules shfli-1#44 en absence ou en présence de doxycycline sont actuellement en cours. La mutation du gène *dkc1*, qui code une pseudo-uridine synthase modifiant les ARN ribosomiques, est associée à un défaut de la traduction spécifiquement des ARNm contenant une séquence IRES, parmi lesquels l'ARNm p27^{kip1} (Yoon et al., 2006). De même, dans les anémies Diamond-Blackfan, la mutation du gène *rps19* codant une protéine ribosomique nécessaire à la maturation de la sous-unité 40S du ribosome est associée à une augmentation du taux de protéine P27^{KIP1} (Miyake et al., 2007). Ainsi, des défauts de maturation des ribosomes peuvent être associés à des modifications de la traduction de l'ARNm p27^{kip1}. Or, parmi les gènes cibles activés par FLI-1 nous avons identifié plusieurs gènes impliqués dans la transcription et/ou la synthèse des ARN ribosomiques. Il apparaît donc envisageable que le facteur FLI-1 puisse inhiber la synthèse de P27^{KIP1} en modifiant la qualité des ribosomes dans les cellules et en favorisant la production de ribosomes incapables d'assurer une traduction IRES-dépendante. Si cette hypothèse est exacte, on devrait s'attendre à trouver des ARNm différents associés aux polysomes en absence et en présence de FLI-1. Dans cette optique, il pourrait être envisagé de réaliser une analyse globale des ARNm purifiés à partir des polysomes des cellules shfli-1#44 en absence et en présence de doxycycline.

Le mécanisme permettant l'accumulation de P27^{KIP1} au cours de la différenciation érythrocytaire est actuellement inconnu. Les seules données disponibles ont été obtenues sur des lignées cellulaires. Tout d'abord, la lignée G1E-ER est une lignée érythroïde immortalisée issue de cellules souches embryonnaires déficientes pour le gène *gata-1*, et qui produisent une protéine de fusion associant la protéine GATA-1 au domaine de liaison à l'hormone du récepteur aux oestrogènes. L'activation par le β -oestradiol de cette protéine provoque la différenciation érythrocytaire des cellules G1E-ER, ce qui est associé à une augmentation du taux d'ARNm p27^{kip1} (Rylski et al., 2003). En ce qui concerne la lignée érythroleucémique

745-A, j'ai montré que la différenciation des cellules induite par l'HMBA n'était pas associée à une augmentation du taux d'ARNm p27^{kip1}. Il serait intéressant d'identifier le mécanisme d'accumulation de la protéine P27^{KIP1} au cours de la différenciation érythrocytaire normale afin de déterminer si l'inhibition de la traduction de P27^{KIP1} est une fonction naturelle de FLI-1 exercée au cours de l'érythropoïèse. Pour cela, il serait envisageable dans un premier temps de mesurer l'évolution du taux d'ARNm p27^{kip1} au cours de la différenciation de progéniteurs érythrocytaires natifs. Dans un second temps, il serait intéressant de mesurer la demi-vie de la protéine P27^{KIP1} dans des cultures de progéniteurs érythrocytaires au cours de la différenciation pour voir si son accumulation est due à une augmentation de sa stabilité ou à une augmentation de son taux de synthèse.

Un autre mécanisme permettant d'expliquer l'augmentation de la synthèse du taux de protéine P27^{KIP1} observé après réduction du taux de protéine FLI-1 pourrait être lié à une régulation de l'exportation de l'ARNm p27^{kip1} dans le cytoplasme. Le facteur eIF4E est normalement impliqué dans l'initiation de la traduction des ARNm. La surexpression du gène *eIF4E* dans la lignée NIH 3T3 induit une augmentation du taux de protéine CYCLINE D1 due à une augmentation du taux d'ARNm cycline D1 cytoplasmique (Rousseau et al., 1996). Des résultats plus récents suggèrent que cette augmentation cytoplasmique du taux d'ARNm cycline D1 est liée la fixation de eIF4E dans sa région 3'UTR ce qui activerait le transport de l'ARNm dans le cytoplasme (Culjkovic et al., 2005). De plus, cette régulation de l'exportation de l'ARNm a été retrouvée spécifiquement dans le cas de plusieurs autres gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Culjkovic et al., 2006). L'ensemble de ces résultats conduit à envisager l'hypothèse selon laquelle FLI-1 pourrait inhiber le transport de l'ARNm p27^{kip1} dans le cytoplasme, inhibant ainsi la synthèse de P27^{KIP1}. Il serait donc intéressant de mesurer l'effet de la répression de l'expression de *fli-1* sur le taux d'ARNm p27^{kip1} présent spécifiquement dans le cytoplasme des cellules. Si l'augmentation du taux de protéine P27^{KIP1}

observée après réduction de l'expression de *fli-1* est effectivement liée à une augmentation du transport de l'ARNm p27^{kip1} dans le cytoplasme, il semble cependant peu probable que le mécanisme de cette régulation soit identique à celui de l'ARN cycline D1 par eIF4E. En effet, la surexpression de *eIF4E* (Lazaris-Karatzas et al., 1990), et donc l'augmentation de l'exportation de différents ARNm ciblés par eIF4E (Culjkovic et al., 2006), est associée à la prolifération cellulaire alors que l'augmentation du taux de protéine P27^{KIP1} est corrélée à un arrêt de prolifération (Hsieh et al., 2000; Matushansky et al., 2000a; Matushansky et al., 2000b; Munoz-Alonso et al., 2005; Rylski et al., 2003; Tamir et al., 2000).

IV- Mécanisme de régulation par FLI-1 de l'expression des gènes de différenciation érythrocytaires

Notre équipe a proposé un modèle selon lequel la répression de l'expression des gènes érythrocytaires par FLI-1 pourrait passer par son recrutement indirect, via une interaction avec le facteur EKLF, sur les régions régulatrices de ces gènes (Starck et al., 2003). Cependant, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine réalisées sur les cellules shfli-1#44 n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de FLI-1 sur les régions régulatrices des gènes *globine α* et *btg2*.

Les facteurs FLI-1 et GATA-1 interagissent et coopèrent pour la fixation sur le promoteur de certains gènes mégacaryocytaires parmi lesquels le gène *gp1ba* (Eisbacher et al., 2003). Les gènes érythrocytaires *globine α*, *alas2* et *ahsp*, ainsi que le gène *btg2* ont été décrits comme des gènes activés par GATA-1. Des résultats obtenus par Fabrice Bouilloux montrent que la réduction du taux de protéine EKLF, par l'expression inductible de shRNA dans les cellules 745A, s'accompagne d'une réduction du taux d'ARNm *globine α*, *alas2* et *ahsp*, et également du taux d'ARNm *btg2*. Ceci suggère que ces gènes, dont l'expression est augmentée après réduction du taux de protéine FLI-1, sont des cibles co-régulées par GATA-

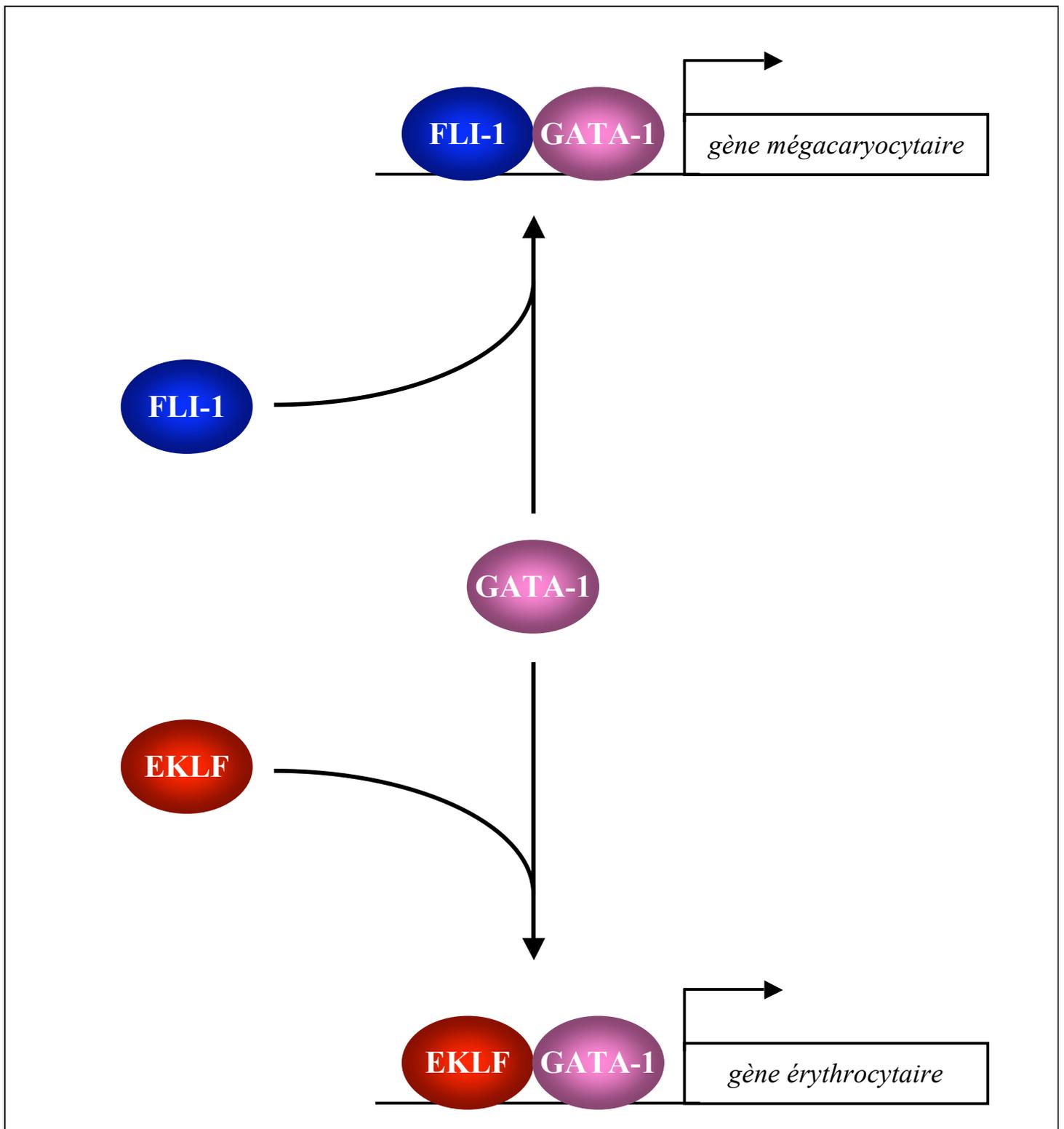


Figure 39 : Représentation schématique du modèle d'antagonisme fonctionnel entre les facteurs FLI-1 et EKLF

Selon ce modèle, le facteur GATA-1 serait présent en quantité limitante dans le progéniteur bipotent érythro-mégacaryocytaire et s'associerait soit à FLI-1 soit à EKLF en fonction de leur taux relatif. Ainsi, en présence d'un taux élevé de FLI-1, l'association FLI-1 / GATA-1 serait favorisée conduisant à une localisation de GATA-1 principalement au niveau des promoteurs des gènes mégacaryocytaires. Au contraire, en présence d'un taux élevé de EKLF, l'association EKLF / GATA-1 serait favorisée conduisant à une localisation de GATA-1 principalement au niveau des promoteurs des gènes érythrocytaires

1 et EKLF. La réduction du taux de protéine EKLF dans les cellules 745A est associée à une augmentation du recrutement de FLI-1 et GATA-1 sur le promoteur du gène *gpIba* (Fabrice Bouilloux, résultats non présentés). Inversement, j'ai observé que la réduction du taux de protéine FLI-1 s'accompagne d'une augmentation du recrutement de GATA-1 sur les régions régulatrices du gène *btg2*, ce qui est associé à une réduction de ce recrutement sur le promoteur du gène mégacaryocytaire *gpIba*.

L'ensemble de ces résultats nous ont conduit à envisager un modèle de compétition entre les facteurs FLI-1 et EKLF pour l'interaction avec GATA-1 (Figure 39). Ainsi, dans les cellules 745A, qui expriment un niveau important de *fli-1*, GATA-1 se retrouverait associé principalement à FLI-1 et localisé au niveau des promoteurs des gènes mégacaryocytaires. En revanche, après réduction du taux de protéine FLI-1, GATA-1 serait majoritairement associé à EKLF et localisé au niveau des régions régulatrices des gènes érythrocytaires. Ce modèle permettrait d'expliquer le mécanisme par lequel FLI-1 contribue au blocage de la différenciation dans les cellules érythroleucémiques, mais également comment le niveau d'expression de *fli-1* et *eklf* dans un progéniteur bipotent MEP peut influencer le choix d'engagement de ce progéniteur.

Afin de valider ce modèle, il serait nécessaire de vérifier si ces modifications de recrutement de GATA-1 en fonction du taux de protéine FLI-1 et EKLF se retrouvent sur les régions régulatrices d'autres gènes érythrocytaires et mégacaryocytaires. De plus, si ce modèle est valide, on devrait s'attendre à observer une augmentation du recrutement de EKLF sur les régions régulatrices des gènes érythrocytaires après réduction du taux de protéine FLI-1 dans les cellules *shfli-1#44*. Malheureusement, nous ne disposons pas actuellement d'anticorps anti-EKLF efficace pour réaliser les expériences d'immunoprécipitation de chromatine nécessaires à cette vérification.

Afin de valider ce modèle, j'ai recherché si, comme c'est le cas du gène *btg2*, la réduction du taux de protéine FLI-1 était associée à une augmentation du recrutement de GATA-1 sur les régions régulatrices du gène *globine α* , qui est également un gène dont le taux d'ARNm est augmenté après réduction du taux de protéine FLI-1. J'ai ainsi pu observer une augmentation du recrutement de GATA-1 sur la région régulatrice HS-26 du gène *globine α* . Ces résultats montrent donc que la réduction du taux de protéine FLI-1 est associée à une augmentation du recrutement de GATA-1 sur les régions régulatrices de 2 gènes dont l'expression augmente au cours de la différenciation des cellules érythroleucémiques.

En revanche, cette augmentation du recrutement de GATA-1 ne semble pas associée systématiquement à une activation transcriptionnelle. En effet, même en absence de doxycycline, je n'ai pas observé d'augmentation du recrutement de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène *globine α* après un jour de différenciation par rapport aux cellules non différenciées. Or, à ce stade de différenciation, il y a déjà une augmentation du taux d'ARNm globine α induite par l'HMBA et qui est amplifiée par la réduction du taux de protéine. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine réalisées après 2 jours de différenciation m'ont permis de mettre en évidence une augmentation du recrutement de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène *globine α* , recrutement qui n'est pas modifié par la réduction du taux de protéine FLI-1. Dans ces conditions, l'augmentation par la doxycycline du recrutement de GATA-1 sur la région HS-26 du gène *globine α* n'est plus observée. Cependant, il reste très difficile de prendre en compte ce résultat étant donné la faible efficacité d'immunoprécipitation obtenue avec l'anticorps anti-GATA-1 lors de cette expérience. Ces observations suggèrent fortement que l'augmentation du taux d'ARNm globine α observée après un jour de différenciation n'est pas due à une activation de la transcription du gène. Ils suggèrent également que l'augmentation du taux d'ARNm globine α induite par la réduction du taux de protéine FLI-1 n'est pas non plus liée à une activation transcriptionnelle. Des

résultats anciens montrent que la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend, induite par le DMSO, est associée à une dégradation massive des ARNm (Krowczynska et al., 1985). Au contraire, il semble que l'ARNm globine α soit stabilisé au cours de la différenciation (Bastos & Aviv, 1977; Bastos et al., 1977; Krowczynska et al., 1985). Il est donc envisageable que l'augmentation du taux d'ARNm globine α observée après un jour de différenciation dans les cellules shfli-1#44 soit due à une augmentation de sa stabilité et que la réduction du taux de protéine FLI-1 amplifie encore plus cette stabilité. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer la demi-vie de l'ARNm globine α , grâce à des cinétiques de dégradation réalisées en présence d'Actinomycine D, avant et au cours de la différenciation de cellules shfli-1#44 traitées ou non par la doxycycline. S'il s'avère que FLI-1 réduit le taux d'ARNm globine α en réduisant sa stabilité, ceci constituerait un nouveau mécanisme original de régulation de l'expression génique par FLI-1. Un des mécanismes par lequel l'ARNm globine α est stabilisé est associé à la fixation, dans la région 3'UTR de l'ARNm, d'un facteur de la famille α CP (Waggoner & Liebhaber, 2003), masquant un site de clivage endonucléolytique. Il serait donc intéressant de rechercher si la réduction du taux de protéine FLI-1 dans les cellules shfli-1#44 induit une modification du taux de protéine des membres de la famille α CP, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du taux d'ARNm globine α . Les protéines de la famille α CP interagissent avec la protéine PABP présente sur la queue polyA de l'ARNm globine α , cette interaction renforçant la fixation des protéines α CP sur l'ARNm globine α . Nous avons vu précédemment que l'augmentation du taux d'ARNm globine α , observé au cours de la différenciation des cellules shfli-1#44 et après réduction du taux de protéine FLI-1, s'accompagne d'une augmentation du taux d'ARNm btg2. La protéine BTG2 est décrite comme un régulateur de l'arginine méthylase PRMT (Perreault et al., 2007). Or, l'activité de la protéine PABP, est elle-même régulée par la méthylation. Ainsi, il pourrait être envisageable que cette augmentation du taux d'ARNm btg2 participe à la l'augmentation

du taux d'ARNm globine α . Cette hypothèse pourrait être testée en recherchant l'effet d'inhibiteurs de l'activité des méthylases sur le taux d'ARNm globine α .

Il a été décrit que les cellules érythroleucémiques de Friend peuvent être induites à se différencier par de faibles doses d'Actinomycine D, suffisantes pour bloquer l'activité de l'ARN polymérase I (Terada et al., 1978). Ce blocage de l'activité de l'ARN polymérase I a pour conséquence une inhibition de la transcription des ARN ribosomiques ce qui va aboutir à une augmentation de la quantité de protéines ribosomiques libres et induire un "stress ribosomique". En effet, certaines protéines ribosomiques sont capables d'interagir avec MDM2 (Lindstrom et al., 2007) conduisant à son inactivation et ainsi à la stabilisation de P53 ce qui va provoquer un arrêt de prolifération (Gilkes & Chen, 2007; Opferman & Zambetti, 2006). Parmi les gènes activés par la protéines P53, nous pouvons noter *btg2* (Rouault et al., 1996). Bien que les cellules érythroleucémiques de Friend ne possèdent pas de protéine P53 active, d'autres membres appartenant à la famille de P53, comme les facteurs P63 ou P73 pourraient compenser cette absence. L'analyse globale du transcriptome réalisé sur les cellules 745-A a mis en évidence une réduction de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la transcription et/ou la synthèse des ARN ribosomiques, ce qui est amplifié après réduction du taux de protéine FLI-1. Ceci pourrait conduire à un "stress ribosomique", induisant l'activation d'un membre de la famille de P53 et l'arrêt de prolifération des cellules. Ainsi, en activant la synthèse des ARN ribosomiques, FLI-1 stimulerait la prolifération des cellules en empêchant un "stress ribosomique", inhibant ainsi une activation par un membre de la famille P53 de l'expression de *btg2*. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de rechercher si l'expression et/ou l'activité des facteurs tels que P63 ou P73 est modifiée par l'HMBA et la doxycycline dans les cellules shfli-1#44. Alternativement, il pourrait être recherché si l'effet de la réduction de l'expression de *fli-1* dans les cellules shfli-1#44 est inhibé par l'utilisation d'un inhibiteur chimique de l'activité de la protéine P53 tel que la

pifithrine. Si c'est le cas, il pourrait être recherché si cette fonction est une fonction naturelle de FLI-1 au cours de l'érythropoïèse, ceci via l'utilisation du modèle de souris transgéniques développé par J. Starck permettant l'inactivation conditionnelle du gène *fli-1*.

V- Rôle de FLI-1 au cours de l'érythropoïèse normale

Les gènes *spi-1* et *fli-1* sont normalement co-exprimés dans les progéniteurs érythrocytaires (Back et al., 2005; Starck et al., 1999b) et notamment dans les cultures de progéniteurs de stress établies en présence d'EPO, de SCF et de Dexaméthasone (Back et al., 2004; Dolznig et al., 2001). Il a été montré que des progéniteurs érythrocytaires de stress issus de souris hétérozygotes *spi-1 +/-* prolifèrent moins vite que des progéniteurs érythrocytaires de stress normaux (Back et al., 2004). De plus, l'arrêt de prolifération et la différenciation des progéniteurs érythrocytaires de stress en culture après privation de SCF et de Dexaméthasone est associé à une réduction de l'expression de *fli-1* (Dolznig et al., 2001). Des études récentes montrent que l'infection par le virus de Friend provoque l'activation de l'érythropoïèse de stress, ce qui permet d'augmenter le nombre de cellules cibles du virus qui sont justement les progéniteurs érythrocytaires de stress (Subramanian et al., 2007; Subramanian et al., 2005). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'expression de *fli-1* observée dans ces progéniteurs érythrocytaires de stress pourrait promouvoir leur prolifération au détriment de leur différenciation et que cette fonction pourrait être détournée par le virus de Friend pendant la phase précoce de l'infection. Joëlle Starck a développé un modèle de souris transgéniques, utilisant le système Cre/lox, permettant l'inactivation conditionnelle du gène *fli-1*. Chez ces souris, l'exon 9 (codant le domaine ETS de liaison à l'ADN indispensable à la fonction de FLI-1) du gène *fli-1* est encadré par 2 séquences lox. Ces souris expriment la recombinaison Cre sous contrôle du promoteur inductible par l'interféron Mx-1. Ainsi, l'injection intra-péritonéale d'un ARN double brin, le pIpC, induit la production d'interféron qui va activer le

promoteur Mx-1, ceci aboutissant à la production de la recombinaise Cre et à la délétion de l'exon 9 du gène *fli-1*. L'utilisation de ce modèle a permis de montrer que l'inactivation du gène *fli-1* dans la rate des souris induit une augmentation du nombre de BFU-E et CFU-E, confirmant le rôle inhibiteur de FLI-1 sur la différenciation érythrocytaire. Afin de tester le rôle de *fli-1* dans la prolifération des progéniteurs érythrocytaires de stress, il serait donc intéressant d'analyser, après inactivation du gène *fli-1*, l'érythropoïèse de stress induite suite à une anémie, ainsi que la possibilité de former des colonies *in vitro* en absence d'EPO après infection de cellules issues de la rate par le virus de Friend.

CONCLUSION

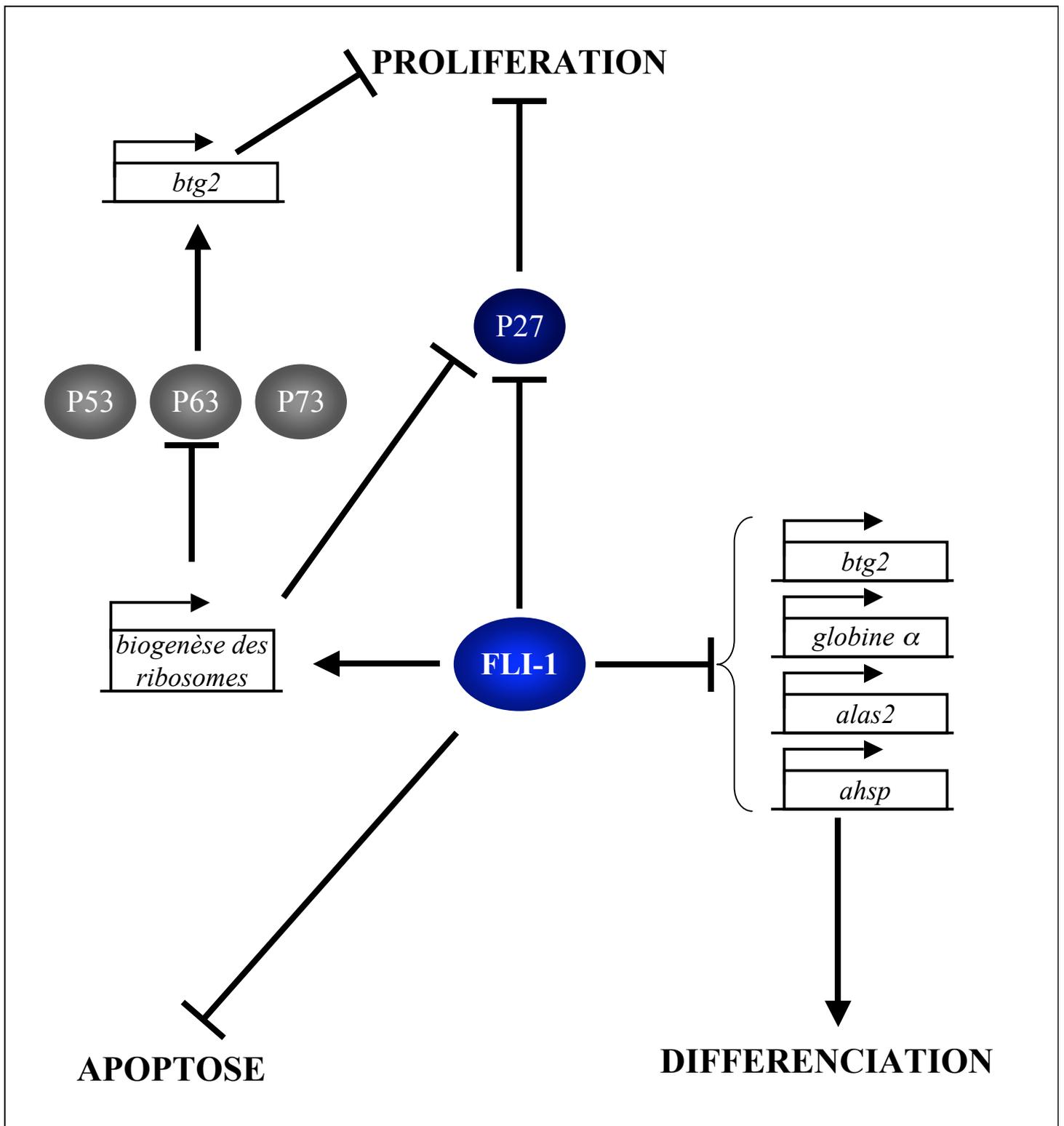


Figure 40 : Représentation schématique des modes d'action possibles de FLI-1 dans les cellules érythroleucémiques 745-A.

CONCLUSION

En conclusion, j'ai donc mis en évidence la contribution du facteur FLI-1 endogène à la transformation des lignées érythroleucémiques présentant une activation du gène *spi-1* par insertion provirale, confirmant un rôle du facteur FLI-1 dans les propriétés oncogéniques de SPI-1 / PU.1. En effet, la réduction de l'expression de *fli-1* entraîne une réduction de la clonogénicité des cellules 745-A, une accélération de leur différenciation normalement induite par l'HMBA (accélération à la fois de l'hémoglobinisation et de l'arrêt de prolifération) et une mort par apoptose aux temps tardifs de différenciation.

La recherche du mode d'action par lequel FLI-1 contribue à la transformation des cellules érythroleucémiques 745-A a conduit à l'identification de plusieurs groupes de gènes dont l'expression et/ou la fonction est régulée par FLI-1 (Figure 40). J'ai d'abord mis en évidence un rôle inhibiteur de FLI-1 sur le taux de synthèse de l'inhibiteur de cycline kinase P27^{KIP1}, le mécanisme précis par lequel FLI-1 interfère avec cette synthèse restant encore à déterminer. Ensuite, il a été identifié un groupe de gènes impliqués dans la transcription et/ou la maturation des ARN ribosomiques, dont le taux d'ARNm est augmenté en présence de FLI-1. Cette augmentation du taux d'ARNm est liée à une fixation de FLI-1 sur le promoteur de ces gènes, suggérant une activation directe de la transcription par FLI-1, et elle pourrait participer au maintien des cellules érythroleucémiques dans un état de prolifération, notamment via l'inhibition de la synthèse de P27^{KIP1}. Enfin, un groupe de gènes érythrocytaires, ainsi que le gène antiprolifératif *btg2*, ont un taux d'ARNm réduit en présence de FLI-1. Les mécanismes par lesquels FLI-1 réduit le taux d'ARNm de ces gènes ne sont pas clairement identifiés. Dans le cas du gène *btg2*, la réduction du taux d'ARNm par FLI-1 est associée à une réduction de la transcription ainsi qu'à une réduction du recrutement du facteur

GATA-1 sur une région régulatrice du gène. En revanche, cette réduction du taux d'ARNm semble indépendante de la transcription dans le cas du gène érythrocytaire *globine α* . Quoi qu'il en soit, la réduction par FLI-1 du taux d'ARNm de ces gènes ne semble pas associée à une fixation de FLI-1 sur leurs régions régulatrices de la transcription, ce qui suggère un mécanisme de répression de la différenciation érythrocytaire différent entre SPI-1 / PU.1 et FLI-1.

MATERIELS ET METHODES

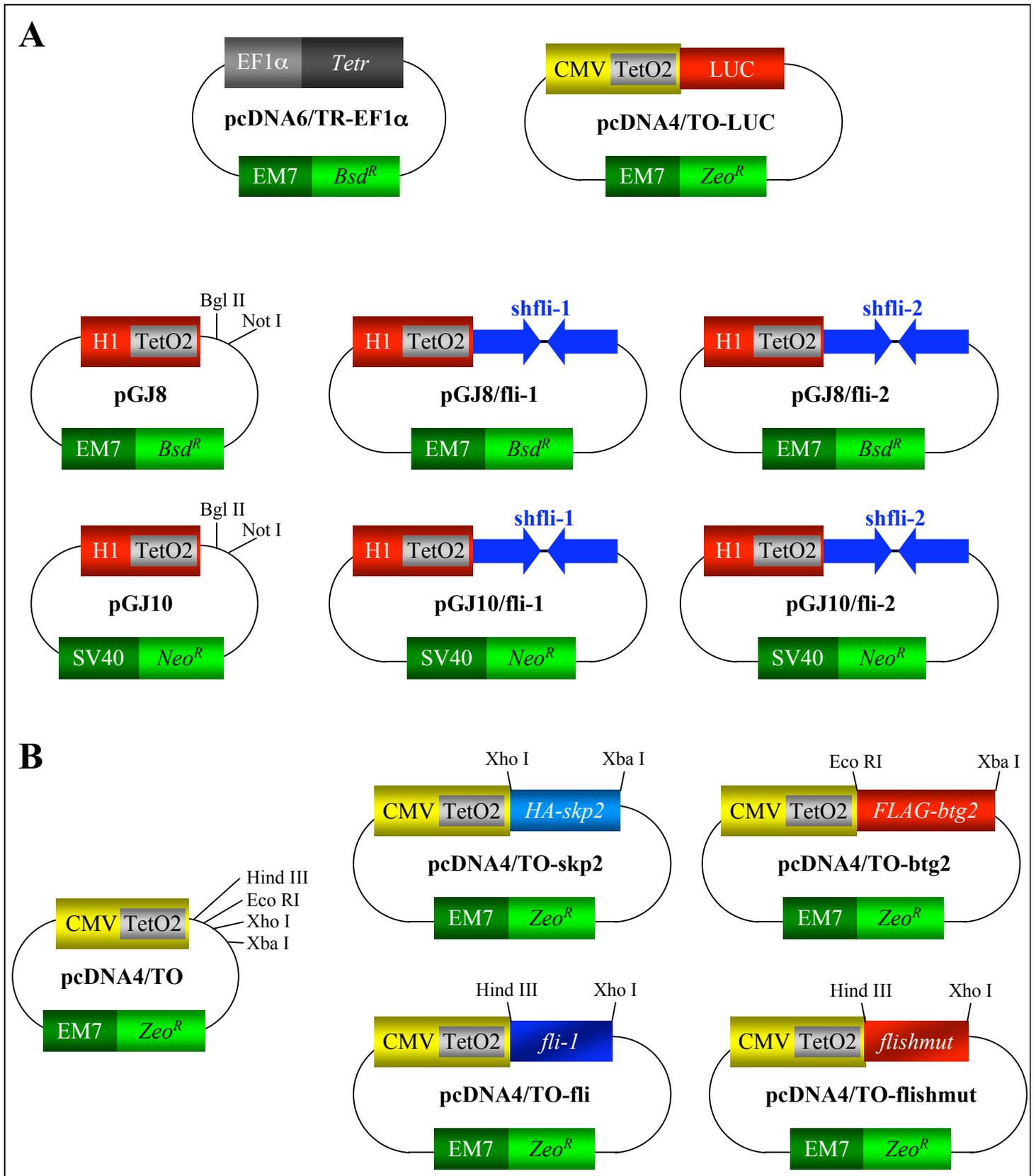


Figure 41 : Représentation schématique des différents vecteurs d'expressions utilisés (1).

Représentation schématique des différents vecteurs d'expression utilisés pour l'expression inducible de shRNA (A) et pour l'expression inducible de cDNA (B)

MATERIELS ET METHODES

I- Plasmides recombinants

A/ Vecteur d'expression de shRNA

1) Production inductible de shRNA à partir d'un promoteur H1 modifié

Afin d'obtenir une lignée 745-A présentant une répression inductible de l'expression de *fli-1*, nous avons choisi une stratégie basée sur l'utilisation d'un promoteur H1 modifié contenant la séquence opérateur TetO2 qui peut être réprimé par la fixation de la protéine bactérienne TETR. Le fonctionnement de ce promoteur est représenté de manière schématique sur la Figure 13.

Les vecteurs pGJ8 et pGJ10 (Figure 41B) possèdent le promoteur H1-TeTO2 décrit ci-dessus et amplifié par PCR à partir du vecteur pTER (van de Wetering et al., 2003). Ils contiennent également deux sites uniques de coupure d'endonucléases de restriction Bgl II et Not I permettant l'introduction d'oligonucléotides codant des shRNA, ainsi qu'un gène de résistance à la blasticidine (pour le vecteur pGJ8) ou au G418 (pour le vecteur pGJ10).

Pour construire les vecteurs pGJ8/shfli-1, pGJ8/shfli-2, pGJ10/shfli-1 et pGJ10/shfli-2 (Figure 41B), deux oligonucléotides spécifiques ont été dénaturés pendant 10 minutes à 100°C puis appariés 30 minutes à température ambiante. Ils ont ensuite été ligaturés dans les vecteurs pGJ8 et pGJ10 préalablement digérés par les endonucléases Bgl II et Not I. Les séquences des oligonucléotides utilisés sont les suivantes : 5' - GATCCCAGTTCAGTCTGGCCTATATTCAAGAGATATAGGCCAGCAGTGAAC TTT TTTGGAAA - 3' et 5' - GGCCTTTCCAAAAAAGTTCAGTCTGGCCTATATCTCTTGAATATAGGCCAGCAG

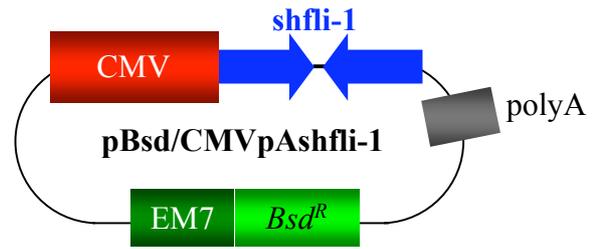
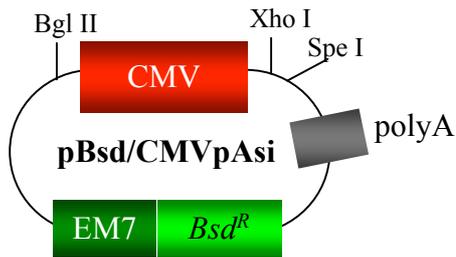
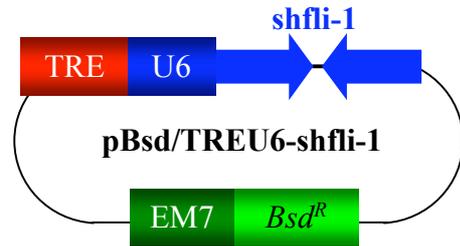
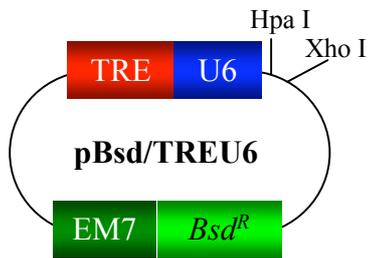
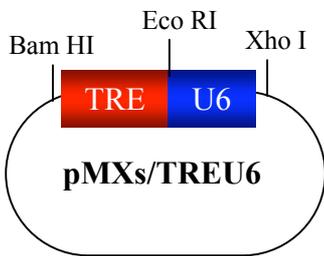
A**B**

Figure 42 : Représentation schématique des différents vecteurs d'expressions utilisés (2).

Représentation schématique des différents vecteurs d'expression utilisés pour l'expression de shRNA à partir du promoteur CMV (A) et pour l'expression inducible de shRNA à partir du promoteur TREU6 (B).

TGAACTGG - 3' pour shfli-1 ; 5' -
 GATCCCCCGATACTACTATGACAAATTCAAGAGATTTGTCATAGTAGTATCGGTT
 TTTGGAAA - 3' et 5' -
 GGCCTTTCCAAAACCGATACTACTATGACAAATCTCTTGAATTTGTCATAGTAG
 TATCGGGG - 3' pour shfli-2.

2) Construction du vecteur pBsd/CMVpAsi

Le vecteur pBsd/CMVpAsi (Figure 42A) a été construit par la société Transat. Il contient un promoteur CMV suivi d'un signal de polyadénylation comme cela a été décrit (Xia et al., 2002). Il contient également deux sites uniques de coupure d'endonucléases de restriction Xho I et Spe I permettant l'introduction d'oligonucléotides codant des shRNA, ainsi qu'un gène de résistance à la blasticidine. Pour construire le vecteur pBsd/CMVpAshfli-1 (Figure 42A), deux oligonucléotides spécifiques ont été dénaturés pendant 10 minutes à 100°C puis appariés 30 minutes à température ambiante. Ils ont ensuite été ligaturés dans le vecteur pBsd/CMVpAsi préalablement digéré par les endonucléases Xho I et Spe I. Les séquences des oligonucléotides utilisés sont les suivantes : 5' - TCGAAGTTCACTGCTGGCCTATATTCAAGAGATATAGGCCAGCAGTGA ACT - 3' et 5' - CTAGAGTTCACTGCTGGCCTATATCTCTTGAATATAGGCCAGCAGTGA ACT - 3'.

3) Construction du promoteur TREU6

Le promoteur TREU6 a d'abord été cloné dans le vecteur pMXs (Kitamura et al., 2003). La séquence TRE a été amplifiée par PCR à partir du vecteur pTRE (Clontech) grâce aux oligonucléotides 5' - GAGAGAGGATCCCGAGGCCCTTTCGTGTCGAG - 3' et 5' -

GAGAGAGAATTCACTCGACCCGGGTACCGAGC – 3' puis clonée dans les sites de coupure par les endonucléases de restriction Bam HI et Eco RI du vecteur pMXs, pour donner le vecteur pMXs/TRE. La partie U6 a été amplifiée par PCR à partir du vecteur p(U6-H1)CGdel (Thérier, 2005) grâce aux oligonucléotides 5' – GAGAGAGAATTCATTTCTAGTAACTATAGAGGCTTAATGTGCG – 3' et 5' – GAGAGACTCGAGAGAGAGAGTAAACAAGGCTTTTCTCCAAGGGATATTTATAGTCTCAAACAC – 3' puis clonée dans les sites de coupure par les endonucléases de restriction Eco RI et Xho I du vecteur pMXs/TRE, pour donner le vecteur pMXs/TREU6 (Figure 42B).

Pour construire le vecteur pBsd/TREU6 (Figure 42B), le promoteur TREU6 a été extrait du vecteur pMXs/TREU6 grâce à une digestion par les endonucléases de restriction Bam HI et Xho I, puis cloné dans les sites de coupure par les endonucléases Bgl II et Xho I dans le vecteur pBsd/CMVpAsi (les endonucléases de restriction Bam HI et Bgl II génèrent des extrémités compatibles).

Pour construire le vecteur pBsd/TREU6-shfli-1 (Figure 42B), deux oligonucléotides spécifiques ont été dénaturés pendant 10 minutes à 100°C puis appariés 30 minutes à température ambiante. Ils ont ensuite été ligaturés dans le vecteur pBsd/TREU6 préalablement digéré par les endonucléases Hpa I et Xho I. Les séquences des oligonucléotides utilisés sont les suivantes :

5' – TGAAAGTTCACTGCTGGCCTATATTCAAGAGATATAGGCCAGCAGTGAAC TTTCT TTTTGGAAA – 3' et 5' – TCGATTTCCAAAAGAAAGTTCACTGCTGGCCTATATCTCTTGAATATAGGCCAG CAGTGAAC TTTCA – 3'.

B/ Vecteurs d'expressions divers

Le vecteur pcDNA6/TR-EF1 α (Figure 41A) nous a été fourni par Christelle Guillouf (Rimmele et al., 2007). Il permet la production, à partir d'un promoteur EF1 α , de la protéine bactérienne TETR. Il possède également un gène de résistance à la blasticidine.

Le vecteur CMV- β gal permet l'expression du gène *β -galactosidase* à partir du promoteur CMV.

Le vecteur pcDNA4/TO (Invitrogen) possède un promoteur CMV modifié contenant la séquence opérateur TetO2 qui peut être réprimé par la fixation de la protéine bactérienne TETR. Il possède également un gène de résistance à la zeocyn (Figure 41C).

Le vecteur pcDNA4/TO-LUC nous a été fourni par Marc van de Wetering. C'est un vecteur d'expression du gène *luciférase* sous contrôle du promoteur CMV-TetO2 (Figure 41A).

Le vecteur pcDNA4/TO-fli (Figure 41C) est un vecteur d'expression du gène *fli-1* murin sous contrôle du promoteur CMV-TetO2. Le gène *fli-1* murin a été amplifié par PCR à partir du vecteur pEF-FLI (Starck et al., 2003) grâce aux oligonucléotides 5' – AAGCTTGAAATGGACGGGACTATTAAG - 3' et 5' - CTCGAGCTAGTAGTAGCTGCCTAAGT - 3' puis cloné dans les sites de coupure par les endonucléases de restriction Hind III et Xho I du vecteur pcDNA4/TO.

Le vecteur pcDNA4/TO-flishmut (Figure 41C) est un vecteur d'expression d'un gène *fli-1* murin contenant 2 mutations ponctuelles silencieuses dans la séquence reconnue par le shRNA shfli-1. Le gène *fli-1* a été amplifié par PCR en 2 étapes à partir du vecteur pEF-FLI. Deux amplifications indépendantes par PCR ont d'abord été réalisées en utilisant les couples d'oligonucléotides 5' – AAGCTTGAAATGGACGGGACTATTAAG - 3' et 5' - GGGAGGTTGTGTTATAGGCGAGCAGAGAACTTTCCTGAGGTAAC - 3' ou 5' – GTTACCTCAGGGAAAGTTCTCTGCTCGCCTATAACACAACCTCCC - 3' et 5' –

CTCGAGCTAGTAGTAGCTGCCTAAGT - 3' (les bases soulignées correspondent aux mutations introduites dans le cDNA fli-1). Les produits d'amplification obtenus ont ensuite été mélangés et une nouvelle amplification par PCR a été réalisée avec les oligonucléotides 5' – AAGCTTGAAATGGACGGGACTATTAAG - 3' et 5' – CTCGAGCTAGTAGTAGCTGCCTAAGT - 3'. Le cDNA fli-1 muté ainsi obtenu a enfin été cloné dans les sites de coupures par les endonucléases de restriction Hind III et Xho I du vecteur pcDNA4/TO

Le vecteur pcDNA4/TO-skp2 (Figure 41C) est un vecteur d'expression du gène *skp2* humain fusionné au peptide HA, sous contrôle du promoteur CMV-TetO2. Le gène *HA-skp2* a été obtenu après digestion du vecteur pCMVSkp2 (Carrano et al., 1999) par les endonucléases de restriction Xho I et Xba I puis cloné dans les sites de coupure par les endonucléases de restriction Xho I et Xba I du vecteur pcDNA4/TO.

Le vecteur pcDNA4/TO-btg2 (Figure 41C) est un vecteur d'expression du gène *btg2* humain fusionné au peptide FLAG, sous contrôle du promoteur CMV-TetO2. Le gène *FLAG-btg2* a été obtenu après digestion du vecteur pSG5FlagBTG2 (Rouault et al., 1998) par les endonucléases de restriction Eco RI et Xba I puis cloné dans les sites de coupure par les endonucléases de restriction Eco RI et Xba I du vecteur pcDNA4/TO.

II- Culture cellulaire

A/ Lignées érythroleucémiques de Friend 745-A

1) Description des lignées et des conditions de culture

La lignée 745-A est une lignée érythroleucémique murine obtenue à partir de souris infectées par le virus SFFV du complexe de Friend. Elle a été cultivée dans du milieu IMDM

(Gibco) contenant 10 % de SVF (Bio West) décomplémenté 30 min à 56°C et 50000 IU / L de pénicilline-streptomycine (Gibco).

La lignée 745/TR est une lignée 745-A produisant de manière stable la protéine bactérienne TETR. Elle a été obtenue après transfection de la lignée 745-A par le vecteur pcDNA6/TR-EF1 α .

Les lignées shfli-1#44 et shfli-2#1 sont 2 lignées 745-A présentant une expression inductible par la doxycycline de 2 shRNA différents dirigés contre le gène *fli-1*. Elles ont été obtenues après transfection de la lignée 745/TR par les vecteurs pGJ10/shfli-1 et pGJ10/shfli-2, respectivement.

La lignée shmut#13 est une lignée 745-A présentant une expression inductible par la doxycycline, à la fois du shRNA shfli-1, et d'un transgène *fli-1* murin contenant 2 mutations ponctuelles silencieuses dans la séquence reconnue par le shRNA shfli-1. Elle a été obtenue après transfection de la lignée shfli-1#44 par le vecteur pcDNA4/TO-flishmut.

Les lignées 44/SKP2#13 et 44/SKP2#16 sont 2 lignées 745-A présentant une expression inductible par la doxycycline du shRNA shfli-1 et d'un transgène *skp2* humain fusionné au peptide HA. Elles ont été obtenues après transfection de la lignée shfli-1#44 par le vecteur pcDNA4/TO-skp2.

Les lignées TR/SKP2#18 et TR/SKP2#29 sont 2 lignées 745-A présentant une expression inductible par la doxycycline d'un transgène *skp2* humain fusionné au peptide HA. Elles ont été obtenues après transfection de la lignée 745/TR par le vecteur pcDNA4/TO-skp2.

Les lignées BTG2#12 et BTG2#14 sont 2 lignées 745-A présentant une expression inductible par la doxycycline d'un transgène *btg2* humain fusionné au peptide FLAG. Elles ont été obtenues après transfection de la lignée 745/TR par le vecteur pcDNA4/TO-btg2.

Toutes les lignées transgéniques dérivées à partir de la lignée 745-A ont été constamment cultivées en présence du ou des antibiotiques qui ont permis leur sélection, à savoir 20 µg / mL de blasticidine (Cayla) et/ou 1 mg / mL de G418 (Invitrogen) et/ou 300 µg / mL de zeocyn (Cayla). L'expression des shRNA et / ou des différents transgènes a été induite grâce à un traitement de 2 jours par 100 ng / mL de doxycycline.

2) Mesure de la clonogénicité

Les cellules ont été cultivées pendant 2 jours en absence ou en présence de doxycycline puis 4 lots de 50 cellules ont étéensemencées dans 1 mL de milieu IMDM contenant 10 % de SVF et 0,8 % de méthylcellulose (Fluka) dans une plaque 24 puits. Après 5 jours de culture, les colonies ont été colorées par ajout de 100 µL de PBS 1X contenant 1 mg / mL de MTT (Sigma) puis comptées, et la plaque a été photographiée.

3) Mesure de la différenciation érythroïde

La différenciation érythroïde des lignées transgéniques issues de la lignée 745-A a été induite grâce à un traitement des cellules par 5 mM d'HMBA. Le taux de cellules produisant de l'hémoglobine a été déterminé en présence de benzidine acide (1 volume de culture cellulaire mélangé à 1 volume de Benzidine 1 % / Acide Acétique 0,5 M / 5 % H₂O₂). Lors de toutes les expériences, les cellules ont été cultivées pendant 2 jours en absence ou en présence de 100 ng / mL de doxycycline avant le traitement par l'HMBA, et la doxycycline a été maintenue pendant toute la durée du traitement.

4) Analyse du cycle cellulaire

1.10⁶ cellules ont été lavées par du PBS 1X puis fixées et perméabilisées pendant au moins 30 minutes dans du PBS 1X / Ethanol 70 %. Après un nouveau lavage au PBS 1X, les ARN ont été digérés par 50 µg / mL de RNase A (Sigma) pendant 30 minutes à température ambiante, puis les cellules ont été marquées par 50 µg / mL d'iodure de propidium (Sigma). La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a ensuite été déterminée par cytométrie de flux (FACSCalibur, Becton Dickinson).

5) Mesure de la mortalité cellulaire

Le taux de cellules mortes a été déterminé grâce à un comptage en présence d'un volume de Bleu Trypan (Sigma).

Le taux de cellules apoptotiques a été déterminé par cytométrie de flux (FACSCalibur, Becton Dickinson) après un marquage réalisé grâce au kit Annexin V-FITC Kit (AbCys).

B/ Lignées érythroleucémiques de Friend NN10

La lignée NN10 est une lignée érythroleucémique murine obtenue à partir de souris infectées par le virus F-MuLV du complexe de Friend. Elle a été cultivée dans du milieu IMDM (Gibco) contenant 10 % de SVF (Bio West) décomplémenté 30 min à 56°C et 50000 IU / L de pénicilline-streptomycine (Gibco).

La lignée NN10/TR est une lignée NN10 produisant de manière stable la protéine bactérienne TETR. Elle a été obtenue après transfection de la lignée NN10 par le vecteur pcDNA6/TR-EF1α.

Les lignées NN10/TR/shfli-1#5 et NN10/TR/shfli-2# sont 2 lignées NN10 présentant une expression inductible par la doxycycline de 2 shRNA différents dirigés contre le gène *fli-1*.

Elles ont été obtenues après transfection de la lignée NN10/TR par les vecteurs pGJ10/shfli-1 et pGJ10/shfli-2, respectivement.

Toutes les lignées transgéniques dérivées à partir de la lignée NN10 ont été constamment cultivées en présence du ou des antibiotiques qui ont permis leur sélection, à savoir 30 µg / mL de blasticidine (Cayla) et/ou 1 mg / mL de G418 (Invitrogen) et/ou 400 µg / mL de zeocyn (Cayla). L'expression des shRNA a été induite grâce à un traitement de 2 jours par 100 ng / mL de doxycycline.

C/ Autre lignées cellulaires

La lignée HeLa est une lignée épithéliale humaine issue d'un adénocarcinome. La lignée HeLa a été cultivée dans du milieu DMEM (Gibco) contenant 5 % de SVF (Bio West) décomplémenté 30 min à 56°C, 50000 IU / L de pénicilline-streptomycine (Gibco) et 2 mM de L-Glutamine (Gibco).

La lignée 3T3 est issue de fibroblastes embryonnaires de souris. Elle a été cultivée dans du milieu IMDM (Gibco) contenant 10 % de SVF (Bio West) décomplémenté 30 min à 56°C et 50000 IU / L de pénicilline-streptomycine (Gibco).

III- Transfection et mesure de l'activité de gènes rapporteurs

La lignée 745-A a été transfectée à l'aide du DAC 30 (Eurogentec, 5 µg de DAC 30 pour 1 µg d'ADN). La lignée NN10 a été transfectée à l'aide du FuGENE 6 (Roche, 3 µL de FuGENE 6 pour 1 µg d'ADN).

Les activités luciférase et β -galactosidase ont été mesurées par luminométrie grâce aux kits Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity (Roche) et β -Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche).

Pour la dérivation de lignées cellulaires transgéniques, 4.10^5 cellules 745-A ou NN10 ont été transfectées par 2 μ g d'ADN plasmidique. Le lendemain de la transfection, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 1.10^2 cellules par puits en présence de l'antibiotique de sélection approprié. Les clones résistants ont été amplifiés en présence de l'antibiotique de sélection puis l'expression du transgène a été mesurée.

IV- Western blot

Les cellules ont été lysées directement dans du bleu de Laemmli 1X [1 % SDS ; 0,04 M Tris-HCl pH 6,8 ; 6 % glycérol ; 0,003 % bleu de bromophénol ; 0,015 M β -mercaptoéthanol (100 μ l pour 10^6 cellules)] pendant 5 minutes à 100°C. Les lysats protéiques ont alors été déposés sur un gel 10 % SDS-PAGE et les protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell) qui a ensuite été bloquée 30 minutes dans une solution de blocage (0,01 M Tris-HCl pH 7,6 ; 0,3 M NaCl ; 0,1 % Tween 20 ; 10 % lait en poudre). La membrane a été incubée pendant 2 heures en présence d'un anticorps primaire puis elle a subi 5 lavages de 5 minutes dans une solution de rinçage (0,01 M Tris-HCl pH 7,6 ; 0,3 M NaCl ; 0,1 % Tween 20). Après une incubation de 1 heure en présence d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase et 5 nouveaux lavages, la membrane a été révélée par chemiluminescence grâce au kit ECL+ (Amersham).

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : polyclonal de lapin anti-FLI-1 (dilution 1 / 200^{ème}, sc-356, Santa Cruz), monoclonal de souris anti-GRB2 (dilution 1 / 200^{ème}, sc-17813, Santa Cruz), polyclonal de chèvre anti-SAP18 (dilution 1 / 100^{ème}, sc-8473, Santa

Cruz), monoclonal de souris anti-TETR (dilution 1 / 2000^{ème}, TET02, Mobitec), monoclonal de souris anti-ACTINE (dilution 1 / 200^{ème}, sc-8432, Santa Cruz), polyclonal de lapin anti-P27^{KIP1} (dilution 1 / 200^{ème}, sc-776, Santa Cruz), polyclonal de lapin anti-SKP2 (dilution 1 / 200^{ème}, sc-7164, Santa Cruz), monoclonal de souris anti- β -GALACTOSIDASE (dilution 1 / 5000^{ème}, Z3781, Promega), monoclonal de rat anti-GATA-1 (dilution 1 / 200^{ème}, sc-265, Santa Cruz), polyclonal de lapin anti-HA (dilution 1 / 200^{ème}, sc-805, Santa Cruz), monoclonal de souris anti-FLAG (dilution 1 / 1000^{ème}, F1804, Sigma).

Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants : polyclonal de chèvre anti-IgG de souris ou de lapin (dilution 1 / 5000^{ème}, Biorad), polyclonal de lapin anti-IgG de rat (dilution 1 / 5000^{ème}, Dako)

Lors de l'analyse du taux de protéine BTG2 ou FLAG-BTG2, les cellules ont été traitées par 10 μ M de MG132 (Sigma) pendant une nuit avant d'être lysées afin d'inhiber la dégradation protéique.

V- RT-PCR quantitative

L'ARN total de cellules a été extrait grâce au RNA PLUS (Q-biogene). 1 μ g d'ARN a ensuite été rétro-transcrit en duplicates pendant 1 heure à 37°C grâce à des hexamères de séquence aléatoire dans un volume final de 20 μ L contenant 200 unités de Réverse-Transcriptase du virus M-MLV (Invitrogen). Les ADNc ont été quantifiés par PCR quantitative grâce au kit Quanti Teck SYBR green PCR kit (Qiagen), sur un LightCycler (Roche) ou un LC480 (Roche), en utilisant les couples d'oligonucléotides présentés dans le Tableau 4.

Gène	Oligonucléotide 5'	Oligonucléotide 3'
ARNr 18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT
fli-1	CAACCAGCCAGTGAGAGTCA	GTTTCGTTGGTGGTCATGTTG
fli-1 endogène	CCGCTACAACAACAAACGTG	ACCTCGTAGCCCCTTCAGAT
oas1	GGAGAGATGCTTCCAAGGTG	AAGGAACACCACCAGGTCAG
ifit1	CAAGGCAGGTTTCTGAGGAG	TGAAGCAGATTCTCCATGACC
bcl2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGTA	GGAGAAATCAAACAGAGGTCGCA
bcl-xl	TGACCACCTAGAGCCTTGGA	AGAACCACACCAGCCACAGT
rb	AGAGAGAACGCCACGAAAAA	GATGGCTGATCACTTGCAGA
mdm2	TGTGTGAGCTGAGGGAGATG	CATTACGCCATCGTCAAGA
slap	AGGGACAAGGCTGAGGAACT	TGTTGGGAAGACGGAAGATT
inpp5p	TCACGATACCCCAAAGGAG	CCTACGGTCTCAGCTTCCAC
lmo2	ATTGCCTCAGCTGTGACCTC	GGATGCACAGAGACCATCCT
p27 ^{kip1}	TTGGGTCTCAGGCAAACCTCT	TCTGTTCTGTGGCCCTTTT
skp2	GCGCTAAAACAGGAGTCTGG	AGACACCCATGCCTGATAGC
globine α	CTGGGGAAGACAAAAGCAAC	GCCGTGGCTTACATCAAAGT
globine β	GCACCTGACTGATGCTGAGA	CTGGGTCCAAGGGTAGACAA
alas2	CCGAAGCCATTCATTTCTA	GCCCAACGATTCACAGTCTT
ahsp	TGAGTGCAGAAGACACACAAA	CCTTTATCCCTGTGGAGATCAG
btg2	GCGAGCAGAGACTCAAGGTT	CGATGCGGTAAGACACTTCA

Tableau 4 : Liste des couples d'oligonucléotides utilisés en RT-PCR quantitative

Site	Oligonucléotide 5'	Oligonucléotide 3'
myoD promoteur	TAACCTTCCACTCCCCTCACAGA	TGTTCTGTGTCGCTTAGGGATGC
skp2 promoteur	GGGAAAAGGAAAACCTGCTC	CCTGGGTTCTTCCACTCTGA
skp2 exon3	GCTTCTTTGCAGGTGTCTCC	CCTTCCCTCCCCTCTCTATG
btg2 exon2	TGAAGTGTCTTACCGCATCG	GGAGACGGCCATCACATAGT
btg2 R3	ATGCCAGACCCACAGAAGTG	GCAAGGTGCTGGTAGCTGTA
gapdh	GTGTTCCCTACCCCAATGTG	AAGTCGCAGGAGACAACCTG
globine α HS-26	GTACAGAGTCAGAAAGGAAAGGACAA	GGCAAATAAACAGGATGGGAAA
globine α promoteur	TGACCAAGGTAGGAGGATACTAACTTCT	TTGCCCGGACACACTTCTTAC
gplb α promoteur	GGGTGGAAGGAAAGTGAGAA	CCCAAGAGCAGGAAGGAGAT

Tableau 5 : Liste des couples d'oligonucléotides utilisés en ChIP

VI- Immunoprécipitation de chromatine

1.10^8 cellules shfli-1#44 ont été fixées 10 minutes à température ambiante sous agitation douce, par ajout directement dans le milieu de culture de 1 / 10^6 de la solution de fixation 10X (PBS 1X ; 11 % formaldéhyde ; 0,1 M NaCl ; 50 mM HEPES pH 7,9). La fixation a été stoppée par addition de 0,125 M final de glycine. Les cellules ont ensuite été centrifugées 5 minutes à 2500 rpm à 10°C et lavées 2 fois par du PBS 1X froid. Le culot de cellules fixées a été lysé dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8 ; 10 mM EDTA pH 8 ; 1 % SDS ; 1 / $25^{\text{ème}}$ inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free inhibitor, Roche)) à raison de 50.10^6 cellules / mL pendant 10 minutes dans la glace. La chromatine a été solubilisée et coupée en fragments d'environ 500 pb par sonication. La chromatine fragmentée (volume équivalent à 2.10^7 cellules) a été diluée dans 10 volumes de tampon CHIP IP (16,7 mM Tris-HCl pH 8 ; 1,2 mM EDTA pH 8 ; 167 mM NaCl ; 1,1 % Triton X-100 ; 0,01 % SDS ; 1 / $25^{\text{ème}}$ inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free inhibitor, Roche)) puis débarassée des protéines fixant de manière aspécifique les billes de sépharose couplées à de la protéine G (Millipore) par une incubation de 4 heures à 4°C sur un axe rotatif (10 μL de billes / mL de chromatine diluée). Après une centrifugation de 3 minutes à 1200 rpm à 4°C , la chromatine a été incubée sur un axe rotatif pendant une nuit à 4°C avec 2 μg d'anticorps anti-HA (sc-805, Santa Cruz), anti-FLI-1 (sc-356, Santa Cruz), ou anti-ARN polymérase II (sc-899, Santa Cruz). Après une centrifugation de 10 minutes à 10000 rpm à 4°C , des billes de sépharose couplées à de la protéine G (Millipore) a été ajoutée (10 μL de billes / mL de chromatine immunoprécipitée) et incubée 3 heures sur un axe rotatif à 4°C . Les billes ont ensuite été lavées 5 fois pendant 5 minutes sur un axe rotatif à 4°C avec les solutions de lavage suivantes : lavage 1 (20 mM Tris-HCl pH 8 ; 2 mM EDTA pH 8 ; 150 mM NaCl ; 0,1 % SDS ; 1 % Triton X-100), lavage 2 (20 mM Tris-HCl pH 8 ; 2 mM EDTA pH 8 ; 500 mM NaCl ; 0,1 % SDS ; 1 % Triton X-100), lavage 3 (10 mM Tris-HCl pH 8 ; 1 mM EDTA pH 8 ; 250 mM

LiCl ; 1 % NP-40 ; 1 % NaDC), lavage 4 et 5 (10 mM Tris-HCl pH 8 ; 1 mM EDTA pH 8). La chromatine immunoprécipitée a été éluée par 2 incubations successives des billes pendant 15 minutes à température ambiante sur un axe rotatif en présence de 250 µL de solution d'éluion (0,1 M NaHCO₃ ; 1 % SDS) puis traitée à la protéinase K (40 µg / mL en présence de 0,2 M de NaCl) pendant 2 heures à 45°C. La fixation a alors été réversée par une incubation d'au moins 4 heures à 65°C et l'ADN récupéré par une extraction au phénol / chloroforme et une précipitation à l'éthanol. Les ADN immunoprécipités ont été quantifiés par PCR quantitative grâce au kit Quanti Teck SYBR green PCR kit (Qiagen), sur un LightCycler (Roche) ou un LC480 (Roche), en utilisant les couples d'oligonucléotides présentés dans le Tableau 5.

Lors des immunoprécipitations réalisées avec l'anticorps anti-GATA-1 (sc-265, Santa Cruz), quelques modifications du protocole ont été effectuées. 200 µL de chromatine fragmentée a été diluée dans 5 volumes de tampon ChIP IP et incubée 1 heure à 4°C sur un axe rotatif en présence de sérum de lapin (Sigma). La chromatine diluée a été débarassée des protéines fixant de manière aspécifique les billes de sépharose par une incubation sur la nuit à 4°C sur un axe rotatif de billes de sépharose couplées à de la protéine A (Millipore) préalablement mélangées à un anticorps secondaire de lapin anti-rat (Sigma). Après une centrifugation de 3 minutes à 1200 rpm à 4°C, la chromatine a été incubée sur un axe rotatif pendant 2 heures à 4°C avec 3 µg d'anticorps monoclonal de rat anti-GATA-1 (sc-265, Santa Cruz), puis pendant 4 heures à 4°C avec un mélange de sépharose couplée à de la protéine A / anticorps secondaire de lapin anti-rat. Le protocole est ensuite identique à celui décrit précédemment.

VII- Mesure de la demi-vie de P27

Des cellules shfli-1#44 ont été lavées par du PBS 1X et incubées pendant 1 heure 30 minutes dans du milieu DMEM dépourvu de Méthionine et Cystéine (Gibco) contenant 10 % de SVF dialysé. De la Méthionine et de la Cystéine marquées au ³⁵S (Translabel, Amersham) ont été ajoutées au milieu à une concentration finale de 75 µCi / mL pendant 2 heures. Les cellules ont alors été lavées 2 fois par du PBS 1X puis cultivées dans du milieu IMDM contenant 10 % de SVF et 100 µg / mL de Méthionine non radioactive. Après 0, 1, 3 et 6 heures de cultures, les cellules ont été lavées 2 fois par du PBS 1X, lysées dans un tampon RIPA (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, 10 mg / mL aprotinin, 10 mg / mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 10% glycerol à raison de 1,4.10⁴ cellules / mL) et centrifugées 20 minutes à 15000 rpm à 4°C. Les extraits ont été pré-incubés pendant 15 minutes sur un axe rotatif à 4°C avec 20 µL de billes de sépharose couplées à de la protéine G (Amersham), puis avec 2 µg d'anticorps anti-P27^{KIP1} (sc-776, Santa Cruz) pendant la nuit. Le lendemain, 20 µL de billes de sépharose couplées à de la protéine G ont été ajoutées aux extraits et l'incubation s'est poursuivie pendant 4 heures. Les billes ont ensuite été lavées 3 fois par du PBS 1X puis chauffées à 100°C pendant 5' dans 40 µL de bleu de Laemmli 2X (2 % SDS ; 0,08 M Tris-HCl pH 6,8 ; 12 % glycérol ; 0,006 % bleu de bromophénol ; 0,03 M β-mercaptoéthanol). Après une centrifugation de 1 minute à 1200 rpm à 4°C, le surnageant a été déposé sur un gel 10% SDS-PAGE et les protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell). La membrane a alors subi une autoradiographie grâce à un Typhoon Trio Imager (Amersham) puis été révélée par chemiluminescence comme décrit précédemment. Le signal radioactif a été quantifié grâce au logiciel ImageQuant TL (Amersham).

VIII- Analyse globale du transcriptome

Deux lots de cellules shfli-1#44 ont été traités pendant 2 jours en absence ou en présence de doxycycline puis leur différenciation a été induite par traitement par l'HMBA. Après 0 et 1 jour de différenciation, les ARN totaux des cellules ont été extraits (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) et le transcriptome des cellules a été analysé grâce à des puces à ADN (projet CIT de La Ligue Nationale Contre le Cancer, plate-forme génomique de l'IGBMC, Strasbourg). Nous avons également joint à l'analyse les ARN totaux de plusieurs lignées induites par le virus F-MuLV, qui n'expriment pas *spi-1* et qui expriment différents niveaux de *fli-1* (Starck et al., 1999a).

Les données obtenues (logarithme du rapport Signal ARN échantillon / Signal ARN de référence, normalisées par la plate-forme génomique de Strasbourg) ont été analysées grâce au logiciel Genespring (Agilent). Les données des cellules shfli-1#44 ont été séparées en 2 groupe : un groupe correspondant aux ARN obtenus en absence d'HMBA (avec et sans doxycycline) et un autre groupe correspondant aux ARN obtenus en présence d'HMBA (avec et sans doxycycline).

Une liste des gènes réprimés au moins 2 fois par l'HMBA avec une "p value" < 0,02 a été réalisée avec une filtration des faux positifs (Benjamini & Hochberg, 1995). Sur cette liste, ont été sélectionnés les gènes réprimés par la doxycycline au moins 1,3 fois avec une "p value" < 0,05. Ces gènes sont présentés sur le Tableau 2 et leurs niveaux d'expression relatifs dans les cellules shfli-1#44, ainsi que dans les lignées F-MuLV sont présentés sur la Figure 27A.

Une liste des gènes activés au moins 2 fois par l'HMBA avec une "p value" < 0,02 a été réalisée avec une filtration des faux positifs (Benjamini & Hochberg, 1995). Sur cette liste, ont été sélectionnés les gènes activés par la doxycycline au moins 1,3 fois avec une "p value" < 0,05. Ces gènes sont présentés sur le Tableau 3 et leurs niveaux d'expression relatifs

dans les cellules shfli-1#44, ainsi que dans les lignées F-MuLV sont présentés sur la Figure 27B.

ANNEXES

ANNEXE

Article 1

Fli-1 contributes to the survival and cooperates with Spi-1/PU.1 in the proliferation and inhibition of differentiation of Friend erythroleukemic cells

Gaëtan Juban¹, Nathalie Cohet¹, Christel Guillouf², François Morlé¹

1- Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 5534, Université Lyon 1, 16 rue Dubois, 69 622 Villeurbanne, France.

2- Laboratoire de Transduction du Signal et Oncogénèse, Inserm U528, Section de Recherche, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75 248 Paris cedex 05, France.

Corresponding author :

François Morlé, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 5534, Université Lyon 1, 16 rue Dubois, 69 622 Villeurbanne, France. Tel : 33 (0)4 72 43 36 37; Fax : 33 (0)4 72 43 26 85; email : morle@univ-lyon1.fr

Keywords :

Fli-1; PU-1; Friend erythroleukemia; p27^{Kip1} translation

4381 words

Abstract

Deregulated expression of ETS factors Spi-1/PU.1 or Fli-1 are known to contribute to erythroleukemia induced by Friend viruses in mouse. However, since *fli-1* gene is itself upregulated by Spi-1/PU.1, the possibility of cooperation between Spi-1/PU.1 and Fli-1 as well as the mechanisms by which Fli-1 contribute to the transformation of erythroleukemic cells overproducing Spi-1/PU.1 remain largely unknown. To address these questions, we used doxycycline-inducible production of shRNA to knockdown Fli-1 protein levels in mouse erythroleukemic cells harboring an activated *Spi-1/PU.1* locus. We show here that Fli-1 knockdown (i) markedly reduced the ability of Friend erythroleukemic cells to generate colonies in semi-solid medium, (ii) accelerated their kinetic of differentiation and G1 arrest in response to HMBA and (iii) induced apoptosis at latter times of differentiation. Interestingly, the acceleration of G1 arrest induced by Fli-1 knockdown is associated with increased rate of p27^{Kip1} synthesis without significant modification of its turnover. Taken together, these data demonstrate that endogenous Fli-1 cooperates with Spi-1/PU.1 in the proliferation and inhibition of differentiation of erythroleukemic cells in association with a reduction of p27^{Kip1} protein synthesis and specifically contributes to their survival.

Introduction

Friend erythroleukemia are powerful models allowing to dissect how multiple oncogenes cooperate to initiate and maintain leukemic transformation. The Friend viral complex is composed of a replication-defective spleen focus-forming virus (SFFV) and a replication-competent Friend Murine Leukemia Virus (F-MuLV) which induce clonal erythroleukemia in susceptible mice (Ben-David & Bernstein, 1991; Lee et al., 2003; Ruscetti, 1999). Acute erythroleukemia is due to the SFFV virus. In the first step of the disease, gp55 ENV protein encoded by SFFV interacts with erythropoietin receptor (Epo-R) and constitutively activates signaling pathways allowing the amplification of proerythroblasts still able to differentiate in the absence of Epo. During this first step, the activation of signaling pathways allowing proerythroblasts proliferation is also strictly dependent on the c-Kit receptor as well as on the small form of the STK receptor tyrosine kinase (sf-STK) (Finkelstein et al., 2002; Subramanian et al., 2005). The second step of the disease is characterized by the outgrowth of erythroleukemic clones which are unable to differentiate and can be established as permanent cell lines *in vitro*. Virtually all tumors display SFFV proviral integration upstream of the *Spi-1/PU.1* gene leading to the deregulated production of the ETS transcription factor Spi-1/PU.1. It is now well established that this deregulated production of Spi-1/PU.1 is a critical event in the process of erythroleukemia induced by SFFV. One of the first evidence came from the observation that chemically induced proliferation arrest and differentiation of SFFV-infected erythroleukemic cells are associated with a decrease in Spi-1/PU.1 levels (Delgado et al., 1994; Galson et al., 1993; Hensold et al., 1996; Schuetze et al., 1992) and can be reversed by its enforced expression (Rao et al., 1997; Yamada et al., 1997). Similarly, enforced expression of Spi-1/PU.1 together with gp55 ENV and a constitutively activated Epo-R in avian erythroid progenitors inhibits differentiation (Quang et al., 1997). Furthermore, *Spi-1/PU.1* transgenic mice spontaneously develop an erythroleukemia characterized by the proliferation of proerythroblasts blocked in their differentiation and dependent on Epo for their proliferation (Moreau-Gachelin et al., 1996). Reciprocally, Spi-1/PU.1 knockdown induced by RNA interference is sufficient to inhibit the proliferation and to restore spontaneous terminal erythroid differentiation of erythroleukemic cell lines established from either SFFV-infected (Atar & Levi, 2005) or Spi-1/PU.1 transgenic mice (Rimmele et al., 2007). At least one contribution of Spi-1/PU.1

overexpression to erythroleukemia is through the inhibition of GATA-1 transcriptional activity (Nerlov et al., 2000; Rekhtman et al., 2003; Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 1999). Indeed, simple enforced expression of GATA-1 is sufficient to restore the differentiation of SFFV-infected erythroleukemic cells (Choe et al., 2003; Rekhtman et al., 2003; Rekhtman et al., 1999). Recent data have shown that Spi-1/PU.1 inhibits some GATA-1 target genes by binding to GATA-1 on promoters and by creating a repressive chromatin structure through the successive recruitment of pRB, histone methylase SUV39h and heterochromatin protein HP1 α (Stopka et al., 2005). However, although this mechanism might explain the contribution of Spi-1/PU.1 to the direct repression of erythroid specific GATA-1-dependent gene transcription, how Spi-1/PU.1 contributes to the proliferation of erythroleukemic cells remains poorly understood.

The replication-competent F-MuLV virus itself also induces clonal erythroleukemia when infected into newborn mice. In 75% of these tumors, F-MuLV provirus is integrated upstream of the *fli-1* gene leading to the deregulated expression of ETS family transcription factor Fli-1 (Ben-David et al., 1990; Truong & Ben-David, 2000). We and others have shown that enforced production of Fli-1 in erythroleukemic cells lines is sufficient to inhibit proliferation arrest and terminal differentiation induced either by chemicals or by SCF withdrawal (Starck et al., 1999a; Tamir et al., 1999; Zochodne et al., 2000). Others have also shown that enforced production of Fli-1 in avian erythroid progenitors is sufficient to allow them to survive and proliferate instead of differentiate in response to Epo (Ano et al., 2004; Lesault et al., 2002; Pereira et al., 1999). These data strongly suggest that Fli-1 contributes to survival and proliferation of F-MuLV infected erythroleukemic cells blocked in their differentiation. The anti-apoptotic *bcl2* gene identified as a direct target gene of Fli-1 may contribute to the survival of erythroleukemic cells that overexpress Fli-1 (Lesault et al., 2002). Furthermore, several studies strongly suggests that Fli-1 overexpression in erythroid cells interferes with Epo-R signaling. For example, *slap* mRNA which encodes a signaling molecule that inhibits Epo-induced differentiation is upregulated by enforced expression of Fli-1 in both murine erythroleukemic cells and avian erythroblasts (Lebigot et al., 2003). Our own studies have shown that Fli-1 behaves as a functional antagonist of EKLF in transient transactivation assays further suggesting that Fli-1 might also contribute to the inhibition of erythroid differentiation through the repression of EKLF target genes (Starck et al., 2003).

All these data indicate that deregulated expression of either Spi-1/PU.1 or Fli-1 can induce survival, proliferation and inhibition of erythroid cells differentiation. Interestingly, we have demonstrated that *fli-1* is a direct target gene activated by Spi-1/PU.1 in SFFV-

infected erythroleukemic cells (Starck et al., 1999a). This raised the intriguing possibility that, as a target gene of Spi-1/PU.1, Fli-1 might also contribute to the transformation of SFFV-infected erythroleukemic cells. In the present study, we addressed this question by using inducible shRNA production to inhibit endogenous *fli-1* gene expression in the SFFV-infected erythroleukemic cell line 745A. We found that *fli-1* knockdown resulted in decreased cell clonogenicity and accelerated proliferation arrest and differentiation in response to HMBA associated with increased globin gene transcription and increased apoptosis. Furthermore, we found that *fli-1* knockdown increased the rate of synthesis of the cyclin inhibitor p27^{Kip1}.

Results

Inducible Fli-1 knockdown in 745A erythroleukemic cells

The initial purpose of our study was to investigate if endogenous Fli-1 expression contributes to the transformation of SFFV-induced erythroleukemic cells harboring an activated *Spi-1/PU.1* locus. For that purpose, we used the SFFV-infected erythroleukemic 745A cell line from which we derived clone 745/TR expressing high levels of the Tet^R repressor under the control of the pEF1 α gene promoter (Rimmele et al., 2007). 745/TR cells were then stably transfected with plasmids pGJ10/*fli1* or pGJ10/*fli2* carrying expression cassettes allowing the production of shRNA targeted against two different regions of *fli-1* mRNA under the control of a doxycycline-inducible H1 promoter (van de Wetering et al., 2003). Figure 1 shows the analyses of one representative clone for each target displaying the strongest reduction of Fli-1 expression after two days in the presence of doxycycline. As expected, doxycycline did not affect significantly Fli-1 protein levels in control 745/TR cells (Figure 1A lanes 1, 2). In marked contrast, doxycycline induced an almost complete suppression of Fli-1 protein in clone shfli-1#44 (Figure 1A, lanes 3, 4) and a strong but non complete suppression of Fli-1 protein in clone shfli-2#1 (Figure 1A, lanes 5, 6). In both clones, maximal Fli-1 knockdown was observed after two days of culture in the presence of 100 ng/mL of doxycycline (data not shown). These two clones allowing inducible knockdown of Fli-1 were then used to determine the contribution of endogenous Fli-1 protein to proliferation, survival and inhibition of cell differentiation.

Fli-1 knockdown reduces the clonogenicity of 745A cells in semi-solid medium

No significant effect of doxycycline could be detected using MTT assay (Mosmann, 1983) on the proliferation and survival of 745/TR, shfli-1#44 or shfli-2#1 cells in liquid medium (data not shown). We thus investigated if doxycycline could affect cell clonogenicity in semi-solid medium as a more stringent indication of their proliferation potential. 745/TR, shfli-1#44 and shfli-2#1 cells were grown for two days in liquid medium with doxycycline and seeded in semi-solid medium still in the presence of doxycycline. The size and the number of colonies obtained 5 days later were then compared to that obtained from cells treated in parallel in the absence of doxycycline. Doxycycline did not change the size (not shown) or the numbers of colonies obtained with control 745/TR cells (Figure 1B, lanes 1, 2). In contrast, the size (not shown) and the number of colonies obtained with shfli-1#44 cells was markedly reduced in the presence of doxycycline (Figure 1B, lanes 3, 4). Similarly, the size (not shown) and the number of the colonies obtained with shfli-2#1 cells were also but less markedly reduced (Figure 1B, lanes 5, 6). Interestingly, the smaller effect of doxycycline observed on shfli-2#1 cells correlated with their lower inhibition of Fli-1 compared to shfli-1#44 cells (Figure 1A, lanes 3,4 and 5,6).

The possibility that the reduction of clonogenicity could result from unspecific effects induced by the deregulation of off-target or interferon-responsive genes was highly improbable since doxycycline induced similar effects in the two clones expressing different *fli-1* shRNA and did not affect the expression levels of *oas1* and *ifit1* commonly induced by dsRNA (Bridge et al., 2003) (data not shown). To directly ascertain that the reduced clonogenicity was indeed a specific effect of Fli-1 knockdown, we tried to reverse the effect of doxycycline by expression of exogenous Fli-1. For that purpose, we designed expression vector pcDNA4/TO/flishmut allowing the doxycycline inducible expression of *fli-1* mRNA carrying two silent mutations in the coding region targeted by shRNA sequence 1. This new construct was then used to transfect shfli-1#44 cells from which we obtained clone shmut#13. Western blot analysis revealed that in contrast to shfli-1#44 cells, initial levels of Fli-1 were maintained in shmut#13 cells after 2 days of culture in the presence of doxycycline (Figure 2A, lanes 2, 4) while endogenous *fli-1* mRNA was still markedly reduced (Figure 2C, compare lanes 3,4 and 5,6). As expected, the clonogenicity of shmut#13 cells was no more affected by doxycycline (Figure 2B, lanes 3, 4). Taken together, these data established that endogenous Fli-1 significantly contribute to the clonogenicity of 745A cells.

Fli-1 knockdown accelerates HMBA-induced erythroid differentiation

To address the role of endogenous Fli-1 in differentiation, shfli-1#44, shfli-2#1 and control parental 745/TR cells were treated for 2 days in the presence of doxycycline to induce *fli-1* knockdown. Then, we added HMBA to induce cell differentiation and we followed the increase in the percentages of differentiated hemoglobin producing cells in the presence or absence of doxycycline during the next 4 days. As expected, the kinetic of increase of differentiated 745/TR cells was not significantly modified by the presence of doxycycline (Figure 3A). In marked contrast, the percentages of differentiated shfli-1#44 and shfli-2#1 cells at day 2 were systematically two to three fold higher in the presence of doxycycline than in the absence of doxycycline. Similarly, the amounts of α and β globin mRNA determined on the whole cell populations at day 2 were also two to three fold higher in the presence than in the absence of doxycycline (Figure 3B). These results thus indicated that loss of endogenous Fli-1 accelerates the kinetic of differentiation in response to HMBA. After 3 days in the presence of HMBA, the positive effect of doxycycline on the percentages of differentiated cells was obscured by the concomitant induction of apoptosis (see below).

Fli-1 knockdown induces apoptosis

The induction of apoptosis by *fli-1* knockdown at late times of differentiation was confirmed by trypan blue coloration (Figure 4A) and FACS analysis of hypodiploid (sub-G1) cells containing fragmented DNA (Figure 4B). As expected, less than 5% of control 745/TR cells at day 3 and 4 of the HMBA treatment were found in the trypan blue positive or sub-G1 cell fractions and these percentages were not affected by doxycycline. Similarly, less than 5% of trypan blue positive and sub-G1 cells were found in the shfli-1#44 and shfli-2#1 cell cultures at days 3 and 4 after the addition of HMBA in the absence of doxycycline. In marked contrast, the percentages of trypan blue and sub-G1 cells in the presence of doxycycline increased from 20% to 40-50% between days 3 and 4 in the shfli-1#44 cell culture and from 10-15% to 35-40% in the shfli-2#1 cell culture. Interestingly again, the smaller increase in death of shfli-2#1 cells compared to shfli-1#44 cells correlated to the lower extend of Fli-1 knockdown in shfli-2#1 cells. Furthermore, in shmut#13 cells in which Fli-1 levels have been restored (Figure 2A), the percentages of dead cells remained below 10% even at day 4 in the presence of doxycycline thus confirming that the induction of cell death by doxycycline was a specific effect of Fli-1 knockdown. Finally, to ensure that cell death induced by doxycycline was due to apoptosis, we looked for the presence of annexin V positive/propidium iodide negative cells by FACS analyses (Figure 4C). As expected, less than 1 % of 745/TR cells were annexin V positive/propidium iodide negative after 3 days of differentiation either in the presence or

the absence of doxycycline. In contrast, the percentage of apoptotic shfli-1#44 cells reached 9.3 % after 3 days in the presence of HMBA and doxycycline. From these data, we concluded that Fli-1 knockdown also induces apoptosis.

Fli-1 knockdown accelerates cell cycle arrest in response to HMBA

Another important aspect of erythroid terminal differentiation is the irreversible block of the cell cycle in G1 phase. To determine the role of endogenous Fli-1 in this aspect, 745/TR, shfli-1#44 and shfli-2#1 cells were treated for 2 days with or without doxycycline, switched in the presence of 5 mM HMBA and the proportion of cells in the G1 phase was determined by propidium iodide staining during the next 4 days. As expected, we confirmed that the proliferation arrest of untreated 745/TR and shfli-1#44 cells was associated with the progressive increase in the proportion of cells in the G1 phase (Figure 5A). However, whereas doxycycline did not modify the kinetic of accumulation of 745/TR cells in G1 phase (Figure 5A, left part), it strongly accelerated that of shfli-1#44 cells (Figure 5A, right part). Similar results were obtained with shfli-2#1 cells (data not shown). These data indicated that Fli-1 knockdown induces a strong acceleration of proliferation arrest due to an accelerated accumulation of cells in G1 phase.

Fli-1 knockdown enhances the synthesis of p27^{Kip1} protein

Previous studies have shown that the increase in p27^{Kip1} level is one of the major event involved in the G1 growth arrest of MEL cells in response to chemical inducers of differentiation (Hsieh et al., 2000; Zhu & Skoultchi, 2001). In agreement with these data, we found that p27^{Kip1} levels in HMBA treated shfli-1#44 cells increased much more rapidly in the presence than in the absence of doxycycline (Figure 5B). Indeed, p27^{Kip1} levels in shfli-1#44 cells already increased after only one day in the presence of doxycycline but did not increase before three days in the absence of doxycycline (Figure 5B, compare lanes 1, 2 to 5, 6). The fact that p27^{Kip1} mRNA levels did not change significantly during the first two days either in the presence or in the absence of doxycycline (Figure 5C) suggested that p27^{Kip1} expression was regulated post-transcriptionally. Cycloheximide chase experiments indicated that p27^{Kip1} protein half life in HMBA treated shfli-1#44 cells was roughly 3 hours and did not change in the presence of doxycycline (Figure 6). Further measurement of p27^{Kip1} half life by chase experiments following pulse of metabolic labeling led to the same estimation of 3 hours and confirmed that doxycycline had no significant effect on this value (Figure 7B and 7C). Finally, we found that the total amount of ³⁵S-methionine-cysteine incorporated into p27^{Kip1}

protein during only one hour was roughly 3 fold higher in the presence than in the absence of doxycycline (Figure 7A) without modification of the total amount incorporated into whole cell proteins (not shown). Taken together, these results thus indicated that Fli-1 knockdown was associated with increased rate of p27^{Kip1} synthesis.

Discussion

In this study, we demonstrate for the first time that endogenous Fli-1 levels do contribute to the proliferation, survival and inhibition of differentiation of erythroleukemic cells harboring an activated *Spi-1/PU.1* locus. This conclusion is based on the observation that Fli-1 knockdown obtained using inducible shRNA production (i) markedly reduces their cloning efficiency in semi-solid medium, (ii) accelerates their kinetics of differentiation and cell cycle arrest in response to HMBA and (iii) induces apoptosis at latter times of differentiation. Importantly, the reduction of cloning efficiency is proportional to the extent of Fli-1 reduction and is completely reversed by restoring initial Fli-1 levels through shRNA insensitive exogenous *fli-1* gene transfection thus ensuring a specific effect of Fli-1 knockdown. Although Fli-1 knockdown is sufficient to reduce cell clonogenicity, it does not allow spontaneous differentiation as we and others recently observed following *Spi-1/PU.1* knockdown (Atar & Levi, 2005; Rimmelé et al., 2007). Thus, in contrast to *Spi-1/PU.1*, Fli-1 levels are not the limiting factor impeding differentiation. However, once differentiation has been initiated by HMBA, *Spi-1/PU.1* levels decline and differentiation is more rapid when endogenous Fli-1 is reduced as evidenced by accelerated G1 growth arrest and accumulation of hemoglobin producing cells. Thus, while endogenous Fli-1 levels are not the limiting factor impeding differentiation they unambiguously contribute to reduce differentiation. Whether Fli-1 levels are acting only by inhibiting G1 arrest or also by independently inhibiting globin gene transcription remains difficult to ascertain from the present data. Indeed, enhanced globin gene mRNA levels observed on the whole cell population during the first days of differentiation in the absence of Fli-1 may simply reflect enhanced number of committed cells. Finally, endogenous Fli-1 levels also contribute to cell survival as evidenced by the accumulation of apoptotic cells at latter times of differentiation. Interestingly, apoptosis was only observed after Fli-1 knockdown thus indicating a specific contribution of Fli-1 to the survival of 745A cells not shared by *Spi-1/PU.1*. Our finding that endogenous Fli-1 levels do contribute to the proliferation, survival and inhibition of differentiation of erythroleukemic

cells harboring activated *Spi-1/PU.1* locus highlights the critical importance of *fli-1* as a target gene of Spi-1/PU.1 in Friend erythroleukemia.

We and others have shown that Spi-1/PU.1 and Fli-1 are co-expressed in normal erythroid cell progenitors (Back et al., 2005; Starck et al., 1999b). Of particular interest, both Spi-1/PU.1 and Fli-1 are expressed in proliferating stress erythroid progenitors cultures established in the presence of dexamethasone, erythropoietin and stem cell factor (Back et al., 2004; Dolznig et al., 2001). Furthermore, *fli-1* downregulation coincides with proliferation arrest and differentiation upon dexamethasone and stem cell factor withdrawal (Dolznig et al., 2001) whereas stress erythroid progenitors derived from *Spi-1/PU.1* +/- heterozygous mice proliferate less rapidly than wild type (Back et al., 2004). These data suggest that, like in erythroleukemic cells (this study) and as already demonstrated for Spi-1/PU.1 (Back et al., 2004; Fisher et al., 2004), Fli-1 might also cooperate with Spi-1/PU.1 to stimulate the proliferation of normal stress erythroid progenitors at the expense of their differentiation. Interestingly, recent studies have shown that the target cells which are amplified upon Friend SFFV infection are indeed stress erythroid progenitors located in the spleen (Subramanian et al., 2005). We suggest therefore that the recurrent *fli-1* gene activation observed in Friend erythroleukemia does not rely on new functions of Fli-1 acquired as a consequence of its overexpression but rather on its natural function played during stress erythropoiesis.

The known importance of p27^{Kip1} in the control of erythroid cell proliferation prompted us to investigate if Fli-1 could be involved in p27^{Kip1} regulation. The results of our investigations demonstrate for the first time that Fli-1 is surprisingly acting at the translation step to reduce p27^{Kip1} levels. This conclusion is based on several concordant observations showing that Fli-1 knockdown increased p27^{Kip1} protein levels but did not affect neither p27^{Kip1} mRNA nor p27^{Kip1} protein turnover as well as by direct measurement of the increased rate of p27^{Kip1} protein synthesis by pulse metabolic labeling. This finding is of particular interest given the recurrent provirus insertions at locus *Fli-3-mir-17-92* recently identified in F-MuLV induced erythroleukemia (Cui et al., 2007). Indeed, this *Fli-3-mir-17-92* locus encodes a cluster of microRNAs which, as shown for Fli-1 in the present study, has been shown to reduce the translation efficiency of p27^{Kip1} mRNA. Taken together, these data further highlights the intriguing point that reduction of p27^{Kip1} synthesis seems to be a common way by which different recurrent proviral integrations may contribute to proliferation in Friend erythroleukemia. Importantly, we found in the present study that Fli-1 knockdown does not affect global protein synthesis thus indicating selective reduction of p27^{Kip1} synthesis. The IRES sequence present in the 5' UTR of p27^{Kip1} mRNA remains a very

attractive candidate to explain this selective regulation (Jiang et al., 2007; Yoon et al., 2006). Further experiments are needed to determine if mir-17-92, Spi-1/PU.1 and Fli-1 favor the preferential translation of p27^{Kip1} mRNA through this IRES and if they contribute to the transformation process through the deregulation of other IRES dependent mRNAs.

In conclusion, this study demonstrates that endogenous Fli-1 levels specifically contributes to the survival and cooperates with Spi-1/PU.1 in the proliferation and inhibition of differentiation of Friend erythroleukemic cells. The unique experimental cell system allowing inducible endogenous *fli-1* gene knockdown represents a very promising tool to identify new Fli-1 target genes to understand its multiple functions in erythroleukemia and in particular to explain the deregulation of p27^{Kip1} synthesis.

Material and methods

Cell culture and transfection

Mouse erythroleukemic cells clone 745A harboring SFFV proviral integration upstream of *Spi-1/PU.1* (Starck et al., 1999a) and all their derivatives were cultured at 37°C under 5% CO₂ in a humidified incubator and in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Invitrogen) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS; Bio West) and antibiotics. 745/TR cells were maintained under 20 µg/mL blasticidin (Cayla). shfli-1#44 and shfli-2#1 cells were maintained under blasticidin and 1 mg/mL G418 (Invitrogen). shmut#13 cells were maintained under blasticidin, G418 and 300 µg/mL Zeocyn (Invitrogen). Erythroid differentiation was initiated by adding by 5 mM HMBA (hexamethylenebisacetamide, Sigma) and hemoglobin containing differentiated cells were numbered by benzidine staining (Starck et al., 1999a). In all differentiation experiments, cells were pretreated for 2 days with or without 100 ng/mL doxycycline (Clontech) before the addition of HMBA and doxycycline was maintained during the whole differentiation time. Colony assays were performed in quadruplicates by seeding 50 cells/well in 500 µL of 0,8 % methylcellulose (Fluka) in IMDM supplemented with 10 % FCS in a 24 wells culture plate. Transfections were performed with DAC30 according to the recommendations of the manufacturer (Eurogentec) and using 2 µg DNA and 10 µg DAC30 for 4 × 10⁵ cells. The day following transfection, cells were plated under appropriate antibiotic selection at a density of 10² cells/well in 96 wells culture plates allowing the selection of single antibiotic-resistant clone per well. Proliferation assays were performed using MTT (Mosmann, 1983) as previously described (Starck et al., 1999b).

DNA constructs

pcDNA6/TR-EF1 α allowing production of the bacterial repressor TETR under the control of human EF1- α gene promoter has been already described (Rimmele et al., 2007). pGJ10 is a 5126 bp vector (complete sequence available upon request) built on a pUC backbone harboring pUC origin of replication, ampicillin resistance bacterial gene, SV40 driven G418 resistance gene and the human H1-TetO2 promoter derived from pTER kindly provided by M Van de Vetering (van de Wetering et al., 2003). This pGJ10 vector contains unique Bgl II and Not I restriction sites allowing the cloning of shRNA encoding sequences under the control of the doxycycline-inducible H1-TetO2 promoter. pGJ10/shfli1 and pGJ10/shfli2 were obtained by cloning double stranded oligonucleotides (Supplementary Table 1) encoding shRNA directed against two different target sites of the murine *fli-1*. pcDNA4/TO/flihm1 was obtained by cloning a murine *fli-1* cDNA sequence (obtained by two step PCR; see supplementary Table 1) containing 2 silent point mutations in the region targeted by pGJ10/shfli1 under the control TET-repressible CMV promoter in commercial pcDNA4/TO vector carrying zeocin resistance (Invitrogen).

Quantitative RT-PCR

Total RNA were prepared using RNA plus (Q-Biogene) according to the recommendations of the manufacturer and quantified by UV spectrophotometry. 1 μ g of total RNA was retro-transcribed in duplicates by random priming in a final volume of 20 μ L containing 200 units of M-MLV RT (Invitrogen) for 1 hour at 37°C. Quantitative PCR were performed using Quanti Teck SYBR green PCR kit (Qiagen) on a LightCycler (Roche) and oligonucleotides indicated in supplementary Table 1. For each RT-PCR duplicate, target gene amplification signals were normalized to the corresponding 18S rRNA signals.

Western blot analyses

Western blot analyses were performed on total cell lysates as previously described (Sarrazin et al., 2000; Starck et al., 1999a) using the following antibodies (all from Santa Cruz) : anti-FLI-1 (sc-356), anti-GRB-2 (sc-17813), anti-27^{Kip1} (sc-776), anti-Actin (sc-8432).

Flow cytometry analyses

Proportions of apoptotic cells were determined by flow cytometry performed on a FACS Calibur (Becton-Dickinson) after double labeling using Annexin V-FITC Kit (AbCys) and following the recommendations of the manufacturer. For cell cycle analyses, 10^6 cells were washed in PBS and fixed for at least 30 min at 4°C in PBS/Ethanol 70 %. After another PBS wash, RNA was digested for 30 min at room temperature by 50 µg/mL RNase A (Sigma) and propidium iodide (50 µg/mL; Sigma) was added before FACS analysis.

Pulse-chase labeling experiments and immunoprecipitation of p27^{Kip1}

shfli-1#44 cells were pre-incubated for 90 min in DMEM lacking methionine and cysteine (Gibco) supplemented with 10 % dialyzed FCS and then for 2 hours in the presence of 75 µCi/mL of ³⁵S-labeled methionine and cysteine (Translabel, Amersham). After two washes in PBS 1X, chase incubation was pursued for 1, 3 and 6 hours in IMDM supplemented with 10% FCS and 100 µg/mL of cold methionine. After each chase period, cells were washed 2 times with PBS 1X, lysed in RIPA buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, 10 mg / mL aprotinin, 10 mg / mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 10% glycerol at 1.4×10^4 cells per mL) and centrifuged at 15000 rpm at 4°C for 20 min. Extracts were precleared with 20 µL of protein G-sepharose beads (Amersham). Precleared extracts were then incubated with 2 µg of polyclonal anti-p27 antibody (sc-776, Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C on a rolling wheel. 20 µL of protein G-sepharose beads (Amersham) were added and incubation continued for 4 hours. Beads were washed 3 times with PBS 1X and boiled with Laemmli loading buffer. The samples were then subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane which was successively exposed for autoradiography using a Typhoon Trio Imager (Amersham) and revealed by chemiluminescence using p27^{Kip1} antibody. Radioactive signals were quantified using ImageQuant TL software (Amersham).

Acknowledgements

We are very grateful to Marc Van de Wetering for kindly providing us his pTer vector before publication, to Anna Greco for her advices in metabolic labeling experiments and to Joëlle Starck, Boris Guyot and Françoise Moreau-Gachelin for helpful discussions and critical

reading of the manuscript. We also thank Colette Gonnet for her excellent technical assistance and Laure Granger for DNA sequencing facilities. This work has been supported by recurrent grants from the CNRS and Université Lyon 1 and by specific grants from the following associations : “Fondation de France” (N° 2003005020), “La Ligue contre le Cancer “ (Labellisation 2005) and by salaries to NC and GJ from “La Ligue contre le Cancer”.

References

- Ano S, Pereira R, Pironin M, Lesault I, Milley C, Lebigot I, Quang CT and Ghysdael J. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 2993-3002.
- Atar O and Levi BZ. (2005). *Biochem Biophys Res Commun*, **329**, 1288-92.
- Back J, Allman D, Chan S and Kastner P. (2005). *Exp Hematol*, **33**, 395-402.
- Back J, Dierich A, Bronn C, Kastner P and Chan S. (2004). *Blood*, **103**, 3615-23.
- Ben-David Y and Bernstein A. (1991). *Cell*, **66**, 831-4.
- Ben-David Y, Giddens EB and Bernstein A. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1332-6.
- Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL and Iggo R. (2003). *Nat Genet*, **34**, 263-4.
- Choe KS, Radparvar F, Matushansky I, Rekhtman N, Han X and Skoultchi AI. (2003). *Cancer Res*, **63**, 6363-9.
- Cui JW, Li YJ, Sarkar A, Brown J, Tan YH, Premyslova M, Michaud C, Iscove N, Wang GJ and Ben-David Y. (2007). *Blood*, **110**, 2631-40.
- Delgado MD, Hallier M, Meneceur P, Tavitian A and Moreau-Gachelin F. (1994). *Oncogene*, **9**, 1723-7.
- Dolznic H, Boulme F, Stangl K, Deiner EM, Mikulits W, Beug H and Mullner EW. (2001). *Faseb J*, **15**, 1442-4.
- Finkelstein LD, Ney PA, Liu QP, Paulson RF and Correll PH. (2002). *Oncogene*, **21**, 3562-70.
- Fisher RC, Slayton WB, Chien C, Guthrie SM, Bray C and Scott EW. (2004). *Leuk Res*, **28**, 83-9.
- Galson DL, Hensold JO, Bishop TR, Schalling M, D'Andrea AD, Jones C, Auron PE and Housman DE. (1993). *Mol Cell Biol*, **13**, 2929-41.
- Hensold JO, Stratton CA, Barth D and Galson DL. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 3385-91.
- Hsieh FF, Barnett LA, Green WF, Freedman K, Matushansky I, Skoultchi AI and Kelley LL. (2000). *Blood*, **96**, 2746-54.
- Jiang H, Coleman J, Miskimins R, Srinivasan R and Miskimins WK. (2007). *Nucleic Acids Res*, **35**, 4767-78.
- Lebigot I, Gardellin P, Lefebvre L, Beug H, Ghysdael J and Quang CT. (2003). *Blood*, **102**, 4555-62.
- Lee CR, Cervi D, Truong AH, Li YJ, Sarkar A and Ben-David Y. (2003). *Anticancer Res*, **23**, 2159-66.
- Lesault I, Quang CT, Frampton J and Ghysdael J. (2002). *Embo J*, **21**, 694-703.
- Moreau-Gachelin F, Wendling F, Molina T, Denis N, Titeux M, Grimber G, Briand P, Vainchenker W and Tavitian A. (1996). *Mol Cell Biol*, **16**, 2453-63.
- Mosmann T. (1983). *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H and Graf T. (2000). *Blood*, **95**, 2543-51.
- Pereira R, Quang CT, Lesault I, Dolznig H, Beug H and Ghysdael J. (1999). *Oncogene*, **18**, 1597-608.
- Quang CT, Wessely O, Pironin M, Beug H and Ghysdael J. (1997). *Embo J*, **16**, 5639-53.
- Rao G, Rekhtman N, Cheng G, Krasikov T and Skoultchi AI. (1997). *Oncogene*, **14**, 123-31.
- Rekhtman N, Choe KS, Matushansky I, Murray S, Stopka T and Skoultchi AI. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 7460-74.
- Rekhtman N, Radparvar F, Evans T and Skoultchi AI. (1999). *Genes Dev*, **13**, 1398-411.
- Rimmele P, Kosmider O, Mayeux P, Moreau-Gachelin F and Guillouf C. (2007). *Blood*, **109**, 3007-14.
- Ruscetti SK. (1999). *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 1089-109.
- Sarrazin S, Starck J, Gonnet C, Doubeikovski A, Melet F and Morle F. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 2959-69.
- Schuetze S, Paul R, Gliniak BC and Kabat D. (1992). *Mol Cell Biol*, **12**, 2967-75.

- Starck J, Cohet N, Gonnet C, Sarrazin S, Doubeikovskaia Z, Doubeikovski A, Verger A, Duterque-Coquillaud M and Morle F. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 1390-402.
- Starck J, Doubeikovski A, Sarrazin S, Gonnet C, Rao G, Skoultchi A, Godet J, Dusanter-Fourt I and Morle F. (1999a). *Mol Cell Biol*, **19**, 121-35.
- Starck J, Mouchiroud G, Gonnet C, Mehlen A, Aubert D, Dorier A, Godet J and Morle F. (1999b). *Exp Hematol*, **27**, 630-41.
- Stopka T, Amanatullah DF, Papetti M and Skoultchi AI. (2005). *Embo J*.
- Subramanian A, Teal HE, Correll PH and Paulson RF. (2005). *J Virol*, **79**, 14586-94.
- Tamir A, Howard J, Higgins RR, Li YJ, Berger L, Zacksenhaus E, Reis M and Ben-David Y. (1999). *Mol Cell Biol*, **19**, 4452-64.
- Truong AH and Ben-David Y. (2000). *Oncogene*, **19**, 6482-9.
- van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FC, Brummelkamp TR, Agami R and Clevers H. (2003). *EMBO Rep*, **4**, 609-15.
- Yamada T, Kondoh N, Matsumoto M, Yoshida M, Maekawa A and Oikawa T. (1997). *Blood*, **89**, 1383-93.
- Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E and Ruggero D. (2006). *Science*, **312**, 902-6.
- Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS, Auron PE, Tenen DG and Sun Z. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8705-10.
- Zhu L and Skoultchi AI. (2001). *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 91-7.
- Zochodne B, Truong AH, Stetler K, Higgins RR, Howard J, Dumont D, Berger SA and Ben-David Y. (2000). *Oncogene*, **19**, 2296-304.

Legends to figures

Figure 1

Doxycycline-inducible fli-1 knockdown reduces the clonogenicity of 745A cells.

Clone 745/TR expressing high levels of the TetR repressor has been derived from 745A erythroleukemic cells. Clones shfli-1#44 and shfli-2#1 have been obtained by stable transfection of 745/TR cells with plasmids pGJ10/fli-1 and pGJ10/fli-2 carrying a doxycycline-inducible shRNA expression cassette targeted to two different regions of *fli-1* mRNA. Cells from each clone have been cultured for two days in the presence or absence of 100 ng/mL of doxycycline (DOX) and 50 cells were then seeded in quadruplicates with or without doxycycline in semi-solid medium. Colonies were numbered 5 days later. **A** : Western blot analysis of Fli-1 protein after two days in the presence of doxycycline. The two bands revealed by the Fli-1 specific antibody correspond to the major (51 kDa) and minor (48 kDa) isoforms of Fli-1 (upper part). GRB2 protein revealed on the same membrane is shown as a loading control (lower part). **B** : Graphical presentation of the relative numbers of colonies obtained in the absence (empty boxes) or presence (black boxes) of doxycycline expressed as percentages of untreated cells (means and standard deviations from four different experiments). Statistically significant (paired Student test with $p < 0.05$) differences are indicated by asterisks.

Figure 2

Rescue of clonogenicity by exogenous Fli-1 expression.

Shmut#13 cells were derived from shfli-1#44 cells following stable transfection with expression vector pcDNA4/TO/fli-shmut carrying a *fli-1* cDNA with 2 silent mutations in the shRNA target sequence 1 placed under the control of a doxycycline-inducible CMV promoter. Shmut#13 and shfli-1#44 cells were grown for two days in the presence or absence of 100 ng/mL of doxycycline (DOX) and cloning efficiency was determined as described in figure 1. **A** : Western blot analysis of Fli-1 protein in parental shfli-1#44 and rescued shmut#13 cells after 2 days of culture with or without DOX. **B** : Relative numbers of colonies expressed as percentages of numbers obtained in the absence of doxycycline (means and standard deviations from 3 different experiments). **C** : Quantitative RT-PCR analysis of endogenous *fli-1* mRNA in parental shfli-1#44 and rescued shmut#13 cells after 2 days of liquid culture

with or without doxycycline. Note that the sense primer used here is located in the 5' UTR region of endogenous *fli-1* mRNA which is absent in the transfected *fli-1* gene thus ensuring only endogenous *fli-1* mRNA amplification (relative values standardized on 18S rRNA; means and standard deviations of duplicate determinations performed on one experiment).

Figure 3

Fli-1 knockdown enhances erythroid differentiation.

745/TR, shfli-1#44 and shfli-2#1 cells were cultured for two days in the presence or absence of 100 ng/mL of doxycycline (DOX) and then induced to differentiate in the presence of 5 mM of HMBA. At the indicated days, the percentages of hemoglobin producing cells were determined by benzidine coloration and the relative levels of α and β -globin mRNA were determined by quantitative RT-PCR. **A** : Percentages of benzidine positive cells (means and standard deviations from 3 different experiments). **B** : Quantification of α and β -globin mRNAs after two days of culture in the presence of 5 mM HMBA (relative levels standardized by 18S rRNA; means and standard deviations of duplicate determinations from one typical experiment repeated two times). Statistically significant differences (paired Student test with $p < 0.05$) are indicated by asterisks.

Figure 4

Fli-1 knockdown induces apoptosis.

745/TR, shfli-1#44, shfli-2#1 or shmut#13 cells were grown for two days in the presence or absence of doxycycline and then for four days in the presence of 5 mM of HMBA as in figure 2. **A** : Percentages of trypan blue positive dead cells (means and standard deviations from three different experiments with 745/TR, shfli-1#44 and shfli-2#1 cells and two experiments with shmut#13 cells). **B** : Percentages of sub-G1 cells containing fragmented DNA determined by FACS analysis after labeling by propidium iodide (means and standard deviations from two different experiments). **C** : FACS diagrams of cells labeled with propidium iodide and annexin V after 3 days of culture in the presence of HMBA. The percentages of propidium iodide negative and annexin V positive apoptotic cells are given (typical results from two different experiments).

Figure 5

Fli-1 knockdown accelerates G1 arrest and p27^{Kip1} protein increase during HMBA-induced differentiation.

745/TR or shfli-1#44 cells were grown for two days in the presence or absence of doxycycline and then for four days in the presence of 5 mM of HMBA as in figure 2. **A** : Evolution of the percentages of viable cells in G1 phase as determined by FACS analysis in the presence (full symbols) or absence (empty symbols) of doxycycline (means and standard deviations from two independent experiments). **B** : Western blot analysis of Fli-1 and p27^{Kip1}. GRB2 is shown as a loading control. **C** : Relative levels of p27^{Kip1} mRNA determined by qRT-PCR and standardization to 18S rRNA (means and standard deviation from 3 independent experiments each with duplicate determinations).

Figure 6

Fli-1 knockdown does not affect p27^{Kip1} turnover.

shfli-1#44 cells were grown for two days in the absence or presence of doxycycline to knockdown Fli-1 then for one day in the presence of 5 mM of HMBA to initiate differentiation and finally for six hours in the presence or absence of 100 µg/mL of cycloheximide to block new protein synthesis. **A** : Western blot analysis of p27^{Kip1} protein during the chase period after the addition of cycloheximide. Actin is shown as a loading control. **B** : Graphical presentation of the decrease of p27^{Kip1} signal determined by densitometric analysis of the Western blot shown in A.

Figure 7

Fli-1 knockdown enhances p27^{Kip1} synthesis.

shfli-1#44 cells were grown for two days in the absence or presence of doxycycline to knockdown Fli-1 then for one day in the presence of 5 mM of HMBA to initiate differentiation and finally for one (A) or two hours (B) in the presence of ³⁵S methionine and cysteine before washing with medium containing excess of cold methionine. At different times post-washing, whole cell extracts were immunoprecipitated with either p27^{Kip1} or control HA antibodies. Immunoprecipitated proteins were loaded on SDS-PAGE, transferred to membranes and membranes were successively exposed to radio-imager and analyzed by Western blot using p27^{Kip1} antibody. **A** : Radioactive and Western blot imaging of p27^{Kip1} immediately following a 1 hour labeling. **B** : Radioactive and Western blot imaging of

p27^{Kip1} at different times following a 2 hours labeling. **C** : Graphical presentation of the decrease of p27^{Kip1} radioactive signal recorded by the radio-imager. Results are expressed as percentages of the starting signal.

Supplemental Table S1 : Oligonucleotides used in this study

shRNA encoding oligonucleotides

Target gene	Sequence
Murine <i>fli-1</i> target 1 (sense)	5'- GATCCCAGTTCCTGCTGGCCTATATTCAAGAGATATAGGCC AGCAGTGAACTTTTTGGAAA - 3'
Murine <i>fli-1</i> target 1 (antisense)	5'- GGCCTTTCCAAAAAGTTCCTGCTGGCCTATATCTCTTGAA TATAGGCCAGCAGTGAACCTGG - 3'
Murine <i>fli-1</i> target 2 (sense)	5'- GATCCCAGCTACTACTAGAATACTTCAAGAGAGTTAGTTC TAGTAGTAGCTTTTTTGGAAA - 3'
Murine <i>fli-1</i> target 2 (antisense)	5'- GGCCTTTCCAAAAAGCTACTACTAGAATACTTCTCTTGAA GTTAGTTCTAGTAGTAGCTGG - 3'

Mutagenesis PCR primers used to obtain shRNA resistant *fli-1* cDNA

PCR reaction	Sequence
Upstream PCR (sense)	5'- AAGCTTGAAATGGACGGGACTATTAAG - 3'
Upstream (antisense)	5'- GGGAGGTTGTGTTATAGGCGAGCAGAGAAGTTCCTGAGG TAAC - 3'
Downstream PCR (sense)	5'- GTTACCTCAGGGAAAGTTCCTCTGCTCGCCTATAACACAACCT CCC - 3'
Downstream PCR (antisense)	5'- CTCGAGCTAGTAGTAGCTGCCTAAGT - 3'

Real time RT-PCR primers (designed to span one intron)

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>oas1</i>	5'- GGAGAGATGCTTCCAAGGTG-3'	5'-AAGGAACACCACCAGGTCAG-3'
α -globin	5'- CTGGGGAAGACAAAAGCAAC-3'	5'- GCCGTGGCTTACATCAAAGT-3'
β -globin	5'- GCACCTGACTGATGCTGAGA-3'	5'- CTGGGTCCAAGGGTAGACAA-3'
<i>fli-1</i> (endogenous specific)	5'- CCGCTACAACAACAACGTG-3'	5'- ACCTCGTAGCCCTTCAGAT-3'
<i>fli-1</i>	5'- CAACCAGCCAGTGAGAGTCA- 3'	5'- GTTCGTTGGTGGTCATGTTG-3'
<i>18S rRNA</i>	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	5'- GCTGGAATTACCGCGGCT-3'
<i>bcl2</i>	5'-ATCGCCCTGTGGATGACTGAGTA - 3'	5'-GGAGAAATCAAACAGAGGTCGCA - 3'
<i>bclxL</i>	5'- TGACCACCTAGAGCCTTGGA -3'	5'- AGAACCACACCAGCCACAGT -3'
<i>ifit1</i>	5'- CAAGGCAGGTTTCTGAGGAG-3'	5'- TGAAGCAGATTCTCCATGACC-3'

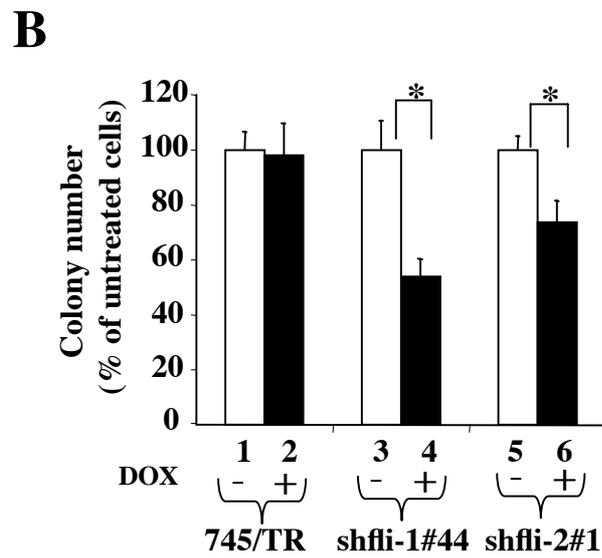
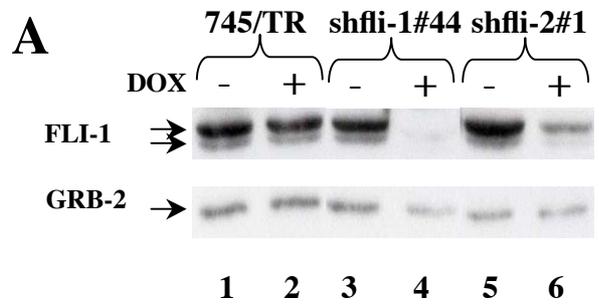


Figure 1: Inducible *fli-1* knockdown reduces clonogenicity of 745-A cells

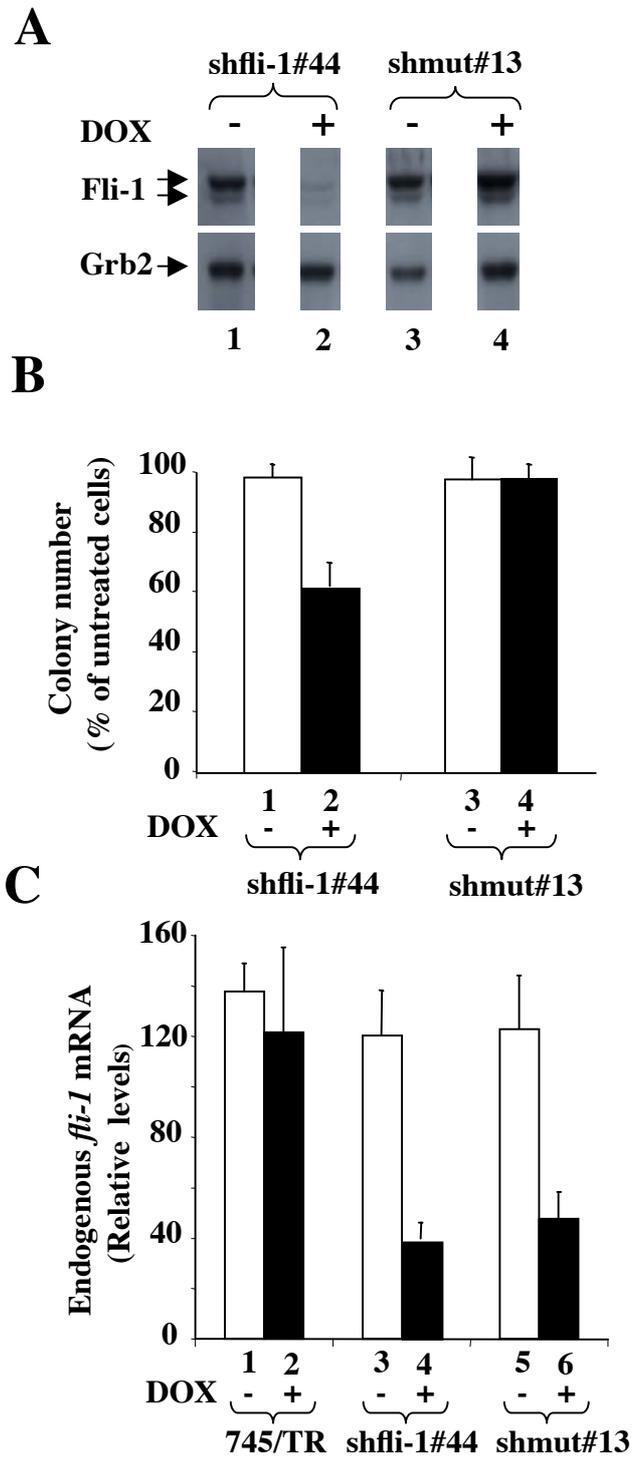


Figure 2 : Rescue of clonogenicity by exogenous Fli-1

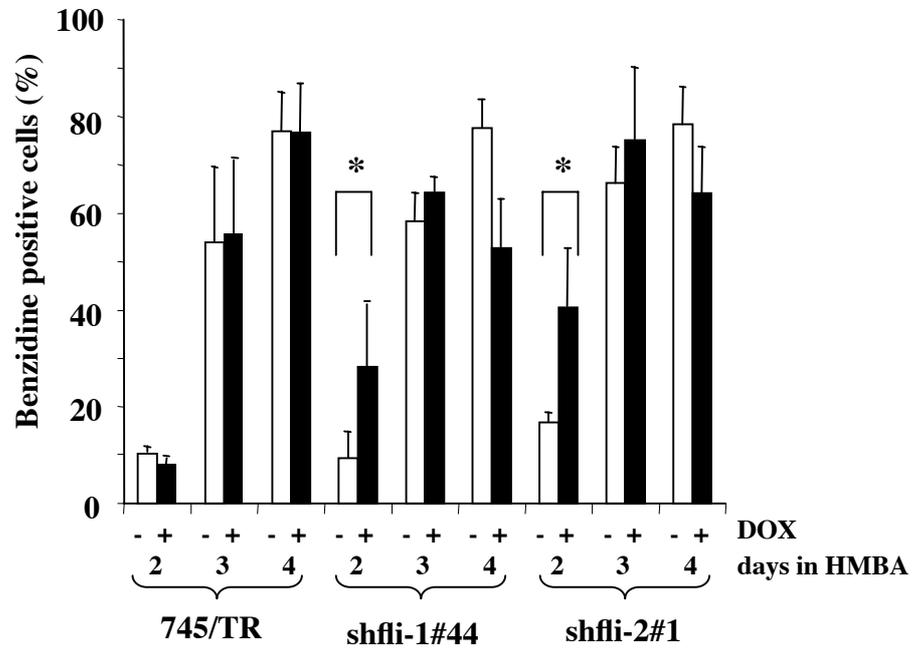
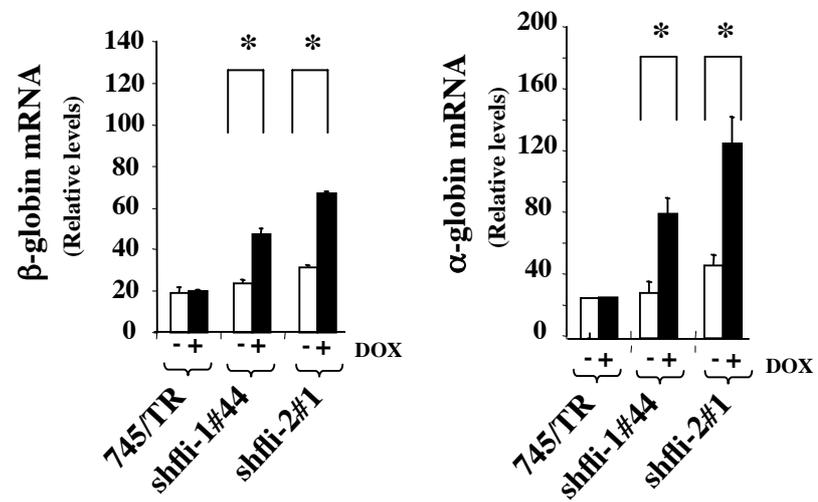
A**B**

Figure 3 : *fli-1* knockdown enhances erythroid differentiation

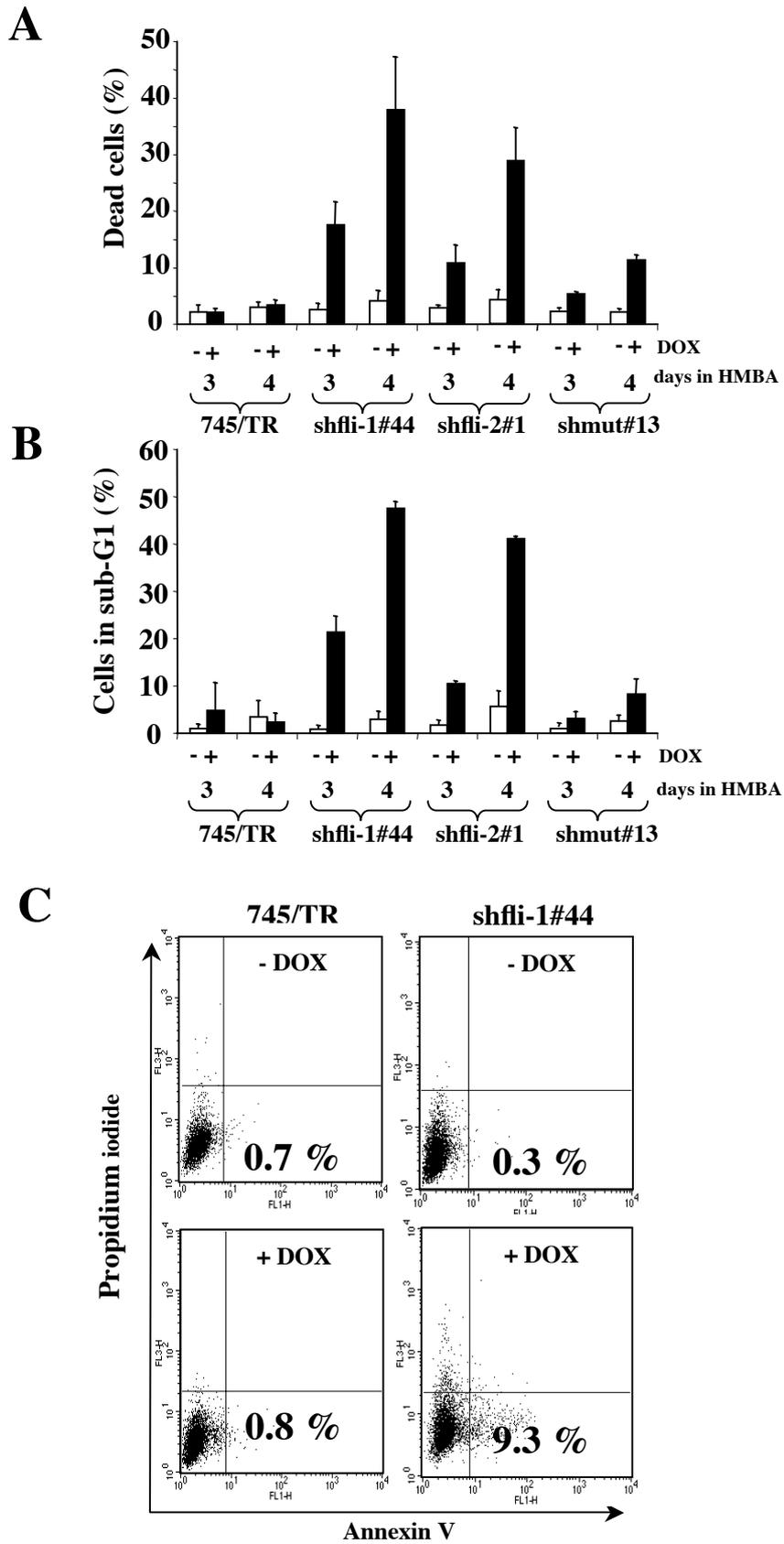


Figure 4 : *fli-1* knockdown induces apoptosis

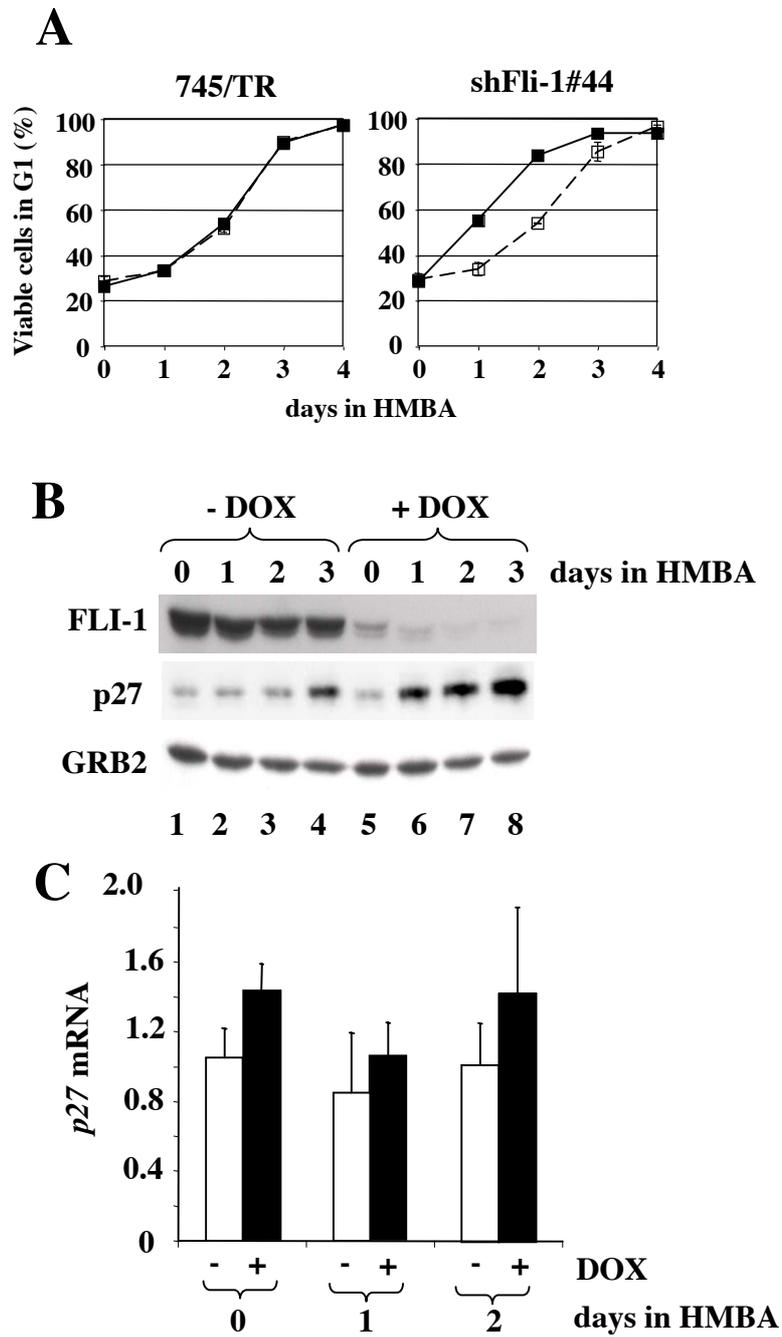


Figure 5 : *fli-1* knockdown increases p27 levels

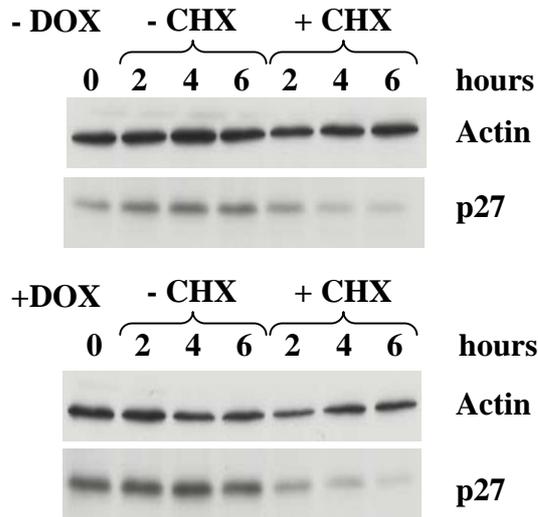
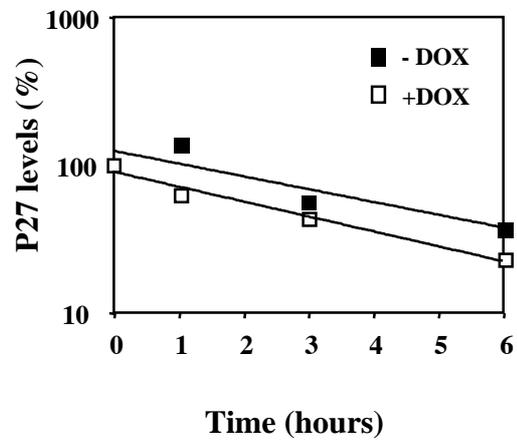
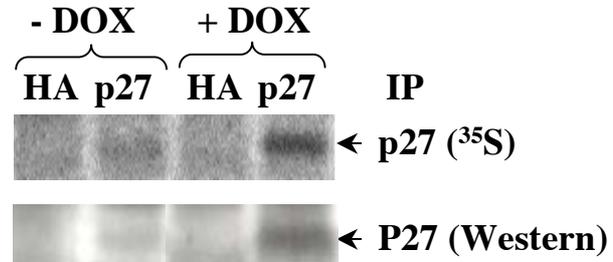
A**B**

Figure 6 : *fli-1* knockdown does not affect p27 stability

A



B



C

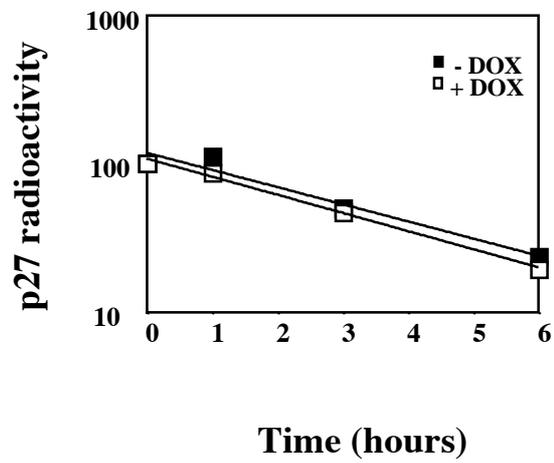


Figure 7 : *fli-1* knockdown enhances p27 synthesis

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M and Jacobsen SE. (2005). *Cell*, **121**, 295-306.
- Afrikanova I, Yeh E, Bartos D, Watowich SS and Longmore GD. (2002). *Oncogene*, **21**, 1272-84.
- Aizawa S, Suda Y, Furuta Y, Yagi T, Takeda N, Watanabe N, Nagayoshi M and Ikawa Y. (1990). *Embo J*, **9**, 2107-16.
- Anguita E, Hughes J, Heyworth C, Blobel GA, Wood WG and Higgs DR. (2004). *Embo J*, **23**, 2841-52.
- Ano S, Pereira R, Pironin M, Lesault I, Milley C, Lebigot I, Quang CT and Ghysdael J. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 2993-3002.
- Atar O and Levi BZ. (2005). *Biochem Biophys Res Commun*, **329**, 1288-92.
- Athanasίου M, Mavrothalassitis G, Sun-Hoffman L and Blair DG. (2000). *Leukemia*, **14**, 439-45.
- Axelrad A. (1969). *Proc Can Cancer Conf*, **8**, 313-43.
- Back J, Allman D, Chan S and Kastner P. (2005). *Exp Hematol*, **33**, 395-402.
- Back J, Dierich A, Bronn C, Kastner P and Chan S. (2004). *Blood*, **103**, 3615-23.
- Bastos RN and Aviv H. (1977). *J Mol Biol*, **110**, 205-18.
- Bastos RN, Volloch Z and Aviv H. (1977). *J Mol Biol*, **110**, 191-203.
- Ben David Y and Bernstein A. (1989). *Ann N Y Acad Sci*, **567**, 165-70.
- Ben-David Y, Bani MR, Chabot B, De Koven A and Bernstein A. (1992). *Mol Cell Biol*, **12**, 4449-55.
- Ben-David Y and Bernstein A. (1991). *Cell*, **66**, 831-4.
- Ben-David Y, Giddens EB and Bernstein A. (1990a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1332-6.

- Ben-David Y, Giddens EB, Letwin K and Bernstein A. (1991). *Genes Dev*, **5**, 908-18.
- Ben-David Y, Lavigueur A, Cheong GY and Bernstein A. (1990b). *New Biol*, **2**, 1015-23.
- Benjamini Y and Hochberg Y. (1995). *J. Roy. Stat. Soc. B.*, **57**, 289-300.
- Berger SA, Sanderson N, Bernstein A and Hankins WD. (1985). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 6913-7.
- Boyes J, Byfield P, Nakatani Y and Ogryzko V. (1998). *Nature*, **396**, 594-8.
- Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL and Iggo R. (2003). *Nat Genet*, **34**, 263-4.
- Broudy VC, Lin NL, Priestley GV, Nocka K and Wolf NS. (1996). *Blood*, **88**, 75-81.
- Carlisle GW, Smith DH and Wiedmann M. (2004). *Blood*, **103**, 4310-6.
- Carrano AC, Eytan E, Hershko A and Pagano M. (1999). *Nat Cell Biol*, **1**, 193-9.
- Chasis JA. (2006). *Curr Opin Hematol*, **13**, 137-41.
- Cho S, Kim JH, Back SH and Jang SK. (2005). *Mol Cell Biol*, **25**, 1283-97.
- Choe KS, Radparvar F, Matushansky I, Rekhman N, Han X and Skoultschi AI. (2003). *Cancer Res*, **63**, 6363-9.
- Chow V, Ben-David Y, Bernstein A, Benchimol S and Mowat M. (1987). *J Virol*, **61**, 2777-81.
- Clark SP and Mak TW. (1984). *J Virol*, **50**, 759-65.
- Corbin A, Prats AC, Darlix JL and Sitbon M. (1994). *J Virol*, **68**, 3857-67.
- Cui JW, Li YJ, Sarkar A, Brown J, Tan YH, Premyslova M, Michaud C, Iscove N, Wang GJ and Ben-David Y. (2007). *Blood*, **110**, 2631-40.
- Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M and Borden KL. (2005). *J Cell Biol*, **169**, 245-56.
- Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M and Borden KL. (2006). *J Cell Biol*, **175**, 415-26.
- de Boer L, Gray PP and Sunstrom NA. (2004). *Biotechnol Lett*, **26**, 61-5.

- De Maria R, Testa U, Luchetti L, Zeuner A, Stassi G, Pelosi E, Riccioni R, Felli N, Samoggia P and Peschle C. (1999a). *Blood*, **93**, 796-803.
- De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U and Peschle C. (1999b). *Nature*, **401**, 489-93.
- Delgado MD, Gutierrez P, Richard C, Cuadrado MA, Moreau-Gachelin F and Leon J. (1998). *Biochem Biophys Res Commun*, **252**, 383-91.
- Delgado MD, Hallier M, Meneceur P, Tavitian A and Moreau-Gachelin F. (1994). *Oncogene*, **9**, 1723-7.
- Delva L, Gallais I, Guillouf C, Denis N, Orvain C and Moreau-Gachelin F. (2004). *Oncogene*, **23**, 4389-99.
- Dolznic H, Boulme F, Stangl K, Deiner EM, Mikulits W, Beug H and Mullner EW. (2001). *Faseb J*, **15**, 1442-4.
- Eisbacher M, Holmes ML, Newton A, Hogg PJ, Khachigian LM, Crossley M and Chong BH. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 3427-41.
- Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH and Weissman AM. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 8945-51.
- Finkelstein LD, Ney PA, Liu QP, Paulson RF and Correll PH. (2002). *Oncogene*, **21**, 3562-70.
- Friend C. (1957). *J. Exp. Med.*, **105**, 307-318.
- Frontelo P, Manwani D, Galdass M, Karsunky H, Lohmann F, Gallagher PG and Bieker JJ. (2007). *Blood*, **110**, 3871-80.
- Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC and Orkin SH. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12355-8.
- Gallagher PG, Liem RI, Wong E, Weiss MJ and Bodine DM. (2005). *J Biol Chem*, **280**, 39016-23.
- Galson DL, Hensold JO, Bishop TR, Schalling M, D'Andrea AD, Jones C, Auron PE and Housman DE. (1993). *Mol Cell Biol*, **13**, 2929-41.
- Galson DL and Housman DE. (1988). *Mol Cell Biol*, **8**, 381-92.
- Gilkes DM and Chen J. (2007). *Cell Cycle*, **6**, 151-5.

- Gopfert U, Kullmann M and Hengst L. (2003). *Hum Mol Genet*, **12**, 1767-79.
- Guardavaccaro D, Corrente G, Covone F, Micheli L, D'Agnano I, Starace G, Caruso M and Tirone F. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 1797-815.
- Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ and Mittal V. (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1927-32.
- Hagemeier C, Bannister AJ, Cook A and Kouzarides T. (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1580-4.
- Hallier M, Lerga A, Barnache S, Tavitian A and Moreau-Gachelin F. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 4838-42.
- Hallier M, Tavitian A and Moreau-Gachelin F. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 11177-81.
- Hansson A, Zetterblad J, van Duren C, Axelson H and Jonsson JI. (2007). *Biochem Biophys Res Commun*, **364**, 675-81.
- Harrison DE and Russell ES. (1972). *Br J Haematol*, **22**, 155-68.
- Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, Favier R and Bernstein A. (2000). *Immunity*, **13**, 167-77.
- Hensold JO, Stratton CA, Barth D and Galson DL. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 3385-91.
- Hoatlin ME, Kozak SL, Lilly F, Chakraborti A, Kozak CA and Kabat D. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9985-9.
- Hong W, Kim AY, Ky S, Rakowski C, Seo SB, Chakravarti D, Atchison M and Blobel GA. (2002). *Mol Cell Biol*, **22**, 3729-43.
- Howard JC, Berger L, Bani MR, Hawley RG and Ben-David Y. (1996). *Oncogene*, **12**, 1405-15.
- Howard JC, Li Q, Chu W, Zochodne B, Kapoor M, Ung Y, Rosen K and Ben-David Y. (2001). *Oncogene*, **20**, 2291-300.
- Howard JC, Yousefi S, Cheong G, Bernstein A and Ben-David Y. (1993). *Oncogene*, **8**, 2721-9.
- Hsieh FF, Barnett LA, Green WF, Freedman K, Matushansky I, Skoultchi AI and Kelley LL. (2000). *Blood*, **96**, 2746-54.
- Hung HL, Lau J, Kim AY, Weiss MJ and Blobel GA. (1999). *Mol Cell Biol*, **19**, 3496-505.

- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G and Linsley PS. (2003). *Nat Biotechnol*, **21**, 635-7.
- Jelacic TM, Thompson D, Hanson C, Cmarik J, Nishigaki K and Ruscetti S. (2007). *J Virol*.
- Jiang H, Coleman J, Miskimins R, Srinivasan R and Miskimins WK. (2007). *Nucleic Acids Res*, **35**, 4767-78.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J and Wolffe AP. (1998). *Nat Genet*, **19**, 187-91.
- Kaminchik J, Hankins WD, Ruscetti SK, Linemeyer DL and Scolnick EM. (1982). *J Virol*, **44**, 922-31.
- Kastner P and Chan S. (2008). *Int J Biochem Cell Biol*, **40**, 22-7.
- Kawada H, Ito T, Pharr PN, Spyropoulos DD, Watson DK and Ogawa M. (2001). *Int J Hematol*, **73**, 463-8.
- Kawakubo H, Carey JL, Brachtel E, Gupta V, Green JE, Walden PD and Maheswaran S. (2004). *Oncogene*, **23**, 8310-9.
- Keys JR, Tallack MR, Hodge DJ, Cridland SO, David R and Perkins AC. (2007). *Br J Haematol*, **136**, 150-7.
- Kihara-Negishi F, Yamamoto H, Suzuki M, Yamada T, Sakurai T, Tamura T and Oikawa T. (2001). *Oncogene*, **20**, 6039-47.
- Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T and Kumagai H. (2003). *Exp Hematol*, **31**, 1007-14.
- Konishi Y, Tominaga M, Watanabe Y, Imamura F, Goldfarb A, Maki R, Blum M, De Robertis EM and Tominaga A. (1999). *Oncogene*, **18**, 6795-805.
- Kooren J, Palstra RJ, Klous P, Splinter E, von Lindern M, Grosveld F and de Laat W. (2007). *J Biol Chem*, **282**, 16544-52.
- Kosmider O, Denis N, Lacout C, Vainchenker W, Dubreuil P and Moreau-Gachelin F. (2005). *Cancer Cell*, **8**, 467-78.
- Kramer MF, Gunaratne P and Ferreira GC. (2000). *Gene*, **247**, 153-66.
- Krowczynska A, Yenofsky R and Brawerman G. (1985). *J Mol Biol*, **181**, 231-9.
- Lahlil R, Lecuyer E, Herblot S and Hoang T. (2004). *Mol Cell Biol*, **24**, 1439-52.

- Lamonica JM, Vakoc CR and Blobel GA. (2006). *Blood*, **108**, 3736-8.
- Landry JR, Kinston S, Knezevic K, Donaldson IJ, Green AR and Gottgens B. (2005). *Blood*, **106**, 2680-7.
- Lavigne A and Bernstein A. (1991). *Oncogene*, **6**, 2197-201.
- Lazaris-Karatzas A, Montine KS and Sonenberg N. (1990). *Nature*, **345**, 544-7.
- Lebigot I, Gardellin P, Lefebvre L, Beug H, Ghysdael J and Quang CT. (2003). *Blood*, **102**, 4555-62.
- Lenox LE, Perry JM and Paulson RF. (2005). *Blood*, **105**, 2741-8.
- Lesault I, Quang CT, Frampton J and Ghysdael J. (2002). *Embo J*, **21**, 694-703.
- Li JP, D'Andrea AD, Lodish HF and Baltimore D. (1990). *Nature*, **343**, 762-4.
- Li YJ, Higgins RR, Pak BJ, Shivdasani RA, Ney PA, Archer M and Ben-David Y. (2001). *Mol Cell Biol*, **21**, 73-80.
- Liew CW, Rand KD, Simpson RJ, Yung WW, Mansfield RE, Crossley M, Proetorius-Ibba M, Nerlov C, Poulsen FM and Mackay JP. (2006). *J Biol Chem*, **281**, 28296-306.
- Lim IK, Lee MS, Ryu MS, Park TJ, Fujiki H, Eguchi H and Paik WK. (1998). *Mol Carcinog*, **23**, 25-35.
- Lin Y and Benchimol S. (1995). *Mol Cell Biol*, **15**, 6045-54.
- Lindstrom MS, Deisenroth C and Zhang Y. (2007). *Cell Cycle*, **6**, 434-7.
- Linemeyer DL, Menke JG, Ruscetti SK, Evans LH and Scolnick EM. (1982). *J Virol*, **43**, 223-33.
- Linemeyer DL, Ruscetti SK, Scolnick EM, Evans LH and Duesberg PH. (1981). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 1401-5.
- Liu Y, Pop R, Sadegh C, Brugnara C, Haase VH and Socolovsky M. (2006). *Blood*, **108**, 123-33.
- Lu SJ, Rowan S, Bani MR and Ben-David Y. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8398-402.
- MacDonald ME, Mak TW and Bernstein A. (1980). *J Exp Med*, **151**, 1493-503.

- Masuya M, Moussa O, Abe T, Deguchi T, Higuchi T, Ebihara Y, Spyropoulos DD, Watson DK and Ogawa M. (2005). *Blood*, **105**, 95-102.
- Matsumura I, Kawasaki A, Tanaka H, Sonoyama J, Ezoe S, Minegishi N, Nakajima K, Yamamoto M and Kanakura Y. (2000). *Blood*, **96**, 2440-50.
- Matushansky I, Radparvar F, Rekhman N and Skoultchi A. (2000a). *Front Biosci*, **5**, D488-92.
- Matushansky I, Radparvar F and Skoultchi AI. (2000b). *Blood*, **96**, 2755-64.
- Matushansky I, Radparvar F and Skoultchi AI. (2003). *Oncogene*, **22**, 4143-9.
- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ and Maki RA. (1996). *Embo J*, **15**, 5647-58.
- Meehan RR, Lewis JD and Bird AP. (1992). *Nucleic Acids Res*, **20**, 5085-92.
- Merika M and Orkin SH. (1995). *Mol Cell Biol*, **15**, 2437-47.
- Millard SS, Vidal A, Markus M and Koff A. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 5947-59.
- Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Kiefer T, Hamaguchi I, Richter J and Karlsson S. (2007). *Stem Cells*.
- Monni R, Haddaoui L, Naba A, Gallais I, Arpin M, Mayeux P and Moreau-Gachelin F. (2008). *Blood*, **111**, 3163-72.
- Moreau-Gachelin F. (1994). *Biochim Biophys Acta*, **1198**, 149-63.
- Moreau-Gachelin F, Robert-Lezenes J, Wendling F, Tavitian A and Tambourin P. (1985). *J Virol*, **53**, 292-5.
- Moreau-Gachelin F, Tavitian A and Tambourin P. (1988). *Nature*, **331**, 277-80.
- Moreau-Gachelin F, Wendling F, Molina T, Denis N, Titeux M, Grimber G, Briand P, Vainchenker W and Tavitian A. (1996). *Mol Cell Biol*, **16**, 2453-63.
- Mowat M, Cheng A, Kimura N, Bernstein A and Benchimol S. (1985). *Nature*, **314**, 633-6.
- Munoz-Alonso MJ, Acosta JC, Richard C, Delgado MD, Sedivy J and Leon J. (2005). *J Biol Chem*, **280**, 18120-9.
- Munroe DG, Peacock JW and Benchimol S. (1990). *Mol Cell Biol*, **10**, 3307-13.

- Munugalavadla V and Kapur R. (2005). *Crit Rev Oncol Hematol*, **54**, 63-75.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN and Bird A. (1998). *Nature*, **393**, 386-9.
- Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H and Graf T. (2000). *Blood*, **95**, 2543-51.
- Nishigaki K, Hanson C, Jelacic T, Thompson D and Ruscetti S. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15488-93.
- Nishigaki K, Thompson D, Hanson C, Yugawa T and Ruscetti S. (2001). *J Virol*, **75**, 7893-903.
- Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R and Grosveld F. (1995). *Nature*, **375**, 316-8.
- Opferman JT and Zambetti GP. (2006). *Cell Death Differ*, **13**, 898-901.
- Owen LA and Lessnick SL. (2006). *Cell Cycle*, **5**, 2049-53.
- Papetti M and Skoultchi AI. (2007). *Mol Cancer Res*, **5**, 1053-62.
- Pebernard S and Iggo RD. (2004). *Differentiation*, **72**, 103-11.
- Pereira R, Quang CT, Lesault I, Dolznig H, Beug H and Ghysdael J. (1999). *Oncogene*, **18**, 1597-608.
- Pereira R, Raingeaud J, Pironin M, Ghysdael J and Quang CT. (2000). *Oncogene*, **19**, 5106-10.
- Perkins AC, Sharpe AH and Orkin SH. (1995). *Nature*, **375**, 318-22.
- Perreault A, Lemieux C and Bachand F. (2007). *J Biol Chem*, **282**, 7552-62.
- Perry JM, Harandi OF and Paulson RF. (2007). *Blood*, **109**, 4494-502.
- Persons DA, Paulson RF, Loyd MR, Herley MT, Bodner SM, Bernstein A, Correll PH and Ney PA. (1999). *Nat Genet*, **23**, 159-65.
- Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH and Costantini F. (1991). *Nature*, **349**, 257-60.
- Pinter A and Honnen WJ. (1989). *Virology*, **173**, 136-43.
- Prasher JM, Elenitoba-Johnson KS and Kelley LL. (2001). *Oncogene*, **20**, 2946-55.

- Quang CT, Wessely O, Pironin M, Beug H and Ghysdael J. (1997). *Embo J*, **16**, 5639-53.
- Rao G, Rekhtman N, Cheng G, Krasikov T and Skoultchi AI. (1997). *Oncogene*, **14**, 123-31.
- Rekhtman N, Choe KS, Matushansky I, Murray S, Stopka T and Skoultchi AI. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 7460-74.
- Rekhtman N, Radparvar F, Evans T and Skoultchi AI. (1999). *Genes Dev*, **13**, 1398-411.
- Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Moura IC, Zeuner A, Kirkegaard-Sorensen T, Varet B, Solary E, Garrido C and Hermine O. (2007). *Nature*, **445**, 102-5.
- Rimmele P, Kosmider O, Mayeux P, Moreau-Gachelin F and Guillouf C. (2007). *Blood*, **109**, 3007-14.
- Rouault JP, Falette N, Guehenneux F, Guillot C, Rimokh R, Wang Q, Berthet C, Moyret-Lalle C, Savatier P, Pain B, Shaw P, Berger R, Samarut J, Magaud JP, Ozturk M, Samarut C and Puisieux A. (1996). *Nat Genet*, **14**, 482-6.
- Rouault JP, Prevot D, Berthet C, Birot AM, Billaud M, Magaud JP and Corbo L. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 22563-9.
- Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L and Sonenberg N. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1065-70.
- Ruscetti SK. (1999). *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 1089-109.
- Ryan JJ, Prochownik E, Gottlieb CA, Apel IJ, Merino R, Nunez G and Clarke MF. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5878-82.
- Rylski M, Welch JJ, Chen YY, Letting DL, Diehl JA, Chodosh LA, Blobel GA and Weiss MJ. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 5031-42.
- Sanchez M, Weissman IL, Pallavicini M, Valeri M, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Migliaccio G and Migliaccio AR. (2005). *Stem Cells*.
- Sarrazin S. (Résultats non publiés).
- Schuetze S, Paul R, Gliniak BC and Kabat D. (1992). *Mol Cell Biol*, **12**, 2967-75.
- Schuetze S, Stenberg PE and Kabat D. (1993). *Mol Cell Biol*, **13**, 5670-8.
- Scolan EL, Wendling F, Barnache S, Denis N, Tulliez M, Vainchenker W and Moreau-Gachelin F. (2001). *Oncogene*, **20**, 5484-92.

- Scott EW, Simon MC, Anastasi J and Singh H. (1994). *Science*, **265**, 1573-7.
- Semenza GL, Traystman MD, Gearhart JD and Antonarakis SE. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2301-5.
- Shibuya T and Mak TW. (1983). *J Cell Physiol*, **117**, 283-9.
- Silver J and Kozak C. (1986). *Journal of Virology*, **57**, 526-533.
- Sitbon M, Sola B, Evans L, Nishio J, Hayes SF, Nathanson K, Garon CF and Chesebro B. (1986). *Cell*, **47**, 851-9.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH and Williams BR. (2003). *Nat Cell Biol*, **5**, 834-9.
- Socolovsky M. (2007). *Curr Opin Hematol*, **14**, 215-24.
- Socolovsky M, Murrell M, Liu Y, Pop R, Porpiglia E and Levchenko A. (2007). *PLoS Biol*, **5**, e252.
- Song SH, Hou C and Dean A. (2007). *Mol Cell*, **28**, 810-22.
- Sosinowski T, Pandey A, Dixit VM and Weiss A. (2000). *J Exp Med*, **191**, 463-74.
- Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, Jackers P, Papas TS, Ogawa M and Watson DK. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 5643-52.
- Starck J, Cohet N, Gonnet C, Sarrazin S, Doubeikovskaia Z, Doubeikovski A, Verger A, Duterque-Coquillaud M and Morle F. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 1390-402.
- Starck J, Doubeikovski A, Sarrazin S, Gonnet C, Rao G, Skoultchi A, Godet J, Dusanter-Fourt I and Morle F. (1999a). *Mol Cell Biol*, **19**, 121-35.
- Starck J, Mouchiroud G, Gonnet C, Mehlen A, Aubert D, Dorier A, Godet J and Morle F. (1999b). *Exp Hematol*, **27**, 630-41.
- Stopka T, Amanatullah DF, Papetti M and Skoultchi AI. (2005). *Embo J*.
- Subramanian A, Hegde S, Porayette P, Yon M, Hankey P and Paulson RF. (2007). *J Virol*.
- Subramanian A, Teal HE, Correll PH and Paulson RF. (2005). *J Virol*, **79**, 14586-94.
- Suzuki M, Yamada T, Kihara-Negishi F, Sakurai T and Oikawa T. (2003). *Oncogene*, **22**, 8688-98.

- Tambourin P, Wendling F and Moreau-Gachelin F. (1981). *Blood Cells*, **7**, 133-44.
- Tambourin PE, Wendling F, Jasmin C and Smadja-Joffe F. (1979). *Leuk Res*, **3**, 117-29.
- Tamir A, Howard J, Higgins RR, Li YJ, Berger L, Zacksenhaus E, Reis M and Ben-David Y. (1999). *Mol Cell Biol*, **19**, 4452-64.
- Tamir A, Petrocelli T, Stetler K, Chu W, Howard J, Croix BS, Slingerland J and Ben-David Y. (2000). *Cell Growth Differ*, **11**, 269-77.
- Terada M, Epner E, Nudel U, Salmon J, Fibach E, Rifkind RA and Marks PA. (1978). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 2795-9.
- Terano T, Zhong Y, Toyokuni S, Hiai H and Yamada Y. (2005). *Exp Hematol*, **33**, 641-51.
- Theoleyre O, Deguillien M, Moriniere M, Starck J, Moreau-Gachelin F, Morle F and Baklouti F. (2004). *Oncogene*, **23**, 920-7.
- Thérier J. (2005). *Thèse de l'Université Claude Bernard Lyon 1, n° d'ordre 121-2005*, 1-230.
- Truong AH, Cervi D, Lee J and Ben-David Y. (2005). *Oncogene*, **24**, 962-9.
- van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FC, Brummelkamp TR, Agami R and Clevers H. (2003). *EMBO Rep*, **4**, 609-15.
- Vannucchi AM, Paoletti F, Linari S, Cellai C, Caporale R, Ferrini PR, Sanchez M, Migliaccio G and Migliaccio AR. (2000). *Blood*, **95**, 2559-68.
- Visvader JE, Mao X, Fujiwara Y, Hahm K and Orkin SH. (1997). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13707-12.
- Waggoner SA and Liebhaber SA. (2003). *Exp Biol Med (Maywood)*, **228**, 387-95.
- Wagner KU, Claudio E, Rucker EB, 3rd, Riedlinger G, Broussard C, Schwartzberg PL, Siebenlist U and Hennighausen L. (2000). *Development*, **127**, 4949-58.
- Wang H, Zhang Y, Cheng Y, Zhou Y, King DC, Taylor J, Chiaromonte F, Kasturi J, Petrykowska H, Gibb B, Dorman C, Miller W, Dore LC, Welch J, Weiss MJ and Hardison RC. (2006). *Genome Res*, **16**, 1480-92.
- Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ and Rabbitts TH. (1994). *Cell*, **78**, 45-57.
- Weiss MJ and Orkin SH. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9623-7.

- Wong KS, Li YJ, Howard J and Ben-David Y. (1999). *Oncogene*, **18**, 5525-34.
- Xia H, Mao Q, Paulson HL and Davidson BL. (2002). *Nat Biotechnol*, **20**, 1006-10.
- Yamada T, Kihara-Negishi F, Yamamoto H, Yamamoto M, Hashimoto Y and Oikawa T. (1998). *Exp Cell Res*, **245**, 186-94.
- Yamada T, Kondoh N, Matsumoto M, Yoshida M, Maekawa A and Oikawa T. (1997). *Blood*, **89**, 1383-93.
- Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E and Ruggero D. (2006). *Science*, **312**, 902-6.
- Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E and Hermine O. (2001). *J Exp Med*, **193**, 247-54.
- Zhang L, Eddy A, Teng YT, Fritzler M, Kluppel M, Melet F and Bernstein A. (1995). *Mol Cell Biol*, **15**, 6961-70.
- Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS, Auron PE, Tenen DG and Sun Z. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8705-10.
- Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith KA, Mueller BU, Narravula S, Torbett BE, Orkin SH and Tenen DG. (2000). *Blood*, **96**, 2641-8.
- Zhuo S, Fan S, Huang S and Kaufman S. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4234-8.
- Zochodne B, Truong AH, Stetler K, Higgins RR, Howard J, Dumont D, Berger SA and Ben-David Y. (2000). *Oncogene*, **19**, 2296-304.

RESUME en français

FLI-1 est un facteur de transcription de la famille ETS dont le gène activé dans les érythroleucémies murines induites par le virus F-MuLV. Le gène *fli-1* est également activé par le facteur SPI-1 / PU.1, un autre facteur ETS dont le gène est lui-même activé dans les érythroleucémies induites par le virus SFFV. Mon travail de thèse visait à définir la contribution de FLI-1 dans les érythroleucémies induites par SPI-1 / PU.1.

Par déplétion inductible de FLI-1, j'ai montré qu'il contribue effectivement à la prolifération et au blocage de la différenciation de cellules érythroleucémiques surexprimant SPI-1. Une approche par gènes candidats et des analyses globales de transcriptome, ont permis de montrer l'implication de FLI-1 dans l'inhibition de la synthèse de l'inhibiteur de cycline kinase P27^{KIP1}, l'activation transcriptionnelle directe de plusieurs gènes contrôlant la synthèse et la maturation des ARNr et la répression de plusieurs gènes érythrocytaires ainsi que du gène antiprolifératif *btg2*.

TITRE en anglais

Function and mechanism of action of *fli-1* proto-oncogene in Friend erythroleukemia.

RESUME en anglais

FLI-1 is an ETS family transcription factor which gene is activated in murine F-MuLV-induced erythroleukemias. *fli-1* gene is also activated by SPI-1 / PU.1, another ETS transcription factor, which gene is activated in murine SFFV-induced erythroleukemias. My thesis work aimed to define the FLI-1 contribution in SPI-1-induced erythroleukemias.

By an unducible *fli-1* knock-down, I showed that it contributes effectively to the proliferation and differentiation inhibition of *spi-1* overexpressing erythroleukemic cells. A candidate gene approach and global transcriptomes analysis, showed the FLI-1 implication in synthesis inhibition of P27^{KIP1} cyclin kinase inhibitor, direct transcriptional activation of several genes controlling rRNA synthesis and maturation, and repression of several erythrocytic genes and *btg2* antiproliferative gene.

DISCIPLINE

Biologie Moléculaire et Cellulaire

MOTS-CLES

Erythroleucémie, Friend, ETS, facteur de transcription, ribosomes, RNAi

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire (CGMC) – UMR CNRS 5534
16, rue Dubois
69622 VILLEURBANNE