



HAL
open science

Mise en évidence de gènes cibles directs communs à FLI-1 et à SPI-1/PU.1 dans les érythroleucémies de Friend

Guillaume Giraud

► **To cite this version:**

Guillaume Giraud. Mise en évidence de gènes cibles directs communs à FLI-1 et à SPI-1/PU.1 dans les érythroleucémies de Friend. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10309 . tel-00707722

HAL Id: tel-00707722

<https://theses.hal.science/tel-00707722>

Submitted on 13 Jun 2012

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° Ordre : 309-2010

Année 2010

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON1

pour l'obtention

du DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 15 décembre 2010

par

Guillaume GIRAUD

TITRE :

**Mise en évidence de gènes cibles directs communs à FLI-1 et à
SPI-1/PU.1 dans les érythroleucémies de Friend**

Directeur de thèse : **François MORLÉ**

Composition du JURY :

M. le Professeur Jérôme LAMARTINE Président

M. le Docteur Philippe KASTNER Rapporteur

M. le Professeur Pierre-Emmanuel GLEIZES Rapporteur

M. le Docteur Laurent DELVA Examineur

M. le Docteur François MORLÉ Examineur

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Pr. Pierre-Emmanuel GLEIZES et le Dr. Philippe KASTNER d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. Je remercie également le Dr. Laurent DELVA et le Pr. Jérôme LAMARTINE pour le temps consacré à l'évaluation de mon travail.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance au Dr. François MORLÉ de m'avoir accueilli au sein de son équipe pour la réalisation de mes travaux de thèse. Il m'a formé au métier de chercheur en m'inculquant toute la rigueur nécessaire à celui-ci. Je le remercie pour sa disponibilité, son soutien et pour la correction et l'évaluation de mon travail.

Je remercie le Dr. Boris GUYOT pour l'ensemble des précieux conseils qu'il m'a donnés qui ont largement contribué à l'avancée de mes travaux. Je le remercie également pour la correction de ce manuscrit de thèse.

Je remercie les membres de l'équipe, Joëlle, Michèle, Colette, Samer et Azza ainsi que Gaëtan pour leur sympathie, leur disponibilité pour des discussions scientifiques extrêmement enrichissantes mais également pour les franches rigolades. Ils ont contribué à maintenir une excellente ambiance de travail.

Je remercie également l'ensemble des membres du CGMC pour la bonne ambiance de travail qui y règne, pour leur disponibilité, pour les différents conseils qu'ils m'ont donné. Une mention spéciale pour les équipes de F. BAKLOUTI (Landry, Osman, Madeleine et Faouzi), de G. MOUCHIROUD (Nadège, Stéphanie, Marie-France et Guy) et d'O. GANDRILLON (Olivier, Sandrine et Anh-Thu) qui m'ont beaucoup conseillé dans différents domaines.

Je remercie également les Dr. Olivier GANDRILLON et Eric JULIEN d'avoir accepté de suivre mon travail lors des comités de thèse.

Je remercie Clothilde DESCHAMPS et le Dr. Christian GAUTIER pour leur aide très précieuse pour le traitement bioinformatique de nos données de CHIP-Seq.

Je remercie la Ligue Nationale Contre le Cancer et ses généreux donateurs pour avoir financé l'intégralité de ma thèse.

Je remercie également mes amis et ma famille. Un GRAND MERCI en particulier à mes parents sans qui je n'aurais jamais pu réaliser ce travail. Il n'y a pas de mots assez forts pour exprimer toute ma gratitude pour l'éducation, la confiance et le soutien sans faille qu'ils m'ont apportés.

Enfin, je tiens à dire un grand MERCI à Gaëlle, ma compagne depuis maintenant cinq ans. Je la remercie pour son soutien sans limite et pour ses multiples encouragements.

<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	6
<u>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES</u>	7
<u>PREAMBULE</u>	10
<u>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</u>	12
<u>I- L'ÉRYTHROPOÏÈSE</u>	12
<u>II- LES ERYTHROLEUCEMIES DE FRIEND</u>	30
<u>III- CONTRIBUTIONS DES FACTEURS SPI-1 ET FLI-1 A LA TRANSFORMATION DES ERYTHROBLASTES</u>	46
<u>IV- LA BIOGENESE DES RIBOSOMES</u>	69
<u>OBJECTIFS DE LA THESE</u>	108
<u>RESULTATS</u>	111
<u>PREMIÈRE PARTIE : CONTRIBUTIONS ADDITIVES DE FLI-1 ET DE SPI-1 AU DÉVELOPPEMENT DES ÉRYTHROLEUCÉMIES DE FRIEND – IDENTIFICATION DE GÈNES CIBLES DIRECTS COMMUNS À FLI-1 ET SPI-1</u>	111
<u>I- FLI-1 CONTRIBUE A LA SURVIE, A LA PROLIFERATION ET AU BLOCAGE DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES ERYTHROLEUCEMIQUES DE FRIEND</u>	111
<u>II- IDENTIFICATION DE GENES CIBLES DIRECTS COMMUNS A FLI-1 ET A SPI-1</u>	133
<u>DEUXIÈME PARTIE : L'ABSENCE DE FLI-1 ET DE SPI-1 CONDUIT-ELLE A UN STRESS RIBOSOMIQUE ?</u>	152
<u>I- HYPOTHESE DE TRAVAIL ET STRATEGIE EXPERIMENTALE</u>	152
<u>II- CONTRIBUTIONS DE FLI-1 ET SPI-1 A LA BIOGENESE DES RIBOSOMES ?</u>	155
<u>III- L'INDUCTION D'UN STRESS RIBOSOMIQUE MIMÉ T'IL L'EFFET DE L'ABSENCE DE FLI-1 ET DE SPI-1 ?</u>	163
<u>IV- ACTIVATION MODEREE DU TAUX DE P53 EN REPONSE A LA DEPLETION DE FLI-1 ET DE SPI-1 DANS LES CELLULES NN10 ET 745A</u>	167
<u>IV- L'ABSENCE DE FLI-1 ET DE SPI-1 CONDUIT-ELLE A UN STRESS RIBOSOMIQUE STABILISANT P53 ?</u>	182
<u>V- EFFET DE LA REPRESSION DE RPL11 SUR LE PHENOTYPE INDUIT PAR L'HMBA ET PAR LA DOXYCYCLINE</u>	188
<u>VI- SYNTHÈSE DES RESULTATS OBTENUS</u>	191
<u>TROISIÈME PARTIE : RECHERCHE DE NOUVELLES CIBLES DIRECTES COMMUNES AUX FACTEURS DE TRANSCRIPTION FLI-1 ET SPI-1</u>	193
<u>I- QUESTIONS POSEES ET STRATEGIE EXPERIMENTALE</u>	193
<u>II- PREPARATION DE LA CHROMATINE FLI-1 DANS LES CELLULES 745A #44 ET LES CELLULES NN10 #5</u>	196
<u>III- ANALYSE DES SEQUENCES</u>	201
<u>DISCUSSION</u>	242
<u>I- SPECIFICITE DES PHENOTYPES INDUITS PAR LA REPRESSION INDUCTIBLE DE <i>FLI-1</i></u>	242
<u>II- LIEN ENTRE FLI-1 ET LA BIOGENESE DES RIBOSOMES</u>	245
<u>III- LA REVERSION DU PHENOTYPE TRANSFORME DES CELLULES ERYTHROLEUCEMIQUES DE FRIEND INDUITE PAR LA DEPLETION DE FLI-1 DE SPI-1 NE S'EXPLIQUE PAS PAR UNE AUGMENTATION DE P53 PROVOQUEE PAR UN STRESS RIBOSOMIQUE</u>	246
<u>IV- GENES CIBLES COMMUNS A FLI-1 ET A SPI-1</u>	254
<u>CONCLUSIONS</u>	262
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	263

I- VECTEUR D'EXPRESSION DE SHARN DE SEQUENCE ALEATOIRE	263
II- CULTURE CELLULAIRE	264
III- WESTERN BLOT	269
IV- RT-PCR QUANTITATIVE	270
V- IMMUNOPRECIPITATION DE LA CHROMATINE	271
VI- FRACTIONNEMENT DES RIBOSOMES	274
VII- CHIP-SEQ	275
<u>ANNEXE 2 : REMPLACEMENT DE LA PROTEINE FLI-1 ENDOGENE DES CELLULES NN10 PAR UNE PROTEINE FLI-1 BIOTINYLEES</u>	<u>279</u>
I- OBTENTION D'UN CLONE NN10 PRODUISANT UNE PROTEINE FLI-1 BIOTINYLEE <i>IN VIVO</i> EN QUANTITES EQUIVALENTES DE LA PROTEINE FLI-1 ENDOGENE	279
II- INVALIDATION DU CLONE BIOFLI-1/BIRA #2C1	290
III- UNE PROTEINE FLI-1 EXOGENE NON ETIQUETEE NE COMPENSE PAS NON PLUS L'ABSENCE DE LA PROTEINE FLI-1 ENDOGENE DANS LES CELLULES NN10	295
IV- CONCLUSION – DISCUSSION	299
V- MATERIEL ET METHODES	300
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>305</u>

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ActD : Actinomycine D
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide désoxycyribonucléique complémentaire
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 4
ChIP : Chromatin immunoprecipitation
ChIP-Seq : ChIP sequencing
DOX : Doxycycline
DMSO : DiMethylSulfOxide
EKLF : Erythroid Kruppel Like Factor
EPO : Érythropoïétine
EPOR : EPO-Receptor
ETS : E-Twenty-Six
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting
FLI-1 : F-MuLV Integration site 1
F-MuLV : Friend Murine Leukemia Virus
5 FU : 5 fluorouracile
HSP70 : Heat Shock Protein 70
IFIT-1 : Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IRES : Internal Ribosome Entry Site
MACS : Model-based Analysis of ChIP-Seq
MDM-2 : Mouse Double Minute 2
MEME : Multiple EM for Motif Elicitation
M-MLV : Moloney-Murine Leukemia Virus
OAS-1 : 2',5'-OligoAdenylate Synthétase 1
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
qPCR : quantitative PCR
RB : RetinoBlastoma
RPL : Protéine Ribosomique de la grande sous-unité
rpm : rotation per minute
RPS : Protéine ribosomique de la petite sous-unité
RT-qPCR : Retro-Transcription quantitative PCR
SDS-PAGE : Sodium DodecylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SFFV : Spleen Focus Forming Virus
shARN : Small hairpin ARN
siARN : Small interfering ARN
SPI-1 : SFFV Proviral Integration site 1
SCF : Stem Cell Factor
SVF : Sérum de Veau Foetal

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

- Figure 1** : Représentation schématique de l'hématopoïèse
- Figure 2** : Vue schématique des différentes étapes de l'érythropoïèse
- Figure 3** : Fonctions des voies de signalisation induites par les couples Epo/EpoR et Kit/SCF au cours de l'érythropoïèse
- Figure 4** : HSP70 protège GATA-1 du clivage par la caspase-3
- Figure 5** : Modèle de l'érythropoïèse de stress proposé par le groupe de R.F. Paulson
- Figure 6** : Activation de l'érythropoïèse de stress par le virus de Friend
- Figure 7** : Les facteurs de transcription de la famille ETS
- Figure 8** : Mécanismes moléculaires conduisant au blocage de la différenciation des cellules MEL par SPI-1
- Figure 9** : Antagonisme fonctionnel entre FLI-1 et EKLF
- Tableau 1** : Partenaires et gènes cibles de FLI-1 et SPI-1 contribuant aux fonctions de SPI-1 et FLI-1 dans la transformation du lignage érythrocytaire
- Figure 10** : Représentation schématique de la biogenèse des ribosomes et de ses régulateurs
- Figure 11** : Les deux voies de maturation des ARNr
- Tableau 2** : Fonctions extra-ribosomiques connues des protéines ribosomiques
- Figure 12** : Représentation schématique du stress ribosomique
- Tableau 3** : Liste des protéines ribosomiques interagissant avec MDM-2 et conduisant à la stabilisation de p53
- Figure 13** : Pathologies associées à une perturbation de la biogenèse des ribosomes
- Tableau 4** : Pathologies associées à une altération de la biogenèse des ribosomes
- Figure 14** : Les facteurs SPI-1 et FLI-1 régulent-ils des gènes cibles directs communs contribuant à leurs fonctions dans la transformation du lignage érythrocytaire?
- Figure 15** : Représentation schématique du système d'expression inductible de shARN
- Figure 16** : Répression inductible de l'expression du gène *fli-1* dans les cellules NN10
- Figure 17** : Effet de la répression de FLI-1 sur la survie, la prolifération et la différenciation des cellules NN10.
- Figure 18** : La mort des cellules NN10 induite par l'absence de FLI-1 correspond à de l'apoptose
- Tableau 5** : Phénotype induit par la répression de *fli-1* dans les cellules NN10
- Figure 19** : L'absence de FLI-1 conduit à un arrêt de la prolifération indépendamment de l'apoptose
- Figure 20** : Répression inductible de l'expression de *fli-1* dans les cellules 745A
- Figure 21** : Effets de la répression de FLI-1 dans les cellules 745A
- Tableau 6** : Phénotype induit par la répression de *fli-1* dans les cellules 745A
- Figure 22** : La mort des cellules 745A induite par l'absence de FLI-1 correspond à de l'apoptose
- Figure 23** : Effets additifs de l'absence de FLI-1 et de SPI-1 dans les cellules 745A
- Tableau 7** : Liste des gènes réprimés par l'HMBA et/ou la doxycycline
- Tableau 8** : Liste des gènes activés par l'HMBA et/ou la doxycycline
- Figure 24** : Une grande majorité de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes est régulée par FLI-1 et par SPI-1
- Figure 25** : FLI-1 et SPI-1 régulent des gènes impliqués dans la biogenèse des Ribosomes

- Figure 26** : Conservation des sites ETS sur les promoteurs des gènes de biogenèse des Ribosomes
- Figure 27** : FLI-1 et SPI-1 sont recrutés sur les promoteurs des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes
- Figure 28** : FLI-1 régule directement l'expression des mêmes gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes dans les cellules NN10
- Figure 29** : Contributions additives de FLI-1 et de SPI-1 et régulation de gènes cibles communs
- Figure 30** : Hypothèse de travail et stratégie expérimentale
- Figure 31** : L'absence de FLI-1 et de SPI-1 réduit la quantité d'ARNr
- Figure 32** : L'absence de FLI-1 et de SPI-1 semble réduire la quantité de protéines ribosomiques RPL11 et RPL24
- Figure 33** : La surexpression de FLI-1 ne stimule pas la biogenèse des ribosomes
- Figure 34** : L'induction d'un stress ribosomique mime les effets de l'absence de FLI-1 et de SPI-1 dans les cellules 745A et NN10
- Figure 35** : p53 est produite dans les cellules 745A et NN10
- Figure 36** : L'induction d'un stress ribosomique stabilise p53 dans les cellules NN10 et 745A
- Figure 37** : L'absence de FLI-1 augmente le taux de protéine p53
- Figure 38** : p53 ne contribue pas à l'arrêt de prolifération et à la différenciation des cellules NN10 et 745A induits par l'absence de FLI-1 et de SPI-1
- Figure 39** : p53 ne contribue pas à l'arrêt de prolifération et à la différenciation des cellules NN10 et 745A induits par l'ActD
- Figure 40** : La répression de Rpl11 ne réduit pas le taux de protéine p53 des cellules 745A en absence de FLI-1
- Figure 41** : L'absence de FLI-1 et de SPI-1 n'entraîne pas d'augmentation détectable de protéines RPL11 libres
- Figure 42** : La répression de Rpl11 atténue la différenciation induite par l'HMBA et par la doxycycline
- Figure 43** : Invalidation de l'hypothèse du stress ribosomique
- Figure 44** : ChIP-Seq FLI-1 et SPI-1 dans trois lignées érythroleucémiques indépendantes
- Figure 45** : Obtention de la chromatine FLI-1 à partir des cellules NN10 #5
- Figure 46** : Obtention de la chromatine FLI-1 à partir des cellules 745A #44
- Figure 47** : Exemple de fichier donné par MACS
- Tableau 9** : Nombre de séquences alignées obtenues pour chaque condition
- Figure 48** : Influence du nombre autorisé de mésappariements sur la détection des pics FLI-1
- Figure 49** : Influence de la taille des pics sur leur qualité
- Figure 50** : Nombre et répartition des pics en fonction de leur taille
- Figure 51** : Identification de pics communs à FLI-1 et SPI-1
- Figure 52** : Identification de motifs consensus associés aux séquences sous les pics
- Figure 53** : Composition des séquences spécifiques à FLI-1 en consensus FLI-1 et SPI-1
- Figure 54** : Localisation des consensus SPI-1 ou FLI-1 par rapport aux pics FLI-1 spécifiques
- Figure 55** : Composition des séquences spécifiques à SPI-1 en consensus FLI-1 et SPI-1
- Figure 56** : Localisation des consensus SPI-1 ou FLI-1 par rapport aux pics SPI-1 spécifiques
- Figure 57** : Composition des séquences communes à FLI-1 et SPI-1 en consensus

FLI-1 et SPI-1

- Figure S8** : Les pics et les consensus FLI-1 et SPI-1 sont à proximité l'un de l'autre pour les pics communs
- Figure S9** : Localisation des consensus SPI-1 ou FLI-1 par rapport aux pics communs à FLI-1 et à SPI-1
- Figure S60** : Conservation des consensus FLI-1 et SPI-1 dans les séquences des pics communs
- Figure S61** : Association des pics spécifiques et communs aux gènes de biogénese des Ribosomes
- Figure S62** : Composition des séquences spécifiques à SPI-1 associés à la biogénese des Ribosomes
- Figure S63** : Lien entre recrutement et régulation ?
- Figure S61** : Principe du ChIP-PET
- Figure S62** : Remplacement de la protéine FLI-1 endogène des cellules NN10 #5 par une protéine FLI-1 exogène biotinylable
- Figure S63** : Déstabilisation de la protéine FLI-1 par une étiquette placée à l'extrémité C-terminal
- Figure S64** : Obtention d'un clone produisant la protéine FLI-1 exogène biotinylable *in Vivo*
- Figure S65** : Obtention d'un clone produisant la protéine FLI-1 biotinylée *in vivo*
- Figure S66** : La protéine FLI-1 exogène étiquetée ne restaure pas le phénotype des cellules NN10 en absence de la protéine FLI-1 endogène
- Figure S67** : La protéine FLI-1 exogène étiquetée ne maintient pas l'expression des gènes cibles de la protéine endogène et n'est pas recrutée sur ses promoteurs cibles
- Figure S68** : Une protéine FLI-1 exogène non étiquetée ne restaure pas non plus le phénotype de cellules NN10 en absence de FLI-1 endogène
- Figure S69** : La protéine FLI-1 non étiquetée ne maintient pas l'expression des gènes cibles directes de la protéine FLI-1 endogène

PRÉAMBULE

Les facteurs de transcription jouent un rôle important dans le contrôle de la prolifération, de la survie et de la différenciation des cellules normales et leur dérégulation est fréquemment à l'origine de nombreux cancers comme les leucémies. En dehors de quelques facteurs de transcription ubiquistes majeurs, tels que p53 ou c-Myc, la nature des facteurs de transcription touchés par ces dérégulations oncogéniques est le plus souvent spécifique de chaque type de cancer. Identifier les raisons d'une telle spécificité représente un enjeu important non seulement pour comprendre le développement tissulaire normal mais également pour définir des stratégies thérapeutiques mieux adaptées à chaque type de cancers. Ainsi, les érythroleucémies de Friend induites par le virus de Friend sont associées quasi-systématiquement à la surexpression de gènes codant les facteurs de transcription FLI-1 et SPI-1/PU.1 appartenant tous deux à la famille des facteurs ETS. D'autre part, notre équipe a montré que SPI-1/PU.1 est un activateur transcriptionnel du gène *fli-1*. Le principal intérêt de l'équipe est de comprendre pourquoi et comment la transformation du lignage érythrocytaire est associée de manière quasi-incontournable à la dérégulation de l'un ou l'autre de ces facteurs.

Dans cette perspective, mon travail de thèse, qui fait l'objet de ce mémoire, repose sur l'hypothèse que SPI-1 et FLI-1 pouvait agir par des mécanismes communs voire par la dérégulation de gènes cibles communs. Pour tester cette hypothèse, je me suis focalisé dans un premier temps sur la caractérisation des contributions additives de ces deux facteurs puis sur la recherche de gènes cibles communs.

Afin de discuter mes résultats et de les replacer dans les connaissances actuelles, la première partie de ce mémoire sera consacrée à une introduction bibliographique qui s'articulera autour de quatre parties. La première partie présentera l'érythropoïèse de manière

générale. Ensuite, la seconde partie détaillera les mécanismes impliqués dans les érythroleucémies de Friend. Puis la troisième partie dressera un bilan des contributions déjà connues des facteurs de transcription FLI-1 et SPI-1/PU.1 dans les érythroleucémies de Friend. Comme nous le verrons dans ma partie résultats, nous avons identifié des gènes cibles de FLI-1 et de SPI-1 impliqués dans la biogenèse des ribosomes. Il m'a donc paru important de consacrer la dernière partie de mon introduction à cette biogenèse dans les conditions physiologiques et pathologiques.

A la suite de cette introduction, mes résultats seront présentés et discutés en tentant de faire le lien avec les connaissances actuelles.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I- L'ÉRYTHROPOÏÈSE

L'érythropoïèse désigne le processus par lequel les globules rouges sont produits à partir de progéniteurs érythrocytaires. Ce processus assure la production de 2.10^{11} globules rouges par jour chez l'Homme. Le globule rouge mature, dont la durée de vie est de 120 jours, assure le transport de l'oxygène des poumons vers les différents organes et celui du dioxyde de carbone dans le sens inverse.

A) Les différentes étapes de l'érythropoïèse

1- De la cellule souche hématopoïétique aux progéniteurs engagés

L'érythropoïèse est une sous-partie d'un processus plus large appelé hématopoïèse. Ce processus assure la production de l'ensemble des cellules sanguines matures à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH). Le modèle dit classique couramment admis et présenté sur la figure 1 fait état d'une séparation totale entre lymphopoïèse et myélopoïèse dès le stade suivant la CSH.

Selon ce modèle, la CSH génère deux types de progéniteurs multipotents, le CLP (Common Lymphoid Progenitor) et le CMP (Common Myeloid Progenitor). Le CLP se différencie à son tour pour donner naissance aux progéniteurs monopotents assurant la production soit des lymphocytes T, soit des lymphocytes B, soit des cellules NK. Le CMP, quant à lui, donne naissance à deux types de progéniteurs bipotents, le GMP (Granulocytes

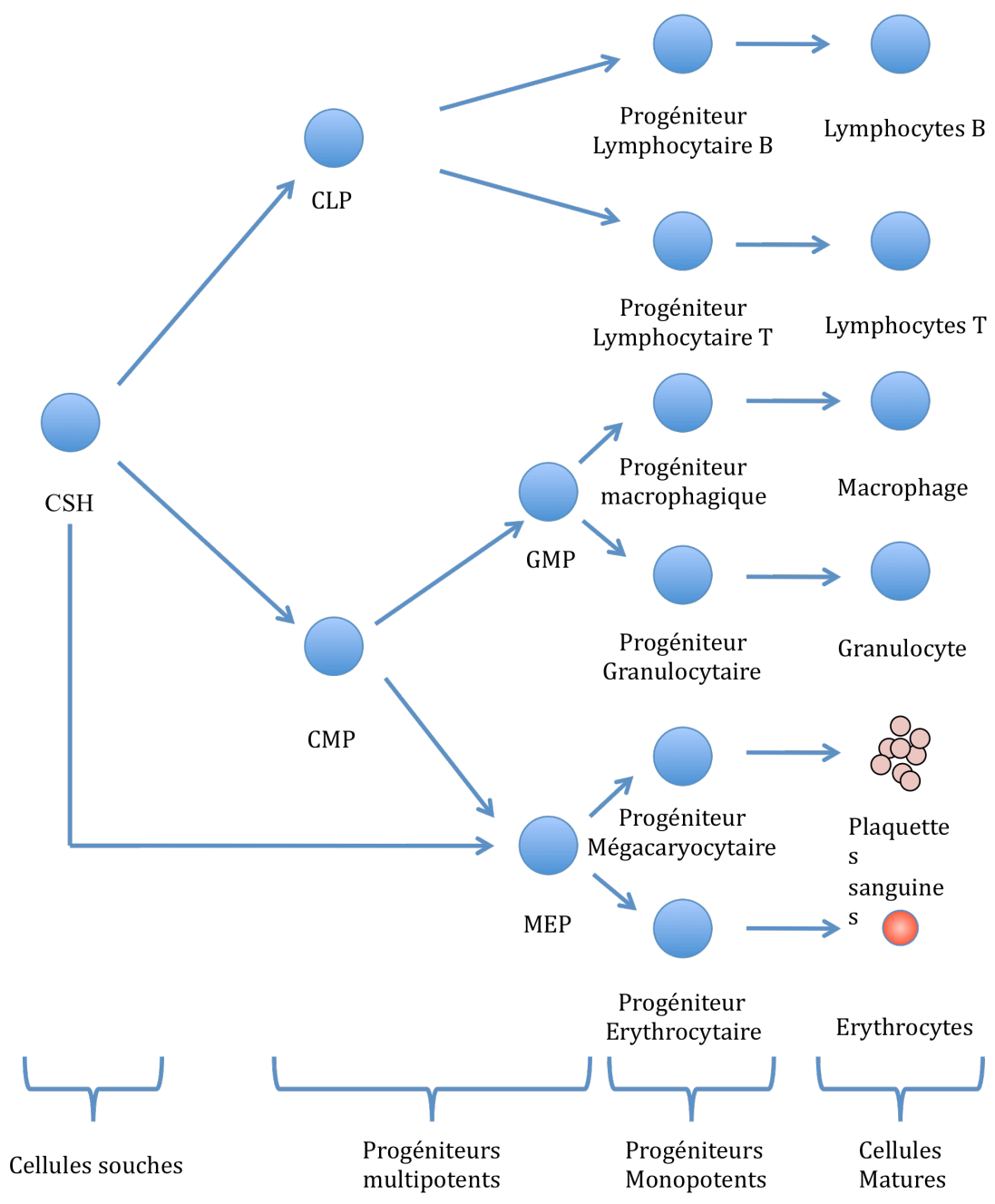


Figure 1 : Représentation schématique de l'Hématopoïèse

Macrophages Progenitor) et le MEP (Megacaryocytes Erythrocytes Progenitor). Le progéniteur GMP génère soit la lignée monocyttaire-macrophagique soit la lignée granulocytaire (neutrophiles, éosinophiles, mastocytes...) alors que le progéniteur MEP produit soit la lignée mégacaryocytaire soit la lignée érythrocytaire.

Néanmoins, ce modèle classique mis en évidence par des essais de colonies est remis en question par des études récentes recensées dans plusieurs revues (Brown and Ceredig, 2009; Ceredig et al., 2009; Kawamoto et al., 2010). Les études listées dans ces revues montrent que l'engagement vers tel ou tel lignage se fait de manière progressive ouvrant des voies alternatives à celles proposées dans le modèle classique. Par exemple, les travaux de J. Adolfsson *et al.* ont mis en évidence l'existence d'une population cellulaire aux potentialités myéloïdes et lymphoïdes dérivées de la CSH mais qui ne génèrent pas de MEP (Adolfsson et al., 2005). Ces études soulignent une certaine plasticité du système hématopoïétique.

1- Des progéniteurs engagés aux globules rouges matures

Les MEP peuvent générer des progéniteurs monopotents, les BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid). Ces progéniteurs vont subir des maturations successives pour former en sept jours des érythrocytes matures chez l'Homme (**Figure 2**). Plus en détail, les BFU-E vont former des progéniteurs plus matures appelés CFU-E (Colony Forming Unit – Erythroid) qui génèrent à leur tour des proérythroblastes. Ces cellules sont fortement basophiles du fait de leur forte concentration en ARN. Ils expriment des marqueurs du lignage érythrocytaire tel que TER119. Les proérythroblastes subissent quatre mitoses successives et génèrent des érythroblastes basophiles puis polychromatophiles. Les érythroblastes polychromatophiles

gènèrent à leur tour des érythroblastes acidophiles puis les réticulocytes. A ce stade, le noyau est extrudé et phagocyté par les macrophages (Chasis and Mohandas, 2008). Une dernière

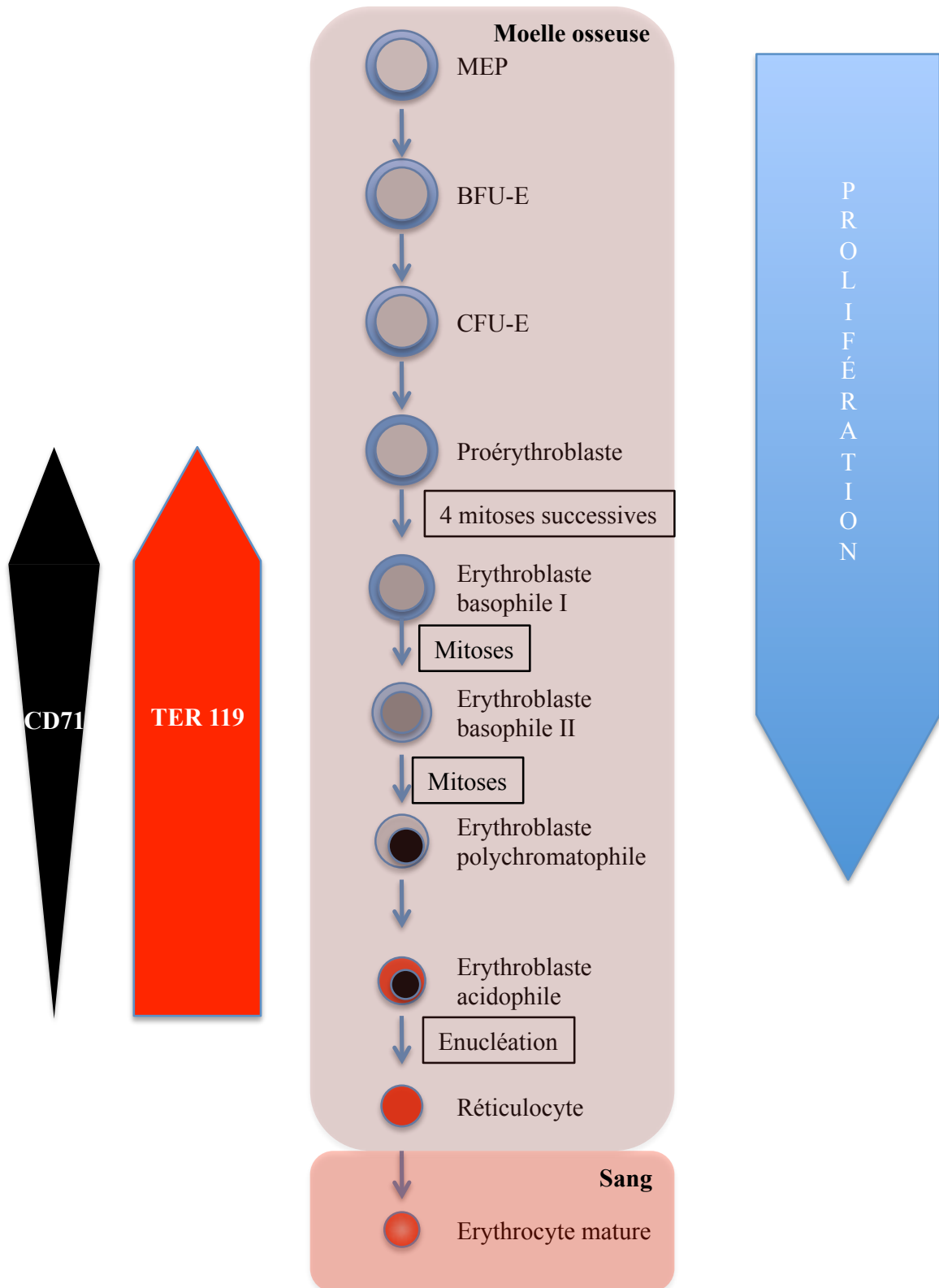


Figure 2 : Vue schématique des différentes étapes de l'érythropoïèse

étape de maturation donne naissance à l'érythrocyte mature qui migre dans la circulation sanguine.

Cette différenciation s'accompagne d'une diminution de la taille des cellules et de l'apparition de micronucléoles signant une diminution de la biogenèse des ribosomes (Smetana, 1975).

B) Régulation de l'érythropoïèse

L'engagement des progéniteurs multipotents vers tel ou tel lignage ainsi que l'amplification de ces progéniteurs sont finement régulés. Cette régulation implique différents acteurs. Cette partie traitera des acteurs qui sont objectivement ou potentiellement dérégulés au cours de l'érythroleucémie de Friend (cf. partie II).

1- Importance des voies de signalisation induites par les couples ligand/récepteur Epo/EpoR et Kit/SCF

1-1 L'érythropoïétine et son récepteur

L'érythropoïétine ou Epo est une cytokine produite par le rein. Le récepteur de cette cytokine, l'EpoR, fait partie de la superfamille des récepteurs de cytokines de type 1 caractérisée par la présence d'un seul domaine transmembranaire (Constantinescu et al., 1999). Il est exprimé majoritairement dans les cellules érythrocytaires et également à faible

niveau dans quelques autres tissus non hématopoïétiques comme le cerveau ou encore le cœur.

L'invalidation du gène codant l'Epo ou l'EpoR induit une létalité embryonnaire entre 13 et 15 jours de gestation chez la souris. Cette létalité est associée à une anémie indiquant un rôle du couple Epo-EpoR dans l'érythropoïèse. Les contributions de ce couple dans l'érythropoïèse ont été recensées dans plusieurs revues (Wojchowski, 2006 ; Merchionne, 2009 ; Noguchi, 2008). Pour résumer, le couple Epo-EpoR est surtout nécessaire pour la survie des progéniteurs érythrocytaires. Des analyses complémentaires ont mis également en évidence un rôle de l'Epo et de son récepteur dans la prolifération ainsi que dans la différenciation terminale des érythroblastes.

L'interaction de l'Epo avec son récepteur induit une homodimérisation de l'EpoR et des modifications conformationnelles qui vont conduire à l'activation de plusieurs voies de signalisation telles que la voie JAK/STAT, la voie des MAPK ou encore la voie PI3K/Akt. L'activation de ces voies contribue aux fonctions du couple Epo - EpoR dans l'érythropoïèse.

1-2 Le couple Kit-SCF

Kit est un récepteur à activité tyrosine kinase de type III. Contrairement à l'EpoR, ce récepteur est aussi bien exprimé dans les cellules hématopoïétiques que dans certains tissus non hématopoïétiques comme les cellules gliales ou encore les mélanocytes (Edling and Hallberg, 2007) (Matsuda et al., 1993). Dans le lignage hématopoïétique, l'expression de Kit est spécifique du compartiment des progéniteurs excepté pour les mastocytes matures qui continuent de l'exprimer. La signalisation induite par kit est dépendante du recrutement de son ligand, SCF (Stem Cell Factor).

Les souris portant des mutations au niveau de kit ou de son ligand souffrent d'anémie indiquant un rôle du couple Kit-SCF dans l'érythropoïèse (Ashman, 1999). Les études caractérisant le rôle de Kit-SCF dans l'érythropoïèse ont été recensées dans la revue de V. Munugalavadla (Munugalavadla, 2005). Le recrutement de SCF sur son récepteur induit une homodimérisation de Kit. Cette homodimérisation conduit à l'activation de plusieurs de voies de signalisation telles que la voie des MAPK, la voie PI3K ou la voie des kinases Src. L'activation de ces voies contribue à la prolifération et à la survie des érythroblastes. Ainsi, par exemple, la lignée érythroleucémique HB-60 prolifère et survit en présence d'Epo et de SCF. En revanche, l'absence de SCF conduit à la différenciation de cette lignée (Tamir et al., 2000). De la même manière, la surexpression de *c-Kit* dans des érythroblastes primaires humains entraîne également une prolifération plus importante et un retard de différenciation (Zeuner et al., 2010). Ces résultats indiquent une contribution répressive de Kit-SCF à la différenciation érythrocytaire.

1-3 Coopération des voies de signalisation Kit-SCF et Epo-EpoR sur la prolifération des progéniteurs érythrocytaires (Figure3)

Les contributions voisines des voies de signalisation induites par les couples Kit-SCF et Epo-EpoR sur la prolifération et la survie et leur coexpression dans le compartiment des progéniteurs immatures suggèrent une coopération entre ces deux voies.

Le groupe de H. Lodish a mis en évidence une interaction physique entre Kit et EpoR (Wu et al., 1995). Afin de déterminer l'effet de cette interaction sur la prolifération des progéniteurs érythrocytaires, M.O. Arcasoy et X. Jiang ont mis en culture des proérythroblastes humains en présence d'Epo et/ou de SCF. La présence seule de l'une ou l'autre de ces cytokines n'est pas suffisante pour assurer la prolifération des proérythroblastes.

En revanche, la présence simultanée de SCF et d'Epo permet cette amplification. Cette prolifération est associée à une activation plus importante des différentes voies de signalisation induites par ces récepteurs comparée à celle obtenue avec l'Epo ou le SCF seuls. Ces résultats montrent donc que les voies de signalisation activées par les récepteurs EpoR et Kit coopèrent dans la prolifération et la survie des progéniteurs érythrocytaires (Arcasoy and Jiang, 2005).

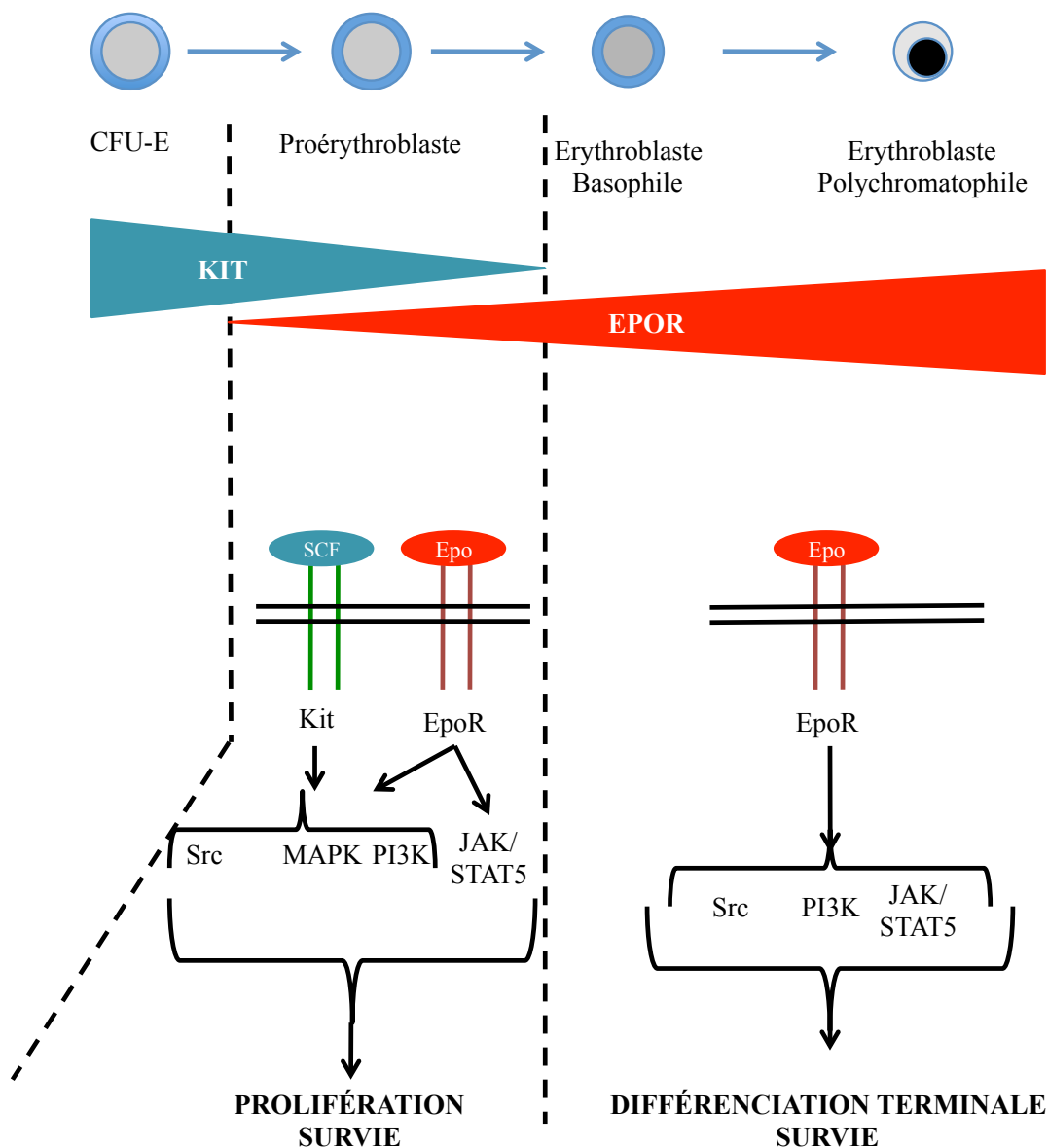


Figure 3 : Fonctions des voies de signalisation induites par les couples Epo/EpoR et Kit/SCF au cours de l'érythropoïèse

D'autres kinases importantes pour les fonctions de ces deux couples dans l'érythropoïèse sont mentionnées dans la revue de V. Munugalavadla (Munugalavadla et al., 2005).

1- Apoptose *versus* différenciation

2-1 *L'activation de la caspase-3 est nécessaire pour l'érythropoïèse*

Les groupes de Wiedman et Peschle ont mis en évidence une activation des caspases au cours de l'érythropoïèse avant le stade érythroblastes basophiles (Carlile et al., 2009; De Maria et al., 1999a). Afin de déterminer la contribution des caspases à la différenciation érythrocytaire, Y. Zermati *et al.* ont inhibé leur activité par un inhibiteur général, Z-Vad-fmk. La répression de l'activité de ces protéines bloque la maturation de cellules érythroïdes humaines au stade d'érythroblaste basophile. Les mêmes observations ont été faites avec un inhibiteur plus spécifique de la caspase-3 (Zermati et al., 2001). L'inhibition de la caspase-3 par ARN interférence conduit également à un arrêt de maturation de ces mêmes progéniteurs (Carlile et al., 2004). Ces résultats montrent que l'activation de la caspase-3 est nécessaire pour la maturation des cellules érythrocytaires.

Afin de déterminer si cette activation de la caspase-3 pouvait conduire à l'apoptose des cellules, les auteurs ont analysé par cytométrie de flux la fluorescence après marquage à l'annexine V qui témoigne de la présence à la surface membranaire de phosphatidyl sérine. Cette analyse n'a pas mis en évidence de différence de fluorescence entre les cellules traitées et non traitées avec l'inhibiteur de caspase Z-Vad-fmk (Carlile et al., 2004; Zermati et al., 2001). La caspase 3 a donc des fonctions non apoptotiques importantes pour la différenciation érythrocytaire.

Le groupe de M. Wiedmann s'est intéressé aux mécanismes pouvant conduire à l'activation de la caspase 3 nécessaire à la différenciation érythrocytaire. Les auteurs se sont intéressés au couple Fas-FasL qui est exprimé dans les érythroblastes. La répression de Fas par siARN réduit de manière significative la différenciation d'érythroblastes humains montrant une fonction non apoptotique de Fas. Cette réduction est corrélée à la réduction de l'activité de la caspase 3 dont la répression conduit également à la réduction de la différenciation de ces cellules. Ces résultats suggèrent que la caspase 3 est activée par la voie de signalisation induite par le couple Fas/FasL. Néanmoins, la répression de l'activité de la caspase 9 en présence de Fas réduit également la différenciation de ces cellules ainsi que l'activité de la caspase 3. L'activation de la caspase 9 signe une dépolarisation des membranes mitochondriales. Ces données suggèrent donc que l'activation de la caspase 3 nécessaire à la différenciation érythrocytaire pourrait également être induite par la mitochondrie. Néanmoins, les mécanismes conduisant à l'activation de cette voie mitochondriale ne sont pas connus (Carlile et al., 2009).

2-2 Protection de GATA-1 par HSP70

GATA-1 est un facteur de transcription de la famille GATA. Il joue un rôle primordial dans l'érythropoïèse (Fujiwara et al., 1996). Il régule un certain nombre de gènes impliqués dans différents processus tels que la différenciation érythrocytaire (Welch et al., 2004) ou encore la résistance à l'apoptose comme Bcl-X_L (Gregory et al., 1999). De manière surprenante, le facteur de transcription GATA-1 est une cible des caspases (De Maria et al., 1999b). Toutefois, l'activation des caspases nécessaire à la maturation des érythroblastes ne conduit pas au clivage de GATA-1 (Zermati et al., 2001). Ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme protégeant GATA-1 de ce clivage et contribuant à la résistance à l'apoptose des cellules érythrocytaires et à leur maturation.

Afin d'identifier ce mécanisme, le groupe d'O. Hermine s'est intéressé aux protéines chaperones Hsp et en particulier à HSP70 qui a été décrite comme étant exprimé dans les cellules érythrocytaires chez le xénope (Winning and Browder, 1988). Les auteurs ont montré qu'en présence d'Epo, HSP70 co-localise avec GATA-1 dans le noyau et interagit avec ce facteur. Cette co-localisation et cette interaction sont perdues par la privation en Epo. De plus, la répression de HSP70 par interférence par l'ARN, comme la privation en Epo, conduit à la réduction du taux de protéine GATA-1 et la réduction conséquente de BCL-X_L induisant l'apoptose massive des cellules (Ribeil et al., 2007). Ces résultats montrent qu'en présence d'Epo, HSP70 protège GATA-1 du clivage par les caspases contribuant aux fonctions non apoptotiques de la caspase 3 dans la différenciation érythrocytaire (**Figure 4**).

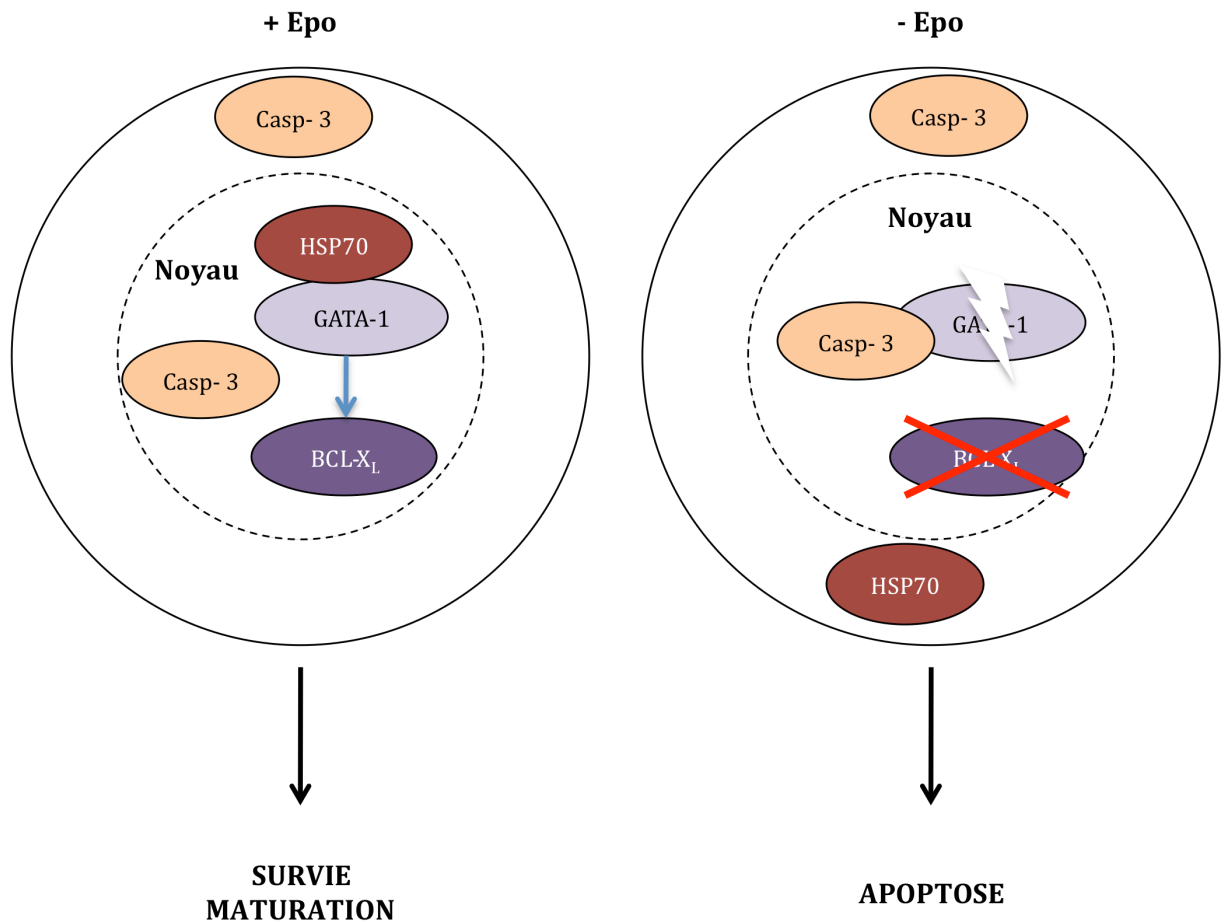


Figure 4: HSP70 protège GATA-1 du clivage par la caspase-3

En présence d'Epo (partie gauche), HSP70 et GATA-1 co-localisent dans le noyau et interagissent. Cette interaction protège GATA-1 du clivage par la caspase-3 et permet l'activation de BCL-X_L conduisant à la survie et à la maturation des érythroblastes.

L'absence d'Epo (partie droite) induit l'export de HSP70 hors du noyau. GATA-1 est alors clivé par la caspase-3 et la protéine BCL-X_L n'est plus activée. Cette situation conduit à l'apoptose des érythroblastes.

2- Rôle de p53 dans la différenciation érythrocytaire

Le facteur de transcription p53 est impliqué dans un certain nombre de processus, notamment l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Choisy-Rossi and Yonish-Rouach, 1998).

La surexpression d'une protéine p53 sauvage dans la lignée leucémique humaine K562 ou dans la lignée érythroleucémique MEL induit un arrêt de prolifération et une reprise du programme de différenciation (Chylicki et al., 2000; Di Bacco and Cotter, 2002) (Johnson et al., 1993). Ces effets sont associés à une activation des caspases dont nous avons pu voir qu'elles sont importantes pour la différenciation érythrocytaire. Ces résultats suggèrent que p53 pourrait contribuer à la différenciation terminale des érythroblastes.

Des analyses immunocytologiques ont permis la détection de l'expression de p53 à partir du stade normoblaste ou érythroblaste (Peller et al., 2003). Le blocage de la différenciation érythrocytaire au stade érythroblaste basophile par l'inhibition des caspases suggère une activation plus précoce des caspases que l'activation de p53 (Zermati, 2001). Cette observation n'est pas cohérente avec une contribution de p53 dans l'activation des caspases. Néanmoins, un manque de sensibilité de la technique utilisée pourrait expliquer l'absence de détection de p53 dans des étapes plus précoces de la différenciation.

Les souris p53^{-/-} ne présentent aucun défaut érythropoïétique, suggérant que l'activation de p53 n'est pas nécessaire pour la différenciation érythrocytaire (Donehower, 1992). En revanche, des analyses *in vitro* ont permis de montrer que l'absence de p53 est associée à une prolifération plus importante des érythroblastes en présence de glucocorticoïdes nécessaires à l'érythropoïèse de stress. Ces résultats suggèrent une contribution de p53 dans le contrôle de la prolifération des cellules érythrocytaires en condition de stress (Ganguli et al., 2002). Cette contribution potentielle n'a pas été documentée dans les souris p53^{-/-}.

La répression de l'expression d'un facteur de transcription de la famille p53, p73, réduit la différenciation érythrocytaire des cellules K562 en présence d'agent inducteur comme l'Epo ou l'hémine. Cette réduction est corrélée à la réduction de l'expression de *gata-1*. Ces résultats suggèrent que le facteur p73 est impliqué dans la différenciation érythrocytaire (Marques-Garcia et al., 2009). Ces résultats suggèrent également que l'absence

de phénotype érythropoïétique dans les souris $p53^{-/-}$ pourrait être liée à une compensation fonctionnelle par p73.

C) L'érythropoïèse de stress

Un stress hypoxique induit une augmentation de la production d'Epo par le rein (Bozzini et al., 1994). L'augmentation du taux d'Epo induit à son tour une érythropoïèse dite érythropoïèse de stress qui se déroule dans la rate. Celle-ci est similaire à l'érythropoïèse fœtale et est caractérisée par la production rapide de globules rouges matures afin de maintenir un hémocrite normal.

1- Production des progéniteurs de stress

L'augmentation du taux d'Epo induite par l'hypoxie contribue notamment au sauvetage d'un réservoir de progéniteurs incapables de survivre en conditions normales du fait de leur faible expression du récepteur de l'Epo (Liu et al., 2006). L'hypoxie contribue également à l'induction d'une population progénitrice spéciale appelée progéniteurs de stress qui correspondent à des BFU-E de stress. Ces progéniteurs présentent des caractéristiques différentes de progéniteurs BFU-E de la moelle osseuse. En effet, les BFU-E de la moelle osseuse de souris ont besoin d'Epo et du SCF pour proliférer *in vitro* et arrivent à maturation au bout de 7 jours de culture. En revanche, les BFU-E de la rate n'ont besoin que d'Epo pour proliférer et 5 jours suffisent pour atteindre une maturation semblable à celle des BFU-E de la moelle osseuse après 7 jours de culture (Lenox et al., 2005).

Ces données montrent donc qu'en réponse à un stress hypoxique, l'Epo, produite massivement par le rein, favorise l'amplification rapide de progéniteurs de stress résistants à l'apoptose dans la rate.

2- Rôle de BMP4

Les souris *fff* (flexed-tail) présentent un retard dans leur réponse à un stress hypoxique (Coleman et al., 1969). Le groupe de R.F. Paulson a mis en évidence que le gène impliqué dans ce phénotype correspond au gène *madh5* ou *smad5* qui code une protéine impliquée dans la signalisation induite par le récepteur des protéines BMP2, 4 et 7 (Bone Morphogenetic Protein). L'analyse de l'expression de ces trois protéines a montré que la protéine BMP4 est induite après l'induction d'une anémie ainsi qu'après une hypoxie tandis que les protéines BMP2 et BMP7 sont peu ou pas exprimées. Cette induction a lieu peu avant l'amplification des BFU-E de stress (Lenox et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation dépendante de BMP4 est impliquée dans l'érythropoïèse de stress.

La recherche des mécanismes par lesquels BMP4 pourrait agir a permis de montrer que cette voie de signalisation favorise l'amplification des progéniteurs de stress en induisant la différenciation de cellules de la rate répondant à BMP4. Les auteurs ont montré que ces cellules capables de répondre au BMP4 correspondent à des MEP (Lenox et al., 2005).

En réponse à une hypoxie, BMP4 est donc produite et induit la différenciation des MEP en progéniteurs BFU-E de stress dans la rate qui constituent la population cible de l'Epo.

3- Rôle de la voie de signalisation Kit/SCF

Comme les souris *fff*, les souris présentant des mutations au niveau du gène codant le récepteur kit montrent un retard dans leur réponse à un stress hypoxique suggérant que la voie de signalisation induite par Kit-SCF est également importante pour l'érythropoïèse de stress. L'analyse des progéniteurs de la rate a montré que le nombre de BFU-E de stress ainsi que le nombre de MEP répondant à BMP4 sont très fortement diminués dans les souris mutées pour Kit comparé à celui des souris sauvages. D'autre part, la culture de cellules spléniques en présence d'Epo, de SCF et/ou de BMP4 a permis de montrer que le BMP4 augmente le nombre de BFU-E de stress tandis que la voie induite par Kit-SCF augmente la taille de leurs colonies (Perry et al., 2007).

Ainsi, les voies de signalisation induites par Kit-SCF et par BMP4 coopèrent pour l'amplification des progéniteurs de stress en réponse à un stress hypoxique.

4- Alimentation de la rate en progéniteurs de stress à partir de cellules de la moelle

Le groupe de R. F. Paulson a cultivé des cellules de rate de souris traitées à la phénylhydrazine (PHZ) en présence ou en absence de BMP4. Cette étude a mis en évidence la présence de cellules répondant à BMP4 (BMP4^R) dans la rate en situation physiologique. En revanche, ce pool de cellules BMP4^R disparaît après 24h de traitement à la PHZ montrant que tous les progéniteurs BMP4^R génèrent des BFU-E de stress après une hypoxie. Cette absence de cellules BMP4^R coïncide avec une période de récupération de 21 jours nécessaire pour générer une réponse optimale à un deuxième stress hypoxique. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la rate nécessite d'être réalimentée en cellules BMP4^R pour pouvoir répondre à un deuxième stress anémique.

L'origine de ces cellules a été déterminée par des expériences de transplantations de cellules de moelle osseuse ou de rate de souris sauvages dans les souris mutées pour Kit. Ces expériences ont permis de montrer la présence de progéniteurs immatures dans la moelle osseuse capables de générer ces cellules BMP4^R. En revanche, seules les cellules présentes dans la rate sont capables de répondre à BMP4 (Perry, 2009).

Ces résultats montrent donc que la rate est réalimentée par des progéniteurs immatures provenant de la moelle osseuse. Arrivés dans la rate, ces progéniteurs se différencient en cellules BMP4^R qui, comme nous l'avons vu, correspondent à des MEP.

5- Importance de la voie Hedgehog

Le fait que ces progéniteurs immatures de la moelle osseuse génèrent des cellules BMP4^R uniquement dans la rate suggère l'existence d'un signal dans cet organe favorisant cette différenciation. Le groupe de R.F. Paulson s'est intéressé à la voie Hedgehog dont il avait été montré auparavant la fonction positive dans la réponse à BMP4 des progéniteurs chondrocytaires. La mutation du récepteur Smo, impliqué dans la voie Hedgehog, abolit la réponse au traitement à la PHZ. A l'inverse, la mutation du récepteur de la voie Hedgehog Ptc (Patched), qui régule négativement Smo en absence de ligand, induit l'apparition de BFU-E de stress dans la moelle osseuse. Ces expériences mettent en évidence le rôle de la voie Hedgehog dans la génération des cellules BMP4^R. La famille Hedgehog comprend trois membres, Shh, Ihh et Dhh. Le membre impliqué dans cette voie a été identifié comme étant Dhh dont l'expression est induite en réponse à la PHZ. Cette voie induit l'expression de BMP4 dans les cellules stromales de la rate qui expriment également Dhh (Perry et al., 2009).

S'appuyant sur l'ensemble de ces résultats, le modèle proposé par le groupe de R.F. Paulson pour l'érythropoïèse de stress est présenté sur la figure 5. La rate est alimentée en permanence par des progéniteurs immatures provenant de la moelle osseuse et générant des progéniteurs BMP4^R sous l'action de la voie Hedgehog. Une hypoxie, engendrée par exemple par une anémie, induit l'expression de l'Epo par le rein et de BMP4 par les cellules stromales de la rate. Cette production de BMP4 induit à son tour la différenciation de la totalité des progéniteurs BMP4^R présents dans la rate en BFU-E de stress. Ces cellules s'amplifient rapidement sous l'effet coopératif des voies de signalisation induites par BMP4 et par le couple Kit/SCF et résistent à l'apoptose grâce à la signalisation induite par le couple EpoR.

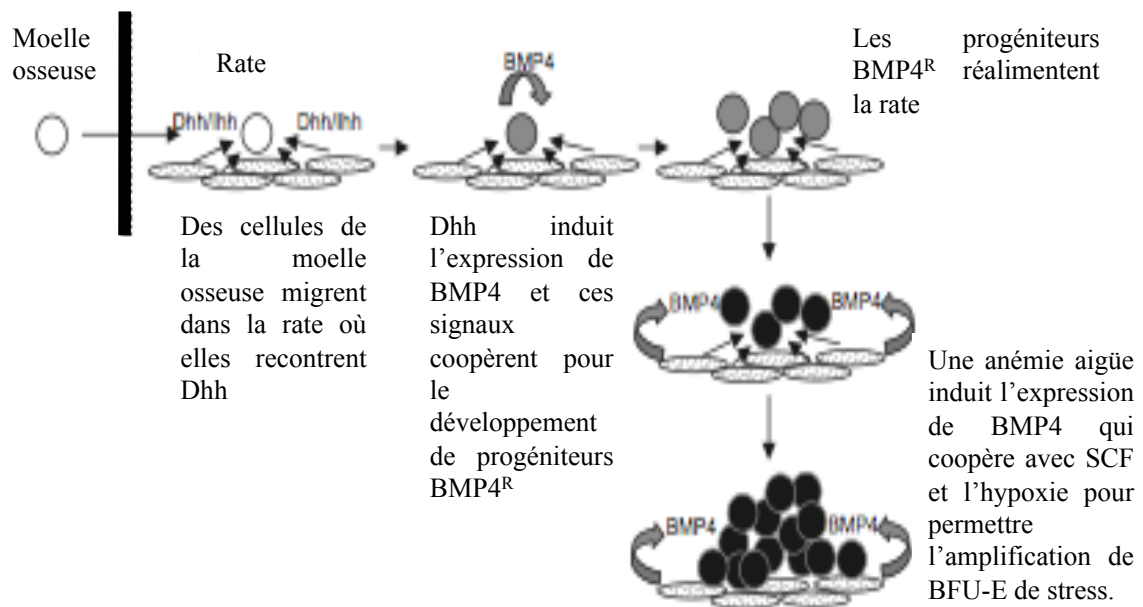


Figure 5 : Modèle de l'érythropoïèse de stress proposé par le groupe de Paulson (d'après Perry et al., 2009)

II- LES ERYTHROLEUCEMIES DE FRIEND

A) Pathologie induite par le virus de Friend : un processus en deux étapes

Les souris de souches sensibles infectées par le virus de Friend développent des érythroleucémies appelées érythroleucémies de Friend (Friend, 1957). La pathologie induite par le virus de Friend a été décrite dans différentes revues (Moreau-Gachelin, 2008; Ney and D'Andrea, 2000; Ruscetti, 1999). Ce virus comporte deux souches nommées en fonction de la pathologie associée à l'érythroleucémie. La souche FV-P induit une érythroleucémie associée à une polycythémie. L'érythroleucémie induite par la souche FV-A s'accompagne d'une anémie. Cette anémie est le résultat d'une augmentation du volume plasmatique alors que le nombre d'érythrocytes a plutôt tendance à augmenter. La résultante est une diminution de la concentration des globules rouges. Chaque souche est composée de deux virus. Le virus SFFV (Spleen Focus Forming Virus) est déficient pour la réplication et constitue l'élément pathogène du virus de Friend. Le virus F-MuLV (Friend-Murine Leukemia Virus) se comporte comme un virus accessoire du virus SFFV et est incapable à lui seul d'induire des érythroleucémies chez les souris adultes.

Les deux souches du virus de Friend induisent des érythroleucémies se développant en deux étapes. La première étape consiste en une prolifération polyclonale de progéniteurs érythrocytaires (BFU-E tardif ou CFU-E). Ces progéniteurs ne sont pas transformés et ont une faible capacité d'auto-renouvellement *in vitro*. Ces progéniteurs sont toujours capables de se différencier. La prolifération et la différenciation de ces progéniteurs sont indépendantes de l'Epo dans le cas de l'infection avec la souche FV-P tandis qu'elles sont partiellement dépendantes de cette cytokine après infection avec la souche FV-A. Dans ce dernier cas, les progéniteurs présentent une hypersensibilité à l'Epo. Cette étape est associée à une érythroblastose et une splénomégalie. Dans le cas de l'infection avec la souche SFFV-P, les

souris meurent généralement à ce stade du fait d'une rupture de la rate (Ney and D'Andrea, 2000). La deuxième étape voit l'apparition de clones transformés dans la rate et la moelle osseuse des souris survivantes. Ces clones sont bloqués dans leur différenciation au stade BFU-E ou CFU-E et présentent une capacité d'auto-renouvellement illimitée *in vitro*. Des lignées érythroleucémiques peuvent être dérivées à partir de ces clones et sont appelées lignées MEL.

B) Événements moléculaires induits par le virus de Friend

1- Activation de l'érythropoïèse de stress

Le virus SFFV est déficient pour la réplication. La comparaison du génome du virus SFFV avec les séquences de virus compétent pour la réplication ont permis de mettre en évidence que cette déficience est liée à la présence de délétions dans les gènes *gag* et *pol* et à des mutations dans le gène *env* (Clark and Mak, 1984). Le génome du virus SFFV ne code pas de proto-oncogène cellulaire (Ben-David and Bernstein, 1991). En revanche, le gène *env* code une glycoprotéine de 55 kDa présente à la surface des cellules infectées, GP55, dont le groupe d'Y. Ikawa a montré qu'elle était responsable de la pathogénicité du virus (Aizawa et al., 1990).

1-1 Activation de la voie de signalisation de l'EpoR

La protéine membranaire GP55 interagit avec l'EpoR (D'Andrea, 1992). Cette interaction conduit à l'activation des voies de signalisation dépendantes de ce récepteur. L'expression forcée de l'EpoR et de la protéine GP55 dans une lignée IL-3 dépendante rend cette lignée indépendante des facteurs de croissance pour sa prolifération (Hoatlin et al.,

1990). Cette interaction explique le développement d'érythroleucémies et l'indépendance vis à vis de l'Epo des progéniteurs infectés au cours de la première phase de la maladie.

En revanche, les progéniteurs érythroïdes infectés avec la souche anémique du virus ne développent pas d'indépendance vis à vis de l'Epo mais seulement une hypersensibilité. L'interaction entre la protéine GP55-A avec l'EpoR n'a pas clairement été montrée. Néanmoins, l'expression de cette glycoprotéine conduit à la formation de CFU-E en présence de faibles doses d'Epo suggérant donc que la protéine GP55-A est également capable d'activer l'EpoR (Constantinescu et al., 1998). Une des raisons pouvant expliquer le fait que cette glycoprotéine ne supporte pas l'indépendance à l'Epo pourrait être la faible expression de GP55-A à la membrane des progéniteurs érythroïdes comparée à l'expression de GP55-P (Ruscetti et al., 1981).

La première étape de la maladie induite par le virus de Friend s'explique donc par une activation aberrante de l'EpoR par la glycoprotéine GP55 conduisant à une prolifération des progéniteurs érythrocytaires infectés indépendante ou partiellement dépendante de la présence de l'Epo.

1-2 Rôle de sf-Stk

Les souris homozygotes portant l'allèle Fv2^s du locus Fv2 sont susceptibles au virus de Friend tandis que les souris homozygotes portant l'allèle Fv2^r sont résistantes. D.A. Persons *et al.* ont montré que le locus Fv2 code la tyrosine kinase Stk qui est l'homologue murin de la protéine Ron chez l'Homme et de la protéine v-sea chez le poulet. Deux isoformes de cette protéine existent du fait de deux promoteurs alternatifs : une forme longue et une forme courte appelée Sf-Stk. L'isoforme Sf-Stk est produite par toutes les souris susceptibles au virus de Friend tandis que les souris résistantes n'expriment que la forme longue. Ces dernières présentent une délétion de trois nucléotides dans le promoteur de la forme courte qui

conduit à la diminution ou à l'extinction de son expression. La mutation nulle de l'allèle Fv2^s dans les souches susceptibles rend les souris résistantes au virus de Friend. Au contraire, la surexpression de Sf-Stk dans les souris de souche résistante les rend susceptibles au virus de Friend. L'ensemble de ces résultats montre donc que la protéine Sf-Stk confère la susceptibilité à ce virus (Persons et al., 1999).

Le groupe de S. Ruscetti a montré une interaction entre Sf-Stk, la glycoprotéine GP55 et l'EpoR (Nishigaki et al., 2001). L'interaction entre GP55 et Sf-Stk conduit à l'activation de cette tyrosine kinase par phosphorylation. De plus, l'expression de Sf-Stk est nécessaire pour la transformation des fibroblastes induite par le virus SFFV (Jelacic et al., 2008). Enfin, la voie de signalisation dépendante de Sf-Stk est nécessaire pour la prolifération des progéniteurs infectés par le virus de Friend et indépendants de l'Epo (Finkelstein et al., 2002). Ces résultats montrent donc que l'action de la glycoprotéine GP55 sur les progéniteurs érythroïdes est dépendante de la formation d'un complexe entre GP55, Sf-Stk et l'EpoR.

1-3 Rôle de la voie Kit/SCF

Les souris mutées au niveau des loci W (White spotting) et Sl (Steel) sont également résistantes au virus de Friend. Ces deux loci codent respectivement le récepteur à activité tyrosine kinase Kit et son ligand SCF (Stem Cell Factor). La signalisation induite par le couple Kit-SCF est importante pour le contrôle de la différenciation et de la prolifération des progéniteurs érythrocytaires. Les souris W et Sl présentent de sévères anémies qui pourraient expliquer leur résistance au virus de Friend (Ashman, 1999).

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la résistance au virus de Friend après mutation de Kit ou SCF, le groupe de R.F. Paulson a analysé la moelle osseuse et la rate de souris double hétérozygotes W/W^V . Cette étude a permis de mettre en évidence que ces animaux présentent un déficit de cellules cibles du virus de Friend dans la rate alors que le nombre de cellules cibles de ce virus dans la moelle osseuse est sensiblement comparable à celui des souris sauvages. De plus, contrairement aux cellules sauvages, les cellules cibles W/W^V de la rate sont incapables de s'amplifier. Cette étude montre que les cellules cibles de la rate ne sont pas les mêmes que dans la moelle osseuse. Le groupe de R.F. Paulson a mis en évidence que les cellules cibles dans la rate sont les progéniteurs bipotents MEP. De manière intéressante, les cellules W/W^V de la rate, en particulier les MEP, n'expriment pas la forme Sf-Stk du locus Fv2 dont nous avons vu dans le paragraphe précédent qu'elle est importante pour l'érythroleucémie de Friend (Subramanian et al., 2005).

L'ensemble de ces résultats montre donc que le développement de la maladie induite par le virus de Friend est dépendant de la signalisation induite par Kit/SCF probablement au moins en partie due au rôle de Kit-SCF dans la régulation de Sf-Stk. Cette voie joue un rôle clé dans la prolifération des progéniteurs de stress de la rate qui constituent la cible du virus de Friend. Cette absence de cellules cibles dans la rate des souris W/W^V conduisant à une résistance au virus de Friend est en accord avec les travaux de Mirand montrant que les souris ayant subi une splénectomie présentent un retard dans le développement de la pathologie de Friend. Dans ce cas, l'érythroleucémie se développe dans le foie (Mirand et al., 1961). La rate constitue donc l'organe clé de l'infection par ce virus. Ces résultats suggèrent également que le virus de Friend utilise la même voie que celle utilisée après hypoxie conduisant à l'amplification de progéniteurs érythrocytaires de stress.

1-4 Rôle de BMP4

Un autre gène de résistance au virus de Friend est le gène *f* (flexed-tail) (Axelrad, 1969). Ce gène correspond au gène *Madh5* ou *Smad5* qui code une protéine impliquée dans la signalisation induite par les récepteurs aux protéines BMP2, 4 et 7 (Lenox et al., 2005). Les souris adultes homozygotes pour la mutation *fff* ne présentent aucun phénotype à l'état physiologique. Comme nous avons pu le voir, ces souris présentent une réponse à une anémie aigüe retardée par rapport aux souris sauvages (cf. paragraphe 2 page 18)

Le groupe de R.F. Paulson a montré que la résistance des souris *fff* est causée par l'absence des cellules cibles du virus de Friend dans la rate. D'autre part, le traitement des cellules infectées par le virus de Friend par le BMP4 conduit à une augmentation de leur nombre suggérant l'implication de la voie induite par BMP4 dans la pathologie de Friend. Cette étude montre également que l'infection par le virus de Friend induit l'expression de *bmp4* dans les progéniteurs érythrocytaires infectés (Subramanian et al., 2008).

L'ensemble de ces résultats montre donc que le virus de Friend utilise la voie de l'érythropoïèse de stress dépendante de BMP4. Le modèle proposé par A. Subramanian *et al.* est que les progéniteurs infectés de la rate produisent cette protéine qui envoie un signal aux cellules stromales de la rate. En réponse à ce signal, ces cellules produisent à leur tour BMP4 qui permet aux MEP de la rate de générer des BFU-E de stress qui constituent les cellules cibles du virus de Friend à l'origine des clones érythroleucémiques (Subramanian et al., 2008) **(Figure 6)**.

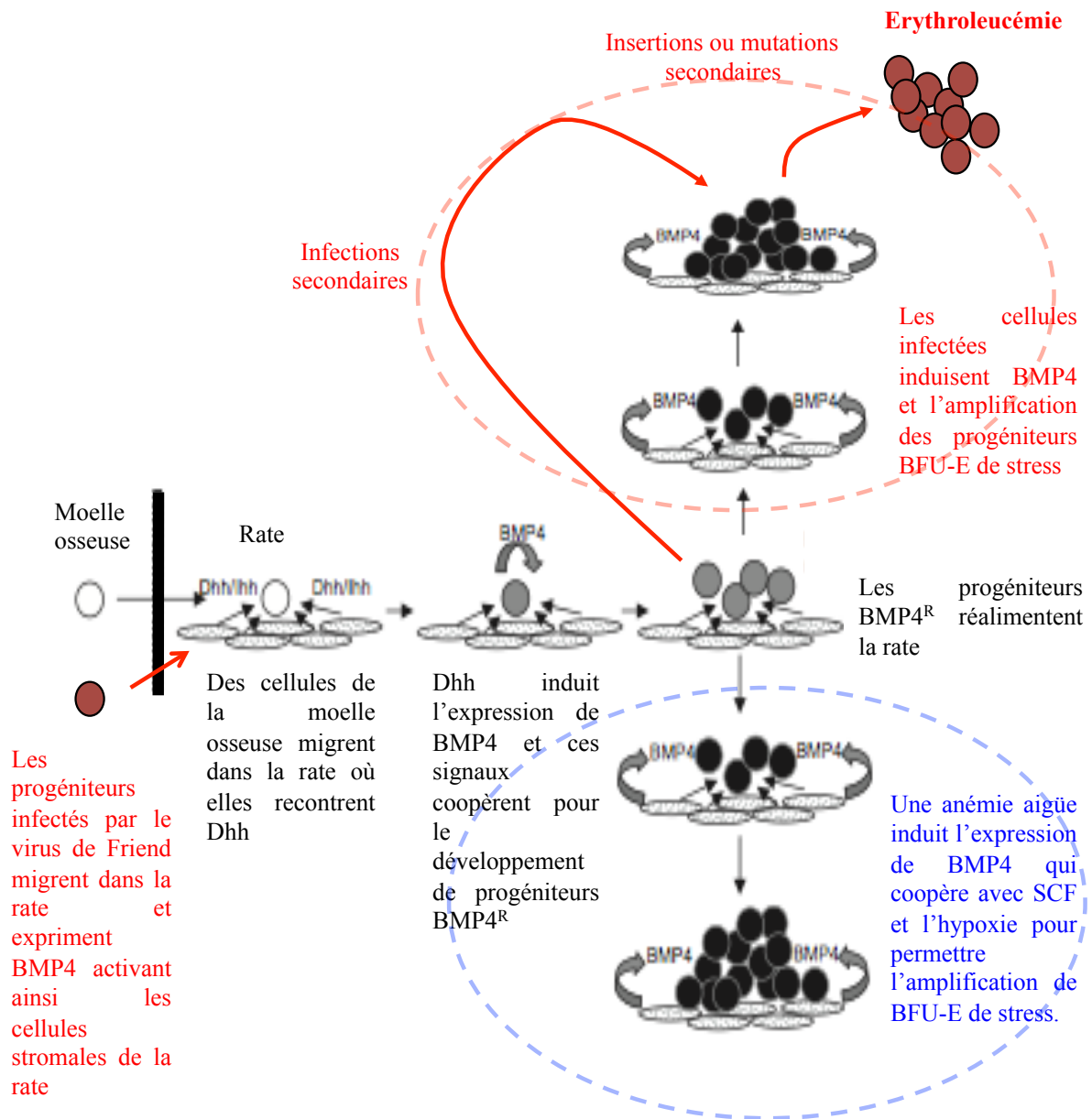


Figure 6 : Activation de l'érythropoïèse de stress par le virus de Friend

2- Insertion provirale en amont du gène *spi-1*

L'activation de la voie de signalisation de l'EpoR par le complexe formé de la glycoprotéine GP55 et la protéine Sf-Stk n'est pas suffisante pour induire la transformation des progéniteurs érythrocytaires infectés. Cette transformation nécessite des événements moléculaires secondaires (Ruscetti, 1999).

Le provirus SFFV est capable de s'intégrer de façon aléatoire dans le génome des cellules qu'il infecte. Toutes ces intégrations provirales ne conduisent pas au développement érythroleucémique. Dans 95% des intégrations conduisant à la transformation, le provirus SFFV s'intègre en amont du gène *spi-1* (SFFV proviral integration) (Moreau-Gachelin et al., 1988). Cette insertion conduit à l'activation de la transcription de ce gène (Moreau-Gachelin et al., 1989). F. Moreau-Gachelin *et al.* et M. Klemz *et al.* ont montré que *spi-1* code le facteur de transcription SPI-1/PU.1 (appelé par la suite SPI-1) appartenant à la famille ETS (Goebel, 1990).

Certaines lignées de cellules érythroleucémiques dérivées de souris infectées par le virus SFFV (lignée SFFV) peuvent être induites à se différencier par des drogues comme le DMSO (DiMethylSulfOxyde) ou l'HMBA (HexaMethylene Bis Acetamide). Ces lignées ont largement été utilisées pour comprendre les mécanismes de transformation. La différenciation induite par ces drogues s'accompagne d'une réduction de l'expression de *spi-1*. Cette corrélation entre la différenciation et la répression de *spi-1* additionnée au fait que la très grande majorité des érythroblastes présentent une activation de ce gène suggère que SPI-1 joue un rôle essentiel dans le développement érythroleucémique.

L'infection de cellules de la moelle osseuse de souris par un rétrovirus exprimant *spi-1* induit la prolifération de blastes aux caractéristiques érythroïdes. Ces cellules ressemblent morphologiquement aux cellules érythroleucémiques de Friend et sont bloqués dans leur différenciation au stade BFU-E ou CFU-E (Schuetze et al., 1993). Ces résultats montrent que SPI-1 est capable d'immortaliser les cellules érythrocytaires. De manière cohérente avec ces résultats, l'inhibition de *spi-1* par siARN dans les cellules MEL permet la reprise de leur différenciation au détriment de leur prolifération (Atar and Levi, 2005).

Afin d'appréhender *in vivo* le rôle de SPI-1 dans le développement érythroleucémique, F. Moreau-Gachelin *et al.* ont développé des souris transgéniques exprimant *spi-1* à partir de

la LTR (Long Terminal Repeat) du virus SFFV. De manière similaire à la pathologie induite par le virus de Friend, ces souris développent des érythroleucémies en deux étapes (Moreau-Gachelin et al., 1996).

L'ensemble de ces résultats montre que le facteur SPI-1 joue un rôle essentiel dans le développement érythroleucémique en permettant la prolifération et le blocage de la différenciation des érythroblastes.

Les mécanismes mis en jeu par le facteur SPI-1 seront traités dans la prochaine partie de cette introduction bibliographique.

3- Inactivation du gène p53

Les clones dérivés des souris infectées par le virus de Friend présentent de manière récurrente des mutations au niveau du gène p53. Ces mutations peuvent être des délétions (Munroe et al., 1988), des mutations ponctuelles (Munroe et al., 1990) ou encore des insertions provirales (Chow et al., 1987). L'ensemble de ces données supporte l'hypothèse que l'inactivation de p53 est importante pour le développement érythroleucémique. En accord avec cette hypothèse, la surexpression d'une protéine p53 sauvage dans les cellules MEL permet de relancer leur processus de différenciation au détriment de leur prolifération (Johnson et al., 1993).

Afin de déterminer *in vivo* le rôle de p53 dans la pathologie induite par le virus de Friend, le groupe de L.L. Kelley a infecté des souris sauvages ou p53^{-/-} avec le virus FVP. Ces expériences ont permis de montrer que les souris p53^{-/-} infectées développent des érythroleucémies plus rapidement que les souris sauvages et présentent une survie moins importante (Prasher et al., 2001).

L'inactivation de p53 est donc un événement important pour la tumorigénicité du virus de Friend.

4- Autres mutations observées dans les souris transgéniques SPI-1

Une revue de F. Moreau-Gachelin résume les résultats obtenus avec son modèle de souris transgénique SPI-1 (Moreau-Gachelin, 2008). Comme nous l'avons vu, ces souris développent des érythroleucémies similaires aux érythroleucémies de Friend. En revanche, bien que bloqués dans leur processus de différenciation, les érythroblastes exprimant *spi-1* restent dépendants des cytokines pour proliférer et ne sont pas transformés. Dans 86% des tumeurs, les auteurs ont observé des mutations dans le gène codant le récepteur Kit. La majorité des mutations observées concerne le domaine catalytique de Kit rendant son activité indépendante de la présence du ligand SCF. Ces données suggèrent donc que l'activation constitutive de Kit est nécessaire à la transformation des érythroblastes. En revanche, ces souris n'expriment pas la glycoprotéine GP55. L'absence de production de cette protéine pourrait expliquer la dépendance vis-à-vis de l'activation constitutive de Kit pour la transformation cellulaire.

B) Pathologie induite par le virus F-MuLV seul

L'infection de souris adultes par le virus F-MuLV seul ne conduit pas au développement d'érythroleucémies. En revanche, les souris nouveau-nées infectées par ce virus développent une érythroleucémie (Mac Donald et al., 1980).

Deux semaines après infection par le virus F-MuLV, les souris nouveau-nées développent une anémie sévère due à l'hémolyse des progéniteurs érythroïdes. Cette anémie est suivie d'une splénomégalie associée à une réticulocytose. Peu de temps après, l'anémie est partiellement corrigée chez les animaux n'ayant pas subi de splénectomie. En revanche, chez les souris splénectomisées, cette anémie s'aggrave. Ces expériences indiquent que l'infection

par le virus F-MuLV active l'érythropoïèse de stress dans la rate nécessaire pour corriger l'anémie (Sitbon et al., 1986).

Dans un deuxième temps, entre 30 et 70 jours, l'hématocrite des souris infectées chute à nouveau. Contrairement à la chute précoce de l'hématocrite décrite précédemment, cette deuxième diminution est associée à une diminution du nombre de réticulocytes indiquant un blocage de l'érythropoïèse (Sitbon et al., 1986).

Ces résultats indiquent donc que la pathologie induite par le virus F-MuLV, comme celle induite par le complexe de Friend entier, est un processus en deux étapes. La première étape est caractérisée par l'amplification de progéniteurs érythrocytaires dans la rate. Ces progéniteurs sont toujours capables de se différencier. La deuxième étape consiste en l'apparition de clones érythroleucémiques incapables de se différencier. Des lignées de cellules érythroleucémiques peuvent également être dérivées de ces clones.

1- Activation de la voie de signalisation EpoR

Contrairement au virus SFFV, le génome du virus F-MuLV ne code pas la glycoprotéine gp55 qui, comme nous avons pu le voir précédemment, confère l'indépendance vis à vis de l'Epo. Néanmoins, des lignées érythroleucémiques dérivées de souris infectées par le virus F-MuLV deviennent indépendantes de l'Epo après retransplantation *in vivo*. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le développement de cette indépendance, le groupe de Y. Ben David a examiné l'expression de l'Epo dans plusieurs lignées érythroleucémiques Epo-indépendantes. 80% d'entre elles produisent cette cytokine à la suite d'un réarrangement génique et non d'une insertion provirale. L'injection de lignées Epo-indépendantes dans les souris BALB/c entraîne une mort des souris plus précocement que l'injection de lignées Epo-dépendantes dans les mêmes souris. Ces résultats montrent une

corrélation entre l'activation de l'Epo et la tumorigénicité du virus F-MuLV (Howard et al., 1996).

En résumé, la pathologie induite par le virus F-MuLV implique l'apparition de clones indépendants de l'Epo pour leur croissance et leur survie. Le mécanisme conduisant à cette indépendance est différent de celui induit par le virus SFFV. Dans le cas du virus F-MuLV, un réarrangement du gène de l'Epo est observé dans une grande majorité des clones érythroleucémiques conduisant à une boucle autocrine.

2- Intégrations du provirus F-MuLV dans le génome

Comme le provirus SFFV, le provirus F-MuLV est capable de s'intégrer de manière aléatoire dans le génome. Seules certaines intégrations provirales conduisent au développement érythroleucémique.

*2-1 Intégration provirale au niveau du locus *fli-1**

Plusieurs groupes ont montré une intégration du provirus F-MuLV au niveau du locus *fli-1* dans 75% des lignées érythroleucémiques dérivées de souris infectées par ce virus (Ben-David et al., 1990; Sels et al., 1992). Le groupe d'A. Bernstein a pu mettre en évidence que ce locus est situé au niveau du chromosome 9. Le même groupe a montré que cette intégration provirale conduit à l'activation de l'expression de ce gène. Ce gène code le facteur de transcription FLI-1 appartenant à la famille ETS (Ben-David et al., 1991).

Afin de déterminer la contribution du facteur FLI-1 dans le développement érythroleucémique, le groupe de F. Morlé a surexprimé *fli-1* dans la lignée SFFV 745A et testé l'effet de cette surexpression sur la différenciation induite par l'HMBA. La

surexpression de ce gène conduit à une réduction du pourcentage de cellules hémoglobinisées indiquant donc que FLI-1 bloque la différenciation des cellules 745A en réponse à l'HMBA (Starck et al., 1999). D'autres groupes ont également entrepris de surexprimer *fli-1* dans les lignées érythroleucémiques humaines K562 et HEL ainsi que dans des érythroblastes aviaires immortalisés par la protéine thermo-sensible ts-v-sea. Les cellules K562 et HEL ont la capacité de se différencier en cellules érythroïdes sous l'action d'inducteur chimique comme l'hémine. La surexpression de *fli-1* dans les cellules K562 ou HEL traitées par l'hémine, qui réduit le taux de transcrits *fli-1* endogène, induit une diminution du pourcentage de cellules hémoglobinisées par rapport aux cellules contrôles (Athanasίου et al., 2000). Enfin, les érythroblastes aviaires surexprimant le récepteur murin de l'Epo se différencient et cessent leur prolifération en présence de cette cytokine tandis que l'absence d'Epo induit leur mort par apoptose. La surexpression de *fli-1* murin dans ces érythroblastes bloque leur différenciation en réponse à l'Epo et maintient leur prolifération. En absence d'Epo, la surproduction de FLI-1 maintient la survie de ces érythroblastes (Pereira et al., 1999). En accord avec ces résultats, l'expression d'un dominant-négatif de FLI-1 qui bloque son activité transcriptionnelle induit une apoptose massive, un arrêt de prolifération et la reprise de la différenciation des cellules érythroleucémiques CB3 (Cui et al., 2009).

FLI-1 contribue donc au développement érythroleucémique en maintenant la survie et la prolifération des érythroblastes au détriment de leur différenciation. Les mécanismes mis en jeu par FLI-1 dans le contrôle de ces trois processus seront traités dans la prochaine partie de cette introduction.

2-2 Intégration provirale au niveau du locus *fli-2*

Le groupe d'A. Bernstein a mis en évidence un autre site d'intégration récurrent du provirus F-MuLV au niveau du locus *fli-2* (Friend Leukemia virus Integration site 2). Ce réarrangement apparaît dans trois des trente lignées analysées dont deux induites par le virus F-MuLV (lignées CB3 et CB7) et une lignée induite par le virus FV-P (lignée DP28-9) (Ben-David et al., 1992). Ce même groupe a cloné l'ADNc de ce locus qui correspond au gène codant la protéine hnRNP A1 qui est impliquée dans l'épissage. Cette intégration, située en aval du gène, est associée à la répression de l'expression de ce gène. De plus, dans la lignée CB3, l'intégration a lieu sur les deux allèles conduisant à la perte totale de l'expression de ce gène. Cependant, l'implication de hnRNP A1 dans le processus érythroleucémique a été invalidée par le groupe d'Y. Ben-David (Ben-David et al., 1992).

D'autres études menées par le groupe d'Y. Ben-David ont permis de mettre en évidence un autre ADNc associé au locus *fli-2*. Il s'agit de l'ADNc du gène codant la sous-unité p45 du facteur de transcription NF-E2 (Nuclear Factor Erythroid 2). L'intégration du provirus F-MuLV au niveau du locus *fli-2* est associée à la répression de l'expression de ce gène. Comme hnRNP A1, p45NF-E2 n'est pas exprimé dans la lignée CB3 dans laquelle l'intégration est associée à la perte de l'autre allèle (Lu et al., 1994).

La protéine NF-E2 est un facteur de transcription de type leucine zipper. Ce facteur est un hétérodimère composé des sous-unités p45 et p18. La sous-unité p18 est un membre de la famille des oncoprotéines Maf et est exprimée dans de nombreux tissus (Andrews et al., 1993; Igarashi et al., 1994). En revanche, la sous-unité p45 n'est exprimée que dans les cellules érythrocytaires, les mégacaryocytes et les mastocytes (Andrews et al., 1993). Les souris déficientes en sous-unité p45 présentent une érythropoïèse défectueuse caractérisée par des hypochromies, des anisocytoses et des réticulocytoses montrant le rôle crucial joué par cette protéine dans la production des globules rouges (Levin et al., 1999).

La perte de l'expression de p45 dans la lignée CB3 est associée à l'absence d'expression des gènes de *globines alpha* et *beta* signant la différenciation érythrocytaire. La réexpression de p45 NF-E2 dans cette lignée induit l'expression de ces mêmes gènes. Ces résultats montrent que p45 NF-E2 est importante pour l'expression des gènes de globines et la différenciation érythrocytaire (Li et al., 2001; Lu et al., 1994).

D'autre part, l'infection de souris sensibles p45 NF-E2^{-/-} par le virus F-MuLV accélère le processus érythroleucémique par rapport à des souris sauvages. La réexpression de p45 NF-E2 dans des lignées dérivées de ces souris ralentit leur prolifération (Li et al., 2001). Ces résultats montrent que p45 NF-E2 est un régulateur négatif de la prolifération.

L'absence de p45 NF-E2 contribue à la pathogénicité du virus F-MuLV en permettant la prolifération des cellules érythroleucémiques au détriment de leur différenciation.

2-3 Intégration provirale au niveau du locus *fli-3*

Le groupe d'Y. Ben-David a mis en évidence un troisième site d'intégration du provirus F-MuLV au niveau du locus *fli-3* (Friend Leukemia Integration site 3), dans 50% de lignées érythroleucémiques de Friend p53 +/- n'exprimant pas *fli-1*.

Chez la souris, il est situé sur le chromosome 14. Ce locus présente une forte conservation de séquence, y compris dans les séquences flanquantes, avec son orthologue chez l'Homme. Ce locus, situé sur le chromosome 13q31 chez l'Homme, est décrit pour contenir un cluster de six miARN (miR-17, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b et miR-92a) appelé miR-17-92. Le groupe de Y. Ben-David a pu montrer que l'intégration du provirus F-MuLV au niveau du locus *fli-3* conduit à la surexpression de ce cluster de miARN (Cui et al., 2007).

Ce cluster est compris dans le troisième intron du transcrit non codant *C13orf25* dont le seul rôle connu est de produire ce cluster. Les contributions de ce cluster de miARN au

développement et aux maladies sont documentées dans la revue de J.T. Mendell (Mendell, 2008). Cette revue met en évidence le potentiel oncogénique du cluster miR-17-92. A titre d'exemple, L. He *et al.* ont montré que l'expression forcée de ce cluster dans les souris transgéniques E μ -myc (souris surexprimant *myc* sous le contrôle du promoteur de la chaîne μ des immunoglobulines) accélère le lymphome à cellules B induit par MYC (He et al., 2005).

Afin d'établir le rôle de *fli-3* dans le développement des érythroleucémies de Friend, J.W. Cui *et al.* ont surexprimé le cluster miR-17-92 entier ou le cluster tronqué contenant uniquement miR-92 dans la lignée HB60-5. Cette lignée prolifère en présence d'Epo et de SCF tandis qu'elle se différencie en présence d'Epo seule. La surexpression de miR-17-92 ou de miR-92 dans les cellules HB60-5 altère la réponse cellulaire à l'Epo et maintient une prolifération au détriment de leur différenciation. Toutefois, la prolifération et le blocage de la différenciation engendrés par miR-92 sont moins importants que pour le cluster entier. Ces résultats montrent que le cluster miR-17-92 est impliqué dans la prolifération et l'arrêt de différenciation des cellules érythroleucémiques et que miR-92 n'est pas le seul miARN actif de ce cluster (Cui et al., 2007).

3- Inactivation de p53

Les lignées érythroleucémiques Epo indépendantes dérivées de souris infectées par le virus F-MuLV présentent fréquemment des mutations au niveau du gène p53 pouvant être des mutations ponctuelles ou des délétions (Howard et al., 1993). Cette observation suggère que l'inactivation de p53 pourrait être impliquée dans le processus érythroleucémique.

Afin de tester cette hypothèse, le groupe de Y. Ben-David a comparé l'évolution de l'érythroleucémie après infection par le virus F-MuLV entre des souris BALB/c sauvages pour p53 et des souris BALB/c p53 *-/-*. Cette étude a permis de mettre en évidence un

développement plus rapide de la maladie chez les souris déficientes pour p53 (Wong et al., 1999).

L'inactivation de p53 est donc également un événement crucial pour le développement érythroleucémique induit par le virus F-MuLV.

En conclusion, le virus de Friend composé des rétrovirus SFFV et F-MuLV induit des érythroleucémies chez la souris en altérant la voie de signalisation dépendante du récepteur de l'Epo, en inactivant p53 par mutagenèse et enfin en activant ou en réprimant l'un ou l'autre d'un très petit nombre de régulateurs dont deux facteurs de transcription de la famille ETS, un facteur de transcription important pour la différenciation érythrocytaire et un cluster de miARNs.

III- Contributions des facteurs SPI-1 et FLI-1 à la transformation des érythroblastes

A) La famille ETS (Figure 7)

Les facteurs de transcription FLI-1 et SPI-1 appartiennent à un groupe de facteurs appelé famille ETS. Cette famille regroupe une trentaine de facteurs de transcription. Ces facteurs sont caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de 85 acides aminés appelé domaine ETS. Ce domaine a une conformation en hélice-tour-hélice présentant une forte homologie entre chaque membre de la famille, la plus faible étant de 35% entre les facteurs ETS-1 et SPI-1. Ces facteurs reconnaissent un motif consensus appelé site ETS et dont la séquence coeur est 5'- GGAA-3' (Wasylyk et al., 1993).

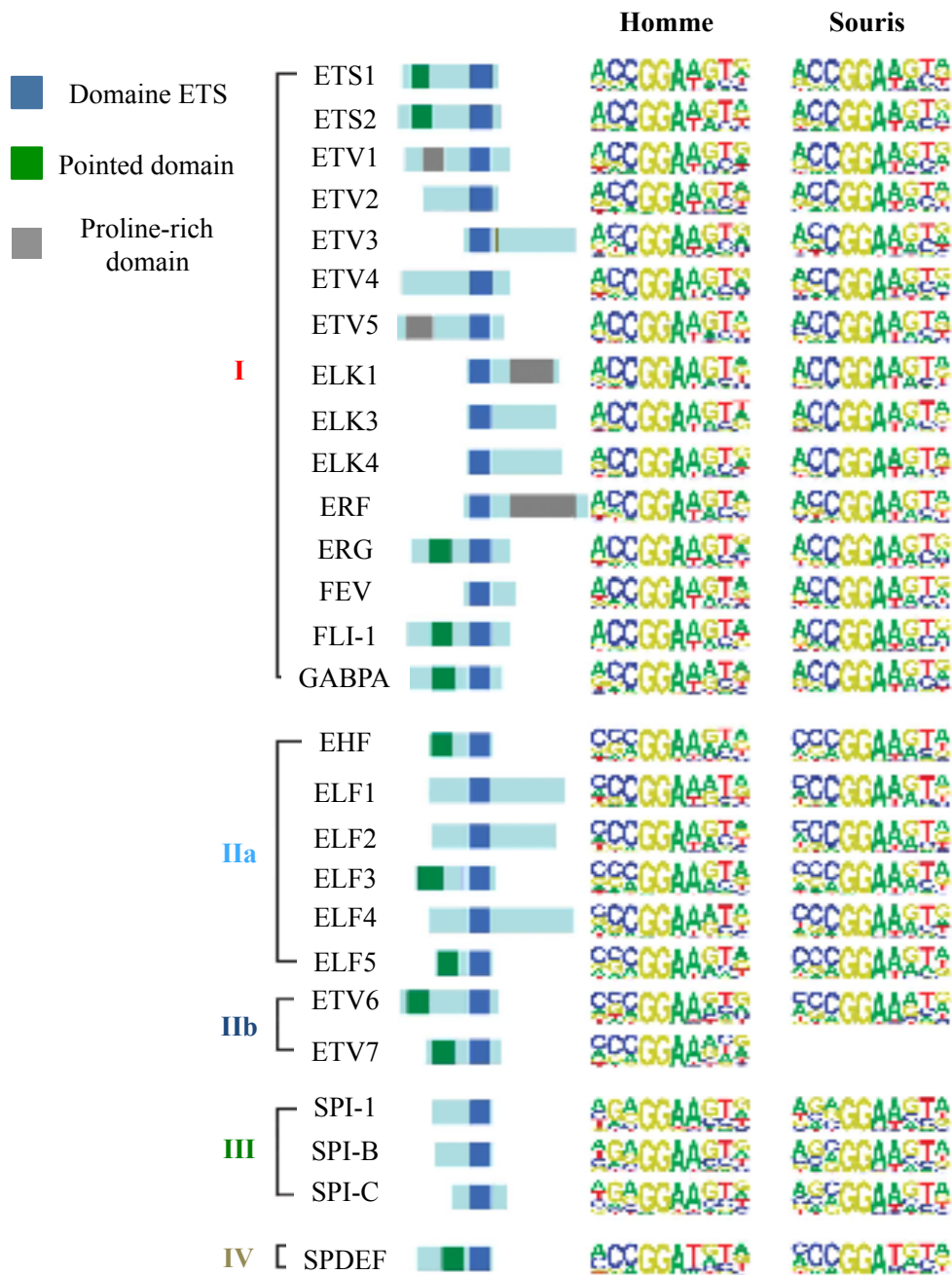


Figure 7 : Les facteurs de transcription de la famille ETS (d'après Wei *et al.*, 2010)

La famille ETS comprend 27 facteurs de transcription portant un domaine de liaison à l'ADN fortement homologue appelé domaine ETS (carré bleu). Ce domaine permet la reconnaissance d'un site cœur consensus GGAA/T.

La séquence environnant cette courte séquence est variable en fonction des facteurs permettant une sous-classification en quatre groupes (I, II (IIa et IIb), III et IV).

B) Contributions de FLI-1 et SPI-1 à la différenciation érythrocytaire normale

Les études démontrant un rôle des facteurs FLI-1 et SPI-1 dans l'hématopoïèse physiologique sont recensées dans les revues de R.P. De Koter et de A.H. Truong (DeKoter et al., 2007; Truong and Ben-David, 2000). Ainsi, les études référencées dans ces revues montrent une contribution de SPI-1 dans les différenciations monocyttaire macrophagique et lymphocytaire B tandis que les contributions de FLI-1 sont nécessaires à la mégacaryopoïèse et à la vasculogénèse. Cette partie traitera exclusivement des études détaillant les contributions de FLI-1 et de SPI-1 dans la différenciation érythrocytaire.

1- SPI-1 est nécessaire pour l'auto-renouvellement des progéniteurs érythroïdes

La contribution de SPI-1 dans la différenciation érythrocytaire a été appréhendée par des expériences de surexpression et d'inactivation chez la souris et chez le poulet. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les souris surexprimant *spi-1* développent des érythroleucémies similaires aux érythroleucémies de Friend (Moreau-Gachelin et al., 1996). De la même manière, la surexpression de *spi-1* maintient la prolifération et la survie des érythroblastes aviaires au détriment de leur différenciation induite par la voie de signalisation activée par Epo-EpoR. En revanche, en absence de EpoR fonctionnel, SPI-1 n'est plus capable de remplir ses fonctions (Quang et al., 1997) (Pereira et al., 2000). La phosphorylation de SPI-1 sur plusieurs résidus sérine est importante pour ses fonctions transcriptionnelles. L'inhibition de la voie PI3K/Akt induit comme le DMSO une reprise de la

différenciation des cellules MEL. La reprise de la différenciation est corrélée à la réduction du taux de protéine SPI-1 phosphorylée puis à une réduction du taux de protéine totale. Ces résultats montrent donc que SPI-1 est une cible de la voie PI3K/Akt qui est activée en réponse à l'Epo (Breig, 2010). Ces résultats indiquent donc que SPI-1 est activée en réponse à la voie de signalisation activée par Epo-EpoR et coopèrent avec cette voie pour assurer la prolifération et la survie des érythroblastes au détriment de leur différenciation.

Les groupes de H. Singh et R.A. Maki ont développé deux modèles de souris SPI-1^{-/-}. Ces deux modèles donnent des résultats contradictoires concernant la contribution de ce facteur à l'érythropoïèse. En effet, les souris du groupe de H. Singh présentent une anémie tandis que celle de R.A. Maki ne présentent aucun défaut érythropoïétique (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1997).

Des analyses *in vitro* ont été entreprises par le groupe de E.W. Scott afin de tester l'effet de l'absence de SPI-1 sur les progéniteurs érythrocytaires. Ils ont donc mis en culture des BFU-E de souris sauvages ou SPI-1^{-/-} en présence de cytokine favorisant leur amplification. Alors que les BFU-E sauvages s'amplifient dans ces conditions, les BFU-E SPI-1^{-/-} ne prolifèrent plus (Fisher et al., 2004). Afin d'établir plus précisément le rôle *in vivo* de SPI-1 dans l'érythropoïèse, le groupe de P. Kastner a développé un nouveau modèle de souris transgénique dans lesquelles l'ADNc de la protéine fluorescente GFP est intégré dans l'exon 1 de *spi-1*. Les souris portant l'allèle *spi-1*^{G/G} présentent un déficit en BFU-E et un excès en CFU-E. Les cellules de foie fœtal *spi-1*^{G/G} cultivées dans des conditions permettant l'amplification des progéniteurs érythrocytaires prolifèrent moins que les cellules *spi-1*^{+/+} et se différencient plus vite. De plus, la réexpression de *spi-1* dans ces cellules restaure une prolifération au détriment de leur différenciation (Back et al., 2004).

Ces résultats montrent que SPI-1 intervient dans l'auto-renouvellement des progéniteurs érythrocytaires et joue un rôle inhibiteur de leur différenciation. Cette contribution est

cohérente avec son expression dans les précurseurs érythrocytaires et son absence d'expression dans les stades plus tardifs de différenciation (Back et al., 2004; Hromas et al., 1993).

2- FLI-1 contribue à la prolifération des progéniteurs érythrocytaires au détriment de leur différenciation

Nous avons pu voir précédemment que la surexpression de *fli-1* dans les érythroblastes aviaires maintient leur prolifération et leur survie et bloque leur différenciation induite par l'Epo (Pereira et al., 1999). Cependant, contrairement aux souris transgéniques surexprimant *spi-1*, les souris surexprimant *fli-1* à partir du promoteur H2^k (promoteur de gène d'histocompatibilité) ne développent pas d'érythroleucémies. Elles développent une maladie rénale causée par l'infiltration de lymphocytes T auto-réactifs résistants à l'apoptose (Zhang et al., 1995). Néanmoins, l'absence de phénotype érythrocytaire pourrait s'expliquer par une expression plus faible de *fli-1* dans ces souris que celle observée par exemple dans les cellules érythroleucémiques de Friend. En effet, le niveau de surexpression de *fli-1* atteint dans ces souris n'excède pas deux fois le niveau de la protéine endogène.

L'invalidation de *fli-1* chez la souris conduit à une très forte diminution des progéniteurs érythrocytaires dans la moelle osseuse (Spyropoulos et al., 2000). Cependant, ces souris présentent également des hémorragies rendant difficile l'interprétation de cette diminution. L'analyse de la population issue de la région AGM (Aorta-Gonad-Mesonephros) de souris *fli-1*^{-/-} à E10 montre que les érythroblastes polychromatophiles et orthochromatiques sont présents en nombre plus important que les proérythroblastes et les érythroblastes basophiles, signant une différenciation accélérée. De plus, la population AGM des souris *fli-1*^{-/-} est composée d'un plus grand nombre d'érythrocytes que les souris sauvages (Kawada et al.,

2001). Le groupe de F. Morlé a développé un modèle d'inactivation conditionnelle de *fli-1* chez la souris afin d'établir le rôle de FLI-1 dans l'hématopoïèse adulte. Parmi les effets observés, nous pouvons noter une augmentation du nombre de BFU-E et de CFU-E expliquée par une augmentation du nombre de MEP et par une probabilité d'engagement du MEP vers la lignée érythrocytaire plus importante. En revanche, les colonies formées par ces progéniteurs sont plus petites après inactivation de *fli-1*. Les auteurs ont mis en culture les MEP sauvages et délétés pour FLI-1 pendant 7 jours et ont mesuré la prolifération et le pourcentage de cellules TER119 positives. L'amplification des MEP délétés est environ deux fois moins importante que celle des MEP sauvages indiquant une réduction de la prolifération. De plus, des analyses complémentaires ont mis également en évidence une accélération de la différenciation des érythrocytes dans les souris FLI-1^{-/-} (Starck et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats démontre que FLI-1 favorise la prolifération des progéniteurs érythrocytaires au détriment de leur différenciation.

L'ensemble des études présentées dans cette partie met en évidence des contributions similaires de SPI-1 et de FLI-1 dans l'érythropoïèse.

C) Mécanismes mis en jeu par FLI-1 et SPI-1 dans la transformation du lignage érythrocytaire

Comme mentionné dans la partie précédente, la production constitutive des facteurs FLI-1 et SPI-1 est un événement récurrent des érythroleucémies de Friend. Cette partie tentera de dresser le bilan des mécanismes actuellement connus pour contribuer aux effets de ces deux facteurs de transcription (**Tableau 1**).

A

	PARTENAIRES PROTÉIQUES
SPI-1	GATA-1 (Rekthman et al., 1999) (Rekthmna et al., 2003) (Stopka et al., 2005) TLS - P54^{nrb} (Hallier et al., 1996) (Hallier et al., 1998) (Delva et al., 2004) p53 – p73 (Tschang et al., 2008)
FLI-1	EKLF - GATA-1 (Starck et al., 2003) SMAD3 (Ravasi et al., 2010)

B

	GÈNES CIBLES ACTIVÉS	GÈNES CIBLES RÉPRIMÉS
SPI-1	FLI-1 (Starck et al., 1999) CDK6 (Matushanki et al., 2003) (Choé et al., 2010)	Gènes cibles de GATA-1 (Rekthman et al., 1999) (Rekthman et al., 2003) (Stopka et al., 2005)
FLI-1	BCL-2 (Lesault et al., 2002) MDM-2 (Truong et al., 2005) SLAP (Lebigot et al., 2003)	Gènes cibles d'EKLF? (Starck et al., 2003) Rb (Tamir et al., 1999) SHIP-1 (Lakhantal et al., 2010)

Tableau 1: Partenaires et gènes cibles de FLI-1 et SPI-1 contribuant aux fonctions de SPI-1 et FLI-1 dans la transformation du lignage érythrocytaire

B : Les gènes écrits en caractères gras correspondent des gènes dont la régulation par FLI-1 ou SPI-1 est associée au recrutement du facteur ETS (montré par ChIP ou EMSA). Les gènes écrits en caractère normal correspondent à des gènes dont le recrutement de SPI-1 ou de FLI-1 sur les promoteurs n'a pas été documenté.

1- Mécanismes impliqués dans les contributions de SPI-1 à la transformation des érythroblastes

1-1 Partenaires protéiques de SPI-1

Antagonisme fonctionnel entre SPI-1 et GATA-1

Comme nous avons pu le voir, SPI-1 participe au blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend. Dans le but de déterminer les mécanismes par lesquels SPI-1 bloque la différenciation des cellules érythrocytaires, le groupe d'A.I. Skoultschi a cherché des interactions possibles entre SPI-1 et des facteurs de transcription érythrocytaires présents dans les cellules MEL tels que EKLF et GATA-1 ou des cofacteurs de transcription comme FOG-1. Par des expériences de « GST- pull down » et de coimmunoprécipitation dans les cellules MEL, ce groupe a pu montrer une interaction directe entre SPI-1 et GATA-1. Cette interaction nécessite le domaine à doigt de zinc de GATA-1 et les domaines de liaison à l'ADN et de transactivation de SPI-1 et conduit à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 (Rekhtman et al., 1999).

Réciproquement, C. Nerlov *et al.* ont montré que GATA-1 est également capable de réprimer les fonctions transcriptionnelles de SPI-1 (Nerlov et al., 2000). De manière intéressante, la surexpression d'une protéine GATA-1 fusionnée au domaine de liaison au ligand du récepteur aux androgènes induit la différenciation des cellules MEL en présence d'oestradiol et atténue la tumorigénicité de ces mêmes cellules (Choe et al., 2003). Ces résultats suggèrent l'existence d'un antagonisme fonctionnel entre GATA-1 et SPI-1 qui conditionnerait le choix entre prolifération et différenciation des érythroblastes.

Afin de mieux comprendre comment SPI-1 inhibe les fonctions transcriptionnelles de GATA-1, le groupe d'A.I. Skoultschi a mené des expériences d'immunoprécipitation de la

chromatine (ChIP) dans les cellules humaines U2OS en présence ou en absence de SPI-1 et de GATA-1. Ces expériences ont permis de montrer que SPI-1 est recruté au niveau des promoteurs cibles de GATA-1 via son interaction avec ce dernier. D'autre part, ils ont pu montrer une interaction entre SPI-1 et pRb dans les cellules MEL. Un mutant SPI-1 incapable d'interagir avec cette protéine est incapable de réprimer GATA-1 et de bloquer la différenciation de ces cellules (Rekhtman et al., 2003). Ces données suggèrent la formation d'un complexe GATA-1-SPI-1-pRB qui réprime l'expression des gènes cibles directs de GATA-1 et conduit au blocage de la différenciation.

De nouvelles expériences de ChIP menées par le même groupe dans les cellules MEL ont permis de montrer que la présence de SPI-1 et de pRb au niveau de ces régions est associée à une méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) marquant un état répressif de la chromatine. Les auteurs ont pu mettre en évidence le co-recrutement de l'Histone méthyltransferase Suv39h décrite pour interagir avec pRB et de la protéine HP1 α . L'induction de la différenciation de ces cellules par la surexpression d'une protéine GATA-1 fonctionnelle ou par le DMSO ou encore par la répression de *spi-1* par interférence par l'ARN est associée à la perte du recrutement du complexe SPI-1-pRB-Suv39h-HP1 α sur les sites GATA-1 tandis que GATA-1 est toujours présent sur ces régions. L'absence de ce complexe répressif s'accompagne d'un échange d'histones avec l'intégration du variant d'histone H3.3 et l'acétylation de H3K9 signant un état permissif de la chromatine. L'histone acétyl transférase CBP, connue pour interagir avec GATA-1, est également recrutée au niveau des sites GATA-1 (Stopka et al., 2005).

SPI-1 crée donc une structure chromatiniennne répressive conduisant à la répression des gènes cibles de GATA-1 et au blocage de la différenciation des cellules MEL (**Figure 8**).

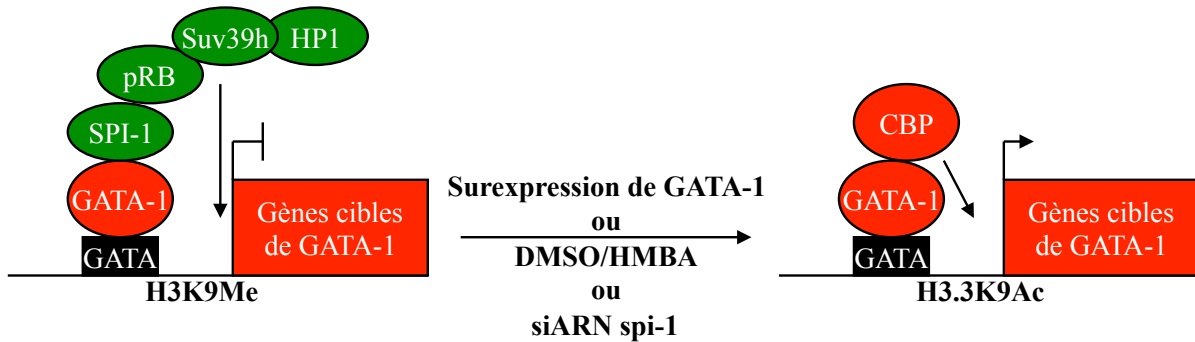


Figure 8 : Mécanismes moléculaires conduisant au blocage de la différenciation des cellules MEL par SPI-1 (d'après Stopka, 2005)

Dans les cellules MEL non différenciées (partie gauche), SPI-1 est recruté au niveau des sites GATA via GATA-1 et co-recrute les protéines pRb, Suv39h et HP1 conduisant à la méthylation de H3K9. Cette structure chromatinienne fermée réprime l'expression des gènes cibles de GATA-1 et contribue au blocage la différenciation des cellule MEL.

L'inversion de la stœchiométrie relative des facteurs GATA-1 et SPI-1 soit par la surexpression de GATA-1, soit par des drogues chimiques comme le DMSO ou l'HMBA ou encore par la répression de *spi-1* par siARN induit la différenciation des cellules MEL (partie droite). Cette différenciation s'accompagne de l'intégration de l'histone H3.3 et le recrutement de CBP conduisant à l'acétylation de H3K9. Cette structure chromatinienne ouverte permet la réexpression des gènes cibles de GATA-1.

Interaction avec des facteurs d'épissage

Des expériences de « GST-pull down » et de coimmunoprécipitations ont également mis en évidence une interaction entre SPI-1 et les facteurs d'épissage TLS et p54^{nrb}. Ces deux facteurs sont capables de lier l'ARN et favoriser la sélection du site 5' d'épissage le plus

distal des ARNm. L'interaction avec SPI-1 empêche la fonction de TLS sur un minigène E1A et réprime également l'épissage d'un minigène de globine beta contenant ses deux premiers exons séparés par un intron (Hallier et al., 1998; Hallier et al., 1996). L'analyse fonctionnelle de mutants de SPI-1 dépourvus de différents domaines a permis de mettre en évidence que cet effet négatif de SPI-1 sur l'activité de TLS est dépendante de son domaine de liaison à l'ADN et de son domaine de transactivation (Delva et al., 2004). D'autre part, l'analyse de l'épissage du minigène E1A placé sous le contrôle d'un promoteur répondant ou non à SPI-1 a permis de montrer que l'activité de liaison à l'ADN de SPI-1 est nécessaire pour cette fonction de SPI-1 (Guillouf et al., 2006). Pris ensemble, ces résultats montrent l'importance du domaine de liaison à l'ADN dans les effets de SPI-1 sur l'épissage.

La réduction du taux de protéine SPI-1 induite par le DMSO est corrélée à l'inclusion de l'exon 16 du gène codant la protéine 4.1R. Cet événement est également observé au cours de la différenciation érythrocytaire normale. L'exon 16 code une partie du domaine de liaison à l'actine et à la spectrine permettant l'ancrage de la protéine 4.1R à la membrane du globule rouge. La surexpression de *spi-1* dans les lignées SFFV et F-MuLV réduit significativement l'inclusion de cet exon. A l'inverse, la répression de *spi-1* par siARN augmente cette inclusion (Blaybel et al., 2008; Theoleyre et al., 2004). Ces résultats montrent que SPI-1 contrôle l'épissage de l'exon 16 du gène *4.1R*.

SPI-1 pourrait donc contribuer au blocage de la différenciation érythrocytaire en régulant des événements d'épissage.

Interaction avec les membres de la famille p53

Des expériences de co-immunoprécipitations menées dans les cellules leucémiques REH ont montré une interaction entre SPI-1 et les facteurs de transcription p53 et p73. La répression de *spi-1* par shARN conduit à une augmentation du taux de transcrits ciblés par ces

deux facteurs comme p21 ou encore Bax. Ces résultats suggèrent que SPI-1 pourrait inhiber les activités transcriptionnelles de p53 et p73 (Tschan et al., 2008).

Cette étude menée dans un contexte non érythroleucémique suggère qu'une des contributions de SPI-1 à la résistance à l'apoptose et à l'arrêt de prolifération pourrait être d'inhiber les fonctions transcriptionnelles de ces deux facteurs de transcription. Des études menées dans les cellules MEL doivent être entreprises pour pouvoir tester cette hypothèse.

1-2 Identification de gènes cibles de SPI-1 impliqués dans ses contributions

Une des hypothèses expliquant la contribution de SPI-1 au phénotype leucémique est que ce facteur dérégulerait l'expression de gènes impliqués dans ce processus. Plusieurs études ont été réalisées afin d'identifier ces gènes. Cette partie traitera de certains gènes dont la contribution dans les effets de SPI-1 dans la prolifération et le blocage de la différenciation des érythroblastes a été montrée.

SPI-1 est un activateur transcriptionnel du gène *fli-1*

Le groupe de F. Morlé a mis en évidence que toutes les lignées dérivées de souris infectées par le virus de Friend et exprimant *spi-1* expriment également le gène *fli-1*. Le traitement par l'HMBA de la lignée 745A, qui conduit à la répression de *spi-1*, conduit également à une réduction du taux de protéine et de transcrits FLI-1. Ces résultats suggèrent que SPI-1 pourrait réguler positivement l'expression du gène *fli-1*. En accord avec cette hypothèse, les cellules érythroleucémiques DS19 surexprimant *spi-1* ont un taux de protéine et de transcrits FLI-1 plus important que celui des cellules DS19 contrôles, y compris en présence d'HMBA. Afin de déterminer si cette régulation de FLI-1 par SPI-1 est la

conséquence du recrutement de SPI-1 sur le promoteur de *fli-1*, les auteurs ont réalisé des expériences d'EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) en utilisant des sondes s'hybridant avec les sites ETS conservés identifiés par le même groupe au niveau du promoteur -270/-41 de *fli-1*. Ces expériences ont permis de montrer *in vitro* le recrutement de SPI-1 au niveau du promoteur du gène *fli-1* (Starck et al., 1999).

Ces résultats montrent donc que SPI-1 est un activateur transcriptionnel direct du gène *fli-1*. Basé sur le fait que la surexpression de *fli-1* dans les cellules 745A inhibe la différenciation induite par l'HMBA (Starck et al., 1999), l'activation de FLI-1 semble être un autre mécanisme par lequel SPI-1 contribue au blocage de la différenciation des cellules MEL. Les contributions de FLI-1 dans le contrôle de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend seront détaillées dans le paragraphe B-2.

SPI-1 active l'expression de *cdk6*

L'induction de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend par le DMSO s'accompagne d'un arrêt de la prolifération. Afin de déterminer les mécanismes qui peuvent expliquer cet arrêt, I. Matushanky *et al.* ont analysé l'expression de kinases dépendantes des cyclines impliquées dans le cycle cellulaire, en particulier CDK2, CDK4 et CDK6. Le traitement au DMSO des cellules MEL entraîne une diminution tardive du taux des protéines CDK2 et CDK4, diminution pouvant être liée à l'activation des inhibiteurs de CDK. En revanche, le taux de protéine et le taux d'ARNm CDK6 diminuent très précocement suite à ce traitement suggérant que la répression de *cdk6* pourrait jouer un rôle dans l'arrêt de prolifération induit par le DMSO. Afin de tester cette hypothèse, les auteurs ont surexprimé une version étiquetée de la protéine CDK6 humaine insensible à l'action des inhibiteurs de CDK. La surexpression de cette protéine de fusion réduit de manière significative la proportion de cellules hémoglobinisées. Ces résultats suggèrent que l'arrêt de prolifération

provoqué par le DMSO est dépendant de la répression de CDK6. Ces résultats montrent également une corrélation entre la diminution de l'expression de *spi-1* et la diminution de celle de *cdk6*. Afin d'établir un lien entre SPI-1 et CDK6, le groupe d'A.I. Skoultchi a surexprimé une protéine SPI-1 fusionnée au domaine de liaison au ligand du récepteur à l'œstrogène. L'activation de cette protéine par l'oestradiol maintient le niveau de protéine et de transcrits CDK6 en présence de DMSO indiquant donc que CDK6 est une cible de SPI-1 (Matushansky et al., 2003). Des analyses de CHIP avec un anticorps anti-SPI-1 à partir de chromatine extraites de cellules MEL ont permis de mettre en évidence le recrutement de SPI-1 sur le promoteur de CDK6 (Choe et al., 2010).

Ces résultats suggèrent donc que SPI-1 pourrait contribuer à la prolifération des cellules érythroleucémiques de Friend en activant directement l'expression de *cdk6*, kinase importante pour le passage des cellules de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire.

1-3 Lien entre SPI-1 et la réplication

Des données récentes du groupe de C. Guillouf et F. Moreau-Gachelin mettent en évidence que la répression de l'expression de *spi-1* dans les proérythroblastes dérivés des souris transgéniques SPI-1 allonge la durée de la phase S du cycle cellulaire. Des analyses complémentaires menées dans ces mêmes cellules et dans la lignée leucémique humaine K562 ont permis de montrer que SPI-1 accélère la progression de la fourche de réplication sans causer de dommages à l'ADN. En revanche, cette accélération augmente la mutabilité de l'ADN (Rimmelé et al., 2010). Ces données mettent donc en évidence une nouvelle fonction oncogénique de SPI-1 qui est de favoriser une instabilité génétique caractéristique des cellules cancéreuses. En revanche, les mécanismes par lesquels SPI-1 contribue à l'accélération de la réplication dans les proérythroblastes ne sont pas encore connus.

Pour résumer, ces résultats mettent en avant une contribution de SPI-1 au blocage de la différenciation, à la prolifération et à la survie cellulaire en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans ces processus, en modulant l'activité de certains partenaires protéiques et en favorisant une instabilité génétique.

2- Mécanismes impliqués dans les contributions de FLI-1 à la transformation de la lignée érythrocytaire

2-1 Partenaires protéiques de FLI-1

Antagonisme fonctionnel entre les facteurs FLI-1 et EKLF (Figure 9)

Comme indiqué précédemment, la surexpression de FLI-1 bloque la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend induite par l'HMBA. En accord avec ces résultats, FLI-1 atténue l'augmentation de la fluorescence GFP induite par l'HMBA lorsque le gène codant la GFP est placé sous le contrôle de la LCR des gènes de globines beta montrant donc que FLI-1 réprime l'expression de marqueurs de la différenciation érythrocytaire. Afin de déterminer comment FLI-1 contribue au blocage de la différenciation des cellules MEL, le groupe de F. Morlé a cherché à identifier des partenaires de FLI-1 en focalisant leur étude sur deux facteurs de transcription connus pour réguler l'expression de la *Globine beta*, GATA-1 et EKLF. Des expériences de « GST-pull-down » et de co-immunoprécipitations ont permis de mettre en évidence l'interaction de FLI-1 avec ces deux facteurs. Les auteurs ont alors entrepris des expériences de gènes rapporteurs afin de tester l'implication de ces interactions sur les activités transcriptionnelles de GATA-1 et d'EKLF. Contrairement à ce que les auteurs

attendaient, la coexpression de GATA-1 et de FLI-1 augmente significativement l'activité luciférase placée sous le contrôle d'éléments de réponse de GATA-1. En revanche, la coexpression de FLI-1 et EKLF atténue l'expression de la luciférase induite par EKLF lorsqu'elle est placée sous le contrôle d'éléments de réponse de EKLF. Réciproquement,

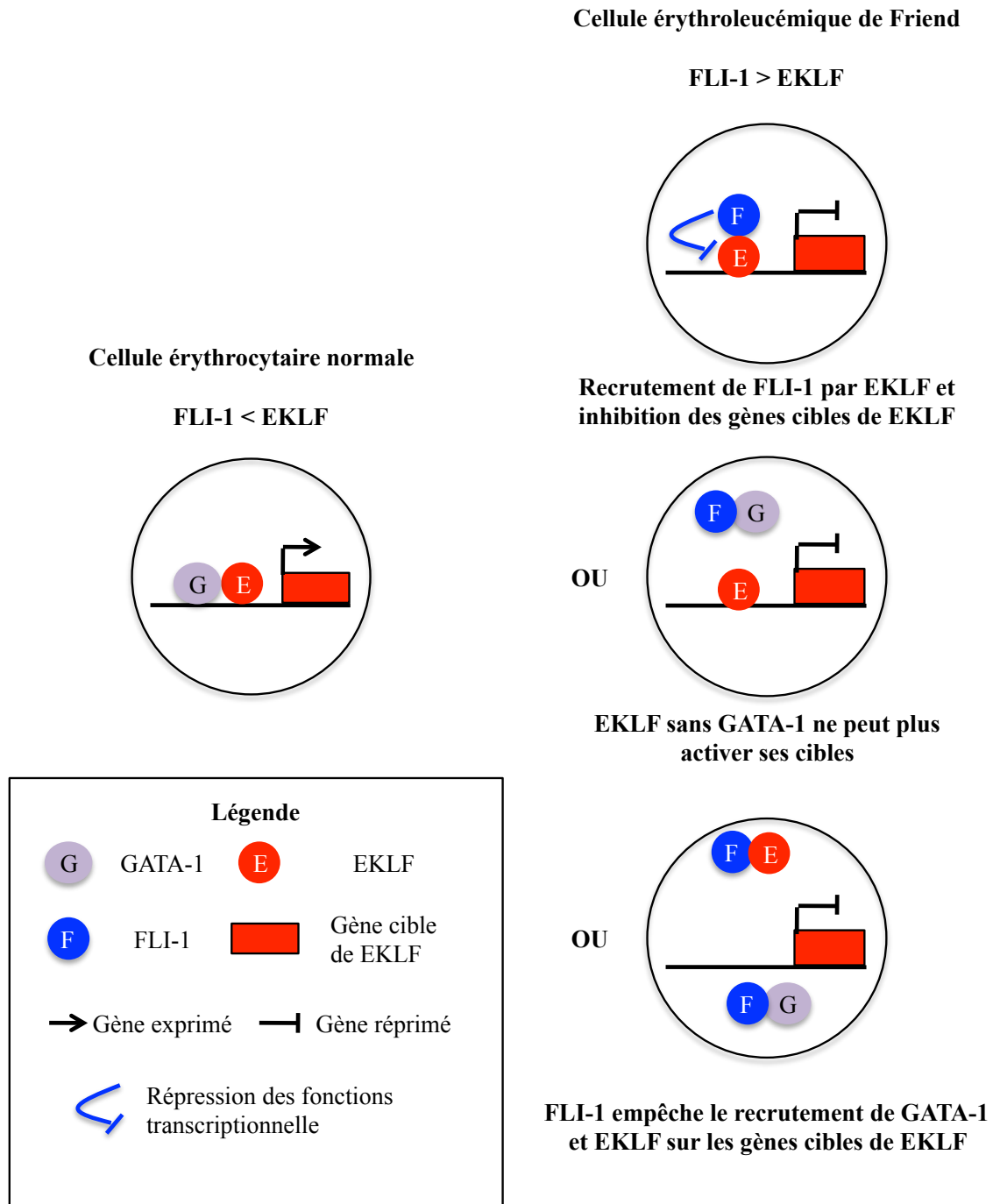


Figure 9 : Antagonisme fonctionnel entre FLI-1 et EKLF

EKLF réprime l'activation de la luciférase par FLI-1 quand celle-ci est contrôlée par un promoteur répondant à ce facteur. Ces résultats montrent l'existence d'un antagonisme fonctionnel entre FLI-1 et EKLF (Starck et al., 2003).

EKLF est un facteur de transcription de la famille KLF. L'inactivation d'EKLF chez la souris a permis de montrer sa contribution à la différenciation érythrocytaire (Coghill, 2001 ; Hodge, 2006). En particulier, les études menées par les groupes de F. Morlé et J. Bieker ont permis de montrer qu'EKLF favorise l'engagement du progéniteur bipotent MEP vers la lignée érythrocytaire (Bouilloux et al., 2008; Frontelo et al., 2007). L'antagonisme fonctionnel entre FLI-1 et EKLF est retrouvé au niveau du contrôle de la fourche de différenciation érythro-mégacaryocytaire. Ainsi, les groupe de F. Morlé et J. Bieker ont pu montrer que la contribution d'EKLF passe au moins en partie par la répression des gènes mégacaryocytaires, en particulier par la répression de l'expression de *fli-1* (Bouilloux et al., 2008; Frontelo et al., 2007). De plus, l'augmentation du taux de transcrit des gènes mégacaryocytaires, *fli-1* compris, est associée à un recrutement plus important de FLI-1 sur le promoteur de ses gènes cibles ainsi qu'à une augmentation du recrutement de GATA-1 sur le promoteur d'au moins un des gènes cibles de FLI-1 (Bouilloux et al., 2008).

Les mécanismes mis en jeu par FLI-1 pour réprimer réciproquement les gènes cibles de EKLF demeurent très mal compris. Le modèle proposé par J. Starck *et al.* selon lequel FLI-1 réprime les gènes cibles de EKLF par son recrutement indirect sur leur promoteur nécessite encore des expériences de CHIP pour être confirmé. S'appuyant sur les derniers résultats cités, une autre possibilité pourrait être un détournement de GATA-1 sur les gènes cibles de FLI-1 contribuant à l'activation de leur expression. Une autre possibilité pourrait être que FLI-1 empêche la fixation de GATA-1 et d'EKLF sur les promoteurs cibles de ce dernier contribuant à la répression de l'expression des gènes cibles d'EKLF. Des mécanismes plus indirects ne sont pas à exclure.

2-2 Identification de gènes cibles de FLI-1

Le facteur FLI-1 régule l'expression de gènes qui sont impliqués dans différents processus. Des études ont permis d'identifier certains gènes cibles susceptibles d'expliquer les contributions de FLI-1 à la transformation de la lignée érythrocytaire.

FLI-1 interfère avec la voie de signalisation Epo/EpoR

FLI-1 bloque la différenciation des érythroblastes aviaires induite par l'Epo. Afin de déterminer les mécanismes mis en jeu par FLI-1 dans cette contribution, le groupe de J. Ghysdael a cherché à identifier des gènes dérégulés par la présence de FLI-1 par la stratégie de RDA (Representational Difference Analysis) en comparant les ADNc issus d'érythroblastes contrôles ou surexprimant FLI-1. Cette stratégie a permis de mettre en évidence une surreprésentation d'ARNm d'un gène homologue au gène SLAP (Src-Like Adaptor Protein) murin dans la librairie FLI-1. La protéine codée par ce gène est un adaptateur possédant des domaines SH2 (Src Homology domain 2) et SH3 (Src Homology domain 3) lui permettant des interactions avec des phosphotyrosines et des domaines riches en proline. Afin d'identifier la contribution de SLAP dans la différenciation induite par l'EpoR, les auteurs ont surexprimé SLAP à un niveau équivalent à celui retrouvé dans les érythroblastes surexprimant *fli-1*. Alors que cette surexpression n'a pas d'effet dans les cellules non traitées par l'Epo, les cellules surexprimant SLAP ont perdu leur capacité à se différencier en présence d'Epo. Le blocage de la différenciation de ces érythroblastes est corrélé à une réduction du niveau de phosphorylation de la protéine STAT5 induite par la présence de l'Epo. Ces résultats montrent donc que la surexpression de SLAP réprime la

différenciation des érythroblastes aviaires et altère la voie de signalisation induite par l'Epo (Lebigot et al., 2003).

Ces résultats suggèrent qu'une des contributions de FLI-1 au blocage de la différenciation des érythroblastes aviaires pourrait être d'altérer les voies de signalisation induite par l'EpoR via l'activation du gène SLAP. En revanche, l'identification de *slap* en tant que cible directe de FLI-1 reste à démontrer.

Répression de l'expression du gène *pRb*

La lignée HB60 est une lignée érythroleucémique de Friend présentant une intégration provirale du virus SFFV en amont du gène *spi-1* et qui exprime *fli-1*. La prolifération de cette lignée est dépendante de l'Epo et du SCF. La présence d'Epo seule dans le milieu de culture induit leur différenciation. Cette différenciation est associée à la diminution de l'expression de *fli-1*. L'expression forcée de *fli-1* dans ces cellules maintient leur prolifération en réponse à l'Epo. Afin d'identifier les mécanismes contribuant à cet effet de FLI-1, Tamir *et al.* ont cherché des gènes pouvant être régulés par FLI-1. Parmi ces gènes, les auteurs se sont intéressés à la protéine pRb (Retinoblastoma protein) dont l'inactivation chez la souris provoque une érythropoïèse défectueuse (Maandag et al., 1994). Le promoteur du gène *Rb* contient une séquence reconnue par FLI-1. Des expériences d'EMSA et de CHIP ont mis en évidence le recrutement de FLI-1 sur cette région. Des tests de gènes rapporteurs ont permis de mettre en évidence que le recrutement de FLI-1 sur cette région réprime son activité promotrice. De plus, les cellules 3T3 surexprimant *fli-1* ont un taux de protéine pRB plus faible que celui des cellules contrôles. FLI-1 régule donc négativement et directement l'expression du gène codant la protéine pRB. La surexpression de *pRB* dans les cellules Saos-2 surexprimant *fli-1* induit une diminution du nombre de colonies en milieu semi-solide (Tamir et al., 1999).

Ces résultats suggèrent qu'une des contributions de FLI-1 à la prolifération des érythroblastes pourrait être de réprimer directement l'expression du gène pRB décrit pour son action anti-proliférative.

FLI-1 active l'expression de *mdm-2*

L'inactivation de p53 est un événement récurrent de la pathologie de Friend. Ce facteur est essentiellement régulé au niveau protéique, en particulier au niveau de la stabilité de sa protéine par l'ubiquitine ligase MDM-2.

L'analyse du promoteur de MDM-2 révèle deux sites de fixation pour les facteurs ETS, dont un est une séquence reconnue par FLI-1. Des expériences de CHIP et d'EMSA à partir de cellules exprimant *fli-1* ont permis de montrer la fixation de FLI-1 au niveau de la région contenant ces deux sites ETS. L'expression de la luciférase placée sous le contrôle de cette région est activée par l'expression de FLI-1, activation perdue après mutation des deux sites ETS. De plus, la surexpression de FLI-1 dans les cellules HB60-5 augmente le taux de protéine MDM-2 et la diminution consécutive du taux de protéine p53 (Truong et al., 2005).

L'activation de MDM-2 et la répression consécutive de p53 pourraient contribuer aux fonctions de FLI-1 dans la prolifération et dans le maintien de la survie des érythroblastes.

FLI-1 réprime l'expression de *ship-1*

SHIP-1 (SH2 domain-containing inositol-5-phosphatase-1) est une phosphatase qui déphosphoryle notamment les kinases PI3K/Akt et MAPK. L'invalidation de SHIP-1 chez la souris induit une augmentation du pool de progéniteurs érythrocytaires (Harder et al., 2004). La progression tumorale induite par l'infection des souris SHIP-1^{-/-} avec le virus F-MuLV est plus rapide que chez des souris sauvages. Ces résultats montrent que la perte de SHIP-1 est importante pour le processus érythroleucémique. L'analyse comparée du profil d'expression

de *fli-1* et de *ship-1* dans différentes lignées montre une corrélation inverse entre ces deux protéines. L'analyse du promoteur du gène *ship-1* révèle la présence de sites ETS. Des expériences de CHIP montrent que FLI-1 est recrutée sur ce promoteur. L'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de cette région est réprimée par des doses croissantes de FLI-1. Cette répression est perdue lorsque le site ETS est muté. Ces résultats démontrent que le recrutement de FLI-1 sur le promoteur de *ship-1* est associé à la répression de son expression.

Afin de déterminer la contribution de cette répression dans la lignée érythroleucémique HB60-5, la répression de *ship-1* par interférence par l'ARN a été entreprise. Celle-ci a révélé que l'absence de SHIP-1 permet le maintien de la prolifération au détriment de la différenciation de ces cellules induite par l'Epo (Lakhanpal et al., 2010).

Ces résultats démontrent que FLI-1 pourrait contribuer à la prolifération ainsi qu'au blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques en réprimant l'expression de *ship-1*.

FLI-1 régule l'expression du gène *bcl-2*

Afin de déterminer les mécanismes mis en jeu par FLI-1 dans le maintien de la survie (Pereira et al., 1999), le groupe de J. Ghysdael s'est intéressé à la protéine anti-apoptotique *bcl-2*. Le dosage du transcrit *bcl-2* par RT-PCR montre un taux plus important de *bcl-2* dans les érythroblastes surexprimant *fli-1* que celui des érythroblastes contrôles suggérant que FLI-1 active l'expression de *bcl-2*. L'analyse du promoteur du gène montre la présence de sites de reconnaissance de FLI-1. Des expériences de CHIP suivies d'une analyse par PCR non quantitative avec un couple d'oligonucléotides amplifiant le promoteur avec les sites ETS montre un faible signal suggérant que FLI-1 pourrait être recrutée *in vivo* sur le promoteur de *bcl-2*.

L'inhibition de BCL-2 par la Me-Antimycin induit l'apoptose des érythroblastes surexprimant FLI-1. Au contraire, l'expression forcée de *bcl-2* dans les érythroblastes n'exprimant pas *fli-1* et en absence d'Epo maintient leur survie comme l'expression forcée de *fli-1*.

De plus, les auteurs ont montré une corrélation entre le niveau d'expression de *fli-1* et celui de *bcl-2* dans les lignées érythroleucémiques de Friend. Ainsi, le niveau d'expression de *bcl-2* dans les cellules F-MuLV est plus important que dans celui des lignées SFFV suivant ainsi parfaitement le pattern d'expression de *fli-1* (Lesault et al., 2002). Ces résultats suggèrent que l'activation de *bcl-2* pourrait contribuer aux fonctions de FLI-1 dans le maintien de la survie des clones érythroleucémiques de Friend.

En conclusion, FLI-1 participe à la transformation de la lignée érythrocytaire en activant ou en réprimant directement l'expression de certains gènes et/ou en modulant l'activité transcriptionnelle de ses partenaires protéiques.

D) Gènes cibles communes à FLI-1 et à SPI-1 ?

1- Classification de la famille ETS en quatre sous-groupes (Figure 7)

Les membres de la famille ETS reconnaissent tous un motif cœur consensus dont la séquence est GGAA avec une affinité plus ou moins grande selon les nucléotides flanquants qui varient d'un facteur à l'autre. Afin d'évaluer le degré de spécificité de fixation, le groupe de J. Taipale a réalisé deux types d'expériences *in vitro*. La technique « microwell-based assay » consiste brièvement à mettre dans un micropuits le domaine de liaison à l'ADN du facteur ETS d'intérêt fusionné à la *Renilla luciférase* et un oligonucléotide contenant la

séquence de forte affinité pour tous les facteurs ETS connus en présence d'un excès d'oligonucléotide présentant des mutations. L'activité du gène rapporteur est mesurée et est inversement proportionnelle à l'affinité du domaine de liaison à l'ADN pour l'oligonucléotide muté. L'autre technique utilisée dans cette étude est la technique de « protein-binding microarrays ». Elle permet de déterminer la fixation d'un facteur de transcription sur des oligomères de 10 nucléotides de séquence aléatoire placés sur une puce à ADN contenant toutes les combinaisons. Ces deux techniques qui sont couramment utilisées en contrôle de l'autre ont permis de classer la famille ETS en quatre sous-familles en fonction de la séquence environnant le site consensus GGAA (Wei et al., 2010) (**Figure 7**). L'analyse des séquences des régions enrichies après la technique de ChIP-Seq a permis de confirmer *in vivo* les séquences déterminées *in vitro* pour certains de ces facteurs.

Selon cette classification, FLI-1 et SPI-1 appartiennent à deux sous-groupes différents.

2- Certains membres de la famille ETS régulent des gènes cibles communs

Indépendamment de ces approches *in vitro*, le groupe de B.J. Graves a réalisé l'inventaire des sites de recrutement de trois facteurs de la famille ETS, GABP α , ETS-1 et ELF-1 par la technique de ChIP on chip dans la lignée cellulaire Jurkat. Cette analyse a révélé l'existence de promoteurs recrutant spécifiquement l'un ou l'autre de ces facteurs ainsi que des régions de recrutement communes à ces trois protéines (Hollenhorst et al., 2007).

Le séquençage à haut débit de fragments de chromatine issus de ChIP d'autres facteurs ETS, à savoir ERG, SPI-1, SPDEF, ELF1 ainsi que pour les protéines de fusion impliquant FLI-1 (EWS/FLI-1) et ERG (EWS/ERG) a également été réalisé par le groupe de J. Taipale. Cette technique, appelé ChIP-Seq permet d'inventorier l'ensemble des sites de recrutement d'un facteur de transcription sur l'ensemble du génome. En revanche, contrairement au ChIP on chip utilisé par le groupe de B.J. Graves, le ChIP-Seq n'est pas limité aux promoteurs. Ces

analyses ont permis de montrer que ces facteurs partagent également des sites de recrutement communs. De façon intéressante, le positionnement des sites de recrutement des facteurs ETS par rapport au +1 de la transcription montre que les sites communs à des facteurs ETS de deux sous-classes différentes sont préférentiellement localisés au niveau de séquences promotrices (Wei et al., 2010).

Enfin, le groupe d'A.D. Sharrocks a également mis en évidence des gènes cibles directs communs à ELK-1 et SAP-1 dans la lignée EcR293 (Boros et al., 2009).

L'ensemble de ces résultats met en évidence que les membres de la famille des facteurs ETS peuvent être recrutés sur les mêmes régions et potentiellement réguler les mêmes gènes cibles.

L'étude de Wei a mis en évidence des régions communes de recrutement pour FLI-1 et SPI- 1 suggérant que ces deux facteurs pourraient réguler des mêmes gènes cibles.

IV- LA BIOGENESE DES RIBOSOMES

Les protéines constituent plus de 80 % de la masse sèche d'une cellule. Afin d'assurer la fonction et l'intégrité de la cellule, la synthèse des protéines doit être finement régulée.

La synthèse protéique, appelée traduction, s'effectue dans le cytoplasme à partir d'ARNm. Elle fait intervenir des facteurs de traduction, des ARNm, des ARNt et les ribosomes.

Les ribosomes sont constitués de deux sous-unités, la grande (60S) et la petite (40S) sous-unités. Les ribosomes contiennent des protéines et quatre ARNr différents. La grande sous-unité comprend 48 protéines ribosomiques (RPL) et les ARNr 5S, 5,8S et 28S. La petite sous-unité comprend 33 protéines ribosomiques (RPS) et l'ARNr 18S. L'activité catalytique des ribosomes est portée par ces ARN.

Cette partie de mon introduction traitera de la biogenèse des ribosomes dans les conditions physiologiques ainsi que des pathologies liées à des perturbations de cette biogenèse.

A) Localisation et étapes de la biogenèse des ribosomes

1- Le nucléole

La biogenèse des ribosomes se déroule dans le nucléole (Stoykova et al., 1985). Le nucléole est un corps nucléaire composé de trois régions qui sont du centre vers la périphérie le centre fibrillaire (FC), la zone fibrillaire dense (DFC) et la zone granulaire (GC) (Scheer and Hock, 1999). Ces différentes régions sont le siège de différentes étapes de la biogenèse des ribosomes. Ainsi, le groupe de F. Watchler a montré que la transcription des ARNr se déroule à la frontière entre le centre fibrillaire et la zone fibrillaire dense (Mosgoeller et al., 1998). La zone granulaire est constituée des ribosomes en cours d'assemblage. Ces différentes étapes de cette biogenèse seront plus détaillées par la suite (cf. paragraphe 2 de cette partie).

Des analyses protéomiques ont été entreprises par différents groupes pour lister les protéines contenues dans le nucléole. Elles ont permis de montrer que 35 % des protéines nucléolaires sont effectivement connues pour être impliquées dans la biogenèse des ribosomes. En revanche, ces analyses ont également montré la présence d'autres protéines impliquées dans d'autres processus et ayant d'autres localisations connues (Andersen et al., 2005; Andersen et al., 2002; Scherl et al., 2002). Ces résultats suggèrent que le nucléole constitue une région multifonctionnelle du noyau. D'autre part, 90 % des protéines

nucléolaires chez la levure ont un homologue chez l'Homme soulignant une haute conservation fonctionnelle du nucléole au cours de l'évolution (Andersen et al., 2002).

2- De la synthèse des ARNr à la formation des ribosomes matures (**Figure 10**)

La biogenèse des ribosomes fait intervenir les trois ARN polymérases. L'ARN polymérase I transcrit les ARNr 28S, 18S et 5,8S. L'ARN polymérase II permet la production des ARNm codant les protéines ribosomiques, des facteurs nécessaires pour cette biogenèse et la majorité des snoARNs. Enfin, l'ARN polymérase III assure la synthèse de l'ARNr 5S.

Ce processus a fait l'objet de plusieurs revues dont celle de M. Fromont-Racine (Fromont-Racine et al., 2003). Cette partie tentera de présenter les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes de façon synthétique.

2-1 Synthèse des ARNr

Synthèse de l'ARNr précurseur 45S

Les ARNr matures 28S, 18S et 5,8S sont codés par des clusters de gènes organisés en tandem sur les chromosomes formant les NOR (Nucleolus Organizer Region) dans les nucléoles. Actuellement, il est dénombré environ 400 gènes organisés en plusieurs dizaines de tandems sur les paires de chromosomes acrocentriques 13, 14, 15, 21 et 22 chez l'Homme. La transcription de ces clusters de gènes est assurée par l'ARN polymérase I qui fonctionne avec des complexes protéiques faisant intervenir principalement les facteurs UBF (Upstream Binding Factor) et SL1 (Selectivity Factor). L'ARNr synthétisé est l'ARNr précurseur 47S qui est rapidement clivé pour former l'ARNr 45S. Ce précurseur contient dans l'ordre la

séquence ETS1 (External Transcribed Sequence), la séquence codant l'ARNr 18S, la séquence ITS1 (Internal Transcribed Sequence), la séquence codant l'ARNr 5,8S, la séquence ITS2, la séquence codant l'ARNr 28S et enfin la séquence ETS2 (Raska et al., 2004) (Figure 11).

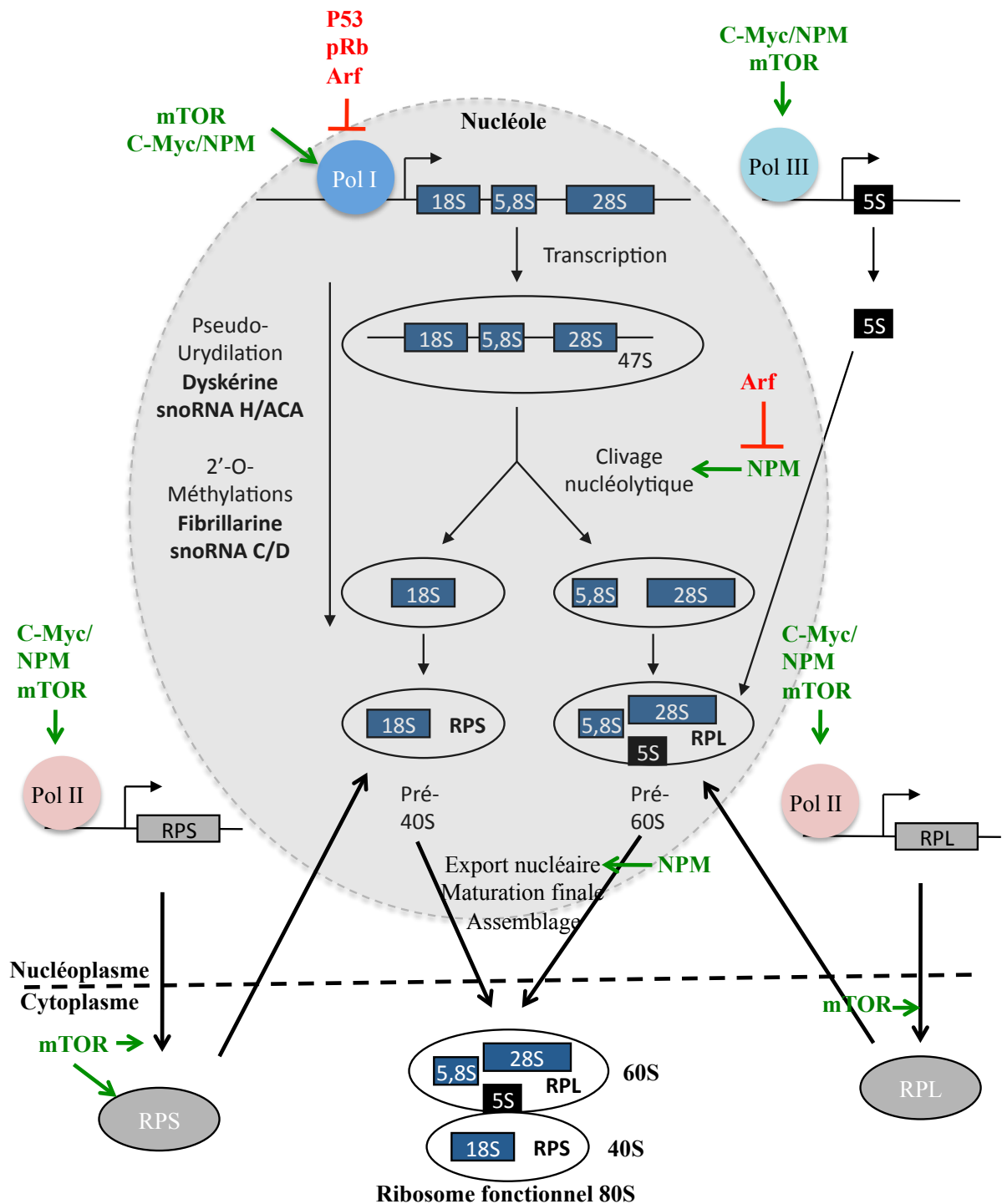


Figure 10 : Représentation schématique de la biogenèse des ribosomes et de ses régulateurs

En vert, les oncogènes activateurs de la biogenèse des ribosomes.
 En rouge, les antioncogènes répresseurs de la biogenèse des ribosomes.
 RPL = Protéines ribosomiques de la grande sous-unité
 RPS = Protéines ribosomiques de la petite sous-unité.

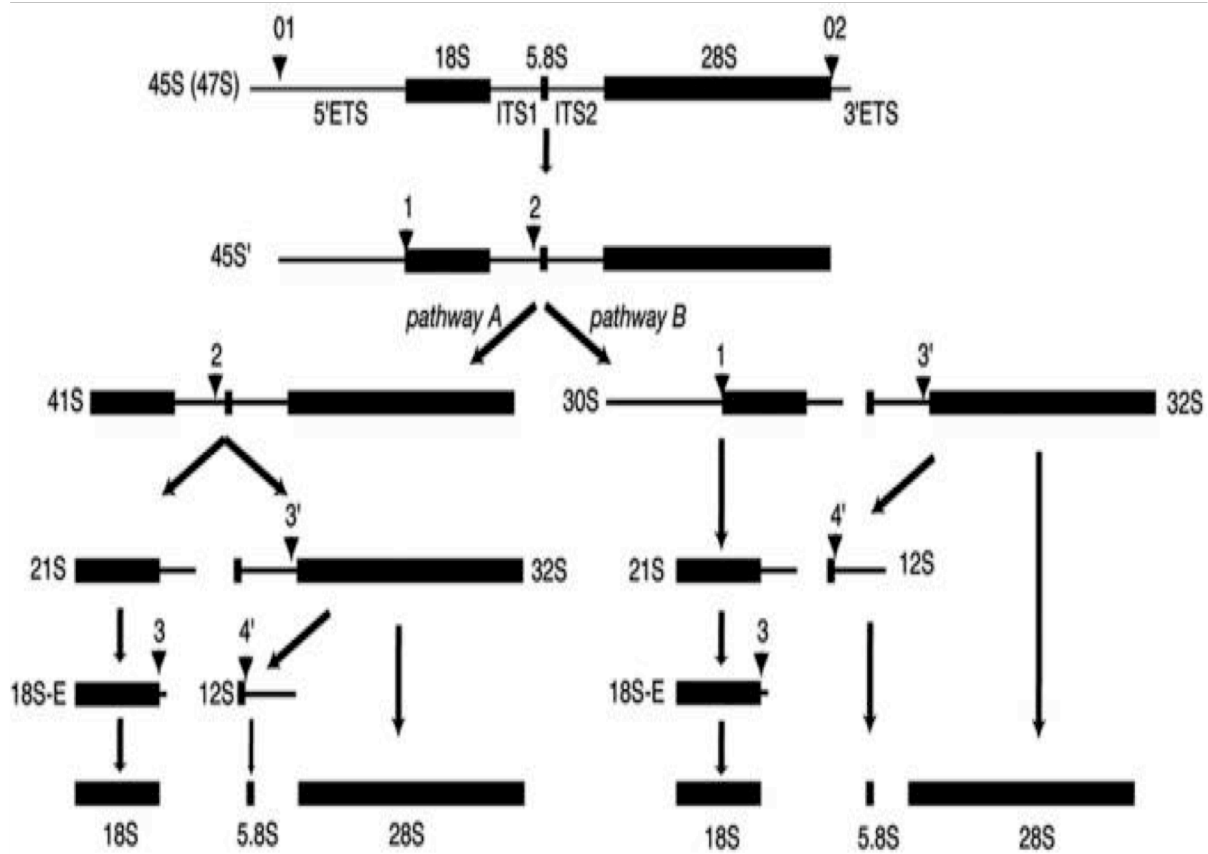


Figure 11 : Les deux voies de maturation des ARNr (d'après Schoemel, 2007)

Transcription du gène codant l'ARNr 5S

L'ARNr 5S n'est pas transcrit à partir du cluster de gènes codant les autres ARNr. On retrouve ce gène sur plusieurs chromosomes chez l'Homme. Le plus gros clusters est localisé sur le chromosome 1 et comprend entre 100 et 150 répétitions en tandem. Le reste des gènes codant cet ARNr est organisé en un petit cluster de 5 à 10 répétitions et de 200 à 300 gènes répartis dans le génome. L'unité de base correspond à une séquence de 120 pb hautement conservée au cours de l'évolution et à une région non transcrite de longueur variable selon les espèces (Long and Dawid, 1980). La synthèse de cet ARNr est assurée par l'ARN polymérase III. Contrairement aux autres ARNr, la synthèse de cet ARNr ne se déroule pas dans le nucléole, il est importé après synthèse dans ce corps nucléaire.

2-2 Maturation des ARNr

Clivage de l'ARNr 45S (Figure 11)

L'ARNr 45S subit une série de clivages aboutissant à la formation des ARNr matures 28S, 18S et 5,8S. Deux voies de clivages de l'ARNr 45S aboutissant à la formation des mêmes ARNr ont été décrites dans les cellules HeLa par le groupe de J.P. Bachellerie (Hadjiolova et al., 1993). Elles ont été appelées voies A et B. Les mécanismes assurant le choix entre ces deux voies sont très peu connus.

Ce processus de clivage requiert des activités exo et endonucléasiques et fait intervenir une multitude de facteurs tels que des enzymes de modifications post-transcriptionnelles, les protéines ribosomiques ou encore des snoARNs (Kressler et al., 2010).

Modifications post-transcriptionnelles des ARNr

Les précurseurs des ARNr sont soumis à des modifications post-transcriptionnelles de deux types : la méthylation de bases sur leur groupe 2'hydroxyl (2'-O-methylation) et la conversion de résidus uridines en pseudouridines. Chez l'Homme, il est dénombré 91 sites de pseudouridylation et 106 sites de 2'-O-methylation. Ces modifications sont co-transcriptionnelles. Nous pouvons retrouver les différents sites de modifications sur le site internet du laboratoire du Dr. Fournier : http://www-snoARN.biotoul.fr/human_yeast/.

Ces modifications post-transcriptionnelles sont assurées par des snoRNPs (Small nucleolar RiboNucleoproteins Particles). Deux familles de snoRNP existent en fonction de la nature du snoARN. La famille C/D contient un snoARN (Small nucleolar ARN) contenant deux boîtes C et D et quatre protéines dont la fibrillarine (Lafontaine and Tollervey, 2000). Cette famille de snoRNP assure les méthylations des ARNr grâce à la fibrillarine qui porte l'activité méthyl transférase. La deuxième famille est la famille H/ACA. Elle contient un

snoARN contenant deux boîtes H et ACA conservées ainsi que quatre protéines dont la dyskérine. Cette famille assure les pseudouridylation grâce à la dyskérine (Hamma and Ferre-D'Amare, 2010). Dans ces deux familles, le snoARN assure le guidage des particules snoRNP. Le site internet, dont l'adresse est <http://evolveathome.com/snoARN/snoARN.php>, référencie les snoARNs ainsi que leurs séquences cibles connues sur les ARNr 18S et 28S.

Les souris présentant une invalidation pour la dyskérine montrent des défauts dans la maturation des ARNr avec notamment la réduction du taux de certains précurseurs des ARNr (Ge et al., 2010). Ces résultats suggèrent que les modifications post-transcriptionnelles des ARNr sont importantes pour leur maturation.

Des études recensées dans la revue de B.G. Lane *et al.* montrent une localisation préférentielle de ces modifications au niveau ou proche des sites catalytiques des ARNr (Lane, 1995). Ces observations suggèrent donc que ces modifications pourraient moduler l'activité du ribosome.

2-3 Les protéines ribosomiques

Les protéines ribosomiques constituent l'autre composant majoritaire des ribosomes. 78 protéines ribosomiques sont produites dans le cytoplasme et ensuite importées dans le nucléole pour s'associer aux ARNr (Warner, 1999). Ce transport fait intervenir l'importine β (Rout et al., 1997). Les protéines ribosomiques jouent un rôle de chaperonnes au cours de l'assemblage des ribosomes et stabilisent également certains domaines des ARNr comme le domaine peptidyl transférase de la grande sous-unité (Ruggero and Pandolfi, 2003).

Hormis leurs fonctions intrinsèques aux ribosomes, certaines protéines ribosomiques possèdent des fonctions extra-ribosomiques qui sont recensées dans les revues de J.R. Warner, de K.B. Mc Intosh (Warner and McIntosh, 2009) et de M.S. Lindström (Lindstrom,

2009) (**Tableau 2**). Nous pouvons classer ces fonctions en deux catégories : celles intervenant dans la biogenèse des ribosomes et celles qui sont complètement dissociées de la fonction du ribosome.

Fonctions extraribosomiques	Protéine ribosomique spécifique (espèce)
Réplication de l'ADN	RPS1, RPL14 (<i>E. Coli</i>)
Régulation transcriptionnelle	RPS10 (<i>E. Coli</i>) RPS20 (Levure)
Régulation de sa propre traduction	RPS4, RPS7, RPS8, RPL4, RPL1, RPL10 (<i>E. Coli</i>) RPS30 (Levure) RPS14, RPS26, RPL7, RPL13A, RPL26 (Homme)
Modifications et épissage de l'ARN	RPS12 (<i>E. Coli</i>) RPS12, RPL26 (Homme)
Activation de l'ADN topoisomérase	RPL41 (Homme)
Réparation de l'ADN	RPS9 (<i>E. Coli</i>) <i>RPS3 (Drosophila Melanogaster)</i> RPS3, RPLP0 (Homme)
Régulation du développement	RPS2, RPS6, RPL19 (<i>Drosophila Melanogaster</i>) RPS15A (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>) RPS18 (<i>Arabidopsis Thaliana</i>) RPS19 (<i>Ascaris lumbricoïde</i>) RPS4X, RPS4Y1 (Homme)
Régulation de la prolifération et de la croissance cellulaires	RPS2, RPS6, RPS13, RPL7, RPL18, RPS27A, RPL31 (Homme)
Régulation de l'apoptose	RPS3, RPS3A, RPS20, RPL35A, RPL7, RPL7A, RPL13A (Homme)
Suppresseur de tumeur	RPS29, RPL5, RPL11, RPL23 (Homme)
Proto-oncogènes	RPL7A (Homme)
Transformation cellulaire	RPL5, RPS27A, RPL31 (Homme)
Progression tumorale, invasion, métastase, différenciation	RPS19, RPLP0, RPL31 (Homme)
Divers	RPS15A (<i>X. Laevi</i>) RPL32 (Souris) RPLP2, RPL5 (Rat) RPL22 (Homme)

Tableau 2 : Fonctions extra-ribosomiques connues des protéines ribosomiques (d'après Lai, 2007)

Les protéines ribosomiques peuvent intervenir à différents niveaux de la biogenèse des ribosomes. Ainsi, certaines protéines ont été décrites pour intervenir dans la transcription par l'ARN polymérase III (Dieci et al., 2009). D'autres protéines ribosomiques interviennent dans la maturation de l'ARNr. A titre d'exemple, les groupes de N.Dahl et de P.E. Gleizes ont montré l'implication de la protéine RPS19 dans la maturation de l'ARNr 18S (Badhai et al., 2009; Choismel et al., 2007). De manière plus générale, la répression de 32 des 33 protéines ribosomiques de la petite sous-unité a permis au groupe de P.E. Gleizes de montrer une dichotomie fonctionnelle des protéines ribosomiques de la sous-unité 40S dans la formation de cette sous-unité. Certaines de ces protéines sont strictement impliquées dans l'initiation de la maturation de l'ARNr 18S alors que les autres sont impliquées dans la progression de la maturation nucléaire et cytoplasmique de cet ARNr ainsi que dans l'export nucléaire de la particule pré-40S (O'Donohue et al., 2010).

D'autres fonctions indépendantes du ribosome ont été décrites pour les protéines ribosomiques. M.S. Dai *et al.* ont montré l'interaction entre la protéine ribosomique RPL11 et le facteur de transcription c-Myc. Cette interaction conduit à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de ce facteur (Dai et al., 2007). Le groupe de F.J. Slack a mis en évidence une fonction de RPS14 dans la maturation du miARN *let-7* chez *C.Elegans*. RPS14 pourrait donc jouer un rôle dans le contrôle de la traduction des ARNm par la modulation de la maturation des miARN (Chan and Slack, 2009).

2-3 Export nucléaire des particules pré-60S et pré-40S et maturations finales

Les protéines ribosomiques s'associent aux ARNr pour former les particules pré-60S et pré-40S dans le nucléole. Ces particules sont ensuite exportées dans le cytoplasme où elles

subissent de nouvelles étapes de maturation pour donner naissance aux deux sous-unités matures du ribosome 60S et 40S. Ces dernières s'associent pour former le ribosome fonctionnel 80S.

L'export nucléaire des particules pré-ribosomiques est un transport actif faisant intervenir différents facteurs. A titre d'exemple, la protéine ribosomique RPS15 est nécessaire à l'export de la particule pré-40S (Rouquette et al., 2005) et le complexe RanGTP à celui de la particule pré-60S (Gleizes et al., 2001; Hurt et al., 1999). D'autres facteurs intervenant dans ce transport sont documentés dans la revue de I. Zemp et U. Kutay (Zemp and Kutay, 2007).

Dans le cytoplasme, les particules pré-ribosomiques subissent de nouvelles étapes de maturation avant de générer le ribosome fonctionnel. Par exemple, le groupe de P.E. Gleizes a mis en évidence un nouveau précurseur de l'ARNr 18S, l'ARNr 18S-E. Ce dernier est détecté dans le noyau et dans le cytoplasme. Ces résultats montrent que l'ARNr 18S subit une dernière étape de clivage dans le cytoplasme contrairement aux ARNr de la particule pré-60S qui arrive complètement à maturation dans le noyau (Rouquette et al., 2005). Une fois toutes les étapes de maturation des pré-ribosomes achevées, toutes les protéines associées aux ribosomes et nécessaires pour l'export et les maturations finales sont décrochées de ces particules. Les deux sous-unités peuvent ainsi s'associer pour assurer la traduction des ARNm.

B) Régulation de la biogenèse des ribosomes

1- Régulation physiologique de la biogenèse des ribosomes

Les ARNr constituent la composante limitante de la biogenèse des ribosomes. Un équilibre existe entre la production des protéines ribosomiques et celle des ARNr. La

régulation des protéines ribosomiques chez la levure est traitée dans deux anciennes revues de J.R. Warner (Warner, 1989; Warner et al., 1986). Pour conserver une équimolarité entre protéines ribosomiques et ARNr, la transcription, l'épissage, la traduction ou encore la stabilité des protéines ribosomiques sont contrôlés. Chez les eucaryotes supérieurs, les protéines ribosomiques sont synthétisées en excès afin de permettre à la cellule de répondre plus rapidement à un besoin accru en ribosomes. Les protéines ribosomiques qui ne s'associent pas aux ribosomes sont rapidement dégradées, leur demie-vie étant de 30 à 40 minutes chez les mammifères (Warner, 1989).

Les protéines ribosomiques sont la cible de modifications post-traductionnelles qui vont réguler leur stabilité et leur fonction. Ainsi, le groupe de R.T. Hay a mis en évidence la neddylation de 36 protéines ribosomiques. La neddylation correspond à l'ajout de la protéine NEDD8 sur des résidus lysine. La protéine MDM-2 est une des enzymes qui assure cette neddylation (Sundqvist et al., 2009). La neddylation des protéines ribosomiques favorise leur stabilisation (Xirodimas et al., 2008). Afin de mieux comprendre la fonction de la neddylation de ces protéines, le groupe de D.P. Xirodimas a étudié la neddylation de la protéine ribosomique RPL11. Leur étude a permis de montrer que la neddylation contrôle non seulement la stabilité de RPL11, mais également sa localisation subcellulaire ainsi que ses fonctions (Sundqvist et al., 2009). D'autres modifications ont été décrites pour les protéines ribosomiques comme la phosphorylation de la protéine RPS6 (Ruvinsky and Meyuhas, 2006) et la méthylation des protéines RPL3 et RPL12 (Polevoda and Sherman, 2007) qui régulent également la fonction de ces protéines.

2- Régulation de la biogenèse des ribosomes par les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs

De manière intéressante, il apparaît que les oncogènes et les protéines suppresseurs de tumeurs régulent la biogenèse des ribosomes à différents niveaux. Cette partie traitera des protéines régulant la biogenèse des ribosomes les plus décrites dans la littérature.

2-1 Le facteur de transcription c-Myc: régulateur général de la biogenèse des ribosomes

Ce facteur de transcription est un membre de la famille Myc qui comprend deux autres facteurs de transcription, N-Myc et L-Myc. Ces trois facteurs reconnaissent un motif consensus appelé boîte E dont la séquence consensus est CACGTG (Alex et al., 1992). La surexpression de c-Myc a été observée dans de nombreux types de cancers dont la liste est répertoriée dans la revue d'A. Albiñ et al. (Albiñ et al., 2010). Au cours du développement, le facteur c-Myc intervient dans le contrôle de la taille et de la synthèse protéique des lymphocytes B (Iritani and Eisenman, 1999) suggérant un rôle de ce facteur dans le contrôle de la biogenèse des ribosomes. Cette contribution a largement été étudiée et le lien existant entre c-Myc, biogenèse des ribosomes et cancer est l'objet de revues complètes (Dai and Lu, 2008; Ruggero and Pandolfi, 2003) (van Riggelen et al., 2010).

Plusieurs études ont montré le recrutement de c-Myc sur les promoteurs des ADNr ainsi que son association avec des cofacteurs de l'ARN polymérase I. Cette association contribue à stimuler la transcription des ADNr (Arabi et al., 2005) (Grandori et al., 2005).

c-Myc est un facteur de transcription classique et par conséquent régule également l'activité de l'ARN polymérase II. Des analyses de transcriptome ont permis de montrer que c-Myc régule l'expression de gènes importants pour la biogenèse des ribosomes. Ainsi, parmi les gènes identifiés, nous pouvons citer la protéine NPM (Nucléophosmine) qui comme nous le verrons dans le paragraphe suivant est importante pour la maturation des ARNr. C-Myc

régule également l'expression de plusieurs protéines ribosomiques comme RPL11 (Menssen and Hermeking, 2002).

Enfin, l'absence de c-Myc dans les fibroblastes est associée à une réduction de la transcription par l'ARN polymérase III. Des analyses de ChIP ont également montré le recrutement de c-Myc sur le promoteur de l'ADNr 5S conduisant à la stimulation de son expression (Gomez-Roman et al., 2003). Ces résultats indiquent donc que c-Myc active également la transcription dépendante de l'ARN polymérase III.

Ces données montrent donc que l'oncogène c-Myc régule la biogenèse des ribosomes à trois niveaux : la synthèse des ARNr 28S, 18S et 5,8S par l'intermédiaire de son rôle de cofacteur de l'ARN polymérase I, la maturation de ces ARNr par la régulation de la transcription de gènes impliqués dans ce processus par l'ARN polymérase II et enfin, la synthèse de l'ADNr 5S par sa fonction stimulatrice de l'ARN polymérase III.

2-2 La nucléophosmine ou NPM

La nucléophosmine, également appelée NPM, B23 ou encore numatrine, est une protéine principalement nucléolaire mais qui peut également être retrouvée dans le cytoplasme. La surexpression de *npm* a été observée dans certains cancers comme ceux de la prostate ou des ovaires (Grisendi et al., 2006).

Le groupe de M.O. Olson a montré *in vitro* que NPM possède une activité endoribonucléase qui lui permet de cliver spécifiquement l'ADNr 45S au niveau de la séquence ITS2 (Herrera et al., 1995; Savkur and Olson, 1998), mais également dans la maturation de l'ADNr 28S plus précisément (Itahana et al., 2003). L'ensemble de ces données montre un rôle de NPM dans la maturation des ARNr.

Des expériences de co-immunoprécipitations menées dans des MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) ont mis en évidence une interaction entre c-Myc et NPM. Cette interaction conduit à la stimulation de l'activité transcriptionnelle de c-Myc (Li et al., 2008). Ces résultats indiquent également qu'en plus de sa fonction dans la maturation des ARNr, NPM joue également un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes de biogenèse des ribosomes via sa coopération avec c-Myc.

Enfin, la répression de NPM dans les cellules NIH 3T3 est associée à la séquestration de la protéine RPL5 dans le noyau signant un défaut d'export de la particule pré-60S (Yu et al., 2006). NPM est donc également impliquée dans l'export nucléaire des pré-ribosomes.

Nous pouvons conclure de ces données que NPM intervient également à 3 niveaux de la biogenèse des ribosomes : la maturation des ARNr par l'intermédiaire de son activité endoribonucléase, la synthèse des ARNr grâce à son interaction avec c-Myc et enfin, l'export nucléaire de la grande sous-unité du ribosome.

2-3 La protéine p19/p14^{Arf} : un régulateur négatif de la biogenèse des ribosomes

La protéine Arf (p19 chez la souris, p14 chez l'Homme) est un membre de la famille INK4a décrite pour contrôler la progression au cours de la phase G1 du cycle cellulaire. La réduction de l'expression d'Arf a fréquemment été observée dans de nombreux cancers comme les cancers du sein ou de la prostate. Elle a été impliquée dans une voie de signalisation appelée stress oncogénique. En réponse à l'expression d'un oncogène, la protéine Arf est induite et conduit à l'activation de la protéine p53 via la répression de l'ubiquitine ligase MDM-2 (Stott et al., 1998; Zindy et al., 1998). Toutefois, l'absence de p53 et de MDM-2 n'empêche pas les effets d'Arf sur la progression du cycle cellulaire suggérant

des fonctions indépendantes de p53 (Weber et al., 2000). Les différentes contributions d'Arf et son lien avec le cancer ont été documentés dans la revue de P. Ozenne (Ozenne et al., 2010).

L'étude de la localisation subcellulaire d'Arf a mis en évidence que cette protéine a une localisation nucléolaire (Zhang and Xiong, 1999). L'inactivation d'Arf chez la souris entraîne une augmentation de la synthèse protéique et du nombre de nucléoles indiquant une contribution de cette protéine dans le contrôle de la biogenèse des ribosomes (Apicelli et al., 2008).

Des expériences de surexpression d'*arf* ont été entreprises afin de déterminer sa contribution dans ce processus. Ces expériences ont montré un rôle négatif d'Arf dans la maturation des ARNr qui serait au moins partiellement dépendant de la déstabilisation de la protéine NPM (Sugimoto et al., 2003) (Itahana et al., 2003).

Des analyses de CHIP ont mis en évidence le recrutement d'Arf sur les promoteurs des gènes d'ADNr suggérant qu'Arf pourrait également contrôler la transcription des ARNr (Ayrault et al., 2004). Une étude récente a montré qu'Arf s'associe avec des facteurs de transcription de l'ARN polymérase I et réprime son activité transcriptionnelle (Lessard et al., 2010).

L'ensemble de ces données démontre que les fonctions antitumorales d'Arf sont associées aux fonctions répressives de cette protéine à deux niveaux de la biogenèse des ribosomes: la transcription et la maturation des ARNr.

2-4 Le facteur p53

Le facteur de transcription p53 est décrit comme une protéine suppresseur de tumeur dont la mutation est un événement récurrent dans la progression tumorale. La réexpression de p53 dans les cellules MCO1 p53^{-/-} entraîne une diminution du taux de transcrits 45S. Cette

diminution est la conséquence d'une action inhibitrice sur la transcription dépendante de l'ARN polymérase I. Des expériences de « GST-pull down » ont mis en évidence une interaction entre p53 et le complexe SL1 empêchant ainsi son interaction avec le facteur UBF nécessaire à l'activité de l'ARN polymérase I (Budde and Grummt, 1999; Zhai and Comai, 2000).

La surexpression de p53 conduit également à une réduction de l'expression des transcrits répétés *Alu* qui est dépendante de l'ARN polymérase III montrant que p53 peut réprimer la transcription dépendante de cette ARN polymérase qui transcrit également de la synthèse de l'ARNr 5S. Cependant, cette action inhibitrice ne conduit pas à la répression de la transcription du gène 5S (Chesnokov et al., 1996).

Ces résultats ont contribué à montrer que la protéine suppresseur de tumeur p53 réprime la biogenèse des ribosomes via la répression de l'activité de l'ARN polymérase I.

2-5 La voie mTOR

mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est une sérine thréonine kinase inhibée par la rapamycine. Elle fait partie de la voie appelée mTOR qui est induite après un signal de croissance. Cette voie comprend des kinases dont la surexpression ou la répression est observée dans des cas de cancers. Cette voie et ses fonctions sont détaillées dans la revue d'A.S. Strimpakos (Strimpakos et al., 2009).

La fonction de la voie mTOR dans la biogenèse des ribosomes a fait l'objet d'une revue par Mayer et Grummt (Mayer and Grummt, 2006). Elle intervient à plusieurs niveaux de la biogenèse des ribosomes. L'inhibition la voie mTOR par la rapamycine dans les cellules HeLa induit une diminution du taux de transcrits 45S. Cette réduction est corrigée par la surexpression de mTOR. De façon étonnante, des analyses de CHIP ont mis en évidence le

recrutement de la kinase mTOR directement sur les promoteurs des gènes codant les ARNr 45S et 5S (Mayer et al., 2004; Tsang et al., 2010). Ces résultats indiquent donc une régulation de la transcription des ARNr par cette voie.

Différentes études ont également mis en évidence le contrôle de l'expression des gènes codant les protéines ribosomiques d'une part en stimulant l'activité de l'ARN polymérase II et d'autre part en favorisant la traduction de leur ARNm. De plus, parmi les kinases de la voie mTOR, nous pouvons mentionner la protéine S6K (RPS6 kinase) qui induit la phosphorylation de la protéine ribosomique RPS6 qui intervient notamment dans le contrôle de la taille et dans l'homéostasie du glucose (Mayer and Grummt, 2006; Reiter et al., 2004) (Ruvinsky et al., 2005).

Ces observations montrent que la voie mTOR coordonne l'expression des différents acteurs de la biogenèse des ribosomes en stimulant les activités ARN polymérase I, II et III et en régulant la traduction et les modifications post-traductionnelles des protéines ribosomiques.

2-6 La protéine pRB

La protéine pRb (Retinoblastoma protein) est un régulateur clé du cycle cellulaire. Sa mutation ou son inactivation sont fréquemment observées dans les cas de cancers comme par exemple le cancer du col de l'utérus (Jayshree et al., 2009).

Des études menées par les groupes de I. Grummt et L.I. Rothblum ont mis en évidence la fonction répressive de la protéine pRb dans la biogenèse des ribosomes par son rôle dans l'inhibition de la transcription par l'ARN polymérase I (Hannan et al., 2000a; Hannan et al., 2000b; Voit et al., 1997).

C) Le stress ribosomique

Une altération de la biogenèse des ribosomes soit par réduction de la synthèse des ARNr soit par l'haploinsuffisance en certaines protéines ribosomiques peut conduire à un stress appelé stress ribosomique ou stress nucléolaire. Ce stress conduit à la stabilisation du facteur de transcription p53 (Rubbi and Milner, 2003). L'ensemble des études ayant contribué à caractériser les mécanismes contribuant à cette stabilisation est résumé dans la revue de Y. Zhang (Zhang and Lu, 2009) et dans celle de C. Deisenroth (Deisenroth and Zhang, 2010). Une perturbation de la biogenèse des ribosomes, par exemple induite par de faibles doses d'actinomycine D, entraîne une délocalisation des protéines ribosomiques en dehors des nucléoles. Il a été mis en évidence par des expériences de co-immunoprécipitations une interaction entre certaines protéines ribosomiques non associées aux ribosomes comme RPL11 et la protéine MDM-2 (HDM-2 chez l'Homme). La protéine MDM-2 est la principale ubiquitine ligase du facteur de transcription p53. L'ubiquitination de p53 par MDM-2 conduit à sa dégradation par le protéasome. L'interaction entre les protéines ribosomiques, en particulier RPL11 et MDM-2 conduit à la répression de l'activité ubiquitine ligase de MDM-2. La surexpression d'un mutant MDM-2 incapable d'interagir avec les protéines ribosomiques ou la répression de l'expression de *Rpl11* par siARN a mis en évidence que la formation des complexes RPL11-MDM-2 conduit à la stabilisation de p53 (Bhat et al., 2004; Lindstrom et al., 2007). Cette stabilisation conduit à une apoptose des cellules et à un arrêt de leur prolifération. Cette voie est représentée de manière schématique sur la figure 12.

Situation normale Inducteurs de stress ribosomique Situation de stress

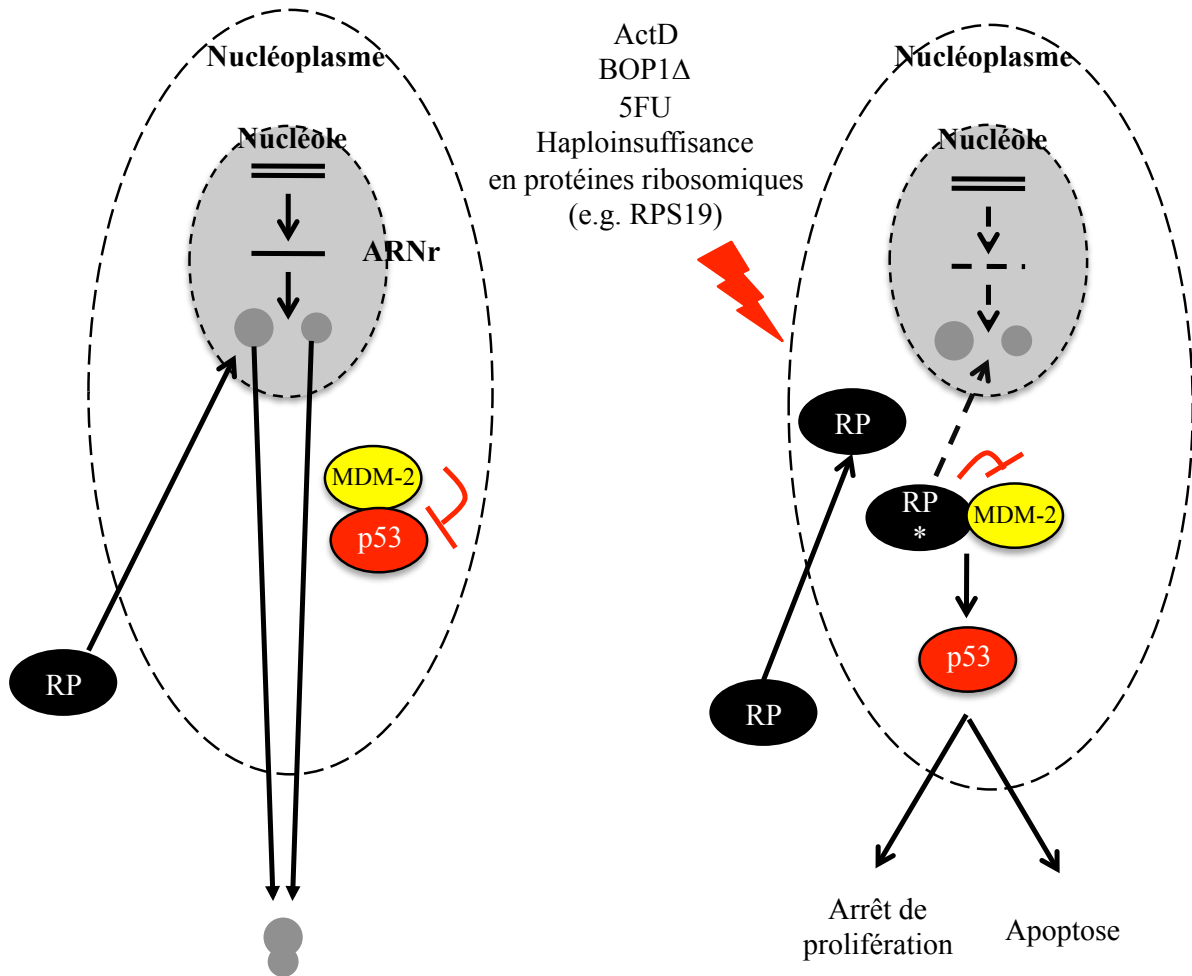


Figure 12 : Représentation schématique du stress ribosomique

RP = Protéine Ribosomique

RP* = Protéine ribosomique interagissant avec MDM-2

ActD = Actinomycine D : Bloque préférentiellement l'ARN polymérase I à faible dose (Dai *et al.*, 2004)

BOP1Δ = dominant négatif de la protéine BOP1 (Pestov *et al.*, 2001)

5FU = 5 FluoroUracile : s'incorpore dans l'ARNr conduisant à sa dégradation (Sun *et al.*, 2007)

D'autres études ont mis en évidence les mêmes fonctions pour d'autres protéines ribosomiques comme RPL5 ou RPL23 (**Tableau 3**). La répression de l'expression de l'une ou l'autre de ces protéines ribosomiques par siARN atténue l'activation de p53 induite par un stress ribosomique. Ceci suggère que les protéines ribosomiques agissent ensemble pour

contrôler le taux de protéine p53. De fait, le groupe de K.H. Vousden a mis en évidence un complexe formé de RPL11, de RPL5 et de l'ARNr 5S qui contrôle la stabilité de p53 (Horn et al., 2008).

	Action sur p53	Références
RPL11	Stabilisation	Bhat <i>et al.</i> , 2004 Dai <i>et al.</i> , 2006 Fumagali <i>et al.</i> , 2009 Lohrum <i>et al.</i> , 2003 Zhang <i>et al.</i> , 2003
RPL23	Stabilisation	Zhang <i>et al.</i> , 2010 Dai <i>et al.</i> , 2004a Jin <i>et al.</i> , 2004
RPS7	Stabilisation	Chen <i>et al.</i> , 2007 Zhu <i>et al.</i> , 2009
RPL5	Stabilisation	Dai <i>et al.</i> , 2004b Marechal <i>et al.</i> , 1994
RPL26	Traduction Stabilisation	Rosenfeld <i>et al.</i> , 2008 Zhang <i>et al.</i> , 2010

Tableau 3: Liste des protéines ribosomiques interagissant avec MDM-2 et conduisant à la stabilisation de p53

**A) Pathologies associées à une perturbation de la biogenèse des ribosomes
(Figure 13)**

La régulation de la biogenèse des ribosomes au cours du développement est extrêmement importante. Toute perturbation de cette biogenèse peut conduire à des pathologies. Celles-ci peuvent se caractériser par une biogenèse exacerbée (cancer) ou au contraire par une

altération de cette biogenèse le plus souvent par une haploinsuffisance en une protéine ribosomique.

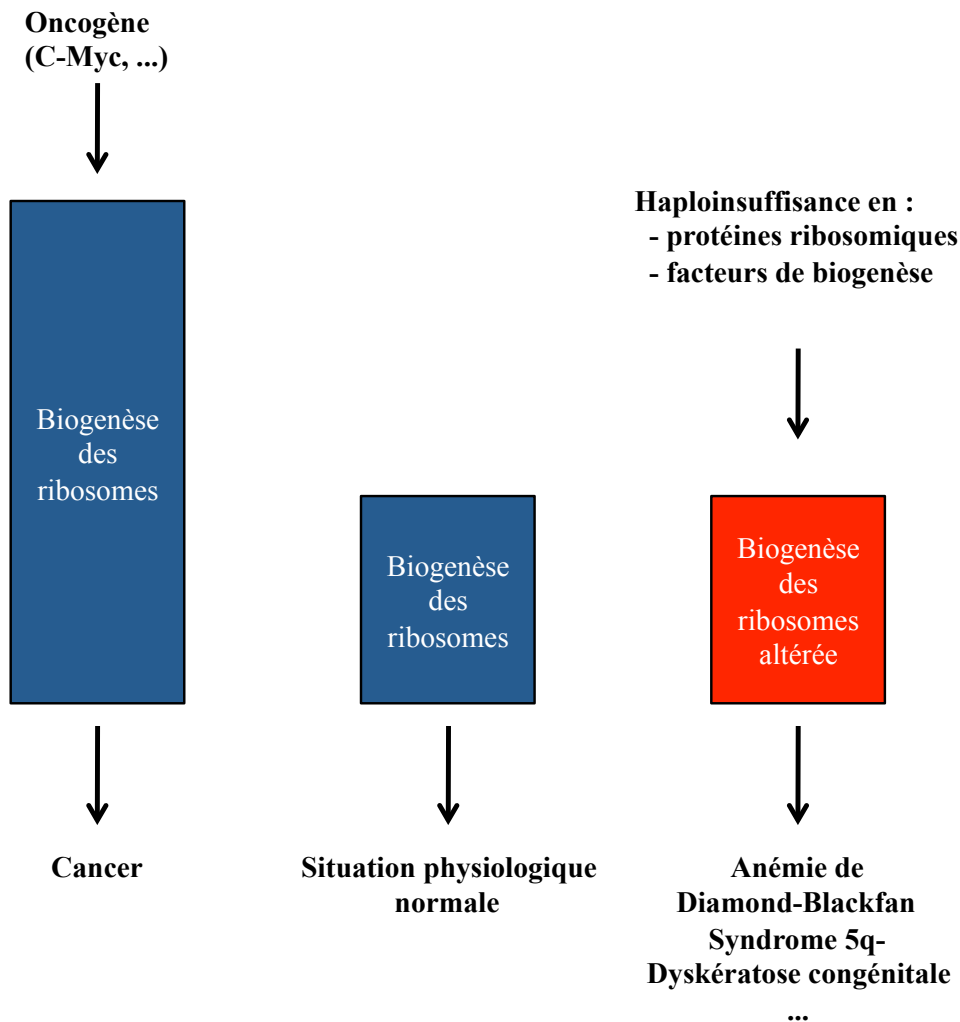


Figure 13 : Pathologies associées à une perturbation de la biogenèse des ribosomes

Deux types de maladies peuvent être engendrées par une perturbation de la biogenèse des ribosomes.

Le développement tumoral (partie gauche) est associée à une augmentation de la biogenèse des ribosomes induite par un oncogène.

En revanche, d'autres types de pathologies comme l'anémie de Diamond-Blackfan sont associées à une altération de la biogenèse des ribosomes induite par l'haploinsuffisance en protéines ribosomiques ou en facteur de biogenèse des ribosomes.

1- Biogenèse des ribosomes et cancer

Nous avons pu voir dans la partie précédente que des oncogènes comme c-Myc ou NPM sont des activateurs de la biogenèse des ribosomes. Au contraire, les protéines suppresseurs de tumeurs comme p53 ou Arf, dont la perte de fonctions est souvent observée dans les cancers, sont des répresseurs de cette biogenèse. Cette observation intéressante suggère qu'une stimulation de la biogenèse des ribosomes pourrait être un événement contribuant à la progression tumorale. La revue de D. Ruggero et P.P. Pandolfi établit un lien entre les dérégulations de la biogenèse des ribosomes et la progression tumorale (Ruggero and Pandolfi, 2003).

1-1 Stimulation de la biogenèse des ribosomes dans les cellules cancéreuses

Modifications quantitatives et qualitatives des nucléoles

Ploton *et al.* ont développé une technique afin de visualiser les nucléoles par microscopie. Cette méthode, appelée AgNOR (Argent NOR) (Ploton et al., 1986), permet la visualisation des protéines associées à ces régions NOR. Cette méthode a été utilisée pour détecter les nucléoles dans plusieurs cancers. Les études antérieures à l'année 2000 ont fait l'objet d'une revue par A. Pich (Pich et al., 2000). B.F. Adeyemi *et al.* ont également utilisé cette technique pour détecter les nucléoles à différents stades de tumeurs de la glande salivaire. Cette étude a mis en évidence une augmentation du nombre de nucléoles dans ces cellules avec une corrélation avec le stade de la maladie (Adeyemi et al., 2006).

Dans un modèle de progression tumorale, le groupe de J.J. Diaz a mis en évidence que les cellules cancéreuses contiennent plus de nucléoles dont la taille et le nombre de centres fibrillaires sont plus importants que dans les cellules normales (Belin et al., 2009).

Ces résultats indiquent que la progression tumorale s'accompagne de modifications quantitatives et qualitatives des nucléoles. Les caractéristiques des nucléoles peuvent donc constituer un facteur pronostique du cancer.

Stimulation de la synthèse des ARNr

La synthèse des ARNr par l'ARN polymérase I nécessite la phosphorylation du facteur UBF. Les kinases ou les phosphatases de ce facteur sont fréquemment retrouvées surexprimées ou réprimées dans les cas de cancer. C'est notamment le cas de la caséine kinase II dont la surexpression est retrouvée dans des cas de leucémies et de tumeurs solides (Ruggero and Pandolfi, 2003). Certaines études ont également montré que les cellules cancéreuses ont un taux d'ARNr 45S augmenté. A titre d'exemple, dans un modèle de progression tumorale étudié par l'équipe de J.J. Diaz, les auteurs observent une augmentation de 20 % du taux de transcrits 45S dans les cellules agressives comparées aux cellules contrôles (Belin et al., 2009). D'autre part, le groupe de R.J. White a mis en évidence une dérégulation de l'ARN polymérase III associée à une augmentation du taux de transcrit 5S dans le cancer du col de l'utérus (Daly et al., 2005).

Ces données bibliographiques mettent en évidence que la synthèse des ARNr est dans la plupart des cas augmentée dans les cellules cancéreuses. Les ARNr constituant le composant limitant de la biogenèse des ribosomes, l'augmentation de leur synthèse pourrait signer une augmentation de ce processus.

Dérégulation de certaines protéines ribosomiques dans les cellules cancéreuses

Comme nous avons pu le voir, les cancers se caractérisent par une stimulation de l'activité de l'ARN polymérase I. La surexpression de protéines ribosomiques a également été fréquemment retrouvée dans les cas de cancers. Néanmoins, ce n'est jamais l'ensemble des protéines ribosomiques qui est touché mais seulement certaines. L'implication des protéines ribosomiques dans les cancers a été largement étudiée dans les cancers colorectaux. RPL31 est la première protéine ribosomique retrouvée surexprimée dans les cellules issues de ces tumeurs. Depuis, la surexpression d'autres protéines ribosomiques a été observée dans ces cancers et font l'objet de la revue de M.D. Lai (Lai and Xu, 2007).

En revanche, la réduction de l'expression de certaines protéines ribosomiques a également été observée dans des cas de cancers colorectaux comme par exemple RPL5 (Lai and Xu, 2007). De la même manière, des études menées chez le poisson zèbre ont mis en évidence que les mutations conduisant à la réduction de l'expression de certaines protéines ribosomiques augmentaient la prédisposition de ces poissons à développer des tumeurs (Amsterdam et al., 2004; Lai et al., 2009).

Ces données ont contribué à montrer que les protéines ribosomiques sont fréquemment retrouvées surexprimées ou mutées dans les cancers. Toutefois, le lien entre ces perturbations et le cancer n'est pas établi.

Augmentation de la synthèse protéique dans les cellules cancéreuses

La fonction des ribosomes est d'assurer la synthèse des protéines. La stimulation de la biogenèse des ribosomes observée dans les cellules cancéreuses suggère que la synthèse des protéines de ces cellules est plus importante que dans des cellules normales.

Les revues de D. Silvera et B. Bilanges montrent le lien entre le contrôle de la traduction et le développement tumoral (Bilanges and Stokoe, 2007; Silvera et al., 2010). Ces revues montrent que la majorité des facteurs de traduction est surexprimée dans les cas de

cancers. Par exemple, la surexpression du gène codant le facteur eIF4A est retrouvée dans les hépatocarcinomes et les mélanomes.

Les souris transgéniques surexprimant *c-myc* à partir du promoteur des chaînes lourdes d'immunoglobulines (souris E μ -Myc) développent des lymphomes à cellules B. La mesure du taux d'incorporation de la méthionine ³⁵S montre une incorporation plus importante chez les souris E μ -Myc signant une augmentation de la synthèse protéique (Barna et al., 2008). De la même manière, la stimulation de la transcription de l'ARN polymérase III par la surexpression d'un facteur essentiel à son activité transforme les MEF (Mouse Embryonic Fibroblast). Cette transformation est associée à l'augmentation de la synthèse protéique. De façon intéressante, ces effets sont corrélés à une augmentation du taux d'ARNt initiateur portant la méthionine qui est limitant dans la cellule. La surexpression de cet ARNt conduit également à l'augmentation de la synthèse protéique et suffit à elle seule à induire la transformation cellulaire (Marshall et al., 2008).

Ces données montrent qu'une augmentation de la synthèse protéique peut conduire au développement tumoral.

1-2 Modifications qualitatives des ribosomes et de leur fonction

Le paragraphe précédent a mis en évidence que les cellules cancéreuses ont une biogenèse des ribosomes et une synthèse protéique augmentées.

Afin de déterminer si des modifications qualitatives des ribosomes pouvaient être observées, le groupe de J.J. Diaz a analysé les voies de maturation des ARNr ainsi que leurs modifications post-transcriptionnelles dans un modèle de progression tumorale. L'analyse des intermédiaires des ARNr par des mesures radioactives à l'aide de sonde s'hybridant avec les ARNr 28S, 18S et 5,8S a mis en évidence l'apparition d'un intermédiaire n'appartenant à

aucune des deux voies de maturation décrites. De plus, l'analyse du taux de méthylation de ces ARNr montre une augmentation de cette modification sur certains sites des ARNr 28S et 5,8S (Belin et al., 2009). Ces résultats indiquent que les cellules cancéreuses présentent des modifications qualitatives des ribosomes.

Le modèle de progression tumorale étudié par l'équipe de J.J. Diaz a également permis de mettre en évidence une réduction de la traduction IRES dépendante (Belin et al., 2009). Au cours de la mitose, la traduction devient dépendante de l'IRES. M. Barna *et al.* ont mesuré la production de la protéine CDK11^{p58}, qui est un gène suppresseur de tumeur et dont la traduction est IRES dépendante, dans les souris Eμ-Myc après synchronisation des cellules. Les cellules B issues de ces souris ne produisent plus cette protéine (Barna et al., 2008).

Ces données montrent que le développement tumoral s'accompagne également de modifications qualitatives des ribosomes et de la traduction sans pour autant démontrer à ce jour un lien de cause à effet entre ces deux phénomènes.

1-3 La stimulation de la biogenèse des ribosomes est-elle nécessaire au développement du cancer ?

L'ensemble de ces données bibliographiques montre que les cellules cancéreuses subissent des modifications quantitatives et qualitatives des ribosomes conduisant à une augmentation de la synthèse protéique et potentiellement à une modification de la qualité de la traduction. Ces modifications sont-elles une conséquence ou une des causes de la transformation cellulaire ? Cette sous-partie traitera des différentes expériences entreprises afin de tenter de répondre à cette question. Comme nous le verrons, cette question fait toujours débat.

L'haploinsuffisance en protéines ribosomiques reverse le phénotype cancéreux

M. Barna *et al.* ont croisé les souris transgéniques E μ -Myc avec des souris Rpl24^{+/-} et testé l'effet de cette haploinsuffisance sur la lymphomagenèse induite par c-Myc. Les souris E μ -Myc /Rpl24^{+/-} présentent une survie plus importante et une rate normale comparée aux souris E μ -Myc indiquant que l'haploinsuffisance en RPL24 atténue la lymphomagenèse induite par c-Myc. Les auteurs ont ensuite testé les effets de cette haploinsuffisance sur les différents paramètres perturbés par c-Myc. L'atténuation du phénotype cancéreux est corrélée à une diminution de la synthèse protéique et la réexpression de CDK11^{p58} au cours de la mitose (Barna et al., 2008). Ces résultats démontrent que la stimulation de la biogenèse des ribosomes induite par c-Myc contribue à la lymphomagenèse induite par ce facteur.

L'inhibition de la transcription ou de la maturation des ARNr atténue le phénotype transformé

L'actinomycine D est une drogue couramment utilisée dans la thérapie anticancéreuse. Par exemple, elle est utilisée dans les rhabdomyosarcomes. Les cellules de ce type de cancer prolifèrent moins vite en réponse à de faibles doses d'actinomycine D (Marchal et al., 1997). A faible dose, l'actinomycine D bloque préférentiellement l'ARN polymérase I induisant une réduction de la synthèse des ARNr (Pinol-Roma and Dreyfuss, 1991). De la même manière, le traitement des cellules U2OS et SaoS-2 par de faibles doses d'actinomycine D induit une apoptose et un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Ces effets sont dépendants de p53 (Montanaro et al., 2007). Des résultats similaires sont observés avec une autre drogue qui inhibe la maturation des ARNr, la 5 fluoro-uracile, ou encore avec un dominant négatif d'une protéine impliquée dans la maturation de la grande sous-unité du ribosome (Pestov et al., 2001; Sun et al., 2007).

Ces données démontrent qu'une inhibition de la synthèse ou de la maturation des ARNr atténue le phénotype cancéreux.

Un mutant MDM-2 incapable d'interagir avec les protéines ribosomiques accélère la lymphomagenèse induite par c-Myc

Le groupe d'Y.Zhang a décrit un mutant de MDM-2 (MDM-2^{C305F}) incapable d'interagir avec les protéines ribosomiques RPL5 et RPL11. Les souris transgéniques produisant ce mutant à l'état hétérozygote ou homozygote se développent normalement. En revanche, l'induction d'un stress ribosomique par de faibles doses d'ActD dans les MEF issus de ces souris conduit à une stabilisation moins importante de p53 que les MEF issus de souris sauvages indiquant que ce mutant altère la voie de stress ribosomique. Afin de tester l'effet de ce mutant sur la lymphomagenèse induite par c-Myc, les auteurs ont croisé les souris Eμ-Myc avec les souris MDM-2^{C305F}. Ces souris développent des lymphomes à cellules B plus rapidement que les souris Eμ-Myc/MDM-2^{wt} et survivent moins longtemps (Macias et al., 2010).

Ces résultats suggèrent que l'empêchement d'un stress ribosomique est important pour la lymphomagenèse induite par c-Myc.

Les résultats présentés dans cette partie sont en faveur d'une contribution de l'augmentation de la biogenèse des ribosomes et de la synthèse protéique dans la progression tumorale. Ils ne permettent toutefois pas de trancher définitivement sur une contribution active de ces augmentations. Ils mettent également en évidence une certaine addiction des cellules cancéreuses à cette biogenèse augmentée (voir paragraphe 1-5).

1-4 Lien entre biogenèse des ribosomes et prolifération cellulaire

Nous pouvons constater que la répression de la biogenèse des ribosomes induit un arrêt de prolifération. Dans certains cas, cet arrêt de prolifération est dirigé par l'activation de p53 via le mécanisme de stress ribosomique décrit précédemment. Néanmoins, la diminution de la biogenèse des ribosomes observée sous l'effet de la protéine Arf en absence de p53 conduit également à un arrêt de prolifération. Ces résultats suggèrent que la biogenèse des ribosomes pourrait contrôler la prolifération cellulaire via des mécanismes indépendants de l'activation de p53 (Weber et al., 2000).

Il existe chez la levure un point crucial situé au cours de la phase G1 appelé START. Ce point de contrôle empêche le passage en phase S quand certaines conditions ne sont pas remplies comme une taille suffisante des cellules (Johnston et al., 1977). Ce point de contrôle fait intervenir la protéine Whi5 qui est l'homologue de la protéine pRb (Rétinoblastome) chez l'Homme. Le groupe de M. Tyers a réprimé chez la levure deux facteurs de transcription important pour la biogenèse des ribosomes. Cette répression conduit à la diminution de la taille des levures et un blocage des cellules en phase G1. D'autre part, à l'instar de l'inhibition de la traduction par le cycloheximide, cette répression conduit à un retard du passage de ce point START. Ces résultats établissent une corrélation entre la taille des cellules, la biogenèse des ribosomes, le taux de synthèse protéique et le passage des cellules en phase S (Jorgensen et al., 2004).

Une étude plus récente a également mis en évidence qu'une perturbation de la biogenèse des ribosomes conduit une augmentation de la durée de la phase G1. Cependant, contrairement à l'étude précédente, les levures présentant une perturbation de la biogenèse des ribosomes ne sont pas plus petites que les levures sauvages (Bernstein et al., 2007).

Ces résultats indiquent que la biogenèse des ribosomes favorise le passage en phase S des cellules. D'autre part, ce point START décrit pour être contrôlé par la taille des cellules, pourrait s'avérer être contrôlé par la biogenèse des ribosomes.

Il a également été décrit chez les eucaryotes supérieurs un point de contrôle au cours du cycle régulé par la taille de la cellule, notamment dans les érythroblastes aviaires (Dolznig et al., 2004). Enfin, la mutation d'une protéine essentielle pour la production des protéines ribosomiques chez la drosophile conduit à une réduction de la taille des mouches ainsi qu'une prolifération moins importante (Montagne et al., 1999).

Ces résultats suggèrent que la biogenèse des ribosomes pourrait contribuer à la prolifération cellulaire en contrôlant la taille des cellules qui contrôle le passage d'un point précis dans la phase G1 du cycle cellulaire. Par conséquent, la stimulation de la biogenèse des ribosomes permettrait aux cellules cancéreuses d'atteindre plus rapidement la taille nécessaire au passage de ce point critique et donc de proliférer plus rapidement. Toutefois, l'étude de K.A. Bernstein *et al.* suggère que la biogenèse des ribosomes pourrait également contrôler directement ce passage en réprimant certaines protéines importantes pour le passage de ce point comme la protéine pRb (Bernstein et al., 2007).

1-5 Sensibilité particulière des cellules cancéreuses à une diminution de la biogenèse des ribosomes ?

L'haploinsuffisance en protéine RPL24 induit la mort par apoptose des cellules de lymphomes B issues de souris transgéniques E μ -Myc. En revanche, de manière surprenante,

les lymphocytes B issues de souris sauvages ne sont pas sensibles à cette haploinsuffisance (Barna et al., 2008).

Depuis de nombreuses années, le traitement du cancer fait appel à des drogues chimiothérapeutiques qui ont pour visée de tuer spécifiquement les cellules cancéreuses. Nous avons pu voir dans un paragraphe précédent que l'actinomycine D à faibles doses et la 5FU ciblent la synthèse et la maturation des ARNr respectivement. Le groupe de D. Eick a pu montrer qu'une grande partie des drogues utilisées pour les traitements chimiothérapeutiques ciblent également la biogenèse des ribosomes (Burger et al., 2010).

Ces observations suggèrent que les cellules cancéreuses pourraient avoir une sensibilité particulière à une perturbation de la biogenèse des ribosomes. Cependant, à l'heure actuelle, les mécanismes responsables de cette addiction ne sont pas encore connus. Comprendre ces mécanismes pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

2- Les pathologies associées à une altération de la biogenèse des ribosomes

Contrairement au cancer, certaines pathologies sont caractérisées par une perturbation de la biogenèse des ribosomes à cause d'une mutation ou d'une délétion touchant un acteur de cette biogenèse. Ces maladies et la protéine touchée correspondante sont listées sur le tableau 4 et sont documentées dans la revue de A. Narla et B.L. Ebert (Narla and Ebert, 2010). Je focaliserai cette partie sur l'anémie de Diamond-Blackfan et le syndrome MDS 5q- qui entraînent chez les patients des défauts hématopoïétiques et en particulier des défauts touchant la lignée érythrocytaire.

Maladie	Protéines touchées	Défaut érythropoïétique	Activation de p53
Anémie de Diamond Blackfan	RPS19 (25%) RPS24 RPS17 RPL35a RPL5 RPL11 RPS7 RPL36 RPS15 RPS27a RPS10 RPS26	Oui	Oui
MDS 5q-	RPS14	Oui	Oui
Dyskératose congénitale	DKC1	Oui	Oui
Hypoplasie des cartilages et des cheveux	RMRP	Oui	Non déterminé
Syndrome de Treacher-Collins	TCOF1	Non	Oui
Syndrome de Shwachman-Diamond	SBDS	Non	Oui

Tableau 4: Pathologies associées à une altération de la biogenèse des ribosomes (d'après Narla and Ebert, 2010)

2-1 L'anémie de Diamond-Blackfan

L'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) est une maladie congénitale touchant 5 à 7 enfants par millions de naissances. Les patients souffrant de DBA présentent une anémie

modérée ou sévère généralement macrocytaire et n'ont qu'un faible nombre de réticulocytes. D'autres défauts hématopoïétiques sont également observés mais sont moins conséquents que le défaut érythropoïétique. Dans près de la moitié des cas, les patients présentent des malformations et des retards de croissance (Da Costa et al., 2010). D'autre part, les patients atteints de DBA ont une susceptibilité accrue au développement de cancers (Lipton, 2006).

Des études de liaison ont mis en évidence une anomalie génétique fréquente localisée sur le chromosome 19q13 chez l'Homme (Gustavsson et al., 1997a ; Gustavsson et al., 1997b). Cette région comprend le gène codant la protéine ribosomique RPS19. De façon surprenante, le quart des patients atteints de DBA présentent des mutations au niveau de ce gène (Draptchinskaia et al., 1999). Depuis cette première observation, 127 mutations du gène *rps19* ont été documentées et sont répertoriées dans la revue de M.F. Campagnoli (Campagnoli et al., 2008). Ces mutations peuvent être soit des insertions/délétions, des mutations faux sens ou encore des mutations ponctuelles. Elles peuvent conduire à une réduction du niveau d'expression du transcrite de la protéine RPS19, à une délocalisation nucléolaire ou à un défaut d'association avec le ribosome. Quelque soit le type de mutations, ces mutations ont été retrouvées à l'état hétérozygote avec le deuxième allèle sauvage soulignant le caractère dominant de la transmission de la maladie.

D'autres gènes codant des protéines ribosomiques ont également été retrouvés mutés chez les patients atteints de DBA. Ainsi, les protéines RPS10, RPS26, RPL5, RPL11, RPS17, RPS24, RPL35a sont retrouvées mutées dans une proportion moins importante de patients atteints de DBA que les mutations touchant RPS19 (Choismel et al., 2008; Cmejla et al., 2009; Doherty et al., 2010; Farrar et al., 2008; Gazda et al., 2008; Quarello et al., 2010).

La répression de RPS19 par siARN dans les fibroblastes issus de sujets sains induit des défauts de maturation de l'ARNr 18S, une séquestration nucléaire de la particule pré-40S et une désorganisation nucléolaire (Choismel et al., 2007). Ces résultats indiquent que la

répression de RPS19 conduit à des défauts de la biogenèse des ribosomes. Ces données suggèrent que la DBA pourrait être associée à une perturbation de la biogenèse des ribosomes.

2-2 Le syndrome MDS 5q-

Le syndrome MDS 5q- est un syndrome myélodysplasique caractérisé par une anémie macrocytaire, un nombre de plaquettes sanguines normal ou élevé et une progression très lente de leucémies aiguës myéloïdes. Le point commun chez tous les patients atteints de cette maladie est une délétion d'une région du bras court du chromosome 5 (Narla and Ebert, 2010) (Boultonwood, 2010).

La région minimale délétée commune aux patients atteints de MDS 5q- contient 40 gènes. Le groupe de T.R. Golub a entrepris de réprimer individuellement chacun des 40 gènes par siARN dans des progéniteurs hématopoïétiques humains normaux afin de déterminer lequel est impliqué dans ce syndrome. La répression du gène codant la protéine ribosomique RPS14 mime le syndrome MDS 5q- avec une sévère réduction des cellules érythrocytaires et un nombre de plaquettes relativement normal. De plus, l'expression forcée de RPS14 dans des cellules de moelle osseuse de patients restaure le phénotype normal. Ces résultats permettent de conclure que l'haploinsuffisance en RPS14 est probablement impliquée dans le phénotype érythrocytaire associé à ce syndrome. D'autre part, une analyse de la maturation des ARNr a mis en évidence que la répression de RPS14 conduit à un défaut de maturation de l'ARNr 18S et de la formation de la sous-unité 40S (Ebert et al., 2008). Ces résultats suggèrent que la réduction du taux de protéine RPS14 induite par la délétion du bras court du chromosome 5 entraîne une perturbation de la biogenèse des ribosomes.

2-3 Mécanismes à l'origine des pathologies DBA et 5q- :

lien avec p53

Plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* ont été développés afin d'identifier les mécanismes impliqués dans l'anémie DBA et le syndrome MDS 5q-.

Modèles *in vitro* pour la DBA

Le groupe de S. Karlsson a analysé l'effet de l'absence de RPS19 dans les cellules souches CD34⁺ humaines et la lignée de cellules érythroïdes humaines TF-1. Dans ces deux modèles, l'absence de RPS19 conduit à un arrêt de prolifération et à un blocage de la différenciation érythrocytaire précoce (Flygare et al., 2005; Miyake et al., 2008) mimant les effets observés dans la DBA. Des résultats similaires ont été observés en réprimant RPS19 dans les cellules de foie fœtal murin (Sieff et al., 2010) indiquant un rôle de RPS19 dans les premiers stades de l'érythropoïèse.

La DBA présente des phénotypes similaires à ceux observés dans une aplasie des globules rouges induite chez le chat par un virus. L'enveloppe du virus altère la fonction de la protéine FLVCR1 qui est le récepteur du virus et qui se trouve être un transporteur de l'hème de l'hémoglobine. L'analyse d'échantillons de patients atteints de DBA montre l'expression du transcrite alternatif de FLVCR1 observé chez les chats malades. L'expression de ce transcrite est augmentée après répression de *rps19* dans les cellules leucémiques K562 (Rey et al., 2008). Ces données suggèrent un lien entre les défauts de biogenèse des ribosomes observés chez les patients atteints de DBA et des défauts de transport de l'hème de l'hémoglobine contribuant aux défauts érythropoïétiques. Elles permettent également de mettre en avant un rôle de RPS19 dans le contrôle de l'épissage qui reste encore inconnu.

Modèles *in vivo* pour la DBA

Chez le poisson zèbre : Le groupe de S. Lin a développé un modèle de poisson zèbre dans lequel les auteurs répriment le gène codant la protéine RPS19 par « morpholino ». La réduction de 50 % du taux de protéine RPS19 conduit comme la DBA à une absence de cellules érythrocytaires matures soulignant un défaut d'érythropoïèse. Ces défauts érythropoïétiques sont associés à une augmentation du taux de protéine p53. Dans le but de déterminer si cette augmentation contribue aux effets de la déplétion de RPS19, les auteurs ont réprimé p53 par des « morpholinos ». En absence de p53, l'absence de RPS19 n'a plus aucun effet sur le lignage érythrocytaire (Danilova et al., 2008). Ces résultats semblent indiquer une contribution cruciale de p53 aux défauts érythropoïétiques observés en absence de RPS19. Néanmoins, nous pouvons nous demander si cette dépendance vis à vis de p53 n'est pas une conséquence de l'absence totale de la protéine RPS19. En effet, les patients atteints de DBA portent les mutations de RPS19 à l'état hétérozygote, exprimant donc encore RPS19. Cette étude ne permet pas d'extrapoler sur un éventuel rôle de p53 dans les conditions similaires à celles observées chez les patients.

Chez la souris : Une étude de mutagenèse chimique à grande échelle a été menée par le groupe de G.S. Barsh. Cette étude a identifié deux mutations Dsk3 et Dsk4 conduisant à des défauts mélanocytaires. Les auteurs ont pu déterminer que ces mutations touchent les gènes codant les protéines ribosomiques RPS19 (Dsk3) et RPS20 (Dsk4). Les défauts mélanocytaires sont associés à une diminution du nombre de cellules érythrocytaires. Ces résultats indiquent que la mutation de RPS19 conduit à une perturbation de l'érythropoïèse. De plus, les auteurs ont également observé une augmentation du taux de protéine p53 évalué par immunofluorescence dans les souris mutées pour RPS19. La mutation de RPS19 dans un fond génétique dépourvu de p53 n'entraîne aucun phénotype, notamment au niveau de l'érythropoïèse (McGowan et al., 2008). Ces résultats indiquent que les effets de la mutation de RPS19 sont dépendants de l'activation de p53.

L'ensemble de ces résultats suggère que les mutations de RPS19 observées chez les patients atteints de DBA sont très probablement impliquées dans les défauts érythrocytaires associés à cette pathologie. Ces modèles mettent également en avant une activation de p53. Cependant, aucune donnée sur une éventuelle activation et un éventuel rôle de p53 chez les patients n'est disponible à ce jour.

L'activation de p53 est également observée après déplétion d'un certain nombre de protéines ribosomiques comme RPS6 (Fumagalli et al., 2009). L'activation de p53 est alors dirigée par la voie de stress ribosomique vue précédemment. Nous pouvons donc penser que l'activation de p53 observée dans les modèles mimant la DBA est la conséquence d'un stress ribosomique induit par l'haploinsuffisance de RPS19. Néanmoins, nous pouvons constater que parmi les protéines mutées dans certains cas de DBA, nous retrouvons RPL11 et RPL5 qui sont décrites pour interagir avec MDM-2 et inhiber ses fonctions conduisant à l'activation de p53. La déplétion de RPL11 chez le poisson zèbre conduit à une apoptose massive dépendante de p53 (Chakraborty et al., 2009). Néanmoins, le mécanisme d'activation de p53 dans cette étude n'a pas clairement été établi et semble indépendant d'autres protéines ribosomiques comme RPL5 et RPL23 connues également pour interagir avec MDM-2. Des études plus approfondies doivent être menées afin de mieux comprendre les mécanismes de la DBA induite par des mutations de RPL11 ou RPL5. Des données préliminaires présentées lors du 51^{ème} congrès de l'ASH (American Society of Hematology) (Horos *et al.* (résumé n°179) ; Moniz *et al.* (résumé n°176) ; Payne *et al.* (résumé n°177) ; Caywood *et al.* (résumé n°1096)) et du 17^{ème} congrès de l'Hémoglobine Switching (Horos *et al.* (poster n°32)) mettent en évidence des mécanismes indépendants de p53 qui conduiraient au même titre que ceux dépendants de p53 à la DBA. Ces données suggèrent que l'haploinsuffisance en protéines

ribosomiques induirait un défaut de traduction dépendante de l'IRES conduisant à la répression de protéines importantes pour la différenciation érythrocytaire.

Modèle pour le syndrome MDS 5q-

Afin d'établir la contribution de la déplétion de RPS14 dans le syndrome MDS 5q-, le groupe d'A.N. McKenzie a développé un modèle de souris transgéniques présentant une délétion d'une région du bras court du chromosome 5 comprenant le gène codant RPS14. Les souris présentant cette délétion montrent un marquage TER119 (glycoprotéine spécifique de la lignée érythrocytaire) diminué par rapport aux souris sauvages. De plus, l'analyse en cytométrie de flux montre la présence de grosses cellules érythroïdes ou macrocytes. Ces résultats indiquent que la déplétion de RPS14 induit une anémie macrocytaire. Un marquage intracellulaire permettant la détection de p53 a montré que, comme les modèles de souris DBA, l'haploinsuffisance en RPS14 conduit à l'apparition d'un très petit nombre de cellules exprimant p53. L'absence de p53 dans les souris déplétées en RPS14 permet la restauration du nombre de progéniteurs érythrocytaires (Barlow et al., 2010). Ces résultats indiquent que l'haploinsuffisance de RPS14 dans ce modèle conduit à une stabilisation de p53 contribuant à l'anémie macrocytaire. Cependant, comme pour la DBA, l'augmentation de p53 et son rôle chez les patients atteints du syndrome MDS 5q- n'ont jamais été décrits à ce jour.

En revanche, ce modèle murin ne permet pas de mimer l'intégralité de la maladie. En effet, les patients atteints du syndrome MDS 5q- présentent un nombre de plaquettes normal ou élevé. Or, dans ce modèle, les souris montrent une réduction de leur nombre de plaquettes. Ces résultats suggèrent qu'un autre gène que celui codant RPS14 contribue à la pathologie MDS 5q-. La comparaison d'expression de miARN entre les souris sauvages et déléetées de la région 5q a permis d'identifier les miARN miR-145 et miR-146 comme étant diminués dans les souris del(5q). La répression de ces miARN conduit à stimulation de la mégacaryopoïèse dont les effets dépendent de l'IL-6 (Starczynowski et al., 2010). Parmi les cibles de miR-145,

nous pouvons noter le gène *fli-1* qui est un facteur important pour la mégacaryopoïèse (Starczynowski and Karsan, 2010). De plus, l'IL-6 est un inducteur de FLI-1 (Hodge et al., 2002). Ces résultats suggèrent que la surexpression de *fli-1* pourrait également contribuer au syndrome MDS 5q-.

Contribution de p53 aux maladies du ribosome

Nous avons vu que plusieurs modèles de la DBA et du syndrome MDS 5q- sont caractérisés par une activation fonctionnelle de p53. Cette dépendance vis à vis de p53 a également été démontrée dans des modèles d'autres pathologies associées à une altération de la biogenèse des ribosomes comme le syndrome de Treacher-Collins (Jones et al., 2008). Cette maladie est associée à la mutation de la protéine TCOF-1, une protéine nucléolaire importante pour la transcription par l'ARN polymérase I (Valdez, 2004). Ces résultats indiquent donc que l'activation de p53 est un événement récurrent observé dans les modèles de maladies du ribosome et pourrait constituer une cible thérapeutique de choix pour traiter ces maladies sous réserve de montrer l'implication de p53 chez les patients.

2-4 Sensibilité particulière de l'érythropoïèse à une réduction de la biogenèse des ribosomes ?

Il est assez frappant de constater qu'une majorité des maladies liées à une réduction de la biogenèse des ribosomes sont caractérisées par une anémie. Ces observations peuvent mettre en évidence une sensibilité particulière des cellules érythrocytaires à une telle réduction. Les mécanismes qui pourraient engendrer cette sensibilité ne sont pour l'instant pas connus.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les gènes *spi-1* et *fli-1* sont activés de manière récurrente par les virus SFFV et F-MuLV. Ils codent respectivement les facteurs de transcription de la famille ETS, SPI-1 et FLI-1 qui reconnaissent une même séquence cœur consensus GGAA. Nous avons pu voir dans mon introduction que l'activation de ces deux facteurs est importante pour le développement érythroleucémique et contribue à la fois à la survie, à la prolifération et au blocage de la différenciation des érythroblastes infectés. De plus, notre équipe a montré avant mon arrivée au laboratoire que SPI-1 est un activateur transcriptionnel du gène *fli-1*.

Parmi les intégrations provirales du virus de Friend conduisant à une érythroleucémie, il est intéressant de noter que plus de trois quarts d'entre elles conduisent à l'activation de deux facteurs ETS. Cette observation souligne l'importance des gènes cibles de ces deux facteurs dans le développement érythroleucémique. De plus, des études mentionnées dans mon introduction montrent que des facteurs ETS peuvent réguler les mêmes gènes cibles malgré une séquence nucléotidique bordant la séquence GGAA reconnue par chacun des facteurs différente. D'autre part, nous pouvons également remarquer que les contributions des facteurs FLI-1 et SPI-1 sont très voisines dans les cellules érythroleucémiques. Ces observations nous ont conduit à proposer que **SPI-1 et FLI-1 régulent directement l'expression de gènes cibles communs et contribuent de manière additive à la survie, à la prolifération et au blocage de la différenciation des érythroblastes (Figure 14)**. Afin de tester cette hypothèse, j'ai utilisé deux clones érythroleucémiques dérivés des lignées 745A (lignée SFFV) et NN10 (lignée F-MuLV) qui ont été obtenus avant mon arrivée au laboratoire par Gaëtan Juban. Ces deux clones permettent la répression inductible de l'expression de *fli-1* par interférence par l'ARN. Comme nous le verrons dans la première partie de mes résultats, SPI-1 et FLI-1

régulent directement l'expression de gènes cibles communs dont une grande proportion est impliquée dans la biogenèse des ribosomes.

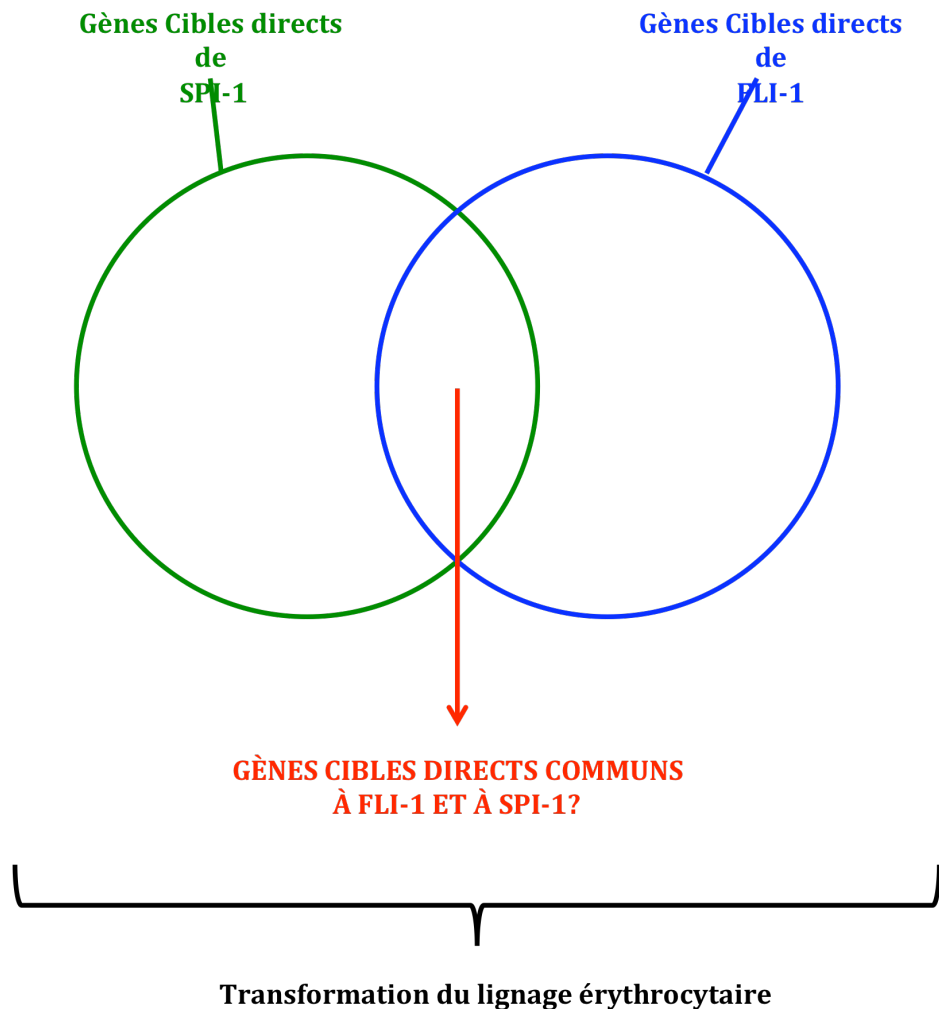


Figure 14 : Les facteurs SPI-1 et FLI-1 régulent-ils des gènes cibles directs communs contribuant à leurs fonctions dans la transformation de la lignée érythrocytaire?

La deuxième partie de mon travail a consisté à déterminer la contribution de ces gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes dans les contributions additives de FLI-1 et SPI-1 au phénotype leucémique. De manière intéressante, le traitement des cellules MEL par de faibles doses d'actinomycine D induit comme l'absence de SPI-1 et FLI-1 la reprise de la

différenciation des cellules MEL au détriment de leur prolifération. A faibles doses, l'actinomycine D bloque préférentiellement l'ARN polymérase I et induit un stress ribosomique conduisant à l'activation de p53. De plus, la surproduction d'une protéine p53 sauvage favorise également la différenciation des cellules MEL au détriment de leur prolifération. L'ensemble de ces observations nous ont conduit à proposer que **l'absence de SPI-1 et FLI-1 induit un stress ribosomique et l'activation consécutive de p53 contribuant à la reprise de la différenciation et à l'arrêt de prolifération des cellules NN10 et 745A**. Le test de cette hypothèse sera traité dans la deuxième partie de mes résultats.

Enfin, la troisième partie de mes résultats sera consacrée à déterminer si d'une part, FLI-1 et SPI-1 régulent d'autres gènes cibles directs communs que ceux impliqués dans la biogenèse des ribosomes et d'autre part de déterminer le mode de recrutement de ces deux facteurs. Afin de répondre à ces questions, nous avons décidé d'utiliser la technique de ChIP-Seq à partir de chromatine enrichie avec les anticorps anti-SPI-1 et anti-FLI-1 et extraites de trois lignées érythroleucémiques indépendantes surexprimant l'un et/ou l'autre de ces facteurs.

RÉSULTATS

PREMIÈRE PARTIE : CONTRIBUTIONS ADDITIVES DE FLI-1 ET DE SPI-1 AU DÉVELOPPEMENT DES ÉRYTHROLEUCÉMIES DE FRIEND – IDENTIFICATION DE GÈNES CIBLES DIRECTS COMMUNS À FLI-1 ET SPI-1

I- **FLI-1 contribue à la survie, à la prolifération et au blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend**

A) **Rôle de FLI-1 dans les cellules NN10**

1- Description du clone NN10 #5

Avant mon arrivée au laboratoire, Gaëtan Juban avait développé le clone de cellules érythroleucémiques NN10 #5. Ces cellules sont dérivées de la lignée érythroleucémique NN10. Cette lignée a été obtenue à partir de souris infectées par le virus F-MuLV et présentent une intégration provirale en amont du gène *fli-1*. Cette lignée a été transfectée dans un premier temps avec un vecteur d'expression de la protéine répresseur TetR. Le clone NN10/TR exprimant massivement cette protéine a été sélectionné. Ces cellules ont ensuite été transfectées avec un vecteur d'expression de shARN (Small hairpin ARN) dirigés contre l'ARNm du gène *fli-1*. L'expression de ces shARN est dirigée par un promoteur H1 dans lequel la séquence de fixation pour la protéine TetR (TetO2) a été insérée (**Figure 15**). En

absence de doxycycline, la protéine TetR est recrutée sur la séquence TetO2 et réprime l'expression des shARN. En revanche, la présence de doxycycline qui interagit avec la protéine TetR déplace cette dernière de la séquence TetO2. Les shARN sont alors produits et l'ARNm de *fli-1* est dégradé.

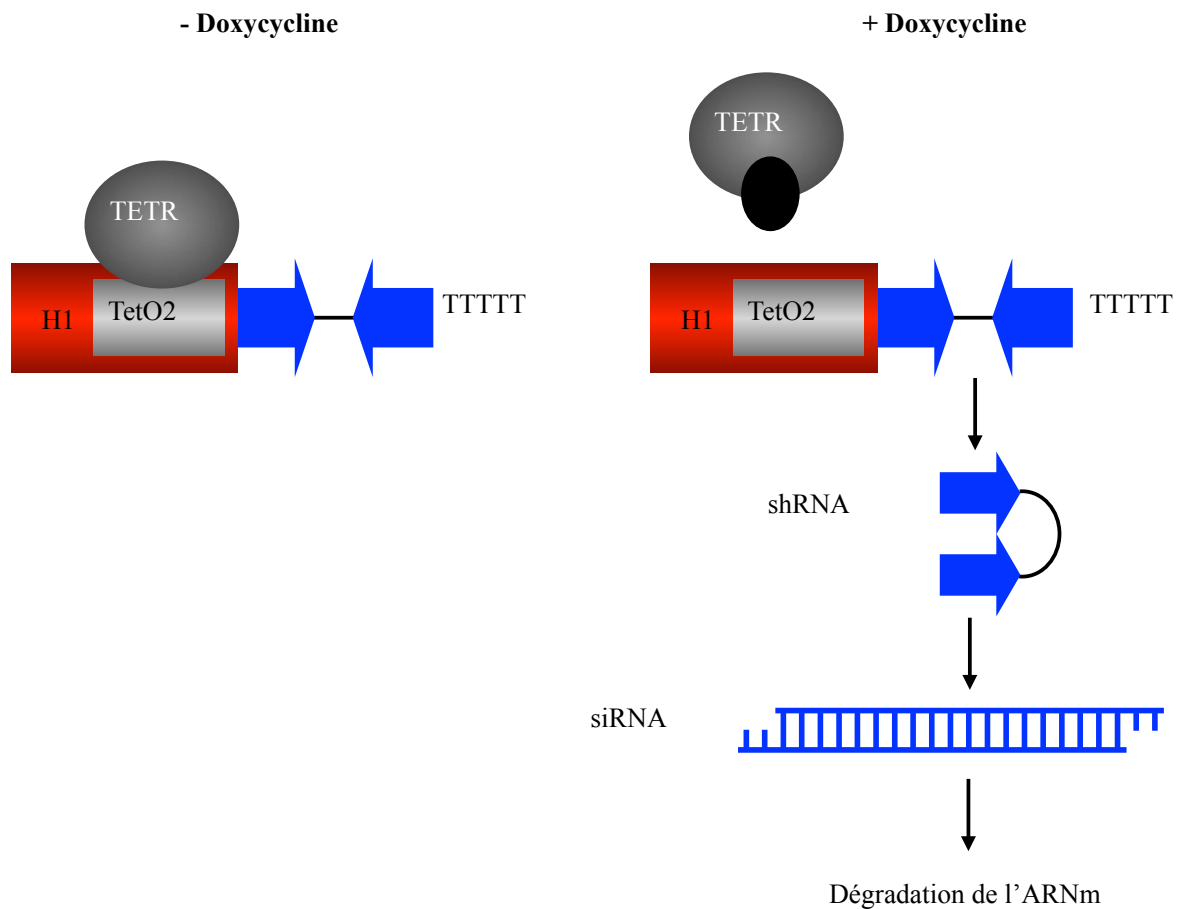


Figure 15 Représentation schématique du système d'expression inducible de shRNA.

La séquence codant le shARN (flèches bleues inversées répétées) est placée sous le contrôle d'un promoteur H1 dans lequel a été introduite la séquence TetO2. En absence de doxycycline (DOX), la protéine TETR se fixe sur la séquence TetO2, réprimant ainsi son activité (partie gauche). En présence de doxycycline (partie droite), celle-ci interagit avec la protéine TetR, l'empêchant de se fixer sur la séquence TetO2, ce qui permet la production des shRNA qui sont ensuite maturés en siRNA. TTTTTT = signal de fin de transcription de l'ARN polymérase III.

J'ai vérifié la fonctionnalité de ce système en mesurant par Western blot le taux de protéine FLI-1 des cellules NN10/TR parentales et des cellules NN10 #5 après deux jours de culture en présence ou en absence de doxycycline . Les résultats sont présentés sur la figure 16A. Le traitement par la doxycycline n'affecte pas le taux de protéine FLI-1 des cellules NN10/TR parentales (figure 16A : comparer puits 1 et 2). En revanche, le taux de protéine FLI-1 des cellules NN10 #5 est réduit de plus de 90 % après deux jours de traitement par la doxycycline (figure 16A : comparer puits 3 et 4). Ces résultats montrent que le système de répression inductible est fonctionnel dans les cellules NN10 et conduit à la répression de l'expression de *fli-1*.

J'ai donc utilisé le clone NN10 #5 afin de déterminer la contribution de FLI-1 au phénotype leucémique des cellules NN10.

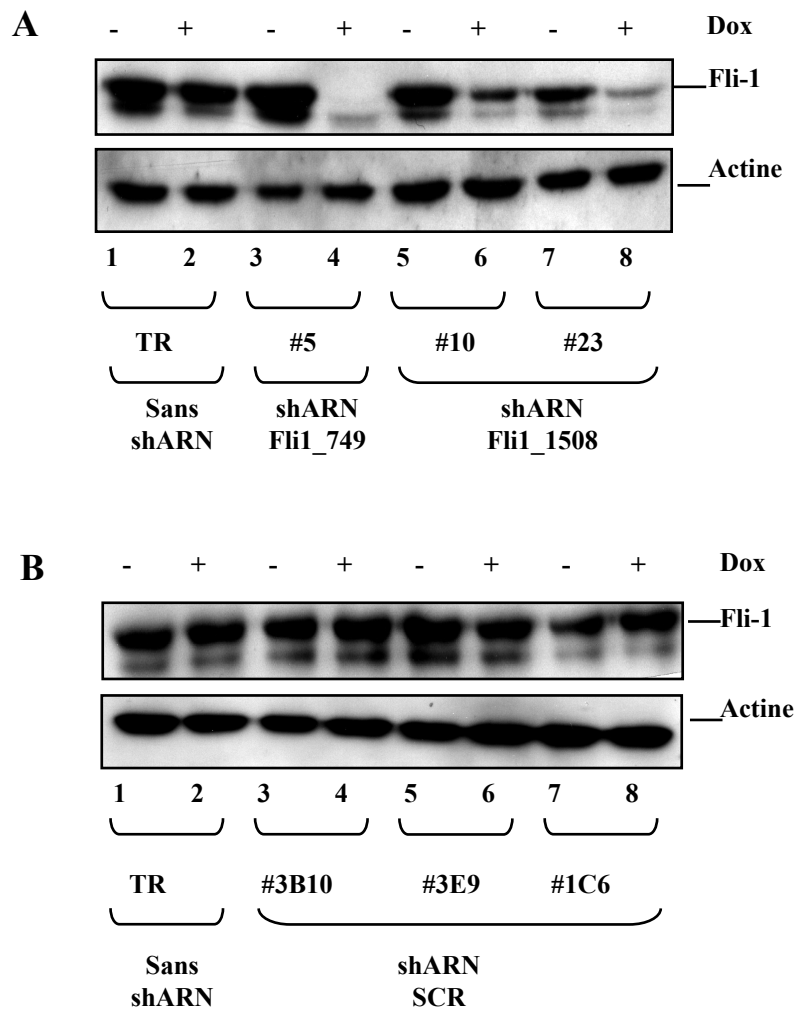


Figure 16 : Répression inducible de l'expression du gène *fli-1* dans les cellules NN10

Analyse en Western blot du taux de protéine FLI-1 dans des clones individuels après deux jours de culture en absence ou en présence de doxycycline (Dox).

A : Les cellules parentales NN10/TR (puits 1 et 2) et trois clones indépendants exprimant soit le shRNA Fli1-749 (puits 3 et 4) soit le shRNA Fli1-1508 (puits 5 à 8).

B : Les cellules parentales NN10/TR (puits 1 et 2) et trois clones choisis au hasard exprimant un shARN contrôle (SCR) (puits 3 à 8).

Les deux bandes révélées par l'anticorps anti-FLI-1 correspondent aux isoformes majeure (51 kDa) et mineure (48 kDa) de Fli-1. L'actine β est montrée au titre de contrôle de charge.

2- La répression de *fli-1* conduit à la mort, à l'arrêt de la prolifération et au blocage de la différenciation des cellules NN10 #5

J'ai testé l'effet de la répression de *fli-1* sur la survie, la prolifération et la différenciation des cellules NN10 #5 et NN10/TR cultivées pendant cinq jours en absence ou en présence de doxycycline. Les résultats sont présentés sur la figure 17.

2-1 L'absence de FLI-1 induit l'apoptose des cellules NN10 #5

J'ai mesuré la survie cellulaire par des comptages au bleu trypan. Le traitement par la doxycycline n'affecte pas la viabilité des cellules parentales NN10/TR (Figure 17B : partie droite). En revanche, nous pouvons constater que le traitement des cellules NN10 #5 conduit à l'apparition de cellules mortes dès trois jours de traitement (Figure 17B : partie gauche). Ces résultats montrent que le traitement des cellules NN10 #5 par la doxycycline conduit à leur mort.

Afin de déterminer si cette mort cellulaire correspond à de l'apoptose, j'ai mesuré le pourcentage de cellules hypodiploïdes (sub-G1) (**Figure 18A**) et le pourcentage de cellules marquées à l'annexine V par cytométrie de flux (**Figure 18B**). Nous pouvons observer que le traitement des cellules NN10 #5 pendant trois jours à la doxycycline conduit à une augmentation de ces deux paramètres. En revanche, le traitement similaire des cellules NN10/TR ne conduit à aucune différence significative entre les cellules traitées ou non traitées. Ces résultats indiquent que la mort des cellules NN10 #5 induite par le traitement par la doxycycline correspond à de l'apoptose.

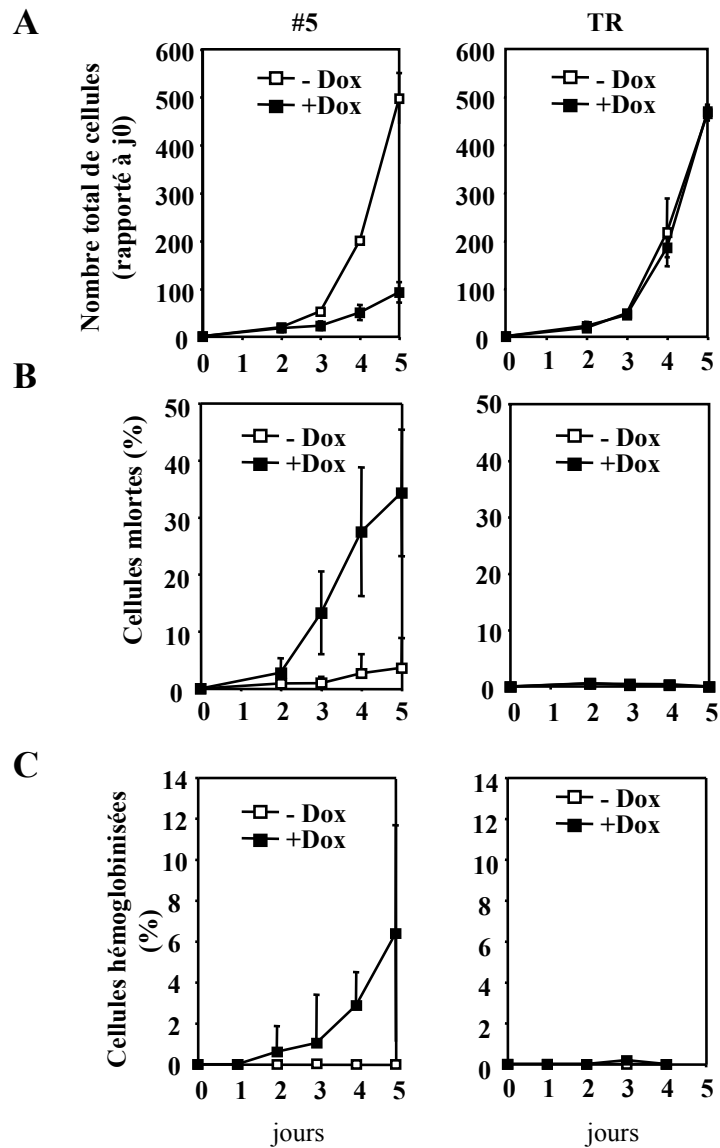


Figure 17 : Effet de la répression de FLI-1 sur la survie, la prolifération et la différenciation des cellules NN10

Les cellules NN10/TR et NN10 #5 ont été cultivées pendant cinq jours en absence (courbes à carrés blancs) ou en présence (courbes à carrés noirs) de doxycycline.

A : Evolution du nombre total de cellules

B : Evolution du pourcentage de cellules mortes déterminé par exclusion au bleu trypan.

C : Evolution du pourcentage de cellules hémoglobinisées déterminé par coloration à la benzidine.

Les valeurs et les écart-types de trois expériences indépendantes sont indiquées.

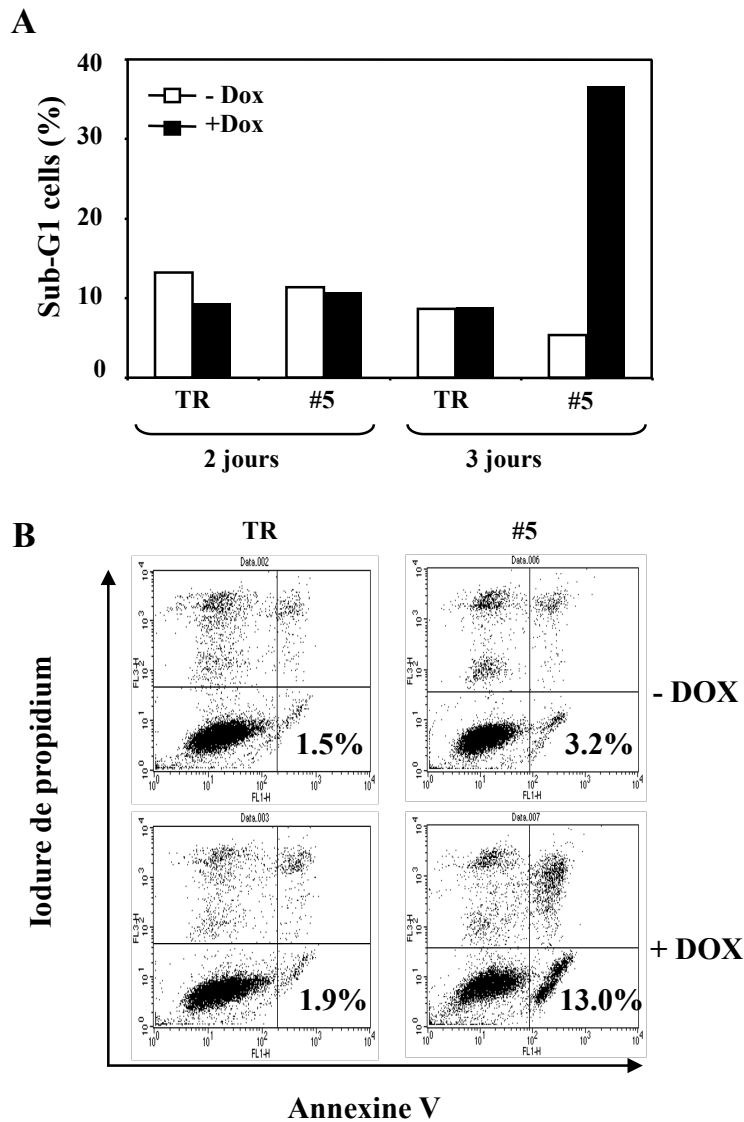


Figure 18 : La mort des cellules NN10 induite par l'absence de FLI-1 correspond à de l'apoptose

Les cellules NN10/TR et NN10 #5 ont été cultivées pendant trois jours en absence ou en présence de doxycycline.

A : Après deux et trois jours, le pourcentage de cellules hypodiploïdes (subG1) a été déterminé par cytométrie de flux après marquage à l'iodure de propidium.

B : Après trois jours, les cellules ont été marquées avec l'annexine V et l'iodure de propidium et le pourcentage de cellules apoptotiques annexine V positives/iodure de propidium négatives a été déterminé par cytométrie de flux.

Les résultats représentatifs de deux expériences indépendantes sont représentés.

Un des gènes cibles connus de FLI-1 est le gène codant la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Lesault et.al, 2000). J'ai donc entrepris de mesurer par RT-qPCR le taux de transcrits du gène *bcl-2* dans les cellules NN10/TR et NN10 #5 traitées ou non pendant deux jours par la doxycycline. Les résultats sont présentés sur le tableau 5. Le traitement par la doxycycline des cellules NN10/TR n'affecte pas le taux de transcrits du gène *bcl-2* (Tableau 5 : 1,16 en présence contre 1 en absence de doxycycline). En revanche, le même traitement des cellules NN10 #5 conduit à une réduction de 66 % de ce taux de transcrits (Tableau 5 : 0,34 en présence contre 1 en absence de doxycycline). Ces résultats indiquent que l'apoptose des cellules NN10 #5 observée après traitement par la doxycycline est corrélée à la réduction de l'expression du gène *bcl-2*.

Clone cellulaire		Nombre relatif de cellules ¹ Jour 4		Cellules mortes ¹ (%) Jour 3		Cellules benzidine positives ¹ (%) Jour 5		Rapport ARNm +Dox/-Dox ¹ Jour 2			
		- Dox	+ Dox	- Dox	+ Dox	- Dox	+ Dox	<i>Bcl2</i>	<i>Alas2</i>	<i>Ahsp</i>	<i>Globine alpha</i>
Sans shARN	TR	100	96.4 (17.6)	<3	<3	0	0	1.16 (0.12)	1.2	1.4	0.9 (0.78)
shARN SCR	3B10	100	110	<3	<3	0	0	ND	ND	ND	ND
	3E9	100	87	<3	<3	0	0	ND	ND	ND	ND
	1C6	100	98	<3	<3	0	0	ND	ND	ND	ND
shARN Fli1_749	5	100	30.8 (13.4)	1 (1.1)	13.2 (7.3)	0	6.4 (5.3)	0.34 (0.22)	3.2 (0.4)	2.7 (0.6)	12.5 (5)
shARN Fli1_1508	10	100	61	<3	15.7	0	4.8	ND	ND	ND	ND
	23	100	73	<3	11.8	0	2.8	ND	ND	ND	ND

Tableau 5 : Phénotype induit par la répression de *fli-1* dans les cellules NN10

¹: Moyennes et écart types (entre parenthèses) de trois expériences indépendantes. ND : Non déterminé. Les valeurs significatives sont écrites en gras sur fond gris.

2-2 L'absence de FLI-1 entraîne une réduction du nombre total de cellules

J'ai mesuré la prolifération par des comptages cellulaires. En présence de doxycycline, le nombre total de cellules NN10 #5 est réduit de 75% comparé à celui des cellules non traitées après cinq jours de traitement. En revanche, les cellules NN10/TR ayant subi le même traitement se comportent comme les cellules non traitées (**Figure 17A**). Ces résultats montrent que le traitement des cellules NN10 #5 par la doxycycline induit une réduction du nombre total de cellules. En revanche, une analyse du cycle cellulaire n'a pas mis en évidence d'accumulation de cellules NN10 #5 traitées par la doxycycline dans une phase particulière du cycle cellulaire (données non montrées).

2-3 L'absence de FLI-1 entraîne l'apparition de cellules hémoglobinisées

Enfin, j'ai mesuré la différenciation des cellules NN10 #5 par des comptages de cellules colorées à la benzidine. Ce réactif est oxydé par l'hème de l'hémoglobine. Le produit de cette oxydation colore en bleu les cellules produisant l'hémoglobine signant la différenciation érythrocytaire. Nous pouvons observer l'apparition de cellules colorées par la benzidine dès trois jours de traitement. Ainsi, après cinq jours de traitement, la proportion de cellules colorées est relativement faible (environ 6 %). Néanmoins, l'apparition de ces cellules est spécifique au traitement des cellules NN10 #5 tandis que les cellules NN10/TR restent incolores après le même temps de traitement (**Figure 17C**). Ces résultats indiquent que le

traitement par la doxycycline conduit à une hémoglobinisation d'une fraction des cellules NN10 #5.

La différenciation érythrocytaire est associée à l'activation de l'expression de certains gènes spécifiques comme *alas-2*, *ahsp* ou encore la *globine alpha*. J'ai donc entrepris de quantifier le taux de transcrits de ces gènes par des expériences de RT-qPCR. Le tableau 5 montre que le traitement des cellules NN10 #5 pendant deux jours induit l'augmentation du taux de transcrits de l'ensemble de ces gènes. En revanche, cette augmentation n'est pas observée dans les cellules NN10/TR ayant subi le même traitement. Ces résultats montrent que l'hémoglobinisation d'une fraction des cellules NN10 #5 induite par le traitement par la doxycycline est corrélée à l'activation de l'expression de gènes signant la différenciation érythrocytaire.

En conclusion de cette partie, l'absence de FLI-1 dans les cellules NN10 #5 induite par la doxycycline est corrélée à une apoptose, à la réduction du nombre total de cellules et à une reprise de leur différenciation. Ces résultats suggèrent une contribution de FLI-1 à la régulation de ces trois processus cellulaires.

1- Le phénotype observé en présence de doxycycline est spécifique de l'absence de FLI-1

L'expression de shARN dans les cellules eucaryotes peut avoir des effets non spécifiques indépendants de la répression de leur cible. Un de ces effets est une réponse à la détection d'ARN double brin qui conduit à la production d'interféron détectable par l'activation de gènes comme *oas1* et *ifit1* (Bridge et al., 2003 ; Jackson et al., 2003 ; Pebernard & Iggo, 2004 ; Sledz et al., 2003). Afin de tester cette réponse aspécifique, les

auteurs utilisant l'interférence par l'ARN ont recours à un shARN de séquence aléatoire qui ne cible aucun ARNm dans la cellule. J'ai donc entrepris d'exprimer de manière inductible par la doxycycline un shARN contrôle pour vérifier que les phénotypes observés en présence de doxycycline ne sont pas la conséquence d'une réponse de ce type. J'ai obtenu trois clones (#3B10, #3E9 et #1C6) à partir des cellules NN10/TR. Le traitement par la doxycycline de ces trois clones comme celui des cellules parentales n'affecte pas le taux de protéine FLI-1 (Figure 16B ; comparer puits 3 et 4, 5 et 6, 7 et 8). De plus, ce traitement n'induit aucun des phénotypes observés dans les cellules NN10 #5 traitées de la même manière (**Tableau 5**). De plus, l'analyse de l'expression des gènes *oas1* et *ifit1* par RT-qPCR a montré que ces gènes ne sont pas activés par la doxycycline dans les cellules NN10 #5 (données non montrées). Ces résultats indiquent que les phénotypes observés en présence de doxycycline ne sont pas la conséquence d'une réponse de type interféron ni d'un effet aspécifique lié à la production d'un shARN en tant que telle.

Un deuxième effet aspécifique est la répression d'une cible secondaire en plus de sa cible principale. J'ai testé la possibilité d'une telle réponse en analysant le phénotype de clones NN10 produisant un shARN dirigé contre une région différente de l'ARNm de *fli-1* de celle produite dans le clone NN10 #5. Les clones shfli-2 #10 et shfli-2 #23 obtenus par Gaëtan Juban et produisant ce shARN de manière inductible par la doxycycline meurent, cessent de proliférer et se différencient (**Tableau 5**). Ces phénotypes, moins marqués que ceux observés dans le clone NN10 #5, sont corrélés à une répression moindre de *fli-1* (Figure 16A ; comparer puits 5 et 6, 7 et 8 ainsi que 4 et 6, 4 et 8). La probabilité que deux shARN ciblent simultanément un autre ARNm que leur cible étant hautement improbable, ces résultats rendent également hautement improbable que les effets induits par les shARN Fli-1 ne soient pas dus à la réduction du taux de protéine FLI-1.

L'ensemble de ces résultats montre que l'apoptose, la réduction du nombre total de cellules et la reprise de la différenciation sont la conséquence de l'absence de FLI-1 et non d'un effet non spécifique de la production de shARN.

2- La réduction du nombre total de cellules en absence de FLI-1 est la conséquence d'un arrêt de prolifération

Les résultats précédents montrent donc que FLI-1 contribue à la survie et au blocage de la différenciation des cellules NN10 #5. En revanche, la réduction du nombre total de cellules en absence de FLI-1 pourrait être la conséquence de l'apoptose plus que le signe d'un arrêt de prolifération des cellules NN10 #5. Afin de tester cette hypothèse, j'ai entrepris de maintenir la survie de ces cellules en surexprimant le gène anti-apoptotique *bcl-2* humain. J'ai donc transfecté les cellules NN10 #5 avec un vecteur d'expression de la protéine BCL-2 humaine (donné par M. Moulin de l'équipe d'A.P. Arrigo, CGMC, Villeurbanne). J'ai ainsi obtenu le clone *bcl-2* #22 qui surexprime ce gène et qui conserve la répression de FLI-1 en réponse à la doxycycline (Figure 19A : comparer puits 5 et 6). J'ai ensuite mesuré le pourcentage de cellules mortes par des comptages au bleu trypan pour déterminer si la production de cette protéine permettait la survie de ce clone. Les cellules NN10 #5 et *bcl-2* #22 ont donc été cultivées pendant cinq jours en absence ou en présence de doxycycline. Les résultats sont présentés sur la figure 19C. Alors que le traitement des cellules NN10 #5 parentales par la doxycycline conduit à environ 40 % de cellules mortes, la proportion de cellules mortes après traitement similaire du clone *bcl-2* #22 n'excède pas 10 %. Ces résultats montrent donc que la production de la protéine BCL-2 humaine maintient la survie du clone *bcl-2* #22 en absence de FLI-1. J'ai mesuré en parallèle la prolifération de ce clone par des comptages cellulaires. Le graphique présenté sur la figure 19B montre que le traitement du clone *bcl-2* #22 comme

celui du clone parental NN10 #5 par la doxycycline conduit à une réduction du nombre total de cellules. Ces résultats montrent donc que la réduction du nombre total de cellules observée en absence de FLI-1 n'est pas la seule conséquence de l'apoptose des cellules NN10 #5.

L'ensemble de ces résultats montre que la protéine FLI-1 endogène contribue à la fois à la prolifération, à la survie et au blocage de la différenciation des cellules NN10 #5.

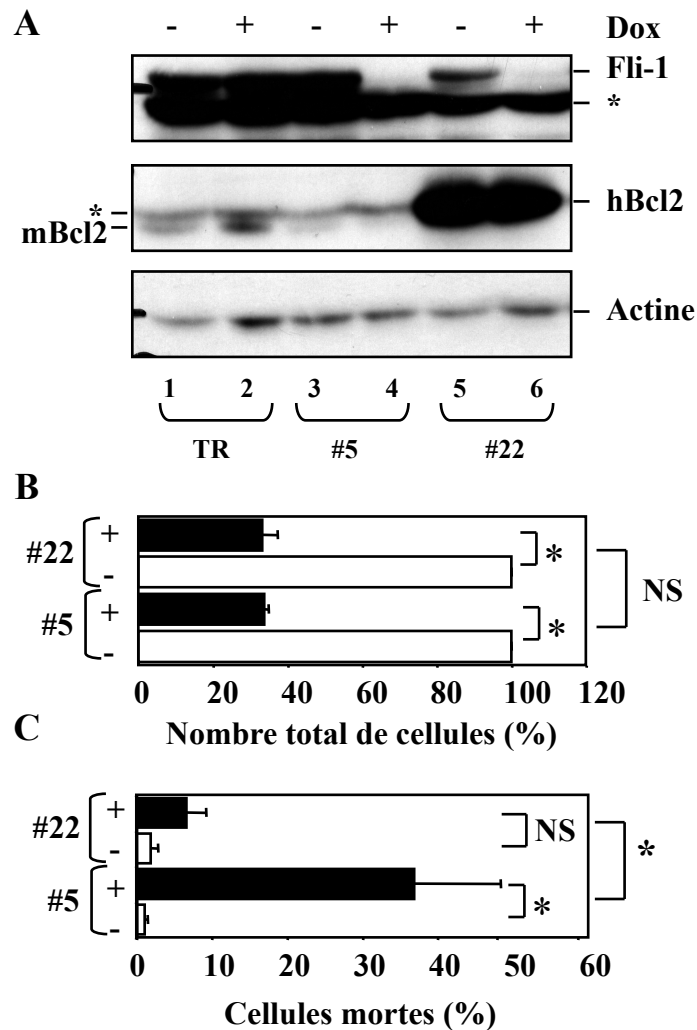


Figure 19 : L'absence de FLI-1 conduit à un arrêt de prolifération indépendamment de l'apoptose

Les cellules NN10 #5 (#5) et les cellules bcl-2 #22 (#22) ont été cultivées pendant cinq jours en absence ou en présence de doxycycline avant analyse .

A : Analyse par Western blot des protéines FLI-1, BCL-2 humaine (hBcl-2) et BCL-2 murine (mBcl-2). L'actine est montrée en tant que contrôle de charge. * : bandes non spécifiques

B : Nombre total de cellules (exprimé en pourcentage du nombre total de cellules non traitées) en absence (barres blanches) ou en présence (barres noires) de doxycycline.

C : Pourcentage de cellules mortes déterminé par bleu trypan en absence (barres blanches) ou en présence (barres noires) de doxycycline.

Les valeurs et les écart-types de trois expériences indépendantes sont présentés. ~~123~~ différences significatives ($p < 0,05$) et non significatives sont respectivement indiquées par une astérisque et par NS.

B) FLI-1 et SPI-1 ont des contributions additives dans les cellules 745A

1- L'absence de FLI-1 accélère la différenciation et l'arrêt de la prolifération et conduit à l'apoptose des cellules 745A #44 traitées à l'HMBA

Le facteur FLI-1 est également produit dans la lignée SFFV 745A qui présente une intégration provirale en amont du gène *spi-1* conduisant à sa surexpression. Dans ce cas, l'expression de *fli-1* est activée par le facteur SPI-1 (Starck et al., 1999). Afin de déterminer la contribution de FLI-1 dans ces cellules, Gaëtan Juban a obtenu le clone 745A #44 qui comme le clone NN10 #5 produit des shARN dirigés contre l'ARNm du gène *fli-1* en réponse à la doxycycline. Le traitement des cellules 745A #44 par la doxycycline conduit à la réduction de plus de 90 % du taux de protéine FLI-1 (figure 20A : comparer puits 3 et 4) tandis que le même traitement n'a aucun effet sur celui des cellules 745A/TR parentales qui n'expriment pas les shARN (figure 20A : comparer puits 1 et 2). Le clone 745A #1 a également été dérivé à partir des cellules 745A/TR et exprime un shARN ciblant une région de l'ARNm du gène *fli-1* différente de celle des cellules 745A #44. L'expression de ce shARN après traitement par la doxycycline conduit à une réduction du taux de protéine FLI-1 moins importante que celle observée dans les cellules 745A #44 (figure 20A : comparer puits 5 et 6 puits 4 et 6).

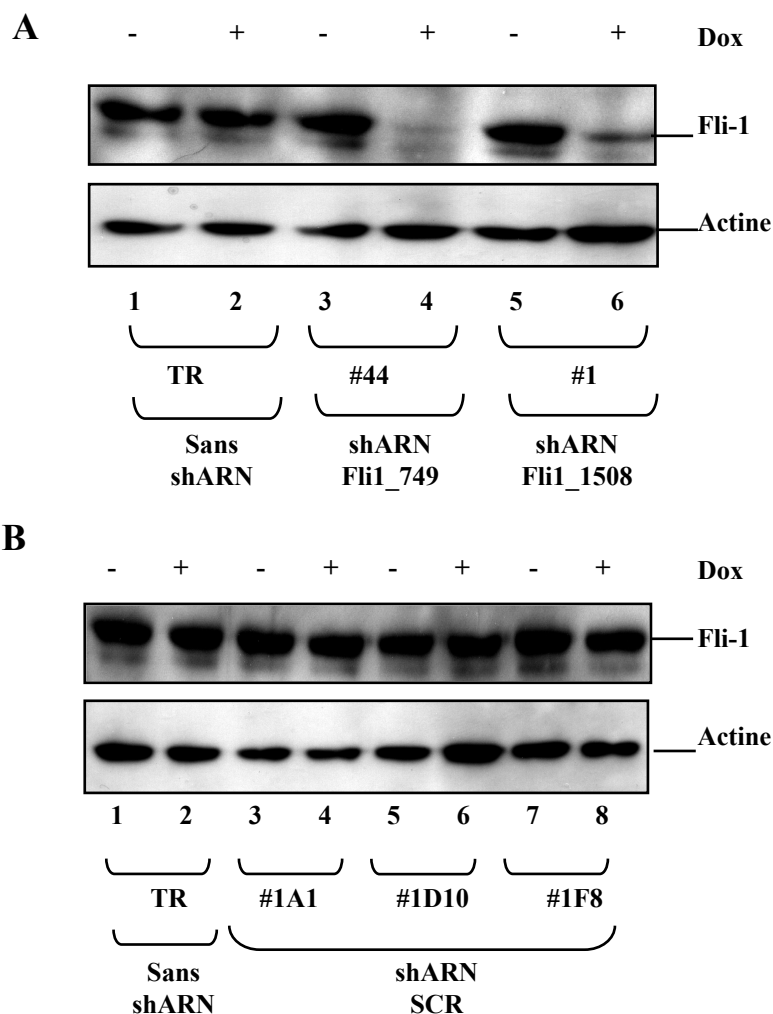


Figure 20 : Répression inducible de l'expression du gène *fli-1* dans les cellules 745A

Analyse en Western blot du taux de protéine FLI-1 dans des clones individuels après deux jours de culture en absence ou en présence de doxycycline (Dox).

A : Les cellules parentales 745A/TR (puits 1 et 2) et deux clones indépendants exprimant soit le shARN Fli1-749 (puits 3 et 4) soit le shARN Fli1-1508 (puits 5 et 6).

B : Les cellules parentales 745A/TR (puits 1 et 2) et trois clones choisis au hasard exprimant un shARN contrôle (SCR) (puits 3 à 8).

Les cellules 745A #44 et 745A #1 ont donc été utilisées pour déterminer la contribution de FLI-1 dans les cellules 745A. Ces cellules ainsi que les cellules 745A/TR ont été cultivées pendant deux jours en présence ou en absence de doxycycline puis replantées soit dans du milieu semi-solide soit dans du milieu liquide (**Figure 21A et données non montrées**). Nous pouvons constater que le traitement par la doxycycline des cellules 745A/TR n'affecte pas leur clonogénicité. En revanche, le traitement similaire des cellules 745A #44 conduit à une réduction d'environ 50 % du nombre de colonies (figure 21A : comparer puits 3 et 4). La répression moins importante de FLI-1 dans les cellules 745A #1 conduit également à une réduction bien que plus faible (environ 20%) de leur nombre de colonies (figure 21A : comparer colonnes 5 et 6). Ces données montrent que l'absence de FLI-1 réduit la clonogénicité des cellules 745A. Contrairement à ce qui était attendu, l'absence de FLI-1 à elle seule (en présence de SPI-1) n'induit pas une reprise de la différenciation ni une mortalité cellulaire des cellules 745A #44 et 745A #1. Cette absence de phénotype en culture liquide pourrait traduire une redondance fonctionnelle entre SPI-1 et FLI-1 au niveau du contrôle de la différenciation et de la survie de ces cellules.

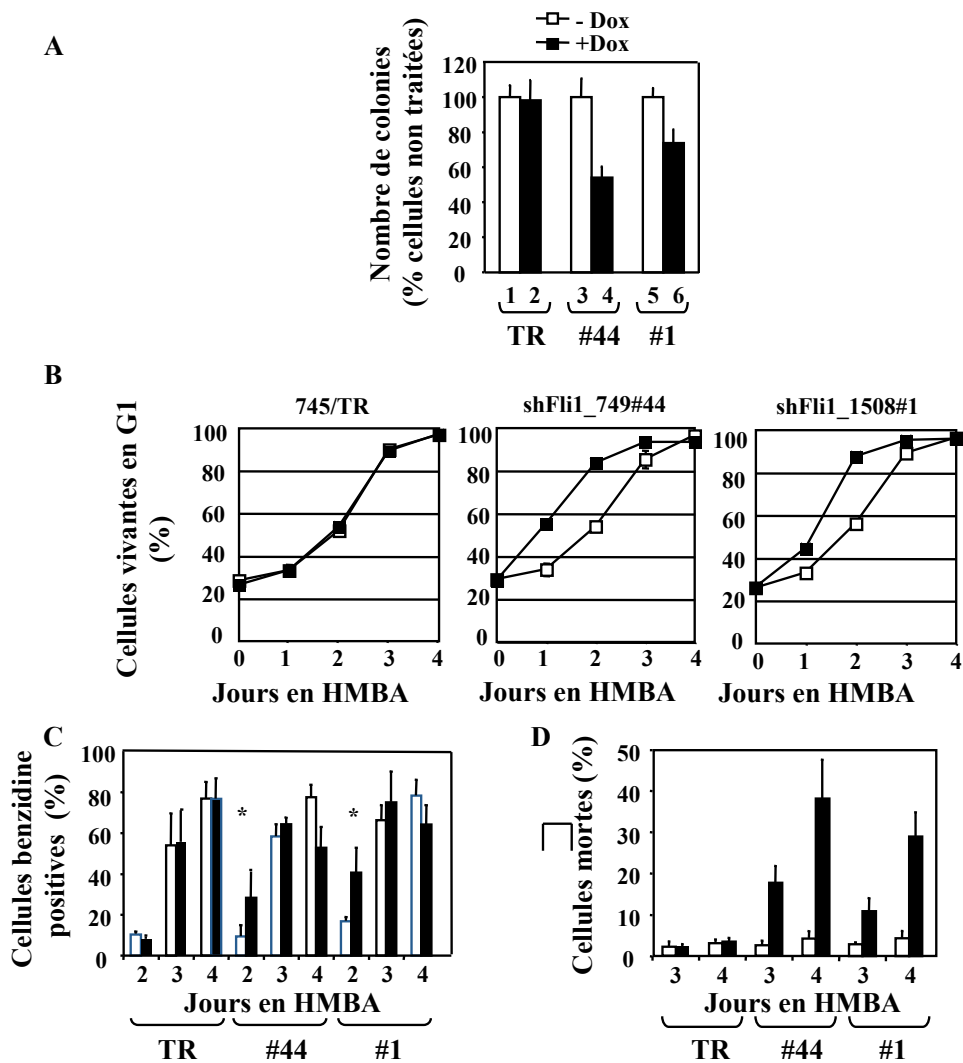


Figure 21 : Effets de la répression de FLI-1 dans les cellules 745A

Les cellules 745A/TR, 745A #44 (shFli1_749 #44) et 745A #1 (shFli1_1508 #1) ont été cultivées pendant deux jours en absence ou en présence de doxycycline puis de nouveau cultivées pendant deux jours soit dans du milieu semi-solide soit dans du milieu liquide supplémenté par 5 mM HMBA pour induire leur différenciation.

A : Nombre relatif de colonies obtenu dans du milieu semi-solide.

B : Evolution du pourcentage de cellules viables en phase G1.

C : Evolution du pourcentage de cellules différenciées (coloration à la benzidine) produisant de l'hémoglobine

D : Evolution du pourcentage de cellules mortes (positives au bleu trypan).

Les moyennes et les écart types pour chaque paramètre obtenus à partir de trois expériences indépendantes sont présentés. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$ après test de Student pairé) sont indiquées par une astérisque.

Les cellules 745A peuvent être induites à se différencier par l'HMBA (HexaMethylene BisAcetamide). Cette différenciation est associée à la réduction du taux de protéine SPI-1. Afin de déterminer la contribution de FLI-1 sur la différenciation et l'arrêt de prolifération induits par l'HMBA, les cellules 745A #44, 745A #1 et 745A/TR ont été cultivées pendant deux jours à la doxycycline puis quatre autres jours dans du milieu supplémenté avec de l'HMBA. La cinétique de différenciation a été mesurée par l'augmentation de la proportion de cellules en phase G1 du cycle cellulaire (**Figure 21B**) et par l'augmentation du pourcentage de cellules colorées à la benzidine (**Figure 21C**). Nous pouvons constater que dès deux jours de traitement par l'HMBA, le traitement combiné à la doxycycline augmente la proportion de cellules 745A #44 en phase G1 (graphique du milieu de la figure 21B) (environ 55 % en absence contre plus de 80 % en présence de doxycycline) et des cellules 745A #1 (graphique de droite de la figure 21B) (environ 60 % en absence contre environ 90 % en présence de doxycycline). Le traitement similaire des cellules 745A/TR ne conduit en revanche pas aux mêmes effets. La proportion de cellules colorées à la benzidine est également augmentée après deux jours de traitement des cellules 745A #44 (Figure 21C : environ 10 % de cellules colorées à la benzidine en absence contre environ 30 % en présence de doxycycline) et 745A #1 (environ 20 % en absence contre environ 40 % en présence de doxycycline). Ces résultats montrent que l'absence de FLI-1 accélère la différenciation et l'arrêt de prolifération des cellules 745A induits par l'HMBA. Cette accélération de la différenciation est associée à une augmentation plus importante du taux de transcrits des gènes de différenciation érythrocytaire *alas-2*, *ahsp* et *globine alpha* (**Tableau 6**).

Clone cellulaire		Nombre relatif de colonies ¹		Cellules mortes ¹ (%) 4 jours en HMBA		Cellules colorées à la benzidine ¹ (%) 2 jours en HMBA		Rapport ARNm + Dox/- Dox ¹ 2 jours en HMBA			
		- Dox	+ Dox	- Dox	+Dox	- Dox	+ Dox	<i>Bcl2</i>	<i>Alas2</i>	<i>Ahsp</i>	α globin
Sans shARN	TR	100	98 (11.7)	3.1 (0.9)	3.4 (0.7)	10.3 (1.1)	7.9 (0.9)	1 (0.1)	0.82 (0.20)	0.87 (0.28)	1 (0.3)
shARN SCR	1A1	100	94.8 (26.3)	<3	<3	11 (2.1)	5.7 (4.6)	ND	ND	ND	ND
	1D10	100	112.0 (28.9)	<3	<3	8.6 (1.7)	7.1 (3.1)	ND	ND	ND	ND
	1F8	100	90.0 (30.2)	<3	<3	7.4 (4.9)	5.9 (2.9)	ND	ND	ND	ND
shARN Fli1_749	44	100	54.1 (6.1)	4.2 (1.7)	38.0 (9.2)	9.2 (4.5)	28.2 (10.5)	1,1 (0,1)	4.9 (2.1)	3.4 (1.1)	2.3 (0.7)
shARN Fli1_1508	1	100	73.8 (7.7)	4.2 (1.7)	28.8 (5.7)	16.8 (1.5)	40.5 (9.9)	1,2 (0,2)	ND	ND	2,7 (0,1)

Tableau 6 : Phénotype induit par la répression de *fli-1* dans les cellules 745A

¹: Moyennes et écart types (entre parenthèses) de trois expériences indépendantes.

ND : Non déterminé. Les valeurs significatives sont écrites en gras sur fond gris.

En parallèle, la survie des cellules a été mesurée par des comptages au bleu trypan après trois et quatre jours de traitement par l'HMBA. Les résultats sont présentés sur la figure 21D. Alors que le traitement simultané des cellules 745A/TR par l'HMBA et par la doxycycline n'affecte pas leur viabilité, nous pouvons observer l'apparition de cellules mortes après trois jours du même traitement des cellules 745A #44 (moins de 5 % en absence contre environ 20 % en présence de doxycycline) et 745A #1 (moins de 5 % en absence contre environ 15 % en présence de doxycycline). Ces résultats indiquent que l'absence de FLI-1 conduit à la mort des cellules 745A. Des marquages à l'annexine V et la mesure du pourcentage de cellules hypodiploïdes sont présentés sur la figure 22. Nous pouvons constater que contrairement aux cellules 745A/TR, le traitement combiné des cellules 745A #44 et 745A #1 par l'HMBA et par la doxycycline conduit à une augmentation de la proportion de cellules hypodiploïdes dès

trois jours après ajout de l'HMBA (**Figure 22A**). De la même manière, le traitement des cellules 745A #44 par l'HMBA et par la doxycycline conduit à une augmentation du pourcentage de cellules marquées par l'annexine V contrairement aux cellules contrôles (**Figure 22B**). Ces résultats montrent donc que la mort cellulaire observée en absence de FLI-1 et SPI-1 correspond à une apoptose.

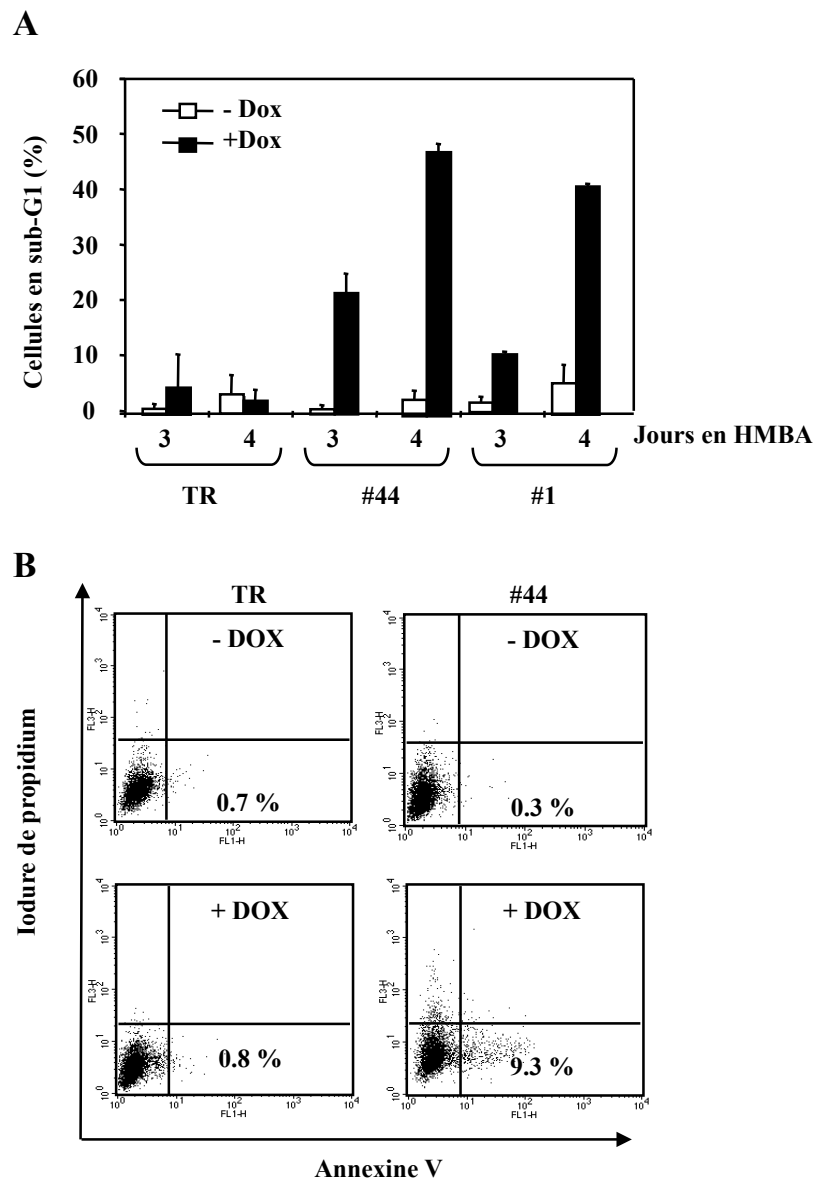


Figure 22 : La mort des cellules 745A induite par l'absence de FLI-1 correspond à de l'apoptose

Les cellules 745A/TR, 745A #44 et 745A #1 ont été cultivées pendant deux jours en absence ou en présence de doxycycline puis la différenciation a été induite par l'ajout de 5 mM HMBA pendant trois et quatre jours avant analyse.

A : Après trois et quatre jours, le pourcentage de cellules hypodiploïdes (subG1) a été déterminé par cytométrie de flux après marquage à l'iodure de propidium.

B : Deux jours après l'addition d'HMBA, les cellules ont été marquées avec l'annexine V et l'iodure de propidium et le pourcentage de cellules apoptotiques annexine V positives/iodure de propidium négatives a été déterminé par cytométrie de flux.

Les résultats représentatifs de deux expériences indépendantes sont représentés.

Afin de tester la spécificité de ces phénotypes, j'ai obtenu trois clones 745A exprimant de manière inductible un shARN de séquence aléatoire. L'expression de ce shARN n'a aucun effet sur le taux de protéine FLI-1 (**Figure 20B** ; comparer puits 3 et 4, 5 et 6 et 7 et 8). D'autre part, aucun des phénotypes mentionnés précédemment n'a été observé dans ces clones (**Tableau6**). Ces résultats montrent donc que l'accélération de la différenciation, de l'arrêt de prolifération et l'apoptose observés en présence de doxycycline sont spécifiques de l'absence de FLI-1.

L'ensemble de ces résultats montre donc que FLI-1 contribue à la fois à la prolifération, à la survie et au blocage de la différenciation des cellules 745A.

1- Contributions additives de FLI-1 et SPI-1

Les résultats précédents suggèrent également que FLI-1 et SPI-1 ont des contributions additives aux phénotypes des cellules 745A #44. Afin de tester cette hypothèse, j'ai entrepris de réprimer de manière plus spécifique l'expression de *spi-1* dans les cellules 745A #44. Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours en présence ou en absence de doxycycline puis transfectées ou pas toutes les 12 h pendant deux jours soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de la *luciférase* (siLUC) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de *spi-1* (siSPI). J'ai dans un premier temps vérifié par Western blot que le taux de protéine SPI-1 était réduit 60 h après la première transfection. Les résultats sont présentés sur la figure 23A. Comme nous pouvons le voir, la transfection des cellules 745A #44 avec les siLUC n'affecte pas le taux de protéine SPI-1 (figure 23A : comparer puits 1 et 2, 4 et 5). En revanche, nous pouvons observer une réduction de plus de 90 % du taux de protéine SPI-1 après transfection des cellules 745A #44 avec les siSPI (figure 23A : comparer puits 1 et 3, 2 et 3, 4 et 6 et 5 et 6).

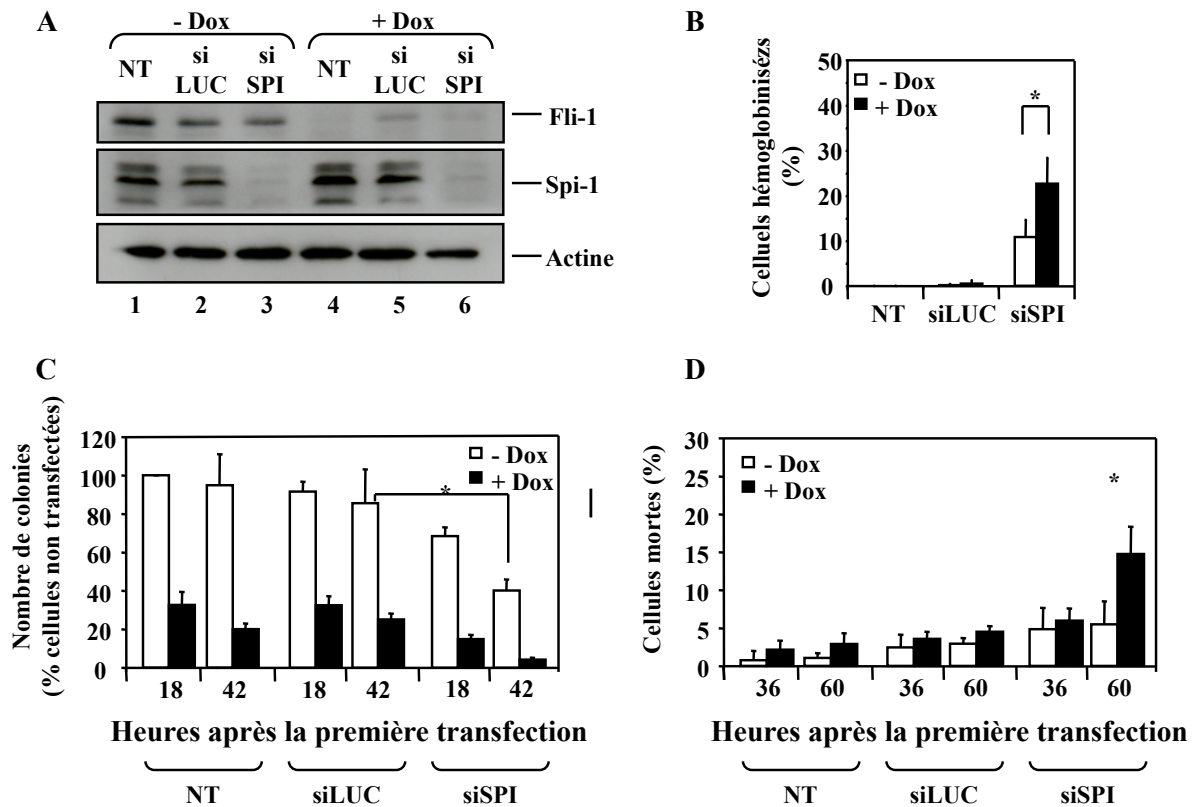


Figure 23 : Effets additifs de l'absence de FLI-1 et SPI-1 dans les cellules 745A.

Les cellules 745A #44 ont été cultivées en présence ou en absence de doxycycline pendant deux jours. Les cellules ont ensuite été transfectées ou non (NT) toutes les 12 h pendant deux jours soit avec des siARN contrôles dirigés contre l'ARNm de la luciférase (siLUC) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de *spi-1* (siSPI).

A : Analyse en Western blot des taux de protéine FLI-1 et SPI-1 réalisée 60 h après la première transfection. L'actine β est montrée en tant que contrôle de charge.

B : Le pourcentage de cellules colorées à la benzidine a été déterminé 60 h après la première transfection.

C : La clonogénicité a été déterminée comme sur la figure 21A.

D : Pourcentage de cellules mortes (positives au bleu trypan).

Les résultats présentés en B, C et D représentent les moyennes et les écart-types de trois expériences indépendantes. Les astérisques représentent les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$ pour un test de Student pairé).

J'ai ensuite testé l'effet de cette répression sur la différenciation, la survie et la clonogénicité des cellules 745A #44 avec ou sans FLI-1. Comme nous pouvons le constater, la répression de *spi-1* par siARN conduit à l'apparition d'environ 10 % de cellules hémoglobinisées (**Figure 23B**) et à la réduction d'environ 50% du nombre de colonies

(**Figure 23C**) mais n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire (**Figure 23D**). La répression simultanée de *fli-1* et de *spi-1* conduit à une augmentation d'environ 25% de la proportion de cellules hémoglobinisées, à une réduction plus prononcée du nombre de colonies (moins de 10 % du nombre de colonies des cellules non transfectées contre environ 40 % dans les cellules non traitées en absence de SPI-1). De plus, nous pouvons observer une augmentation de mortalité des cellules 745A #44 60 h après la première transfection (15% de cellules mortes contre au plus 5 % dans les autres conditions). Les cellules transfectées avec les siLUC se comportent comme les cellules non transfectées. Ces résultats reproduisent donc les résultats obtenus avec l'HMBA, hormis le blocage des cellules en phase G1 qui semble être spécifique de l'HMBA.

L'ensemble de ces résultats montre donc que FLI-1 et SPI-1 contribuent de manière additive à la survie, à la prolifération et à la différenciation des cellules 745A #44.

II- Identification de gènes cibles directs communs à FLI-1 et à SPI-1

A) Identification de gènes cibles directs communs à FLI-1 et SPI- impliqués dans la biogenèse des ribosomes dans les cellules 745A #44

1- Analyse du transcriptome des cellules 745A #44

FLI-1 et SPI-1 sont deux facteurs de transcription de la famille ETS et reconnaissent la même séquence consensus minimale GGAA. Par conséquent, ils pourraient réguler des gènes cibles communs. Nous avons émis l'hypothèse que les contributions additives de FLI-1 et SPI-1 pourraient être la conséquence de la régulation de tels gènes. Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé une puce arborant 17106 ADNc pour réaliser le profil d'expression des

ARN des cellules 745A #44 cultivées pendant deux jours en absence ou en présence de doxycycline puis un jour en présence ou en absence d'HMBA (travaux réalisés dans le cadre du projet CIT3 de la Ligue Nationale Contre le Cancer). Nous avons ainsi pu identifier deux groupes de gènes qui sont activés ou réprimés d'au moins deux fois par l'HMBA et qui sont encore plus activés ou réprimés par la doxycycline. La liste de ces gènes est présentée sur les tableaux 7 et 8.

Nom commun ³	UniGene Cluster ID	Fold HMBA ¹	P-HMBA	Fold Dox ²	P-Dox
Rse6	Mm.103835	0.11	0.005	0.36	0.035
Sdccag1	Mm.46705	0.21	0.005	0.58	0.007
Imp4	Mm.291745	0.22	0.002	0.50	0.004
Phlda2	Mm.334344	0.23	0.026	0.69	0.029
Nfya	Mm.4929	0.24	0.001	0.54	0.003
Igf2	Mm.3862	0.26	0.000	0.55	0.000
Kcnn4	Mm.9911	0.26	0.004	0.49	0.018
Mif	Mm.2326	0.26	0.000	0.68	0.037
Psm12	Mm.21667	0.26	0.002	0.32	0.000
Rcl1	Mm.28630	0.26	0.005	0.33	0.014
Rcl1	Mm.28630	0.26	0.012	0.38	0.016
Ldha	Mm.29324	0.27	0.002	0.68	0.013
Rpl18	Rn.484	0.27	0.016	0.51	0.045
Edg5	Mm.46493	0.28	0.036	0.50	0.035
Wdr4	Mm.143771	0.28	0.002	0.61	0.023
KIAA1285	Hs.38512	0.29	0.000	0.42	0.001
Ddx21	Mm.25264	0.30	0.000	0.59	0.000
Ppp1r14b	Mm.140	0.30	0.000	0.66	0.007
Hif3a	Mm.135110	0.31	0.002	0.51	0.012
Hprt1	Mm.299381	0.31	0.001	0.49	0.008
2810007J24Rik	Mm.290727	0.32	0.001	0.48	0.003
Cct6a	Mm.153159	0.32	0.002	0.64	0.024
Eif4b	Mm.290022	0.32	0.002	0.53	0.003
Gpi1	Mm.390025	0.32	0.024	0.47	0.047
Hist1h2ao	Mm.250564	0.32	0.003	0.66	0.042
Myc	Mm.2444	0.32	0.000	0.63	0.008
Tgfb1	Mm.248380	0.32	0.006	0.59	0.032
Sept9	Mm.38450	0.33	0.000	0.68	0.006
Eif4b	Mm.290022	0.33	0.009	0.54	0.042
Nolc1	Mm.78861	0.33	0.015	0.56	0.097
Psm12	Mm.21667	0.33	0.006	0.48	0.018
2310056P07Rik	Mm.212991	0.34	0.002	0.68	0.037
CARD11	Hs.300355	0.34	0.003	0.57	0.005
Ccl3	Mm.1282	0.34	0.002	0.39	0.004
Jag2	Mm.186146	0.34	0.003	0.66	0.009
Tubb5	Mm.422888	0.34	0.009	0.63	0.046
Ddx21	Mm.25264	0.35	0.004	0.60	0.010
Hprt1	Mm.299381	0.35	0.004	0.49	0.009
Npm1	Mm.6343	0.35	0.006	0.73	0.239
Rpo1-3	Mm.317557	0.35	0.000	0.64	0.034
4921537D05Rik	Mm.296971	0.36	0.002	0.70	0.040
Gnb2l1	Mm.5305	0.36	0.003	0.72	0.025
Smarcc1	Mm.85410	0.36	0.013	0.41	0.012
Syncrip	Mm.260545	0.36	0.000	0.72	0.032
Sept9	Mm.38450	0.37	0.003	0.68	0.046
Ddx24	Mm.3935	0.37	0.033	0.51	0.012
Fytd1	Mm.12831	0.37	0.000	0.67	0.042
Nhp2l1	Mm.299312	0.37	0.001	0.58	0.017

Nolc1	Mm.78861	0.37	0.047	0.65	0.123
Npm1	Mm.6343	0.37	0.023	0.85	0.303
Pde4dip	Mm.129840	0.37	0.043	0.60	0.018
Rcc2	Mm.253	0.37	0.002	0.72	0.039
HNRPL	Hs.589594	0.38	0.001	0.61	0.001
Impdh2	Rn.8093	0.38	0.001	0.65	0.014
Mcm7	Mm.241714	0.38	0.005	0.63	0.003
Nip7	Mm.334789	0.38	0.002	0.66	0.000
sp	Mm.257181	0.38	0.000	0.60	0.004
Tomm7	Mm.291868	0.38	0.004	0.46	0.004
5033413D16Rik	Mm.34859	0.39	0.004	0.62	0.028
5033413D16Rik	Mm.34859	0.39	0.013	0.64	0.028
Ogn	Mm.4258	0.39	0.003	0.54	0.010
Tcl1b1	Mm.241933	0.39	0.017	0.43	0.035
Triap1	Mm.27951	0.39	0.003	0.45	0.015
Dapk2	Mm.335252	0.40	0.006	0.48	0.008
Hspa8	Mm.290774	0.40	0.001	0.75	0.020
Mak3	Mm.278726	0.40	0.022	0.55	0.038
Myc	Mm.2444	0.40	0.002	0.66	0.016
Ptgir	Mm.287572	0.40	0.029	0.57	0.005
Rbbp7	Mm.270186	0.40	0.004	0.52	0.014
Tnfrsf1b	Mm.235328	0.40	0.004	0.66	0.027
Tpi1	Mm.4222	0.40	0.001	0.64	0.013
Pld2	Mm.260177	0.42	0.021	0.45	0.045
Snord22	Mm.292489	0.42	0.009	0.65	0.004
2810026P18Rik	Mm.21798	0.43	0.003	0.72	0.033
ARPC2	Hs.529303	0.44	0.004	0.67	0.006
EIF4G1	Hs.433750	0.44	0.010	0.63	0.047
Mapk6	Mm.18856	0.44	0.000	0.68	0.004
Pus7	Mm.58660	0.44	0.007	0.64	0.037
U2af1-rs2	Mm.180953	0.44	0.022	0.54	0.038
Cdc2a	Mm.281367	0.45	0.022	0.48	0.034
Foxp4	Mm.240062	0.45	0.016	0.57	0.049
Hrc	Mm.39968	0.45	0.001	0.76	0.039
Ndn12	Mm.19944	0.45	0.045	0.66	0.011
Nfatc3	Mm.383185	0.45	0.002	0.64	0.039
Nol6	Mm.285797	0.45	0.037	0.46	0.037
Rbbp7	Mm.270186	0.45	0.021	0.54	0.036
Snrpb	Mm.88216	0.45	0.001	0.56	0.002
2010305A19Rik	Mm.28354	0.46	0.007	0.66	0.046
Bmpr1b	Mm.39089	0.46	0.023	0.48	0.046
Ccnb1	Mm.260114	0.46	0.014	0.59	0.048
Hspe1	Rn.106093	0.46	0.001	0.73	0.003
Pdss1	Mm.249752	0.46	0.026	0.61	0.004
Ptcd1	Mm.277413	0.46	0.026	0.55	0.046
Rab18	Rn.53248	0.46	0.002	0.58	0.020
Trappc5	Mm.29090	0.46	0.045	0.70	0.040
Zfp26	Mm.107441	0.46	0.011	0.57	0.030
Zfp3612	Rn.22055	0.46	0.018	0.57	0.032
Asb2	Mm.27159	0.47	0.001	0.64	0.020
Chd1	Mm.8137	0.47	0.048	0.53	0.044

Mbd2	Mm.322	0.48	0.009	0.61	0.026
Nola2	Mm.28203	0.48	0.000	0.70	0.002
Rbbp7	Mm.270186	0.48	0.024	0.55	0.044
Rnf26	Mm.303115	0.48	0.000	0.69	0.010
2610204K14Rik	Mm.241472	0.49	0.006	0.69	0.001
D730048J04Rik	Mm.17626	0.49	0.010	0.50	0.009
Ethe1	Mm.29553	0.49	0.016	0.51	0.028
Gcn5l2	Mm.218837	0.49	0.001	0.67	0.028
Rab18	Rn.53248	0.49	0.005	0.67	0.033
Spats2	Mm.276650	0.49	0.012	0.54	0.002
Tcp1	Mm.32019	0.49	0.005	0.68	0.039
Fads2	Mm.38901	0.50	0.010	0.64	0.004
Mbd2	Mm.322	0.50	0.028	0.71	0.040
Sfrs2	Mm.21841	0.50	0.012	0.68	0.025

Tableau 7 : Listes des gènes réprimés par l'HMBA et/ou la doxycycline

1 : Ratio + HMBA – DOX/ - HMBA - DOX

2 : Ratio + HMBA + DOX/ +HMBA – DOX

3 : Les gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes ou codant des snoARN sont indiqués en vert ou en jaune respectivement

P-HMBA et P-DOX correspondent à la p-value des différences observées entre les conditions +/- HMBA (P-HMBA) ou +/- doxycycline (P-DOX) à partir de quatre mesures indépendantes pour chaque condition (deux expériences indépendantes analysées chacune sur deux puces).

Nom commun ³	UniGene Cluster ID	Fold HMBA ¹	P-HMBA	Fold Dox ²	P-Dox
Hba-a1	Mm.196110	6.93	0.003	1.48	0.032
Hba-a1	Mm.196110	6.90	0.001	1.43	0.027
Alas2	Mm.302724	6.67	0.007	2.10	0.026
Runx1	Mm.4081	6.42	0.001	1.47	0.033
Ppp1r1b	Mm.45372	5.99	0.006	2.31	0.040
Phf1	Mm.385178	5.65	0.000	1.51	0.007
Btg2	Mm.239605	5.43	0.003	2.35	0.006
Wwp1	Mm.78312	4.94	0.000	1.58	0.002
Slc2a4	Mm.10661	4.88	0.001	1.50	0.017
Tsc22d1	Mm.153272	4.51	0.003	1.99	0.041
Stam2	Mm.263639	4.44	0.001	1.48	0.024
Adam15	Mm.274049	4.31	0.018	2.92	0.004
Cd200	Mm.245851	4.28	0.003	1.43	0.043
Lrrc49	Mm.269413	4.22	0.001	2.11	0.005
Rnf113a2	Mm.24846	4.17	0.050	2.44	0.046
2310021P13Rik	Mm.275082	4.13	0.003	1.86	0.001
Cept1	Mm.259845	4.12	0.013	2.27	0.018
Figl1	Mm.236114	4.05	0.004	2.02	0.011
Col7a1	Mm.6200	4.02	0.006	2.38	0.024
AA536717	Mm.206990	4.01	0.018	1.93	0.005
Grn	Mm.1568	4.01	0.020	2.98	0.002
Wbp1	Mm.1109	3.88	0.000	2.03	0.007
5031434O11Rik	Mm.387178	3.87	0.008	2.26	0.027
Nup50	Mm.28379	3.83	0.025	2.85	0.041
Tnrc6b	Mm.131328	3.60	0.000	2.01	0.002
AW549542	Mm.381453	3.59	0.002	1.45	0.022
Tsc22d1	Mm.153272	3.59	0.001	1.56	0.038
Pcyt1a	Mm.390903	3.51	0.001	1.87	0.017
Fech	Mm.1070	3.50	0.001	1.67	0.027
5330420D20Rik	Mm.252862	3.43	0.000	1.44	0.012
Fech	Mm.1070	3.31	0.001	1.62	0.015
Tsc22d1	Mm.153272	3.31	0.000	1.45	0.001
Ftl1	Mm.30357	3.29	0.006	1.66	0.026
Vezf1	Mm.46628	3.29	0.000	1.38	0.019
Zfp313	Mm.22225	3.20	0.009	2.61	0.019
Ube2l6	Mm.38261	3.18	0.008	3.08	0.011
Disp1	Mm.358721	3.14	0.003	1.50	0.023
Ell	Mm.271973	3.13	0.005	2.99	0.005
Gpr146	Mm.270003	3.11	0.001	3.06	0.002
Cul7	Mm.329078	3.06	0.002	1.32	0.046
Bxdc5	Mm.28128	3.03	0.048	2.11	0.003
Add3	Mm.44106	3.00	0.002	1.56	0.029
Hist1h4h	Mm.227295	2.97	0.013	1.83	0.036
Mknk2	Mm.42126	2.91	0.000	1.43	0.020
Grn	Mm.1568	2.88	0.000	2.64	0.001
Lysmd4	Mm.121691	2.87	0.018	2.32	0.023
Ucp2	Mm.171378	2.87	0.004	2.06	0.007
Acadvl	Mm.18630	2.84	0.049	1.49	0.039
1500010J02Rik	Mm.285785	2.83	0.000	1.59	0.013

Bles03	Rn.7405	2.81	0.007	2.20	0.008
Usp11	Mm.34489	2.78	0.000	1.61	0.009
Vapb	Mm.260456	2.78	0.014	2.41	0.019
BB114266	Mm.290849	2.77	0.022	2.07	0.039
Sesn3	Mm.227443	2.77	0.029	1.70	0.020
Pigx	Mm.37613	2.76	0.029	2.17	0.030
TRAFD1	Hs.5148	2.75	0.022	1.31	0.007
1110032O16Rik	Mm.248646	2.71	0.042	2.38	0.047
C630007C17Rik	Mm.119383	2.68	0.001	1.42	0.003
Nek7	Mm.143817	2.68	0.021	1.92	0.046
Ankrd12	Mm.34706	2.63	0.024	1.94	0.044
Dse111	Mm.20169	2.60	0.042	2.48	0.005
Hipk2	Mm.23790	2.58	0.030	2.52	0.041
Rbm5	Mm.259197	2.57	0.002	1.64	0.011
Acot2	Mm.371675	2.55	0.001	1.56	0.023
Prr13	Mm.29865	2.55	0.001	1.49	0.018
Hiat11	Mm.239196	2.54	0.000	1.54	0.001
Ptprf	Mm.29855	2.54	0.024	2.50	0.025
Nrp2	Mm.372142	2.51	0.028	2.25	0.026
Sh3d19	Mm.2454	2.50	0.009	1.59	0.041
2310002B06Rik	Mm.220253	2.48	0.020	1.98	0.030
Sec22a	Mm.259164	2.48	0.008	1.48	0.048
Tmem111	Mm.275989	2.48	0.005	1.51	0.046
Usp8	Mm.272629	2.48	0.000	2.14	0.000
Syap1	Mm.44207	2.47	0.001	2.10	0.002
Cyhr1	Mm.247752	2.46	0.002	1.38	0.033
Cdx2	Mm.20358	2.44	0.046	1.88	0.041
Djc1	Mm.246674	2.44	0.037	2.05	0.003
Dgkg	Mm.194986	2.39	0.003	1.38	0.049
Gmppa	Mm.23951	2.39	0.001	1.94	0.005
Ccdc28a	Mm.296565	2.35	0.000	1.98	0.020
Setd5	Mm.367159	2.34	0.000	1.49	0.012
Atrx	Mm.10141	2.33	0.003	1.78	0.009
Arl1	Mm.291247	2.32	0.012	1.75	0.019
AU045094	Mm.17836	2.32	0.002	1.42	0.012
Ep400	Mm.270487	2.31	0.002	1.51	0.027
Src	Mm.22845	2.29	0.035	2.19	0.047
0610031J06Rik	Mm.256034	2.28	0.000	1.69	0.002
Clta	Mm.298875	2.28	0.003	1.53	0.036
Tmem110	Mm.143025	2.27	0.003	1.49	0.027
Pold4	Mm.32518	2.25	0.003	1.63	0.002
Ahsa1	Mm.22626	2.21	0.004	1.62	0.011
Add1	Rn.5788	2.20	0.000	1.47	0.024
Tbc1d5	Mm.120650	2.20	0.005	1.50	0.032
Dio3as	Mm.381985	2.19	0.006	1.44	0.046
BC004728	Mm.26282	2.18	0.005	1.72	0.033
BC028801	Mm.394292	2.18	0.004	1.81	0.041
C4b	Mm.18845	2.18	0.004	1.76	0.014
Tmcc2	Mm.273785	2.18	0.000	1.34	0.025
Wdr6	Mm.335454	2.17	0.002	1.84	0.003
Nrbp	Mm.292040	2.16	0.000	1.85	0.000

201011101Rik	Mm.188105	2.12	0.031	1.94	0.032
Mphosph6	Mm.181836	2.11	0.000	1.37	0.001
Spryd3	Mm.385009	2.11	0.040	1.84	0.040
Usp7	Mm.295330	2.11	0.009	1.98	0.007
2310021P13Rik	Mm.275082	2.10	0.000	1.32	0.000
Aes	Mm.180013	2.09	0.000	1.65	0.009
Myl6	Mm.337074	2.09	0.001	1.61	0.007
Golph4	Mm.249232	2.08	0.007	1.44	0.048
Lamp2	Mm.486	2.08	0.005	1.45	0.025
Cdon	Mm.80509	2.07	0.006	1.61	0.018
Gmcl1	Mm.321452	2.06	0.018	1.65	0.021
Pspc1	Mm.20129	2.06	0.024	1.76	0.019
Nol7	Mm.279041	2.05	0.019	1.78	0.026
Drg1	Mm.3250	2.04	0.024	1.89	0.032
Fut8	Mm.35628	2.04	0.005	1.47	0.023
1700024C24Rik	Mm.83578	2.03	0.013	1.57	0.032
Cxcl1	Mm.21013	2.03	0.000	1.41	0.033
Map3k3	Mm.27041	2.03	0.007	1.33	0.033
Sepr1	Mm.28212	2.03	0.019	1.85	0.034
Nr1d2	Mm.26587	2.02	0.011	1.51	0.049
Smyd3	Mm.222338	2.02	0.001	1.38	0.043
Ezh1	Mm.5027	2.01	0.009	1.66	0.019
Foxj2	Mm.87142	2.01	0.002	1.63	0.000
Kel	Mm.19958	2.00	0.049	1.95	0.031

Tableau 8 : Listes des gènes activés par l'HMBA et/ou la doxycycline

1 : Ratio + HMBA – DOX/ - HMBA - DOX

2 : Ratio + HMBA + DOX/ +HMBA – DOX

3 : Les gènes signant la différenciation érythrocytaire terminale sont indiqués en rouge.

P-HMBA et P-DOX correspondent à la p-value des différences observées entre les conditions +/- HMBA (P-HMBA) ou +/- doxycycline (P-DOX) à partir de quatre mesures indépendantes pour chaque condition (deux expériences indépendantes analysées chacune sur deux puces).

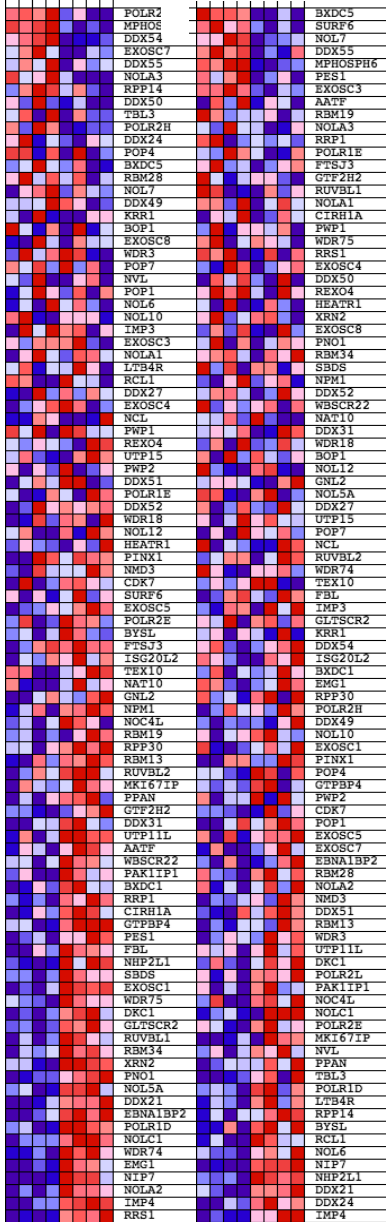
Comme attendu, le traitement par l'HMBA et par la doxycycline conduit à l'augmentation du taux de transcrits de gènes érythrocytaires comme *Ahsp* ou encore *Alas-2* (indiqués en rouge sur le tableau 8). De manière frappante, parmi les gènes dont l'expression est réduite d'au moins deux fois par l'HMBA et d'au moins 1,3 fois par le traitement combiné par l'HMBA et par la doxycycline (comparé à l'HMBA seul), une grande proportion de gènes est impliquée dans différentes étapes de la biogenèse des ribosomes (environ 20 %) (indiqués en vert et jaune sur le tableau 7). Ces gènes incluent notamment deux gènes (*Myc*, *Rpo 1-3*) impliqués dans la transcription des ARNr, huit gènes (*Ddx21*, *Imp4*, *Nhp211*, *Nip7*, *Nol6*,

Nolc1, *Npm1* et *Rcl1*) impliqués dans plusieurs étapes de la maturation des ARNr, un gène codant une protéine ribosomique (*Rpl18*) et huit gènes hôtes de snoARN impliqués dans les modifications post-transcriptionnelles des ARNr (*Cct6a*, *Gnb2L1*, *Hspa8*, *Snord22*, *Eif4g1*, *Snrpb*, *Mbd2* et *Tcp1*). Cette forte proportion de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes identifiés comme des cibles de FLI-1 et de SPI-1 nous a conduit à réaliser des analyses de GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Ces analyses révèlent que l'ensemble des gènes de biogenèse des ribosomes sont significativement surreprésentés parmi les gènes réprimés de façon additive par l'HMBA et par la doxycycline. Cette surreprésentation est également significative pour les gènes hôtes de snoARN H/ACA mais ne l'est pas pour les gènes de protéines ribosomiques (**Figure 24**).

Biogenèse des ribosomes

++++---- HMBA ++++++++ HMBA

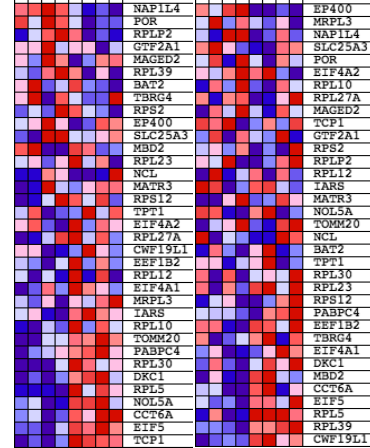
----- Dox +++++---- Dox



SnoARN à boîtes H/ACA

++++---- HMBA ++++++++ HMBA

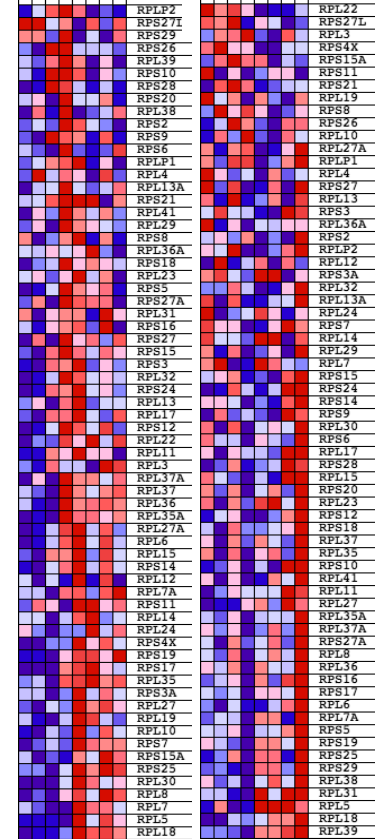
----- Dox +++++---- Dox



Protéines ribosomiques

++++---- HMBA ++++++++ HMBA

----- Dox +++++---- Dox



SnoARN à boîtes C/D

++++---- HMBA ++++++++ HMBA

----- Dox +++++---- Dox

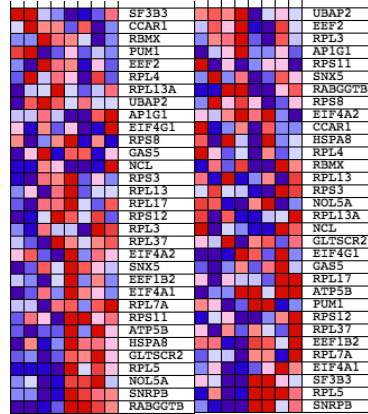
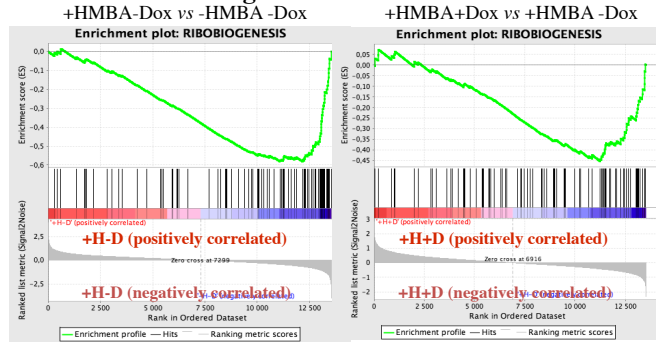


Figure 24 A

Effet HMBA - DOX

Effet DOX + HMBA

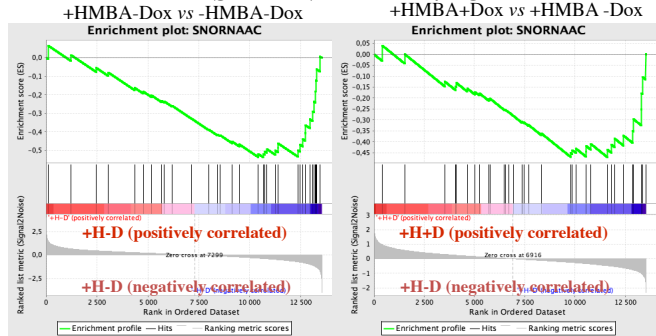
Biogenèse des ribosomes



NES -1.727
 Nom p-val <0.000
 FDR q-val 0.018
 FWER p-val 0.013

NES -1.622
 Nom p-val 0.035
 FDR q-val 0.109
 FWER p-val 0.058

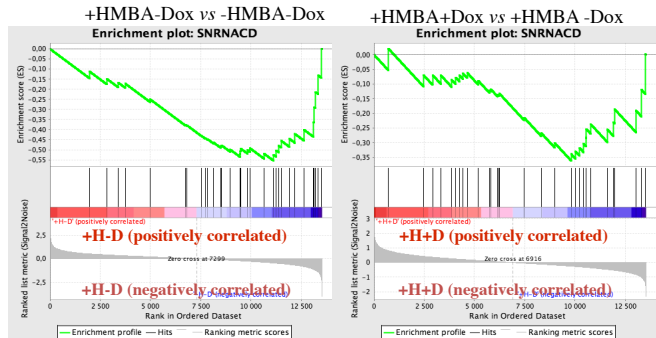
SnoARN à boîtes H/ACA



NES -1.536
 Nom p-val 0.049
 FDR q-val 0.043
 FWER p-val 0.039

NES -1.621
 Nom p-val 0.045
 FDR q-val 0.066
 FWER p-val 0.077

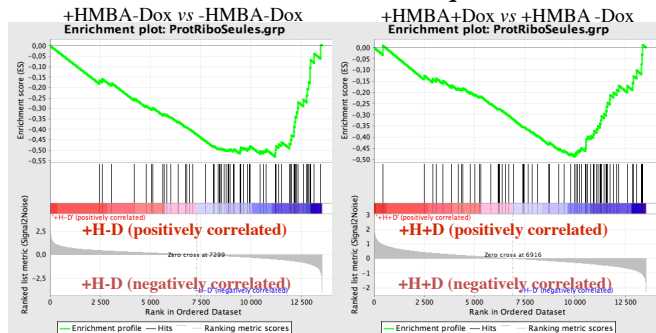
SnoARN à boîtes C/D



NES -1.484
 Nom p-val <0.000
 FDR q-val 0.046
 FWER p-val 0.056

NES -1.326
 Nom p-val 0.180
 FDR q-val 0.135
 FWER p-val 0.155

Protéines ribosomiques



NES -1.279
 Nom p-val 0.248
 FDR q-val 0.263
 FWER p-val 0.117

NES -1.157
 Nom p-val 0.342
 FDR q-val 0.364
 FWER p-val 0.168

Figure 24B

Figure 24 : Une grande majorité de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes est régulée par FLI-1 et SPI-1

Des analyses GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) corrélée avec l'effet HMBA ont été réalisées à partir des données d'expression des cellules 745A #44 traitées ou non par l'HMBA en absence de doxycycline (colonne de gauche). Des analyses GSEA corrélée avec l'effet doxycycline ont été réalisées à partir des données d'expression des cellules 745A #44 traitées ou non par la doxycycline en présence d'HMBA (colonne de droite). Quatre listes de gènes correspondant à des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes, des gènes hôtes de snoARN à boîtes C/D ou H/ACA ou des gènes codant des protéines ribosomiques ont été analysées. Les présentations graphiques des résultats ont été réalisées à l'aide du logiciel GSEA v2 (A. Subramanian et al., 2005 PNAS 102 : 15545-50).

A : Présentation de chacune des quatre listes de gènes ordonnées selon leur différentiel d'expression en réponse à l'HMBA ou la doxycycline (Figuré rose : expression augmentée ; Figuré bleu : expression diminuée)

B : Profil (courbe verte) des scores d'enrichissement («Running ES score») et positionnement des membres de chacune des listes de gènes (barres verticales) dans la liste des gènes ordonnés selon leur différentiel d'expression par condition (comparaison +/- HMBA colonne de gauche ; comparaison +/-doxycycline colonne de droite). Les listes de gènes et les conditions pour lesquelles les listes présentent un enrichissement significatif sont indiquées par la couleur rouge des tests statistiques utilisés (NES : Score d'enrichissement maximal normalisé; Norm p-val : p-value normalisée; FDR q-val : q-value du taux de faux positif; FWER p – value : « Family-Wise Error rate p-value »).

2- Validations des données du transcriptome par RT-qPCR

Certains de ces gènes ont été choisis pour valider les données de transcriptome par des expériences de RT-qPCR. Ces gènes incluent un gène (*Rpo1-3*) impliqué dans la transcription des ARNr, sept gènes (*Ddx21*, *Imp4*, *Nhp211*, *Nip7*, *Nol6*, *Nolc1* et *Npm1*) impliqués dans différentes étapes de la maturation des ARNr, un gène codant une protéine ribosomique (*Rpl18*), l'ARNr précurseur 45S et enfin 5 gènes hôtes de snoARNs (*Tcp1*, *Gnb211*, *Hspa8*, *Snhg1* et *Snrpb*). Les ADNc ont été extraits à partir de cellules 745A #44 et 745A/TR cultivées en présence ou en absence de doxycycline pendant deux jours puis un jour en présence ou en absence d'HMBA. Les résultats sont présentés sur la figure 25. Le traitement des cellules 745A/TR et 745A #44 par l'HMBA conduit à la réduction du taux de transcrits de l'ensemble des gènes testés. Le traitement simultané des cellules 745A #44 par l'HMBA et par la doxycycline conduit à une réduction plus importante de ces transcrits (entre 20 et 50%)

au contraire du même traitement des cellules 745A/TR pour lesquelles ce traitement n'a aucun effet comparé au traitement par l'HMBA seul (**figure 25 A, B et C**). Ces résultats valident donc les données du transcriptome pour les quelques gènes testés.

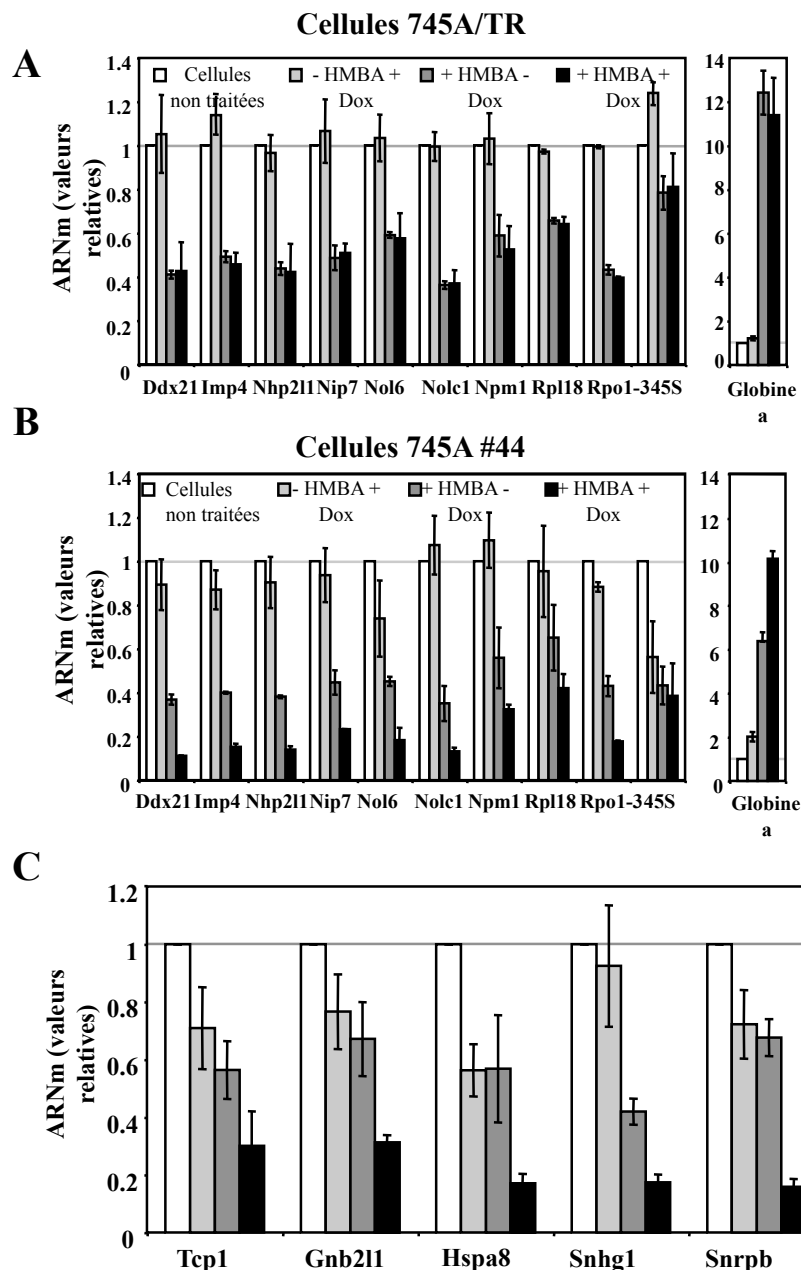


Figure 25: FLI-1 et SPI-1 régulent des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes

Les cellules 745A/TR et 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours en présence ou en absence de doxycycline puis leur différenciation a été induite par l'ajout de 5 mM HMBA 1 jour avant l'analyse du taux de transcrits des gènes indiqués par RT-qPCR (45S : ARNr précurseur 45S).

A : Valeurs relatives du taux de transcrits déterminées dans les cellules 745A/TR (moyennes et écart types de trois expériences indépendantes).

B : Pareil que A pour les cellules 745A #44

C : Pareil que B pour des gènes hôtes de snoARNs.

3- FLI-1 et SPI-1 sont recrutés sur les promoteurs des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes

De manière intéressante, la majorité de ces gènes présentent au niveau de leur séquence promotrice des sites ETS conservés chez différentes espèces (**Figure 26** : cas du promoteur de *Nip-7*). Des analyses de ChIP avec des anticorps anti-FLI-1 et anti-SPI-1 à partir des cellules 745A #44 non traitées suivies de PCRq ont donc été réalisées afin de tester le recrutement de FLI-1 et de SPI-1 sur le promoteur de ces gènes. Les résultats sont présentés sur la figure 27. Nous pouvons observer un enrichissement de la chromatine avec ces deux anticorps témoignant du recrutement de ces deux facteurs sur les promoteurs de la majorité de ces gènes (sauf *Npm1*) (**Figure 27A et B**). Des analyses similaires ont également montré le recrutement de FLI-1 et de SPI-1 sur les promoteurs de 3 gènes hôtes de snoARN (*Tcp1*, *Gnb2L1* et *Hspa8*) (**Figure 27 C et D**).

Ces résultats suggèrent donc très fortement que FLI-1 et SPI-1 régulent directement l'expression de gènes impliqués dans différentes étapes de la biogenèse des ribosomes.

-330 pb

Souris	ACGCCACTGAGCTTCGG GGAA GCGG-----
Rat	ACGCCATTGGGCCTCAG GGAA GCGG-----
Homme	GCGCCACTGGGCCTCGG GGAA GCGG-----
Orang-Outan	GCGCCACTGGGCCTCGG GGAA GCGG-----
Chien	CCGCCACTGGGCCTCGG GGAA GCGG-----
Cheval	ACGCCAGTGGGCCTCCG GGAA GCGG-----
Opossum	GCGCCACTGACCCTCCG GGAA CCGA-----
Poulet	GCGTGTGAGGCGCGCGG GGAA GCGG-----
Epinoche	---TCTCCAGCTGTCC GGAA GCTG-----

-304 pb

Souris	-----TCC GGAA TAGCGACGCCAGGAGCCCTCAT
Rat	-----TCG GGAA TAGCGACGCCAGGAGTCCCTCAT
Homme	-----TCC GGAA CAGCGACGCCAGGAGCCCTCAT
Orang-Outan	-----TCC GGAA CAGCGACGCCAGGAGCCCTCAT
Chien	-----TCC GGAA CAGCGACGCCAGGAGCCCTCAT
Cheval	-----TCC GGAA CAGCGACGCCAGGAGTCCCTCAT
Opossum	-----TCT GGAA CAGCGAGGCCAGGAGCCCTCAT
Poulet	-----CCGCTGACGG-----AGGCGGAGACGCGC
Epinoche	-----TCTTAAAGATGGACGCCAGGATACTCTCAT

Figure 26 : Conservation des sites ETS sur les promoteurs des gènes de biogenèse des ribosomes

La figure représente la séquence d'une partie de la région promotrice du gène *nip-7* qui est un gène cible de FLI-1 et SPI-1. L'analyse de cette séquence montre la conservation chez plusieurs espèces de deux sites de recrutement pour FLI-1 et SPI-1 écrits en gras et en rouge en position -304 et -330 par rapport au +1 de la transcription.

Ce gène est représentatif d'une majorité des gènes cibles de FLI-1 et SPI-1 impliqués dans la biogenèse des ribosomes.

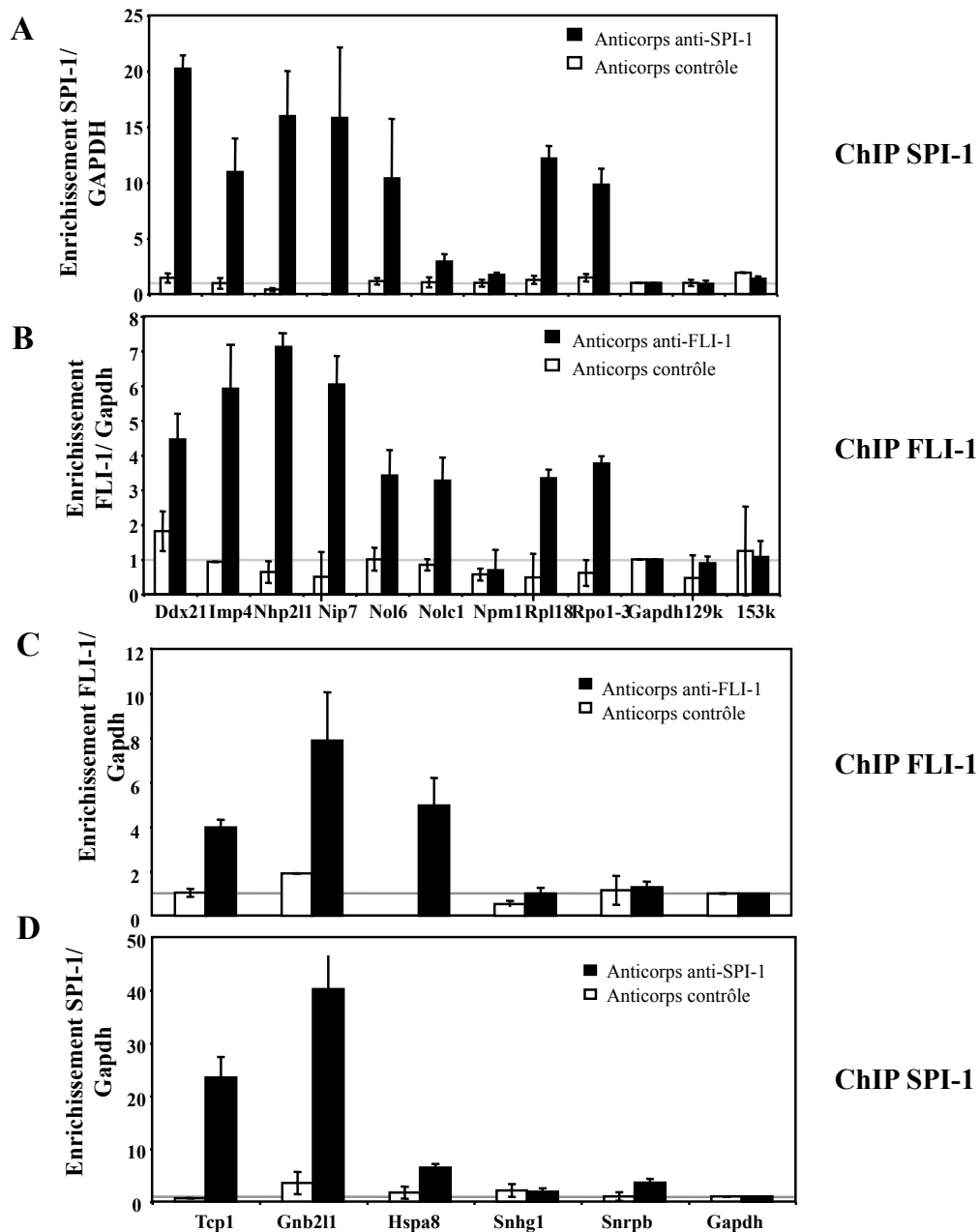


Figure 27 : FLI-1 et SPI-1 sont recrutés sur les promoteurs des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes

A : Occupation de SPI-1 sur les promoteurs des gènes indiqués déterminés par ChIP à partir de cellules 745A #44 non traitées en utilisant un anticorps anti-SPI-1 (colonnes noires) ou un anticorps anti-Ubc9 contrôle (colonnes blanches). **B** : Occupation de FLI-1 sur les promoteurs des gènes indiqués déterminés par ChIP à partir de cellules 745A #44 non traitées en utilisant un anticorps anti-FLI-1 (colonnes noires) ou un anticorps anti-Ubc9 contrôle (colonnes blanches). **C** : Pareil que B pour les promoteurs de gènes hôtes de snoARN. **D** : Pareil que A pour les promoteurs de gènes hôtes de snoARN. Le promoteur de *gapdh* et les régions du locus de globine alpha 129k et 153k sont utilisés en contrôles négatifs. Les valeurs sont exprimées en proportions relatives de la chromatine non immunoprécipitée et standardisées par rapport au bruit de fond déterminé par le promoteur du gène *gapdh* (moyennes et écart types de trois expériences indépendantes).

4- FLI-1 régule directement l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes dans les cellules NN10

Nous avons ensuite testé si FLI-1 régulait directement l'expression de ces gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes dans les cellules NN10 qui n'expriment que FLI-1 mais pas SPI-1. Les cellules NN10/TR et les cellules NN10 #5 ont été cultivées pendant deux jours en présence ou en absence de doxycycline. Les ARN de ces cultures ont été extraits puis rétro-transcrits et des analyses de RT-qPCR ont été réalisées. Les résultats sont présentés sur la figure 28A. Le traitement par la doxycycline des cellules NN10/TR n'affecte pas le taux de transcrits des gènes de biogenèse des ribosomes (Figure 28A : barres blanches). En revanche, l'expression d'une majorité de ces gènes est réduite après déplétion de FLI-1 dans les cellules NN10 #5 (Figure 28A : barres noires). Ces résultats montrent donc que FLI-1 régule également des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes dans les cellules NN10.

Le recrutement de FLI-1 sur le promoteur de ces gènes a été testé en immunoprécipitant la chromatine de cellules NN10 #5 non traitées avec un anticorps anti-FLI-1 puis les fragments de chromatine correspondant aux promoteurs des gènes de biogenèse des ribosomes ont été amplifiés par qPCR. Les résultats présentés sur la figure 28B montrent la présence de FLI-1 sur le promoteur d'une majorité de ces gènes.

L'ensemble de ces résultats suggère donc très fortement que FLI-1 régule directement l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes dans les cellules NN10.

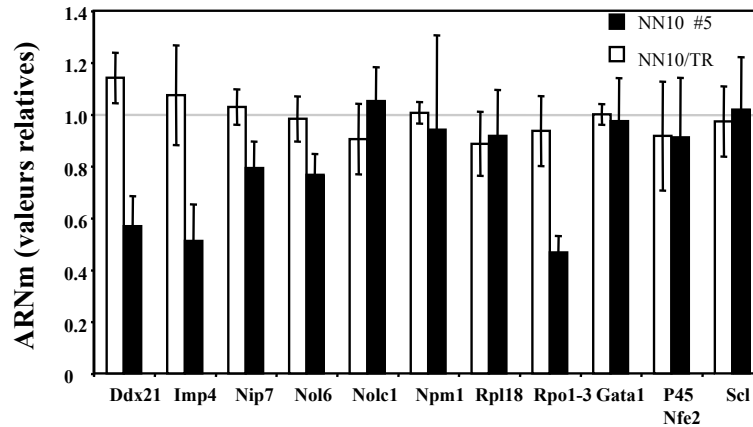
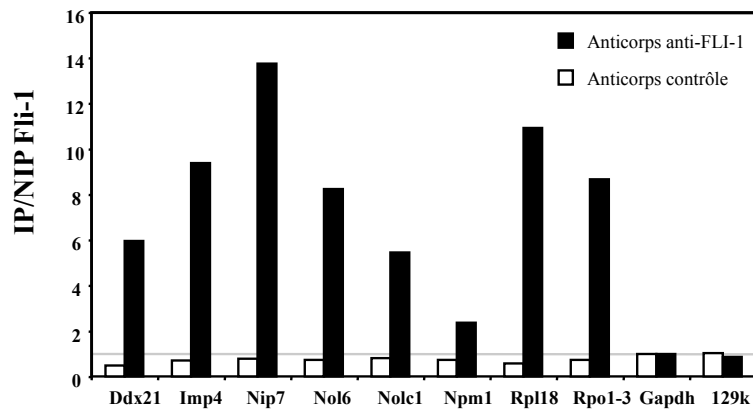
A**B**

Figure 28 : FLI-1 régule directement l'expression des mêmes gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes dans les cellules NN10

A : Les cellules NN10/TR et les cellules NN10 #5 ont été cultivées pendant deux jours en présence ou en absence de doxycycline avant la réalisation d'expériences de RT-qPCR pour mesurer le taux de transcrits des gènes indiqués. Les valeurs sont standardisées par rapport aux cellules NN10/TR (barres blanches) et NN10 #5 (barres noires) non traitées (moyennes et écart types de trois expériences indépendantes).

B : Occupation de FLI-1 sur les promoteurs des gènes indiqués déterminée par des expériences de ChIP à partir de cellules NN10 #5 non traitées à l'aide d'un anticorps anti-FLI-1 (barres noires) ou anti-Ubc9 contrôle (barres blanches). Le promoteur du gène *gapdh* et la région du locus de globine alpha 129k sont utilisés en contrôle négatif. Les valeurs représentent les proportions relatives de la chromatine non immunoprécipitée et standardisées par rapport au bruit de fond déterminé par le promoteur du gène *gapdh* (moyennes et écart types de deux expériences indépendantes).

Pour conclure cette partie qui a fait l'objet d'une publication (cf. annexe 1), nous avons donc montré que SPI-1 et FLI-1 contribuent de manière additive à la survie, à la prolifération et au blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend et régulent directement l'expression de mêmes gènes impliqués dans différentes étapes de la biogenèse des ribosomes (**Figure 29**).

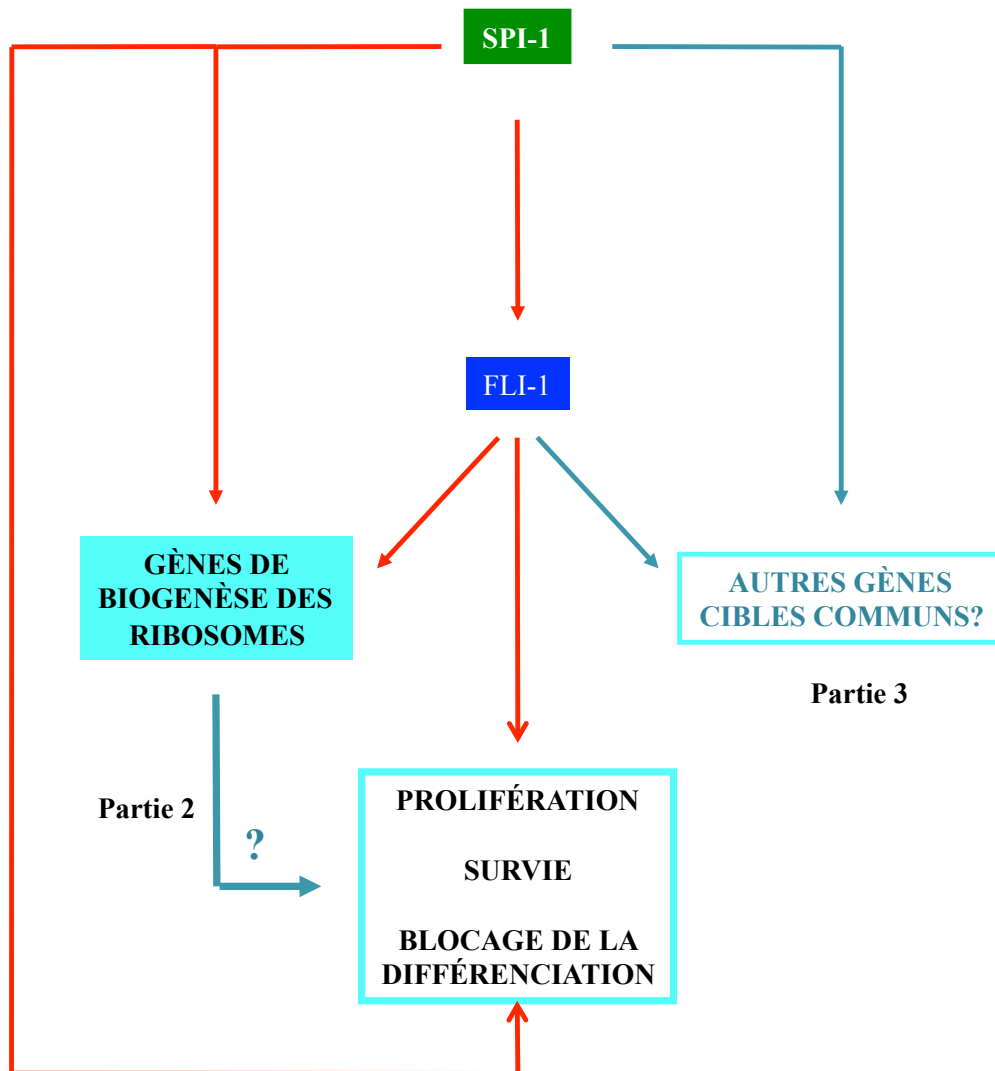


Figure 29 : Contribution additives de FLI-1 et SPI-1 et régulation de gènes cibles communes

Dans la première partie de mes résultats, j'ai montré que FLI-1 et SPI-1 ont des contributions additives sur la prolifération, la survie et le blocage de la différenciation et régulent directement l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes.

Les deuxième et troisième parties seront consacrées à déterminer la contribution de ces gènes dans les fonctions de SPI-1 et FLI-1 et de déterminer s'il existe d'autres gènes cibles directes communes à ces deux facteurs.

Les flèches rouges indiquent les résultats déjà démontrés.

Les flèches vertes indiquent les questions posées.

La régulation de ces gènes soulève deux questions. La biogenèse des ribosomes contribue t'elle aux effets additifs de FLI-1 et de SPI-1 dans les cellules MEL ? Existe t'il d'autres gènes cibles directs communs à FLI-1 et à SPI-1 ? Ces deux questions seront traitées dans les deuxième et troisième parties de mes résultats.

DEUXIÈME PARTIE : L'ABSENCE DE FLI-1 ET DE SPI-1 CONDUIT-ELLE A UN STRESS RIBOSOMIQUE ?

I- Hypothèse de travail et stratégie expérimentale

La diminution d'un nombre important de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes en réponse à la déplétion des facteurs SPI-1 et FLI-1 dans les cellules érythroleucémiques soulève la question du rôle de cette diminution dans l'arrêt de la prolifération et la différenciation qui lui sont associés. Comme nous avons pu le voir dans mon introduction bibliographique, une perturbation de la biogenèse des ribosomes peut entrainer des modifications quantitatives et/ou qualitatives des ribosomes. Une altération de la biogenèse des ribosomes peut également déclencher une voie de stress appelée stress ribosomique conduisant à la stabilisation de p53 et à l'activation de ses fonctions via la répression de MDM-2 par certaines protéines ribosomiques libres. De manière intéressante, le traitement de la lignée érythroleucémique SFFV DS19 (dont dérive le clone 745A étudié ici) par de faibles doses d'actinomycine D permet la reprise de leur processus de différenciation au détriment de leur prolifération (Terada et al., 1978). A faibles doses, l'actinomycine D réprime préférentiellement l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I. Cette répression conduit à un stress ribosomique et l'activation consécutive de p53 (Jin et al., 2004). La surexpression d'une protéine p53 de conformation sauvage dans une autre lignée

érythroleucémique SFFV DP16 conduit aux mêmes observations que le traitement par l'actinomycine D (Johnson et al., 1993). L'ensemble de ces données nous a conduit à proposer que **l'absence de FLI-1 et de SPI-1 induirait l'apparition d'un stress ribosomique et l'activation consécutive de p53 qui contribuerait à la mort, à l'arrêt de la prolifération et à la reprise de la différenciation des cellules NN10 et 745A (Figure 30).**

Cette deuxième partie de mes résultats traitera de l'exploration de cette hypothèse. La stratégie que j'ai utilisée est schématisée sur la figure 30.

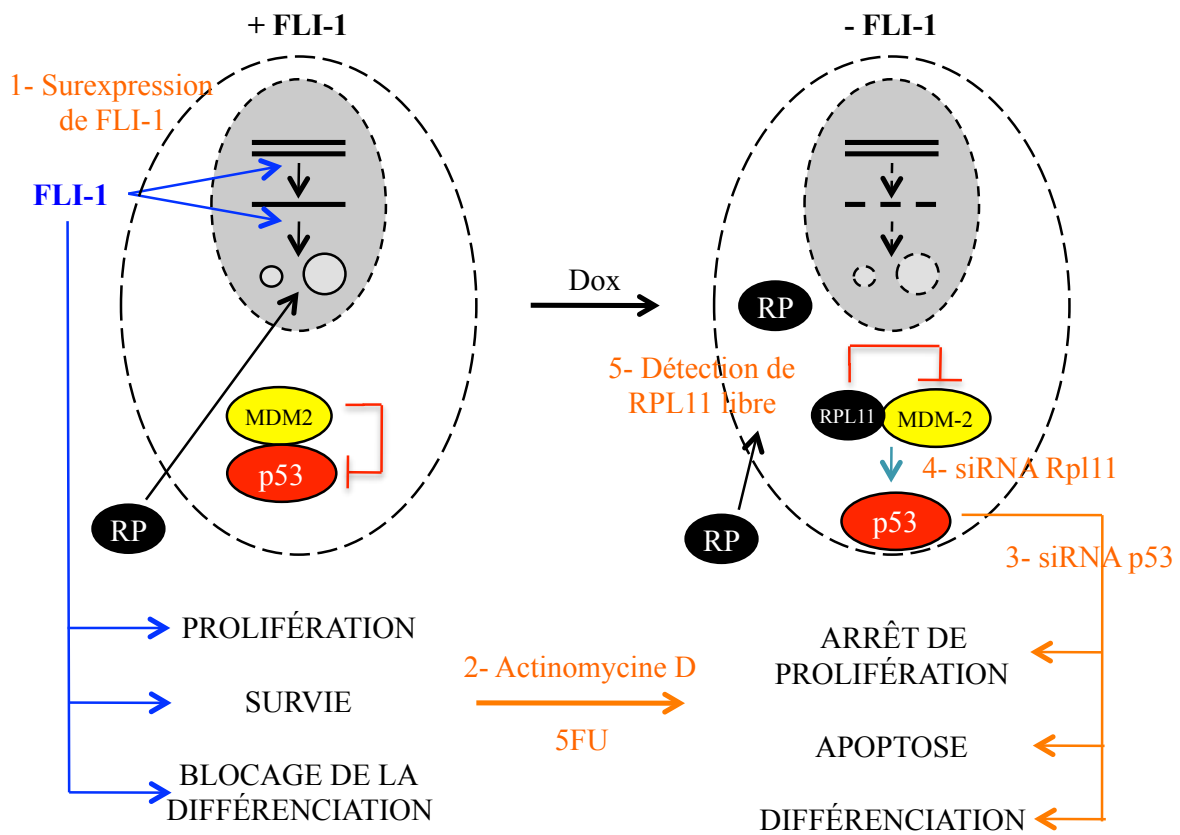


Figure 30 : Hypothèse de travail et stratégie expérimentale

Le facteur FLI-1 régule des gènes impliqués dans différentes étapes de la biogenèse des ribosomes. Notre hypothèse de départ est que l'absence de FLI-1 induirait un stress ribosomique qui contribuerait à l'arrêt de prolifération, l'apoptose et la reprise de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend.

Les flèches bleues indiquent les résultats obtenus.

Les flèches oranges indiquent les différentes étapes de notre stratégie expérimentale qui vont être traitées dans cette partie des résultats. Si notre hypothèse est bonne, nous devrions pouvoir montrer que :

1- La déplétion de FLI-1 entraîne une réduction du nombre de ribosomes et qu'à l'inverse une surexpression de FLI-1 stimule cette biogenèse

2- Le traitement des cellules érythroleucémiques NN10 et 745A par deux drogues décrites pour induire un stress ribosomique miment les effets induits par l'absence de FLI-1

3- La protéine p53 contribue à la différenciation et à l'arrêt de la prolifération des cellules érythroleucémiques

4- La régulation du taux de protéine p53 est dépendante de la protéine RPL11, un médiateur du stress ribosomique

5- La déplétion de FLI-1 entraîne l'accumulation de protéines ribosomiques RPL11 libres

II- Contributions de FLI-1 et SPI-1 à la biogenèse des ribosomes ?

A) La déplétion de FLI-1 et SPI-1 réduit la synthèse des ARNr

La réduction de l'expression des gènes impliqués dans les différentes étapes de la biogenèse des ribosomes observée en absence de FLI-1 et de SPI-1 suggère que l'absence de ces deux facteurs pourrait conduire à une réduction de cette biogenèse. Afin de tester cette hypothèse, j'ai quantifié le rendement d'extraction en ARN et le taux de transcrits de l'ARNr précurseur 45S, deux paramètres liés à la synthèse des ARNr dont nous avons pu voir qu'elle constituait la partie limitante de la biogenèse des ribosomes. J'ai ainsi cultivé les cellules 745A #44 en présence ou en absence de doxycycline pendant deux jours puis la différenciation a été induite par l'ajout d'HMBA deux jours avant l'analyse.

1- L'absence de SPI-1 et de FLI-1 réduit le rendement d'extraction en ARN par cellule

Les ARNr constituent près de 80% de la quantité d'ARN total. Ainsi, toute modulation de la quantité d'ARNr peut être révélée par le calcul du rendement d'extraction en ARN à partir d'un même nombre de cellules quelque soit la condition. Pour tester la possibilité que l'absence de FLI-1 et de SPI-1 induise une réduction de la quantité d'ARNr, les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours par la doxycycline puis leur différenciation a été induite par l'HMBA deux jours avant l'analyse. Les ARN ont été extraits à partir de 10^6 cellules puis ont été dosés par spectrophotométrie UV à 260 nm. Les résultats sont présentés sur la figure 31A.

La quantité d'ARN total extraite à partir des cellules traitées par la doxycycline est réduite d'environ 40 % par rapport aux cellules non traitées (Figure 31A : 100 % en absence

contre 56 % en présence de doxycycline). De la même manière, le traitement par l'HMBA réduit également la quantité d'ARN totale extraite (Figure 31A : 100 % en présence contre 45,7 % en présence d'HMBA). En revanche, le traitement simultané des cellules 745A #44 par l'HMBA et par la doxycycline ne réduit pas de manière significative la quantité d'ARN total extraite par rapport aux cellules traitées par l'HMBA seul (Figure 31A : 45,7 % en présence d'HMBA contre 34,2 % en présence d'HMBA et de doxycycline).

Ces résultats montrent que le rendement d'extraction en ARN total est réduit par l'absence de FLI-1 ou de SPI-1 suggérant une réduction de la quantité d'ARNr. En revanche, ces données ne mettent pas en évidence d'effet additif de FLI-1 et de SPI-1 sur cette réduction.

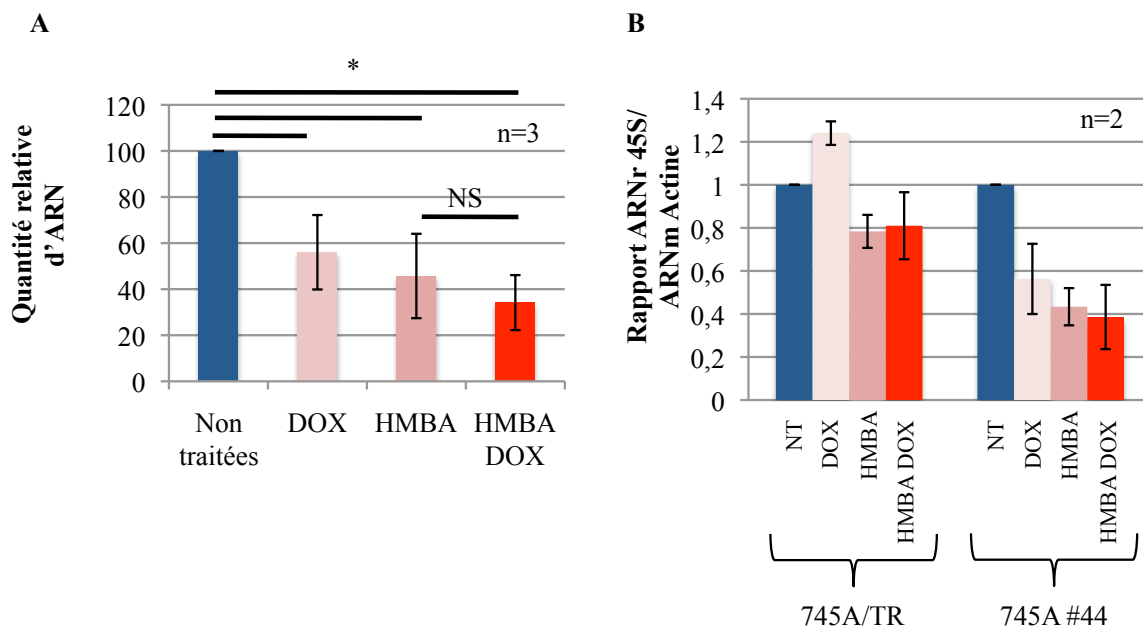


Figure 31 : L'absence de FLI-1 et SPI-1 réduit la synthèse des ARNr

A : Les cellules 745A #44 ont été cultivées en absence ou en présence de doxycycline pendant deux jours puis leur différenciation a été induite par l'ajout d'HMBA deux jours avant analyse. Les ARN de 1.10^6 cellules ont été extraits et la quantité extraite a été dosée par spectrophotométrie UV à 260 nm. Les valeurs normalisées sur la quantité d'ARN extraite à partir des cellules non traitées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : différence significative (p -value < 0,05) NS :différence non significative (p -value > 0,05)

B : Mesure par RT-qPCR du taux d'ARNr précurseur 45S de cellules 745A #44 et 745A /TR cultivées dans les mêmes conditions qu'en A. Les valeurs normalisées sur l'ARNm Actine et rapportées au taux de transcrits 45S des cellules non traitées représentent la moyenne de deux expériences indépendantes.

2- L'absence de FLI-1 et de SPI-1 réduit le taux d'ARNr 45S

Les résultats précédents suggèrent donc que la synthèse des ARNr est réduite après la déplétion de FLI-1 ou de SPI-1. Les ARNr matures sont formés après le clivage d'un ARNr précurseur, l'ARNr 45S. J'ai donc voulu déterminer si l'absence de FLI-1 et de SPI-1 pouvait conduire à une réduction du taux de transcrits 45S. Les cellules 745A #44 ont donc été cultivées pendant deux jours par la doxycycline puis leur différenciation a été induite par l'HMBA deux jours avant l'analyse. Les ARN d'un même nombre de cellules ont été extraits puis rétro-transcrits. Le taux de transcrits 45S a été quantifié par des expériences de RT-qPCR. Les résultats sont présentés sur la figure 31B.

La figure 31B montre que le traitement des cellules 745A #44 par la doxycycline seule réduit le taux de transcrits 45S (Figure 31B : 1 en absence contre 0,56 en présence de doxycycline). De la même manière, le traitement par l'HMBA des cellules 745A #44 conduit à une réduction légèrement plus importante de ce taux de transcrits (Figure 32B : 1 en absence contre 0,43 en présence d'HMBA). Enfin, le traitement simultané des cellules 745A #44 par la doxycycline et par l'HMBA ne conduit pas à une réduction plus importante du taux de transcrits 45S que celle induite par l'HMBA seul (Figure 31B : 0,43 en présence d'HMBA seul contre 0,39 en présence d'HMBA et de doxycycline).

Ces résultats indiquent que l'absence de FLI-1 ou de SPI-1 réduit le taux de transcrits précurseur 45S.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la différenciation des cellules 745A #44 induite par l'HMBA s'accompagne d'une réduction de la synthèse des ARNr. A ce stade de l'analyse, il est difficile de conclure sur la contribution de FLI-1 et de SPI-1 à la biogenèse des ribosomes, cette réduction pouvant être la conséquence de la différenciation.

B) Effets de l'absence de FLI-1 et de SPI-1 sur le taux des protéines RPL11 et RPL24

J'ai ensuite testé l'effet de l'absence de FLI-1 et de SPI-1 sur le taux des protéines ribosomiques RPL11 et RPL24 dont les anticorps étaient à disposition dans le laboratoire. J'ai donc cultivé les cellules 745A #44 en présence ou en absence de doxycycline pendant deux jours puis j'ai induit leur différenciation en ajoutant de l'HMBA deux jours avant l'analyse. J'ai analysé le taux des protéines RPL11 et RPL24 par Western blot dont les résultats sont présentés sur la figure 32.

La figure 32 montre que le traitement des cellules 745A #44 par la doxycycline n'a aucun effet sur le taux de protéine RPL11 (figure 32A : comparer puits 1 et 2) ni sur le taux de protéine RPL24 (figure 32B : comparer puits 1 et 2). En revanche, le traitement par l'HMBA entraîne une diminution des protéines RPL11 (Figure 32A) et RPL24 (Figure 32B) en moyenne plus importante en présence qu'en absence de doxycycline, bien que cette diminution varie d'une expérience à l'autre. Ainsi, la figure 32 montre que le traitement par l'HMBA des cellules 745A #44 entraîne une légère réduction du taux de protéine RPL11 (figure 32A : comparer puits 1 et 3 ; 100 % en absence contre 64 % en présence d'HMBA) et de RPL24 (figure 32B : comparer puits 1 et 3 ; 100 % en absence contre 86 % en présence d'HMBA). De la même manière, le traitement simultané des cellules 745A #44 par l'HMBA et par la doxycycline conduit à une réduction plus importante des taux de protéine RPL11 (figure 32A : comparer puits 1 et 4 et 3 et 4 : 100 % en absence contre 50 % en présence d'HMBA et de doxycycline) et RPL24 (figure 32B : comparer puits 1 et 4 puis 3 et 4 ; 100 % en absence contre 33 % en présence d'HMBA et de doxycycline).

Ces résultats suggèrent que l'absence de ces deux facteurs réduit la quantité de protéines ribosomiques RPL11 et RPL24 suggérant une réduction de la quantité de ribosomes présente dans les cellules 745A #44.

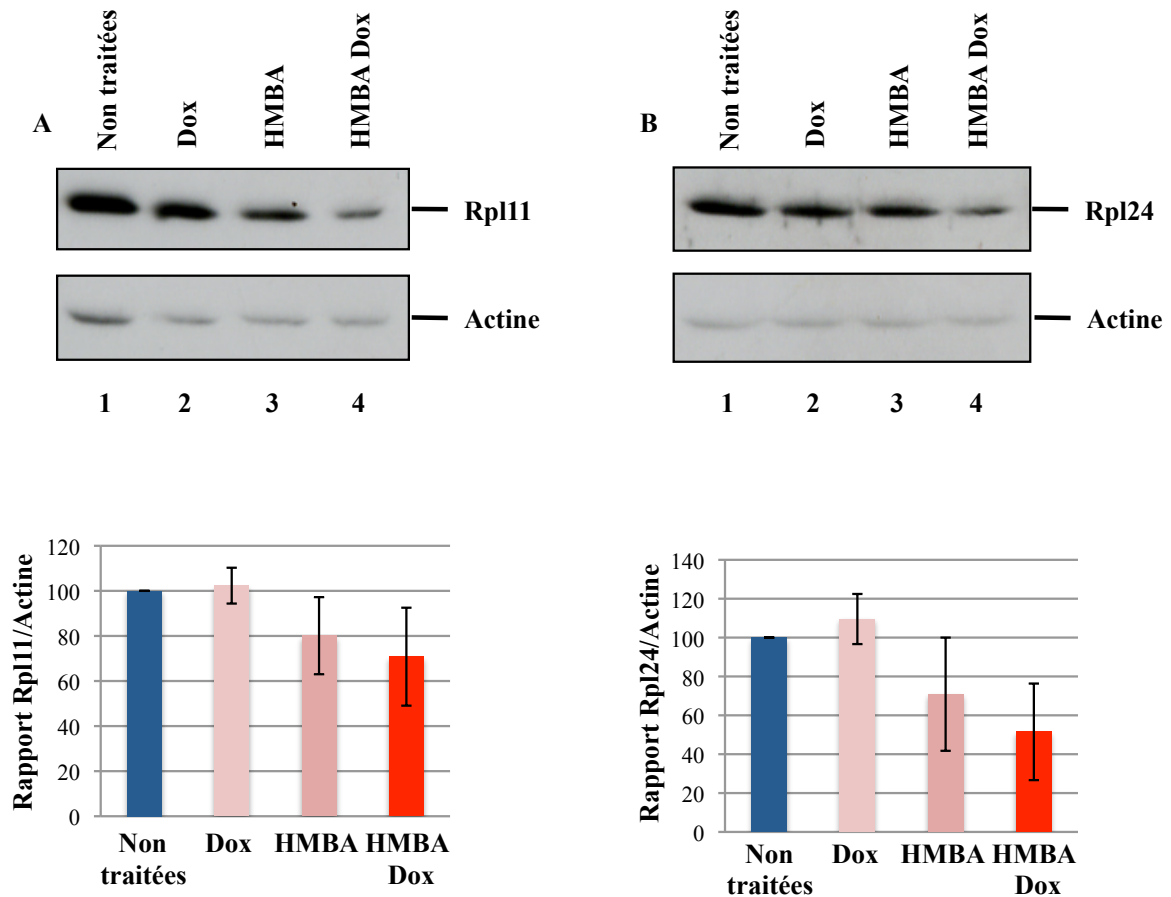


Figure 32 : L'absence de FLI-1 et de SPI-1 semble réduire la quantité de protéines ribosomiques RPL11 et RPL24

Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours en présence ou en absence de doxycycline (DOX) puis leur différenciation a été induite par l'ajout d'HMBA deux jours avant l'analyse.

A : Analyse par Western blot du taux de protéine RPL11 des cellules 745A #44 ayant subi le traitement décrit ci-dessus. En bas, le graphique montre la quantification par Image J. Les valeurs, exprimées en pourcentage du taux de RPL11 des cellules non traitées, représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

B : Analyse par Western blot du taux de protéine RPL24 des cellules 745A #44 ayant subi le traitement décrit ci-dessus. En bas, le graphique montre la quantification par Image J. Les valeurs, exprimées en pourcentage du taux de RPL24 des cellules non traitées, représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

C) La surexpression de FLI-1 ne maintient pas la biogenèse des ribosomes en présence d'HMBA

L'absence de FLI-1 ou de SPI-1 semble être corrélée à une réduction de la biogenèse des ribosomes. Est-ce qu'à l'inverse la surexpression de FLI-1 stimule la biogenèse des ribosomes ? Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait obtenu le clone znfli-1 #11 en transfectant les cellules 745A avec le vecteur pMTCI/FLI-1. Ce vecteur permet l'expression de *fli-1* à partir d'un promoteur activé par la présence de Zinc dans le milieu de culture. Ce clone a été utilisé pour montrer que le maintien de l'expression de *fli-1* en présence d'HMBA bloque la différenciation des cellules 745A induite par cet agent chimique (Starck et al., 1999). J'ai donc utilisé ce clone afin de déterminer si la surexpression de *fli-1* maintenait la biogenèse des ribosomes en présence d'HMBA. Les cellules 745A contrôles et les cellules znfli-1 #11 ont donc été cultivées pendant deux jours en présence d'HMBA avec ou sans 170 μM ZnCl_2 .

J'ai dans un premier temps vérifié que le traitement des cellules par le ZnCl_2 conduisait à la surexpression de FLI-1 dans les cellules znfli-1 #11 en mesurant le taux de protéine FLI-1 par Western blot. La figure 33A montre que le traitement des cellules 745A par le ZnCl_2 en présence d'HMBA n'affecte pas le taux de protéine FLI-1 (Figure 33A : comparer puits 1 et 2). En revanche, le même traitement des cellules znfli-1 #11 conduit à une augmentation d'environ trois fois du taux de protéine FLI-1 (Figure 33A : comparer puits 3 et 4). Le traitement par le ZnCl_2 conduit donc à une surexpression de FLI-1 dans le clone znfli-1 #11.

Parallèlement à cette quantification, j'ai mesuré le rendement d'extraction en ARN, le taux d'ARNr précurseur 45S et le taux de transcrits du gène *nip7*, un gène cible de FLI-1 et de SPI-1. Les résultats sont présentés respectivement sur les figures 33B, 33C et 33D. Les trois figures montrent que le traitement des cellules znfli-1 #11, comme celui des cellules 745A par

le ZnCl₂ n'affecte pas de manière significative le rendement d'extraction d'ARN (Figure 33B : 100 % en absence contre 123 % en présence de ZnCl₂), le taux de transcrits 45S (Figure 33C : 100 % en absence contre 87 % en présence de ZnCl₂) et le taux de transcrits *nip7* (Figure 33D : 100 % en absence contre 78 % en présence de ZnCl₂).

Ces résultats montrent donc que la surexpression de FLI-1 en présence d'HMBA n'augmente pas la biogenèse des ribosomes des cellules 745A. Ces résultats suggèrent un découplage entre la perturbation de la biogenèse des ribosomes et la contribution de FLI-1 au blocage de la différenciation des cellules 745A induite par l'HMBA. Néanmoins, ces résultats n'éliminent pas la contribution de la baisse de la biogenèse des ribosomes à la différenciation induite par l'HMBA et par la doxycycline.

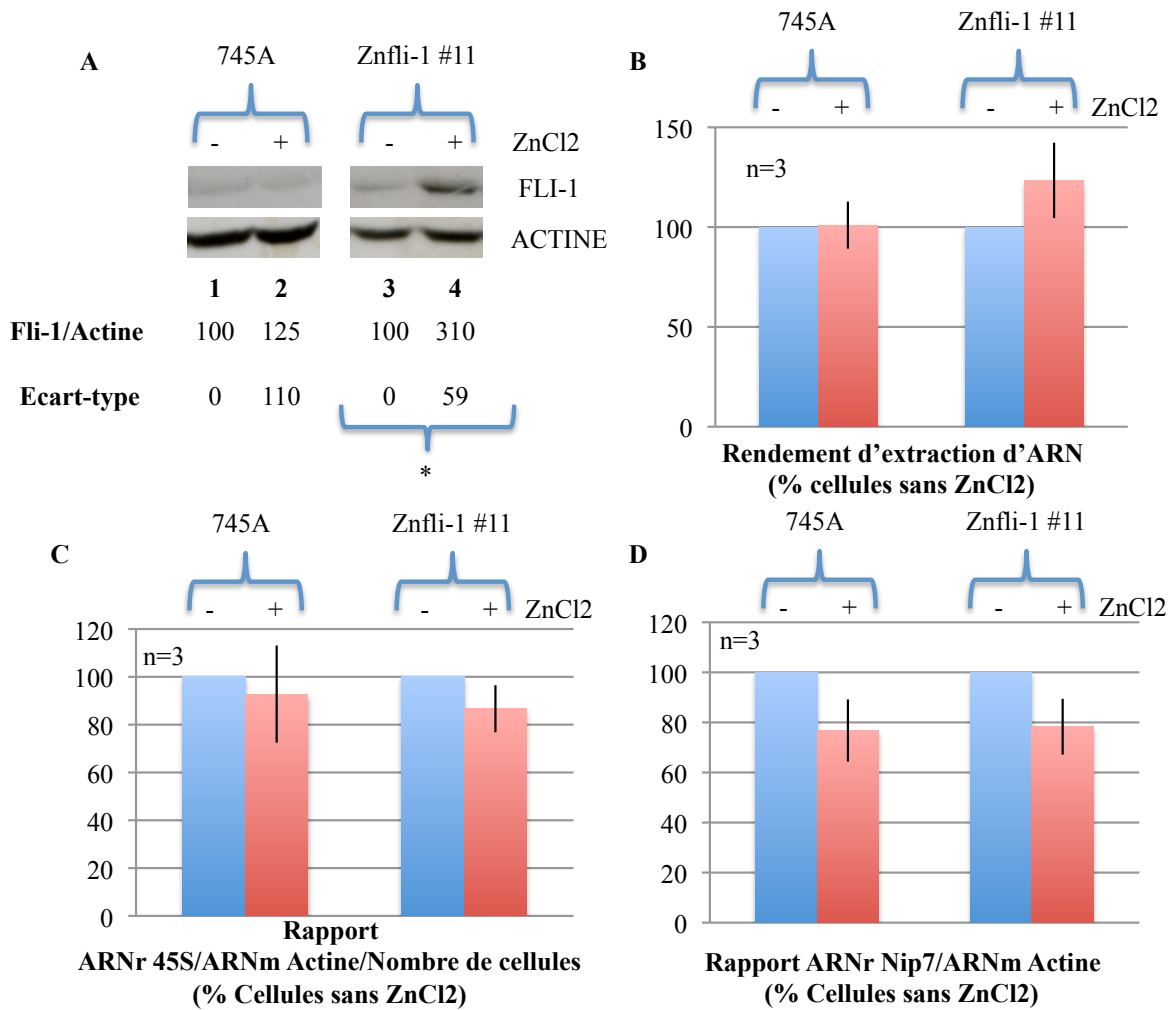


Figure 33 : La surexpression de FLI-1 ne stimule pas la biogenèse des ribosomes

Les cellules znfli-1 #11 et 745A parentales ont été cultivées pendant deux jours en présence de 5 mM HMBA en présence ou en absence de 170 μ M ZnCl₂.

A : Analyse par Western blot du taux de protéine FLI-1 (partie haute) et Actine (partie basse) extraites à partir des cellules 745A (puits 1 et 2) et znfli-1 #11 (puits 3 et 4) en présence d'HMBA avec (puits 2 et 4) ou sans ZnCl₂ (puits 1 et 3). Les chiffres en-dessous des blots correspondent à la moyenne et l'écart-type de la quantification des Western par Image J de 3 expériences indépendantes. Les données sont normalisées par rapport aux cellules sans ZnCl₂. * : différences significatives ($p < 0,05$)

B : Calcul du rendement d'extraction d'ARN à partir de $4 \cdot 10^6$ cellules 745A (deux colonnes de gauche) et znfli-1 #11 (deux colonnes de droite) en présence (colonnes rouges) ou en absence de ZnCl₂ (colonnes bleues). Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes et sont normalisées par rapport aux valeurs des cellules sans ZnCl₂.

Mesure par RT-qPCR du taux de précurseurs 45S (**C**) et du taux d'ARNm Nip7 (**D**) à partir des cellules 745A (deux colonnes de gauche) et znfli-1 #11 (deux colonnes de droite) en présence (colonnes rouges) ou en absence de ZnCl₂ (colonnes bleues). Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes et sont normalisées par rapport aux valeurs des cellules sans ZnCl₂. Elles sont rapportées au nombre de cellules pour le précurseur 45S.

III- L'induction d'un stress ribosomique mime t'il l'effet de l'absence de FLI-1 et de SPI-1 ?

A) Le traitement des cellules NN10 #5 par de faibles doses d'actinomycine D induit leur différenciation et un arrêt de prolifération

Comme mentionné dans le paragraphe A de cette deuxième partie, une perturbation de la biogenèse des ribosomes peut déclencher une voie de stress appelée stress ribosomique qui conduit à l'activation de p53. Dans un premier temps, j'ai voulu déterminer si l'induction artificielle d'un stress ribosomique pouvait mimer l'absence de FLI-1 et de SPI-1 dans les cellules NN10 #5. J'ai donc cultivé les cellules NN10 #5 en présence de faibles doses d'actinomycine D (ActD) ou de DMSO (contrôle du solvant) pendant trois jours et j'ai mesuré la survie, la prolifération et la différenciation de ces cellules. A faibles doses, l'ActD bloque préférentiellement l'activité ARN polymérase I et est décrite pour induire un stress ribosomique.

La figure 34A montre que le traitement des cellules NN10 #5 par de faibles doses d'ActD induit l'apparition de cellules mortes (Figure 34A : 1,4 % en absence contre 22,8 % en présence d'ActD), une réduction du nombre total de cellules (Figure 34A : 100 % en absence contre 6,6 % en présence d'ActD) et l'apparition de cellules hémoglobinisées signant la différenciation (Figure 34A : moins de 0,5 % en absence contre 20 % en présence d'ActD). Aucun des phénotypes décrits n'est observé après le traitement des cellules NN10 #5 par le DMSO.

Ces résultats montrent donc que le traitement des cellules NN10 #5 par de faibles doses d'ActD mime les effets induits par l'absence de FLI-1.

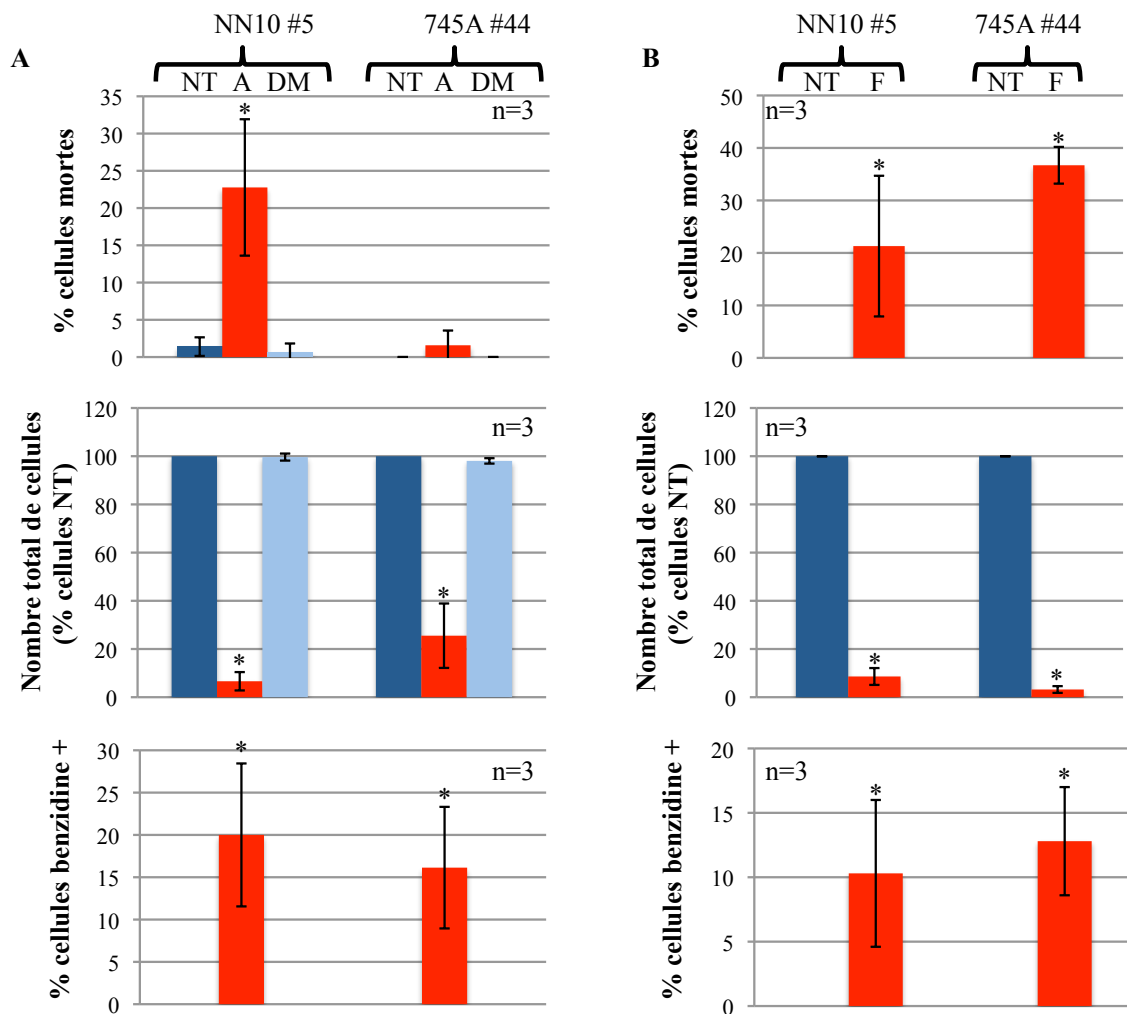


Figure 34 : Les traitements des cellules NN10 #5 et 745A #44 par l'actinomycine D ou par le 5-fluorouracile miment les effets de l'absence de FLI-1 et SPI-1

A : Les cellules NN10 #5 et 745A #44 ont été cultivées pendant trois jours en absence (NT) (barres bleues foncées) ou en présence de 5 ng/mL d'actinomycine D (A) (barres rouges) ou de 0,0002 % DMSO (barres bleues claires) (contrôle de solvant). Le pourcentage de cellules mortes (graphe du haut), le nombre total de cellules (graphe du milieu – exprimé en pourcentage des cellules non traitées) et le pourcentage de cellules colorées à la benzidine ont été mesurés par comptage cellulaire. Les barres représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : différence significative ($p < 0,05$).

B : Les cellules NN10 #5 et 745A #44 ont été cultivées pendant trois jours en absence (NT) (barres bleues foncées) ou en présence de 10 μ M de 5 fluorouracile (F) (barres rouges) pendant trois jours. Le pourcentage de cellules mortes (graphe du haut), le nombre total de cellules (graphe du milieu – exprimé en pourcentage des cellules non traitées) et le pourcentage de cellules colorées à la benzidine ont été mesurés par comptage cellulaire. Les barres représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : différence significative ($p < 0,05$).

Le traitement des cellules 745A #44 par de faibles doses d'ActD mime les effets de l'absence de FLI-1 et de SPI-1

J'ai ensuite voulu déterminer si l'ActD avait les mêmes effets dans les cellules 745A #44. Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant trois jours en absence ou en présence d'ActD ou de DMSO. La survie, la prolifération et la différenciation ont été testées. Les résultats sont présentés sur la figure 34A.

Comme nous pouvons l'observer, le traitement par l'ActD des cellules 745A #44 conduit à une réduction du nombre total de cellules (Figure 34A : 100 % en absence contre 25,5 % en présence d'ActD) et à l'apparition de cellules hémoglobinisées (Figure 34A : moins de 0,5 % en absence contre 16,1 % en présence d'ActD). En revanche, contrairement au traitement des cellules NN10 #5, le traitement des cellules 745A #44 par l'ActD n'a pas d'effets sur leur survie (Figure 34A : moins de 1 % en absence contre 1,4 % en présence d'ActD). Le traitement des cellules 745A #44 par le DMSO n'a strictement aucun effet sur ces trois paramètres.

Ces résultats montrent donc que l'ActD comme l'absence de FLI-1 et de SPI-1 induit un arrêt de prolifération et une reprise de la différenciation de cellules 745A #44.

C) Le traitement des cellules NN10 #5 par le 5 fluorouracile (5-FU) mime les effets de l'absence de FLI-1

J'ai ensuite voulu tester l'effet d'une autre drogue décrite pour induire un stress ribosomique, le 5 FU. Les produits de la métabolisation de cette drogue s'incorporent dans les ARNr et inhibent leur maturation. Le groupe de H. Lu a montré que le traitement des cellules humaines U2OS par le 5-FU induit un stress ribosomique et l'activation consécutive de p53

(Sun et al., 2007). J'ai donc cultivé les cellules NN10 #5 en absence ou en présence de 5-FU pendant trois jours et la survie, la prolifération et la différenciation de ces cellules ont été mesurées.

La figure 34B montre que le traitement des cellules NN10 #5 par le 5-FU conduit à l'apparition de cellules mortes (Figure 34B : moins de 0,5 % en absence contre 21,3 % en présence de 5-FU), à la réduction du nombre total de cellules (Figure 34B : 100 % en absence contre 8,6 % en présence de 5-FU) et à l'apparition de cellules hémoglobinisées (Figure 34B : moins de 0,5 % en absence contre 10,3 % en présence de 5-FU).

Ces résultats montrent que, le traitement des cellules NN10 #5 par le 5-FU, comme celui par l'ActD et l'absence de FLI-1, induit la mort, l'arrêt de prolifération et la différenciation des cellules NN10.

D) Le traitement des cellules 745A #44 par le 5-FU mime les effets de l'absence de FLI-1 et de SPI-1

Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant trois jours en absence ou en présence de 5-FU afin de tester l'effet de cette drogue sur leur survie, leur prolifération et leur différenciation. Les résultats sont présentés sur la figure 34B.

Comme nous pouvons l'observer sur cette figure, le traitement des cellules 745A #44 par le 5-FU conduit à l'apparition de cellules mortes (Figure 34B : moins de 0,5 % en absence contre 36,7 % en présence de 5-FU), à la réduction du nombre total de cellules (Figure 34B :

100 % en absence contre 3,2 % en présence de 5-FU) et enfin à l'apparition de cellules hémoglobinisées (Figure 34B : moins de 0,5 % en absence contre 12,8 % en présence de 5-FU).

Ces résultats montrent que le traitement des cellules 745A #44 mime les effets phénotypiques de l'absence de FLI-1 et de SPI-1.

Pris ensemble, ces résultats montrent que deux drogues décrites pour induire un stress ribosomique miment les effets de l'absence de FLI-1 et de SPI-1 sur le phénotype des cellules NN10 et 745A.

IV- Activation modérée du taux de p53 en réponse à la déplétion de FLI-1 et de SPI-

1 dans les cellules NN10 et 745A

A) p53 est exprimé dans les cellules 745A et NN10

Comme j'ai déjà pu le mentionner dans ce manuscrit, un stress ribosomique, induit par exemple par de faibles doses d'ActD conduit à l'activation de p53 (Choong et al., 2009). Le facteur de transcription p53 est muté de manière récurrente dans les lignées érythroleucémiques de Friend. En particulier, les cellules 745A présentent la mutation C269S qui touche le domaine de liaison à l'ADN de p53 (Barnache et al., 1998). Cette mutation affecte l'activité transcriptionnelle de p53. La protéine p53 possède également une activité cytoplasmique qui intervient notamment dans la contribution de p53 à l'apoptose (Wolff et al., 2008). Malgré cette mutation dans les cellules érythroleucémiques de Friend, p53 pourrait malgré tout conserver cette activité cytoplasmique. En revanche, aucune donnée documentant une mutation de p53 dans les cellules NN10 n'est disponible dans la littérature.

Dans un premier temps, j'ai voulu déterminer si les cellules NN10 #5 et 745A #44 produisaient la protéine p53. J'ai donc analysé par Western blot le taux de protéine p53 de ces cellules en prenant comme contrôle positif les cellules érythroleucémiques de Friend CB7 (Munroe et al., 1990) et comme contrôle négatif les cellules érythroleucémiques de Friend CB3 (Ben-David et al., 1988).

La figure 35 montre un taux de protéine p53 très important dans les cellules NN10 #5 (figure 35 : voir puits 3). Le taux de protéine p53 des cellules 745A #44 est, en revanche, beaucoup plus modéré (figure 35 : comparer puits 3 et 4).

Ces résultats indiquent donc que p53 est produite par les cellules 745A et NN10.

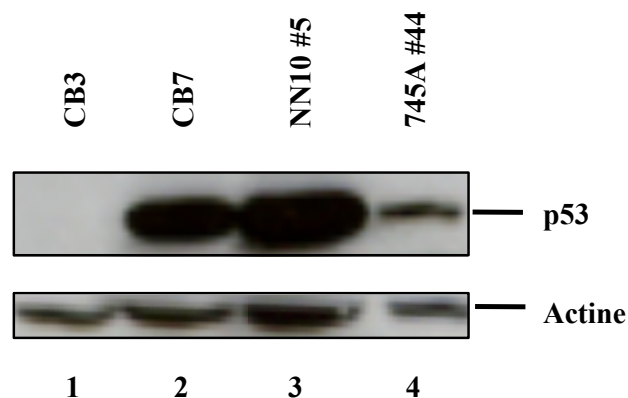


Figure 35 : p53 est produite dans les cellules 745A #44 et NN10 #5

Analyse par Western blot du taux de protéine p53 des cellules érythroleucémiques CB3 (Puits 1 – contrôle négatif), CB7 (Puits 2 – contrôle positif), NN10 #5 (Puits 3) et 745A #44 (Puits 4). L'actine est montrée en contrôle de charge.

B) Le traitement des cellules NN10 #5 et 745A #44 par de faibles doses d'ActD conduit à l'augmentation du taux de protéine de p53

Comme mentionné dans la partie B, le traitement par l'ActD des cellules NN10 #5 et 745A #44 mime les effets induits par l'absence de FLI-1 et de SPI-1. Plusieurs groupes ont montré que le traitement similaire de différents types cellulaires conduisait à la stabilisation de p53 (Choong et al., 2009 ; Sundqvist et al., 2009). J'ai donc voulu déterminer si le traitement des cellules NN10 #5 et 745A #44 par l'ActD conduisait à l'augmentation du taux de protéine p53. Les cellules NN10 #5 et les cellules 745A #44 ont donc été cultivées en absence ou en présence de faibles doses d'ActD ou de DMSO (contrôle du solvant) pendant trois jours. J'ai réalisé des extraits protéiques totaux et des extractions d'ARN pour doser le taux de protéine et de transcrits p53 dans ces cellules. Les résultats sont présentés sur la figure 36.

La figure 36A montre que le traitement des cellules 745A #44 et des cellules NN10 #5 par l'ActD conduit à une augmentation du taux de protéine p53 (figure 36A : 745A #44 : 100 en absence contre 520 en présence d'ActD ; NN10 #5 : 100 en absence contre 199 en présence d'ActD). En revanche, le DMSO n'affecte pas le taux de protéine p53 dans les cellules 745A #44 (Figure 36A : 100 en absence contre 158 en présence de DMSO) et dans les cellules NN10 #5 (Figure 36A : 100 en absence contre 133 en présence de DMSO).

Afin de déterminer si cette augmentation du taux de protéine p53 observée après traitement par l'ActD des cellules NN10 #5 et 745A #44 est liée à une augmentation du taux de transcrits du gène *p53*, j'ai mesuré ce taux par des expériences de RT-qPCR. Nous pouvons constater que l'ActD n'affecte pas le taux de transcrits *p53* dans les cellules 745A #44 (Figure 36B : 1 en absence contre 1,25 en présence d'ActD) et dans les cellules NN10 #5 (Figure 36B : 1 en absence contre 1,12 en présence d'ActD).

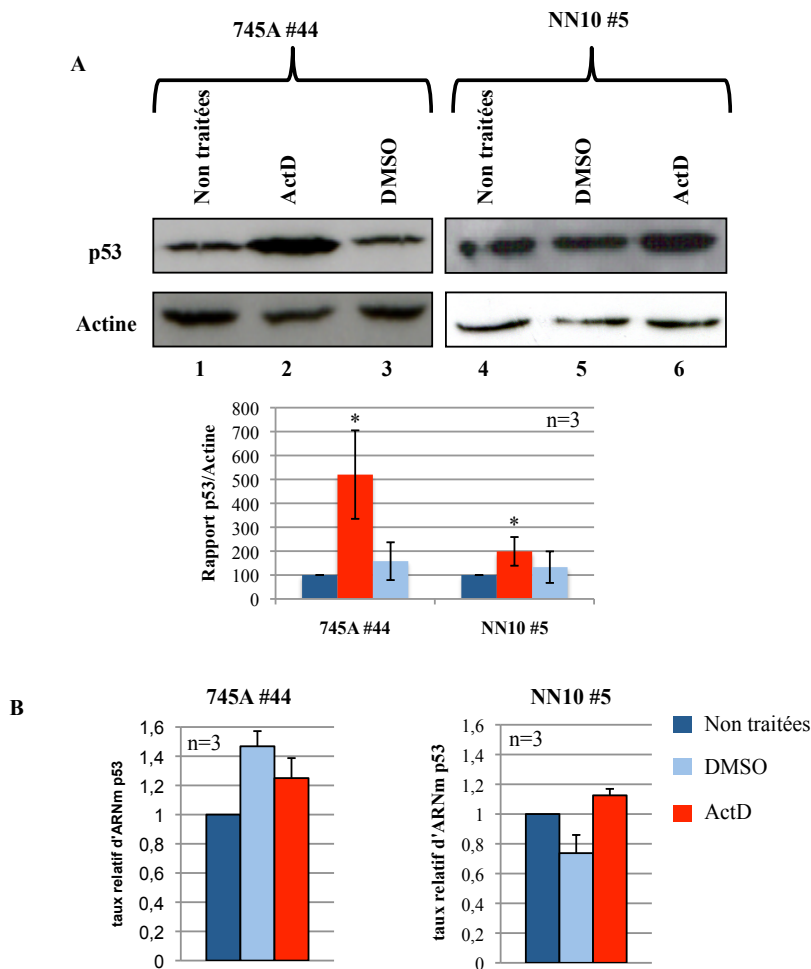


Figure 36 : Le traitement par de faibles doses d'actinomycine D augmente le taux de protéine p53 dans les cellules NN10 #5 et 745A #44

Les cellules 745A #44 et les cellules NN10 #5 ont été cultivées pendant trois jours en absence ou en présence d'ActD ou de DMSO.

A : Mesure par Western blot du taux de protéine p53 et quantification du signal par le logiciel ImageJ. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : $p < 0,05$

B : Mesure par RT-qPCR du taux de transcrits du gène *p53*. Les valeurs sont rapportées au taux de transcrits du gène *actine* et sont normalisées par rapport aux cellules non traitées. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes.

Ces résultats montrent donc que le traitement des cellules NN10 #5 et 745A #44 par de faibles doses d'ActD conduit à une augmentation du taux de protéine p53 indépendante de son niveau d'ARNm. Ces résultats suggèrent également que, bien que mutée, la protéine p53 conserve une régulation en réponse au traitement par une drogue (ActD) connue pour induire une voie de stress ribosomique.

C) L'absence de FLI-1 augmente le taux de protéine p53

Fort de ces résultats, je me suis intéressé aux effets de l'absence de FLI-1 et de SPI-1 sur le taux de protéine p53 des cellules 745A #44 et NN10 #5.

Les cellules NN10 #5 ont donc été cultivées pendant trois jours en présence ou en absence de doxycycline. Le taux de protéine p53 a été mesuré par Western blot. Comme nous pouvons le voir sur la figure 37A, l'absence de FLI-1 est corrélée à une augmentation du taux de protéine p53 (Figure 37A : 100 en absence contre 162 en présence de doxycycline).

Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours en absence de doxycycline puis leur différenciation a été induite par l'ajout d'HMBA deux jours avant l'analyse du taux de protéine p53 par Western blot. De façon surprenante, la figure 37A montre que l'induction de la différenciation des cellules 745A #44 par l'HMBA s'accompagne d'une réduction drastique du taux de protéine p53 (Figure 37A : 100 en absence contre 27 en présence d'HMBA). En revanche, le traitement simultané des cellules 745A #44 par l'HMBA et par la doxycycline augmente le taux de protéine p53 comparé à celui des cellules traitées uniquement par l'HMBA (Figure 37A : 27 en présence d'HMBA contre 63 en présence d'HMBA et de doxycycline). Néanmoins, ce taux de protéine n'atteint pas celui des cellules non traitées (Figure 37A : 100 en absence contre 63 en présence d'HMBA et de doxycycline).

Ces résultats indiquent donc que l'absence de FLI-1 conduit à une augmentation du taux de protéine p53. J'ai voulu ensuite déterminer si cette augmentation était liée à une augmentation du taux de transcrits p53. Les ARN des cellules traitées dans les mêmes conditions décrites ci-dessus ont été extraits puis rétro-transcrits. Des expériences de RT-qPCR ont été réalisées afin de doser le taux de transcrits p53. Les résultats présentés sur la figure 37B montrent que le traitement des cellules NN10 #5 par la doxycycline n'affecte pas de manière significative le taux de transcrits p53 (Figure 37B : 1 en absence contre 0,76 en présence de doxycycline). De la même manière, les traitements des cellules 745A #44 par l'HMBA (Figure 37B : 1 en absence contre 1,18 en présence d'HMBA) ou par l'HMBA et par la doxycycline (Figure 37B : 1 en absence contre 1,63 en présence d'HMBA et de doxycycline) n'affectent pas le taux de transcrits p53. Ces résultats indiquent donc que l'augmentation de p53 observée en présence de doxycycline dans les cellules NN10 #5 et en présence d'HMBA et de doxycycline dans les cellules 745A #44 n'est pas la conséquence d'une augmentation du taux de ses transcrits.

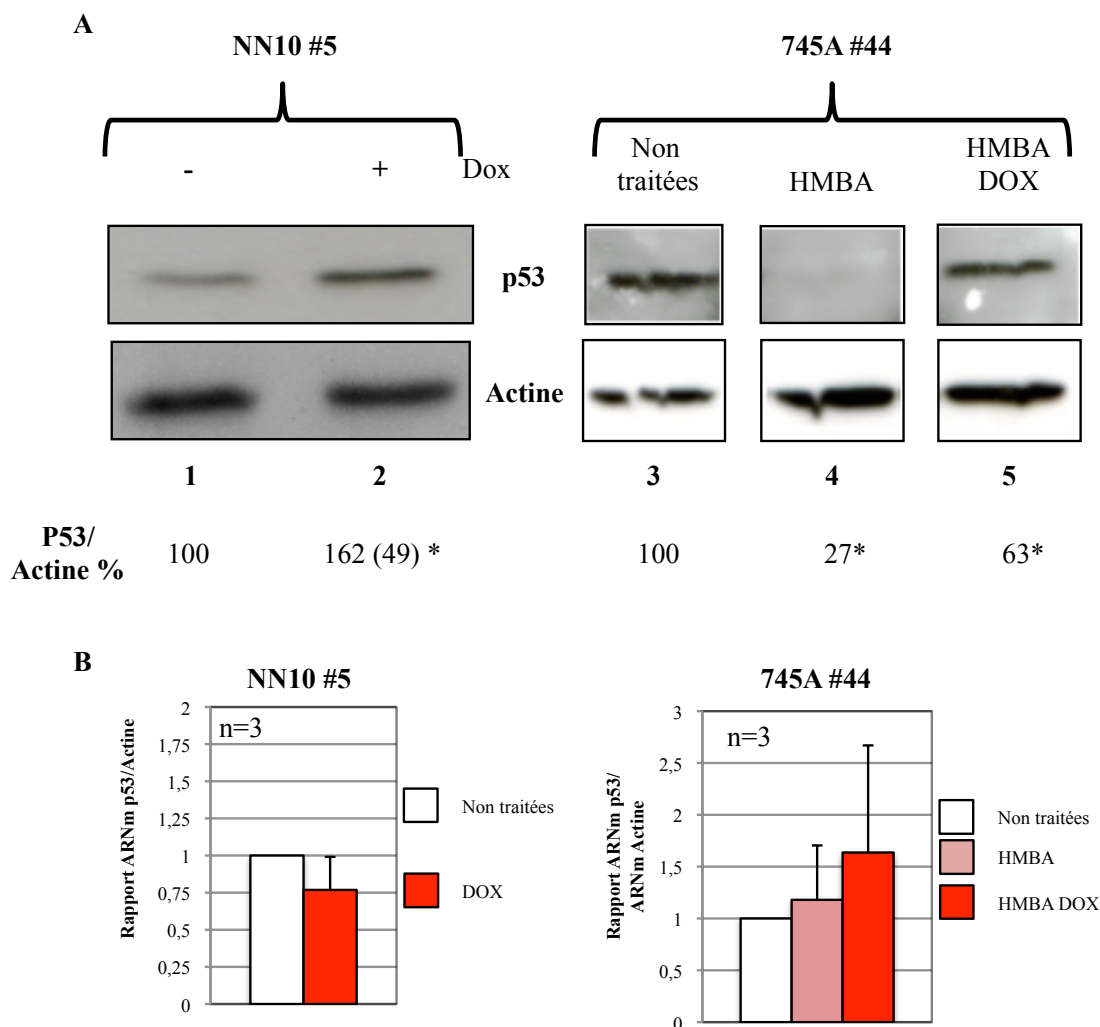


Figure 37 : L'absence de FLI-1 conduit à une augmentation du taux de protéine p53 dans les cellules 745A et NN10

A : Analyse en Western blot du taux de protéine p53 des cellules NN10 #5 cultivées pendant deux jours en absence (Puits 1) ou en présence (Puits 2) de doxycycline et des cellules 745A #44 traitées par l'HMBA avec (puits 5) ou sans (Puits 4) doxycycline ou non traitées (puits 3). L'actine β est utilisée comme contrôle de charge. Les valeurs indiquées représentent les moyennes et les écart types de la quantification des blots à l'aide du logiciel ImageJ à partir de cinq expériences indépendantes. * : $p < 0,05$.

B : Analyse par RT-qPCR du taux de transcrits p53 des cellules NN10 #5 (graphique de gauche) et 745A #44 (graphique de droite) cultivées dans les mêmes conditions qu'en A. Les valeurs, rapportées au taux de transcrits de l'actine β et à la valeur des cellules non traitées, représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

D) L'augmentation de p53 ne contribue pas à la différenciation ni à la prolifération des cellules 745A #44 et des cellules NN10 #5

L'absence de FLI-1 dans les cellules NN10 #5 et les cellules 745A #44 augmente le taux de protéine p53. J'ai testé la contribution de cette augmentation à la différenciation et à l'arrêt de prolifération de ces cellules en réprimant l'expression de p53 par siARN.

1- Répression de p53 dans les cellules NN10 #5 en présence de doxycycline

Les cellules NN10 #5 ont donc été cultivées pendant trois jours en absence ou en présence de doxycycline et transfectées soit sans siARN soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm du gène codant la luciférase (siLUC) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm du gène codant p53 (siP53). La différenciation et la prolifération de ces cellules ont été mesurées. Les résultats sont présentés sur la figure 38.

Dans un premier temps, j'ai testé la répression de p53 par ces siARN en dosant le taux de protéine p53 par Western blot. La figure 38A montre une réduction du taux de protéine p53 en présence des siP53 alors que les siLUC n'ont pas d'effets sur le taux de protéine p53.

J'ai ensuite testé la prolifération de ces cellules par des comptages cellulaires. Comme attendu, le traitement des cellules NN10 #5 par la doxycycline conduit à une réduction du nombre total de cellules en absence de siARN (Figure 38B : 100 % en absence contre 67 % en présence de doxycycline) et en présence de siLUC (Figure 38B : 96,2 % en absence contre 59,3 % en présence de doxycycline). La répression de p53 n'atténue pas cette réduction (Figure 38B : 80,5 % en absence contre 52,4 % en présence de doxycycline).

J'ai enfin testé la différenciation en calculant la proportion de cellules hémoglobinisées par des comptages de cellules colorées par la benzidine. La présence de siLUC n'affecte pas l'hémoglobinisation des cellules NN10 #5 induite par la doxycycline (Figure 38C : 15,6 % en absence de siARN contre 15,9 % en présence de siLUC). De la même manière, la répression de p53 n'atténue pas cette différenciation (Figure 38C : 15,6 % en absence de siARN contre 15,7 % en présence de siP53).

Ces résultats montrent donc que p53 ne contribue pas à l'arrêt de prolifération et à la différenciation des cellules NN10 #5 induite par l'absence de FLI-1.

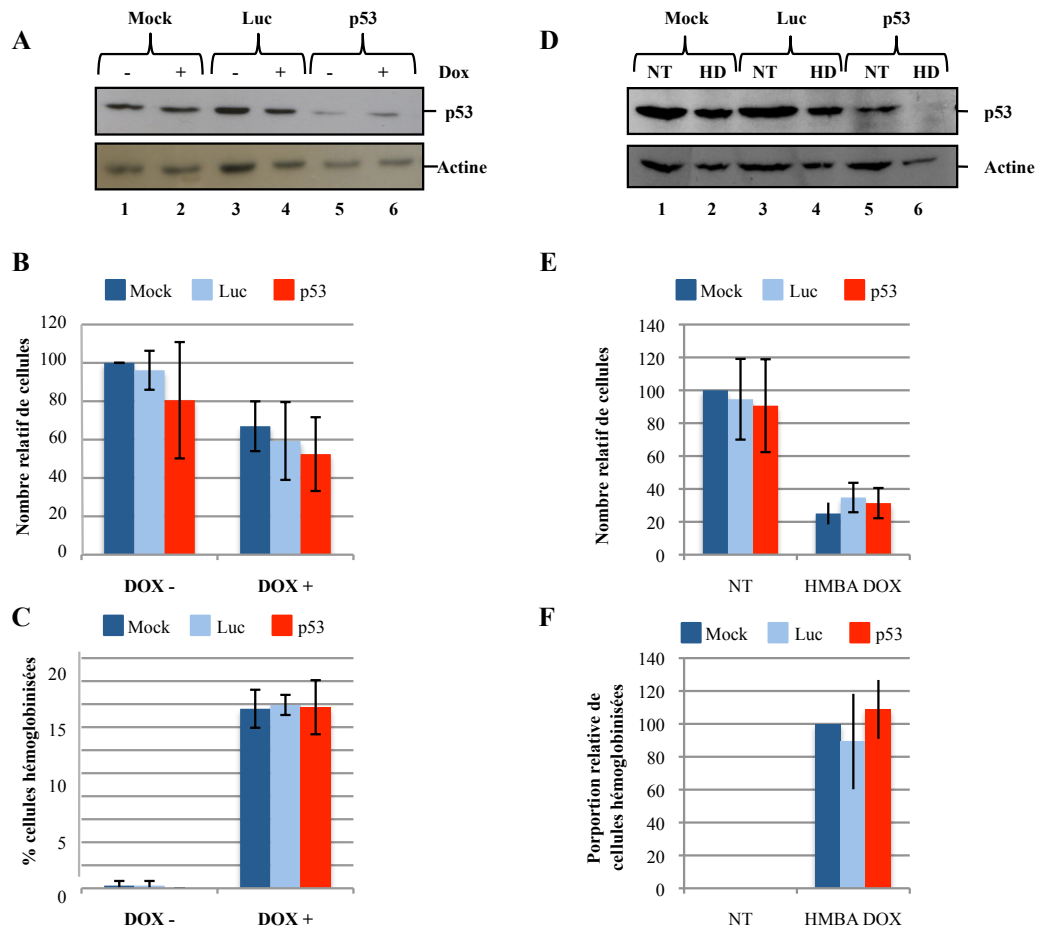


Figure 38 : L'activation de p53 ne contribue pas à l'arrêt de la prolifération et à la différenciation des cellules NN10 et 745A induite par l'absence des facteurs ETS

A : Analyse par Western blot du taux de protéine p53 de cellules NN10 #5 cultivées pendant trois jours en absence (Puits 1, 3 et 5) ou en présence (Puits 2, 4 et 6) de doxycycline et transfectées une fois soit sans siARN (Mock) (Puits 1 et 2) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de la luciférase (Puits 3 et 4) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de p53 (Puits 5 et 6). L'actine β est montré en contrôle de charge. **B** : Mesure de la prolifération des cellules NN10 #5 dans les conditions décrites en A. Les valeurs exprimées en pourcentage des cellules non traitées et transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. **C** : Mesure de la différenciation des cellules NN10 #5 dans les conditions décrites en A. Les valeurs exprimées en pourcentage des cellules traitées et transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. **D** : Analyse par Western blot du taux de protéine p53 de cellules 745A #44 cultivées pendant deux jours en absence (Puits 1, 3 et 5) ou en présence de doxycycline puis deux jours en présence d'HMBA (puits 2, 4 et 6) et transfectées deux fois soit sans siARN (Puits 1 et 2), soit avec des siARN dirigés contre la luciférase (Puits 3 et 4) soit avec des siARN dirigés contre p53 (Puits 5 et 6). L'actine β est montrée en contrôle de charge. **E** : Mesure du nombre total de cellules 745A #44 dans les conditions décrites en D. Les valeurs exprimées en pourcentage des cellules traitées et transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. **F** : Mesure de la différenciation des cellules 745A #44 dans les conditions décrites en D. Les valeurs exprimées en pourcentage des cellules traitées et transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

2- Répression de p53 dans les cellules 745A #44 en présence d'HMBA et de doxycycline

Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours en absence ou en présence de doxycycline et transfectées soit sans siARN soit avec des siLUC soit avec des siP53. Leur différenciation a été induite par l'ajout d'HMBA et les cellules ont de nouveau été soumises à une nouvelle transfection deux jours avant l'analyse. Les résultats sont présentés sur la figure 38D, E et F.

J'ai mesuré la répression de p53 par ces siARN en dosant le taux de protéine p53 par Western blot. La figure 38D montre qu'en présence de siP53, le taux de protéine p53 est réduit (Figure 38D : comparer les puits 1 et 5 et les puits 2 et 6). En revanche, la présence de siLUC dans les cellules 745A #44 n'affecte pas le taux de protéine p53 (Figure 38D : comparer les puits 1 et 3 et les puits 2 et 4). Ces résultats indiquent que l'expression de *p53* est réprimée dans les cellules 745A #44 en présence des siP53.

Comme pour les cellules NN10 #5, j'ai mesuré la prolifération des cellules 745A #44 dans ces différentes conditions par des comptages cellulaires. La figure 38E montre que le traitement simultané par l'HMBA et par la doxycycline entraîne une réduction du nombre total de cellules en absence de siARN (Figure 38E : 100 % en absence contre 25 % en présence d'HMBA et de doxycycline) et en présence de siLUC (Figure 38E : 94,5 % en absence contre 34,7 % en présence d'HMBA et de doxycycline). La répression de p53 n'atténue pas cette réduction (Figure 38E : 90,6 % en absence contre 31,4 % en présence d'HMBA et de doxycycline).

J'ai mesuré la différenciation des cellules 745A #44 en calculant la proportion de cellules hémoglobinisées par des comptages de cellules colorées par la benzidine. La figure

38F montre que la présence de siLUC dans les cellules 745A #44 n'affecte pas la différenciation induite par l'HMBA et par la doxycycline (Figure 38F : 100 % en absence de siARN contre 89,3 % en présence de siLUC). Les mêmes résultats sont observés après répression de p53 (Figure 38F : 100 % en absence de siARN contre 108,9 % en présence de siP53).

Ces résultats indiquent donc que la protéine p53 ne contribue pas à l'arrêt de la prolifération et à la différenciation des cellules 745A #44 induits par l'absence de SPI-1 et de FLI-1.

3- Répression de p53 dans les cellules NN10 #5 en présence d'ActD

Afin de déterminer si l'absence de contribution de p53 à la différenciation et à l'arrêt de prolifération induits par l'absence de FLI-1 et de SPI-1 est la conséquence d'une perte de fonction liée à sa mutation, j'ai voulu déterminer si p53 pouvait contribuer aux phénotypes induits par l'ActD dont il a été décrit que les effets étaient au moins partiellement dépendants de ce facteur. Pour répondre à cette question, j'ai cultivé les cellules NN10 #5 pendant trois jours en absence ou en présence d'ActD ou de DMSO et je les ai transfectées soit sans siARN soit avec des siLUC soit avec des siP53. Les résultats sont présentés sur la figure 39.

La figure 39A montre que la transfection des cellules NN10 #5 avec des siP53 entraîne une réduction du taux de protéine p53 quelque soit la condition de traitement (Figure 39A : comparer les puits 1 et 7, les puits 2 et 8 et les puits 3 et 9). En revanche, la présence de siLUC n'affecte pas le taux de protéine p53 (Figure 39A : comparer les puits 1 et 4, les puits 2 et 5 et les puits 3 et 6). Ces résultats indiquent donc que l'expression de *p53* est réprimée par les siP53 dans les cellules NN10 #5.

Comme précédemment, la prolifération des cellules NN10 #5 a été mesurée par des comptages cellulaires. Comme attendu, le traitement des cellules NN10 #5 par de faibles

doses d'ActD entraîne une réduction du nombre total de cellules en absence de siARN (Figure 39B : 100 % en absence d'ActD contre 36,6 % en présence d'ActD) et en présence de siLUC (Figure 39B : 103,2 % en absence contre 25,1 % en présence d'ActD). De la même manière, la répression de p53 n'atténue pas cette réduction du nombre total de cellules (Figure 39B : 95,8 % en absence contre 31,9 % en présence d'ActD).

La différenciation des cellules NN10 #5 a été mesurée par des comptages de cellules colorées par la benzidine. La figure 39C montre que la présence de siLUC n'affecte pas la différenciation des cellules NN10 #5 induite par l'ActD (Figure 39C : 100 % en absence de siARN contre 105,6 % en présence de siLUC) comme la répression de p53 (Figure 39C : 100 % en absence de siARN contre 141,7 % en présence de siP53).

Ces résultats démontrent donc que p53 ne contribue pas à l'arrêt de prolifération et à la différenciation des cellules NN10 #5 induits par l'ActD.

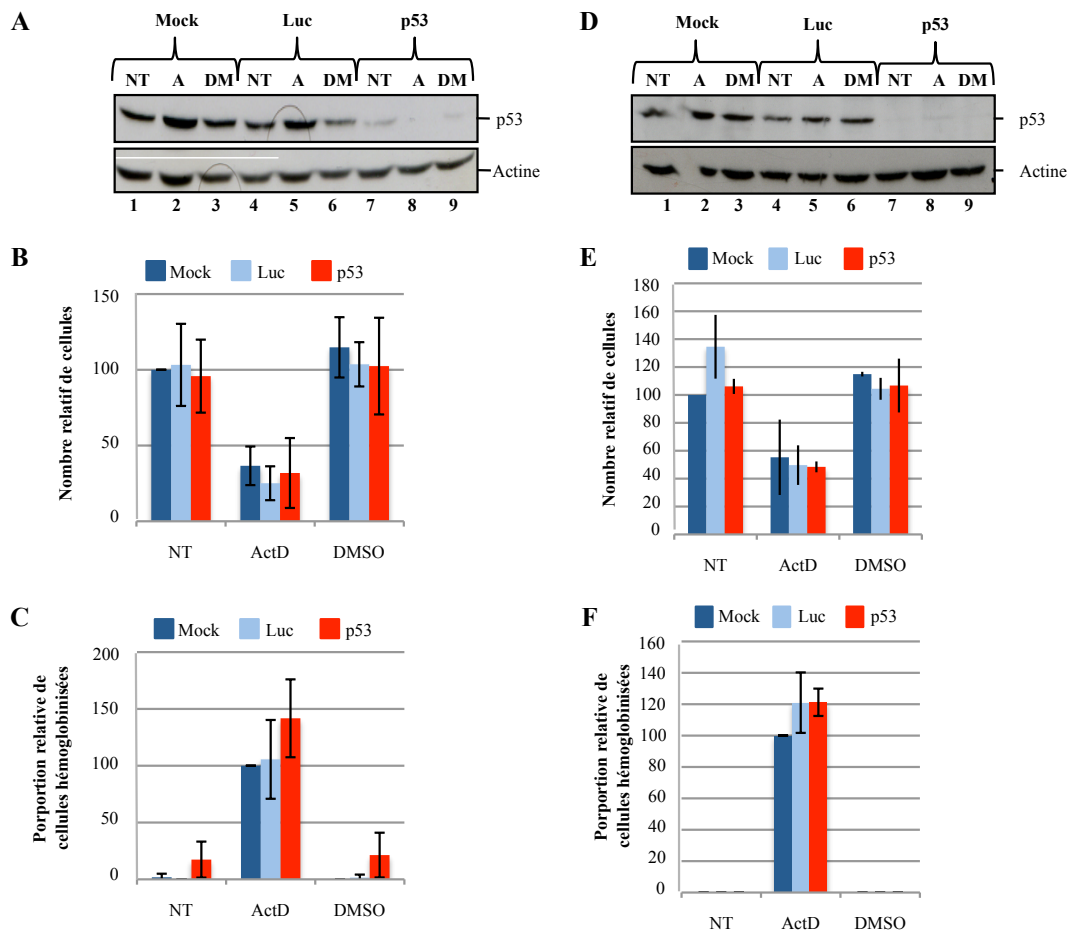


Figure 39 : L'activation de p53 ne contribue pas à l'arrêt de prolifération et à la différenciation des cellules 745A et NN10 induits par l'actinomycine D

A : Analyse par Western blot du taux de protéine p53 de cellules NN10 #5 cultivées pendant trois jours en absence (Puits 1, 4 et 7) ou en présence d'actinomycine D (Puits 2, 5 et 8) ou de DMSO (Puits 3, 6 et 9) et transfectées une fois soit sans siARN (Mock) (Puits 1, 2 et 3) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de la luciférase (Puits 4, 5 et 6) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de p53 (Puits 7, 8 et 9). L'actine β est montré en contrôle de charge. **B** : Mesure de la prolifération des cellules NN10 #5 dans les conditions décrites en A. Les valeurs exprimées en pourcentage des cellules non traitées et transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. **C** : Mesure de la différenciation des cellules NN10 #5 dans les conditions décrites en A. Les valeurs exprimées en pourcentage des cellules traitées et transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. **D** : Analyse par Western blot du taux de protéine p53 de cellules 745A #44 cultivées pendant quatre jours en absence (Puits 1, 4 et 7) ou en présence d'actinomycine D (Puits 2, 5 et 8) ou de DMSO (Puits 3, 6 et 9) et transfectées une fois soit sans siARNs (Puits 1, 2 et 3) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de la luciférase (Puits 4, 5 et 6) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de p53 (Puits 7, 8 et 9). L'actine β est montrée en contrôle de charge. **E** : Mesure du nombre total de cellules 745A #44 dans les conditions décrites en D. Les valeurs exprimées en pourcentage des cellules traitées et transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. **F** : Mesure de la différenciation des cellules 745A #44 dans les conditions décrites en D. Les valeurs exprimées en pourcentage des cellules traitées et transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Répression de p53 dans les cellules 745A #44 en présence d'ActD

Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant quatre jours en absence ou en présence d'ActD ou de DMSO et transfectées deux fois soit sans siARN soit avec des siLUC soit avec des siP53. Le taux de protéine p53, la prolifération et la différenciation sont présentés sur la figure 39.

La figure 39D montre que la transfection des cellules 745A #44 avec des siP53 conduit à la réduction du taux de protéine p53 (Figure 39D : comparer les puits 1 et 7, les puits 2 et 8 et les puits 3 et 9) tandis que la présence de siLUC n'affecte pas le taux de protéine p53 (Figure 39D : comparer les puits 1 et 4, les puits 2 et 5 et les puits 3 et 6). Ces résultats montrent que l'expression de *p53* est réprimée par les siP53.

J'ai mesuré la prolifération des cellules 745A #44 par des comptages cellulaires. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 39E, le traitement des cellules 745A #44 par l'ActD induit une réduction du nombre total de cellules que ce soit en absence de siARN (Figure 39E : 100 % en absence contre 55,3 % en présence d'ActD) ou en présence de siLUC (Figure 39E : 134,6 % en absence contre 49,7 % en présence d'ActD). La répression de p53 n'a aucun effet sur cette réduction (Figure 39E : 106,1 % en absence contre 48,4 % en présence d'ActD).

J'ai enfin mesuré la différenciation des cellules 745A #44 par des comptages de cellules colorées par la benzidine. La figure 39F montre que la présence de siLUC n'affecte pas la différenciation induite par l'ActD (Figure 39F : 100 % en absence de siARN contre 121 % en présence de siLUC) comme la répression de p53 (Figure 39F : 100 % en absence de siARN contre 121,2 % en présence de siP53).

Ces résultats indiquent donc que la protéine p53 ne contribue pas à l'arrêt de prolifération et à la différenciation des cellules 745A #44 induite par l'ActD.

L'ensemble des résultats présentés dans ce paragraphe suggère que la protéine p53 n'est pas fonctionnelle dans les cellules NN10 et 745A. Notre hypothèse de départ qui était qu'un stress ribosomique conduisant à l'activation de p53 contribue à la différenciation et à l'arrêt de prolifération induits par l'absence de FLI-1 et SPI-1 est donc invalidée. Néanmoins, ces résultats n'éliminent pas la possibilité que l'augmentation du taux de protéine p53 observée en absence de FLI-1 puisse résulter d'un stress ribosomique.

IV- L'absence de FLI-1 et de SPI-1 conduit-elle à un stress ribosomique stabilisant p53 ?

Afin de tester cette hypothèse, j'ai entrepris de déterminer d'une part si l'augmentation de p53 en absence de FLI-1 était dépendante de la protéine RPL11, un des médiateurs essentiels du stress ribosomique et d'autre part si l'augmentation du taux de protéine p53 observée dans les cellules 745A #44 en présence d'HMBA et de doxycycline comparée au taux de p53 en présence d'HMBA était la conséquence d'un stress ribosomique.

A) La répression de Rpl11 n'atténue pas l'augmentation du taux de protéine p53 des cellules 745A #44

Afin de déterminer si l'augmentation du taux de protéine p53 induite par le traitement simultané des cellules 745A #44 par l'HMBA et par la doxycycline est la conséquence d'un stress ribosomique, j'ai tenté de réprimer l'expression du gène codant la protéine ribosomique RPL11 qui est une des protéines capables d'interagir et de réprimer les fonctions ubiquitine

ligase de MDM-2. J'ai donc cultivé les cellules 745A #44 pendant deux jours en présence de doxycycline puis leur différenciation a été induite par l'ajout d'HMBA. Parallèlement à ce traitement, les cellules ont été transfectées deux fois à 48h d'intervalle soit sans siARN, soit avec des siLUC soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm du gène *rpl11* (siRPL11). Les résultats sont présentés sur la figure 40.

Dans un premier temps, j'ai voulu tester la répression de RPL11 par les siRPL11. J'ai mesuré le taux de protéine RPL11 par Western blot et le taux de transcrits *Rpl11* par RT-qPCR. De manière surprenante, le taux de protéine totale RPL11 n'est pas affecté par la présence des siRPL11 (Figure 40A : comparer les puits 1 et 3) ni par les siLUC (Figure 40A : comparer les puits 1 et 2). La non réduction du taux de protéine Rpl11 en présence des siRPL11 peut s'expliquer par la stabilité importante des ribosomes. Par conséquent, seule la fraction de protéine RPL11 non associée aux ribosomes doit être affectée par les siRPL11. J'ai donc entrepris de vérifier l'effet des siRPL11 sur le taux de transcrits RPL11 par des expériences de RT-qPCR. La figure 40B montre une réduction du taux de transcrits *Rpl11* en présence de siRPL11 (Figure 40A : 100 % en absence de siARN contre 23,7% en présence de siRPL11). Les siLUC n'affectent pas non plus le taux de transcrits *Rpl11* (Figure 40A : 100 % en absence de siARN contre 113,6 % en présence de siLuc). Ces résultats indiquent que les siRPL11 réduisent le taux de transcrits *Rpl11* nous permettant conclure quant à sa contribution au taux de protéine p53 dans cette condition.

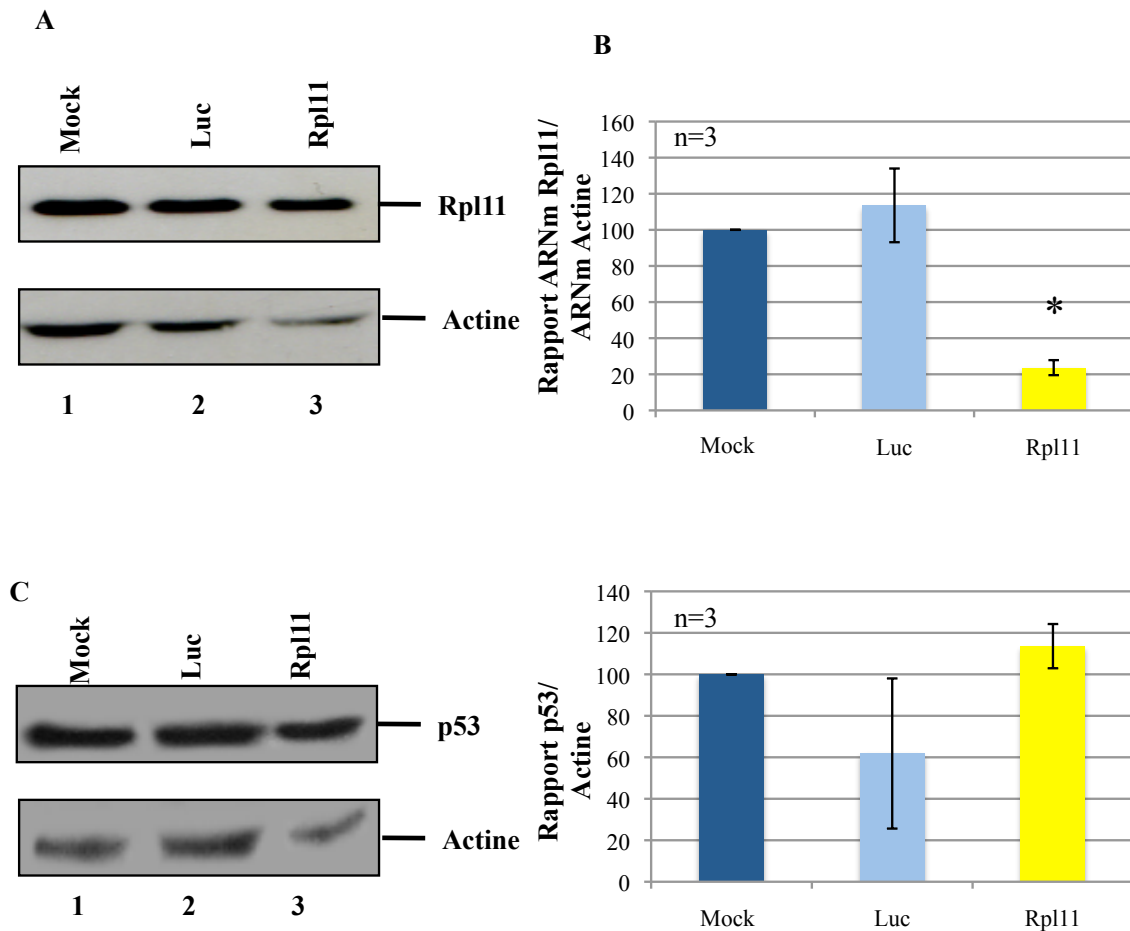


Figure 40 : La répression de Rpl11 ne réduit pas le taux de protéine p53 des cellules 745A en absence de SPI-1 et de FLI-1

Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours en présence de doxycycline puis leur différenciation a été induite par l'HMBA deux jours avant analyse. Ces cellules ont subi deux transfections soit sans siARN (Mock) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de la luciférase (Luc) soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm de Rpl11 (Rpl11).

A : Analyse par Western blot du taux de protéine Rpl11 (blot supérieur) et Actine β (blot inférieur).

B : Analyse par RT-qPCR du taux de transcrits Rpl11. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du taux de transcrits des cellules transfectées sans siARN rapporté au taux de transcrits Actine et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : $p < 0,05$.

C : Analyse par Western blot du taux de protéine p53 (blot supérieur) et Actine β (blot inférieur). Le graphique de droite représente la quantification de blot p53 issue de trois expériences indépendantes. Les valeurs, obtenues avec le logiciel ImageJ, sont exprimées en pourcentage du taux de protéines p53 rapporté au taux de protéines Actine des cellules transfectées sans siARN.

J'ai ensuite déterminé l'effet de la répression de RPL11 sur le taux de protéine p53. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 40C, la répression de Rpl11 dans les cellules 745A #44 ne réduit pas le taux de protéine p53 (Figure 40C : comparer puits 1 et 3 ainsi que barres bleue foncée et jaune). La figure 40C montre également un écart-type important pour la quantification par ImageJ du taux de protéine p53 en présence de siLUC. Cette variabilité est la conséquence d'un effet non reproductible du siARN sur le taux de protéine p53 (figure 40C : comparer puits 1 et 2 et barres bleue foncée et bleue claire).

Ces résultats tendent à montrer que l'augmentation du taux de protéine p53 observée en présence d'HMBA et de doxycycline n'est pas dépendante de la protéine ribosomique RPL11. Les groupes de S. Volarevic et de M. Nister ont montré que la seule répression de RPL11 atténue l'activation de p53 en réponse à l'ActD ou à des siARN dirigés contre l'ARNm de *Rpl24* (Lindstrom and Nister, 2010 ; Barkic et al., 2009). Basé sur ces observations, mes résultats tendent également à montrer que l'augmentation de p53 observée en absence de FLI-1 en présence d'HMBA dans les cellules 745A #44 n'est pas dépendante d'un stress ribosomique.

B) Effet de l'absence de FLI-1 et de SPI-1 sur le pool de protéine

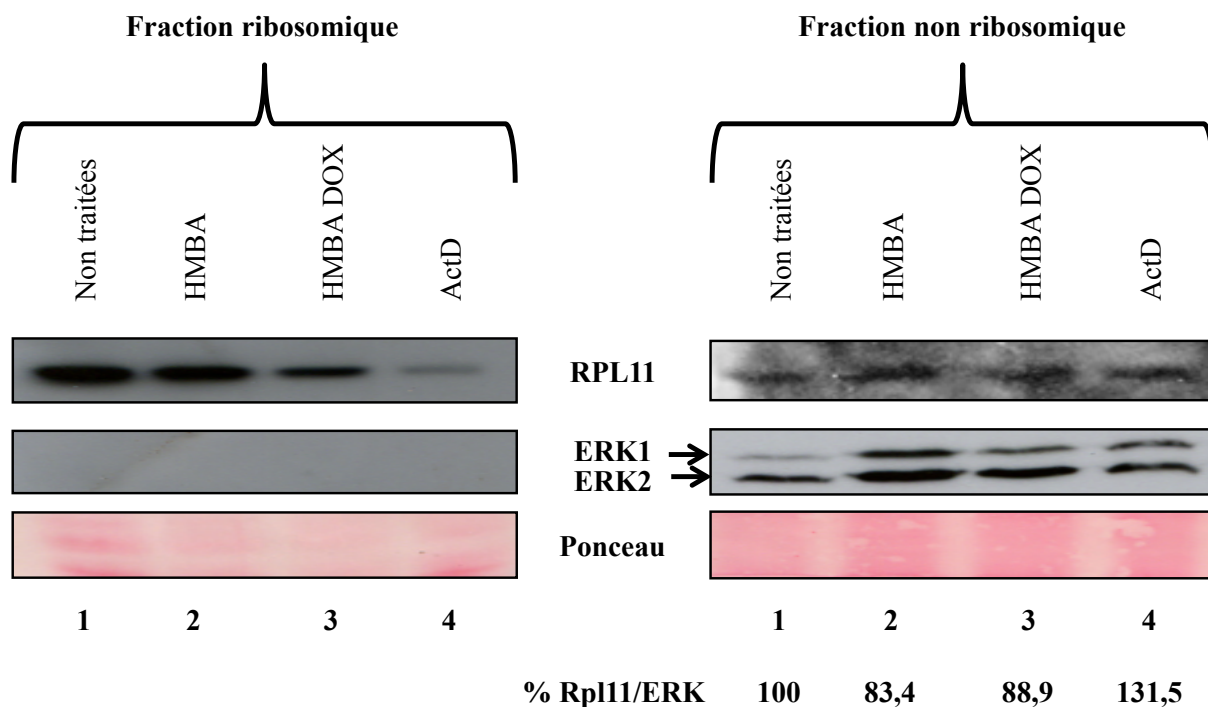
RPL11 libre ?

Un stress ribosomique se caractérise par l'accumulation dans le nucléoplasme de protéines ribosomiques libres. Afin de déterminer si l'absence de FLI-1 et de SPI-1 induit un stress ribosomique, j'ai tenté de quantifier le pool de protéine ribosomique RPL11 par un fractionnement cellulaire. Les cellules 745A #44 ont donc été cultivées pendant deux jours en présence de doxycycline puis leur différenciation a été induite par l'HMBA deux jours avant l'analyse. En parallèle à ce traitement, j'ai cultivé ces mêmes cellules en présence ou en

absence d'ActD pendant 36 h comme contrôle positif d'un stress ribosomique. Les cellules ont ensuite été lysées intégralement et soumises à une ultracentrifugation permettant le culottage des ribosomes. Les ribosomes et la fraction libre ont alors été déposés sur gel de SDS-PAGE et le taux de protéine RPL11 dans ces différentes fractions a été quantifié par Western blot.

La figure 41 montre que la protéine ERK1/2 qui est ici utilisée comme contrôle de charge n'est détectée que dans la fraction non ribosomique suggérant que le fractionnement est de bonne qualité. Nous pouvons également constater que la protéine RPL11 est détectée dans la fraction libre des cellules non traitées. Contrairement à ce qui était attendu, le taux de protéine RPL11 libre n'est pas affecté par le traitement par de faibles doses d'ActD (Figure 42 : comparer puits 5 et 8). De la même manière, le traitement des cellules 745A #44 par l'HMBA en présence ou en absence de doxycycline n'a aucun effet sur le taux de protéine RPL11 libre (Figure 41 : comparer puits 5 et 6 puits 5 et 7). Toutefois, le traitement simultané par l'HMBA et par la doxycycline semble diminuer le taux de protéine RPL11 dans la fraction ribosomique (Figure 41 : comparer puits 1 et 3) comme le traitement par l'ActD (Figure 41 : comparer puits 1 et 4) alors que le traitement par l'HMBA seul n'a pas d'effet sur ce taux (Figure 41 : comparer puits 1 et 2). La même observation est constatée pour la protéine RPL24 (données non montrées). Cette diminution pourrait refléter la réduction du nombre de ribosomes en réponse à ce traitement.

Ces résultats suggèrent donc que l'absence de FLI-1 et de SPI-1 dans les cellules 745A #44 n'entraîne pas d'augmentation détectable du pool de protéine RPL11 libre suggérant donc que l'absence de FLI-1 et de SPI-1 n'induit pas un stress ribosomique.



5,8.10⁶ cellules chargées

Figure 41 : L'absence de FLI-1 et de SPI-1 n'entraîne pas d'augmentation détectable du pool de protéines RPL11 libres

Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours en absence ou en présence de doxycycline puis leur différenciation a été induite par l'HMBA. En parallèle, les cellules 745A #44 ont été traitées pendant 36h par 5 ng/mL d'actinomycine D (ActD). 90.10⁶ cellules ont été lysées puis les ribosomes ont été culotés. Les ribosomes (puits 1 à 4) et la fraction non ribosomique (puits 5 à 8) de 5,8.10⁶ cellules ont été déposés sur gel SDS-PAGE puis révélé soit avec l'anticorps anti-RPL11 (blot supérieur) ou avec l'anticorps anti-ERK1 (blot inférieur) servant de contrôle de charge. La partie inférieure correspond au rouge ponceau.

Le signal RPL11 a été quantifié par le logiciel Image J et normalisé par rapport au signal donné par l'anticorps anti-ERK1 et est exprimé en pourcentage du signal des cellules non traitées.

Les images de la fraction ribosomique et de ERK1/2 de la fraction non ribosomique correspondent à des expositions de 10 secondes.

L'image du blot anti-RPL11 de la fraction non ribosomique correspond à une exposition de cinq minutes.

V- Effet de la répression de RPL11 sur le phénotype induit par l'HMBA et par la doxycycline

A) La répression de RPL11 atténue la différenciation des cellules 745A #44 induite par l'HMBA et par la doxycycline

Parallèlement à la quantification du taux de protéine p53 après répression de RPL11 (cf. paragraphe 2 de la partie E et figure 42 A et B), j'ai mesuré la différenciation des cellules 745A #44. Les résultats sont présentés sur la figure 42.

J'ai mesuré la différenciation des cellules 745A #44 en comptant les cellules colorées par la benzidine. La figure 42C montre que la présence de siLUC dans les cellules 745A #44 n'affecte pas l'hémoglobinisaiton induite par le traitement simultané par l'HMBA et par la doxycycline (figure 42C : 100 % en absence contre 92,4 % en présence de siLuc). En revanche, la répression de Rpl11 réduit de près de 60 % cette hémoglobinisaiton (figure 42C : 100 % en absence de contre 38,5 % en présence de siRpl11). J'ai voulu déterminer si cette réduction de l'hémoglobinisaiton des cellules 745A #44 après répression de Rpl11 était corrélée à la réduction des gènes de globine β . J'ai pour cela dosé le taux de transcrits de ce gène par RT-qPCR. La figure 42D montre que la présence de siLuc n'affecte pas le taux de transcrits *globine β* (figure 42D : 100 % en absence contre 105,7 % en présence de siLUC). Comme pour l'hémoglobinisaiton des cellules 745A #44, la répression de Rpl11 réduit de manière significative le taux de transcrits de ce gène de différenciation érythrocytaire (Figure 42D : 100 % en absence contre 53,8 % en présence de siRpl11).

Ces résultats suggèrent que RPL11 contribue à la différenciation des cellules 745A #44 induite par l'HMBA et par la doxycycline et ce, indépendamment de p53.

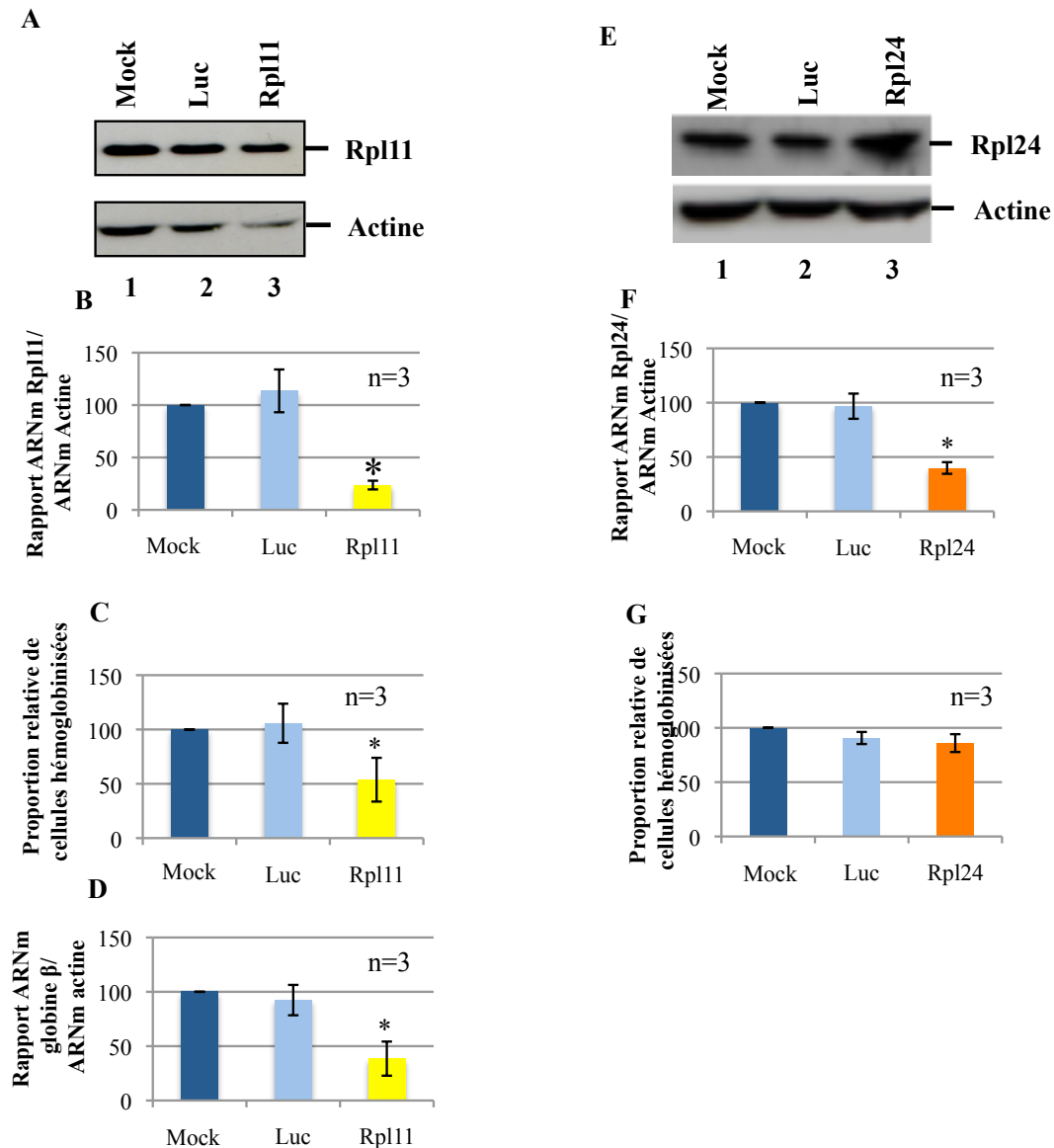


Figure 42 : La répression de Rpl11 atténue la différenciation induite par l'HMBA et par la doxycycline

A, B : Cf. légende des figures 42A et B

C : Mesure de la différenciation (coloration par la benzidine) des cellules 745A #44 cultivées dans les conditions décrites dans la figure 42. Les valeurs, exprimées en pourcentage des cellules transfectées sans siARN (Mock) représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : différence significative ($p < 0,05$). **D** : Mesure par RT-qPCR du taux de transcrits globine β rapporté au taux de transcrit Actine. Les valeurs, exprimées en pourcentage des cellules transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : différence significative ($p < 0,05$). **E** : Mesure par Western blot du taux de protéines Rpl24 (blot supérieur) et Actine β (blot inférieur) des cellules 745A #44 cultivées en présence d'HMBA et de doxycycline et transfectées soit sans siARN (Puits 1), soit avec des siARN dirigés contre la luciférase (Puits 2), soit avec des siARN dirigés contre Rpl24 (Puits 3). **F** : Mesure par RT-qPCR du taux de transcrits Rpl24 rapportés au taux de transcrits Actine des cellules 745A #44 cultivées dans les conditions décrites en C. Les valeurs, exprimées en pourcentage des cellules transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : différence significative ($p < 0,05$). **G** : Mesure de la différenciation (coloration par la benzidine) des cellules 745A #44 cultivées dans les conditions décrites en C. Les valeurs, exprimées en pourcentage des cellules transfectées sans siARN représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

**B) La répression de RPL24 n'a pas d'effet sur la différenciation des cellules
745A #44 induite par l'HMBA et par la doxycycline**

L'atténuation de la différenciation des cellules 745A #44 induite par l'HMBA et par la doxycycline observée en présence de siRPL11 pourrait s'expliquer par un effet de la répression de RPL11 sur le taux global de la traduction. Afin de tester cette hypothèse, j'ai réprimé une autre protéine ribosomique, RPL24. Les cellules 745A #44 ont donc été cultivées en présence de doxycycline pendant deux jours puis leur différenciation a été induite par l'HMBA. Pendant ce traitement, les cellules ont été transfectées deux fois soit sans siARN soit avec des siLUC soit avec des siARN dirigés contre l'ARNm du gène *rpl24*.

Dans un premier temps, j'ai testé la répression de *Rpl24* en mesurant le taux de protéine et de transcrits par Western blot et par RT-qPCR. Les résultats sont présentés sur la figure 42E, F et G. Comme pour la transfection des cellules 745A #44 avec les siRpl11, la transfection des cellules 745A #44 avec les siRpl24 ne conduit pas à une réduction du taux de protéine RPL24 totale (figure 42E: comparer puits 1 et 3). En revanche, cette transfection conduit à une réduction du taux de transcrits *rpl24* (figure 42F : 100 % sans siARN contre 40 % en présence de siRpl24). La réduction du taux de transcrits RPL24 n'est pas observée après transfection des cellules 745A #44 avec les siLuc (figure 42F : 100 % en absence contre 96,8 % en présence de siLuc).

J'ai alors voulu déterminer si la répression de *Rpl24* affecte la différenciation des cellules 745A #44 induite par l'HMBA et par la doxycycline. J'ai ainsi compté les cellules colorées par la benzidine. La figure 42G montre que la transfection des cellules 745A #44 avec des siLuc n'affecte pas leur hémoglobination (figure 42G : 100 % en absence contre 90,7 % en présence de siLuc). De la même façon, la répression de *Rpl24* dans ces mêmes

cellules ne conduit pas à une réduction de la différenciation (figure 42G : 100 en absence contre 85,9% en présence de siRpl24).

Ces résultats montrent que RPL24 ne contribue pas à la différenciation des cellules 745A #44 et suggèrent une contribution spécifique de RPL11 dans la différenciation de ces cellules induite par l'HMBA et par la doxycycline.

VI- Synthèse des résultats obtenus

Les résultats présentés dans cette deuxième partie suggèrent donc que l'absence de SPI-1 et de FLI-1 induite par l'HMBA et par la doxycycline réduit le niveau de biogenèse des ribosomes des cellules 745A #44 et conduit à une augmentation du taux de protéine p53. Néanmoins, cette augmentation de p53 n'est pas dépendante d'un stress ribosomique et ne contribue pas à la reprise de la différenciation et à l'arrêt de la prolifération induits par l'absence de SPI-1 et de FLI-1. De plus, l'absence de ces deux facteurs ETS dans les cellules 745A #44 n'entraîne pas d'augmentation détectable du pool de protéines ribosomiques RPL11 libres suggérant qu'il n'y a pas induction d'un stress ribosomique. Par conséquent, ces résultats invalident notre hypothèse selon laquelle une voie de stress ribosomique relayé par la stabilisation de p53 pourrait contribuer aux phénotypes induits par l'absence de FLI-1 et de SPI-1.

De plus, j'ai pu mettre en évidence une contribution de la protéine RPL11 dans la différenciation des cellules 745A induite par l'absence de FLI-1 et de SPI-1 dont le mécanisme reste à découvrir (**Figure 43**).

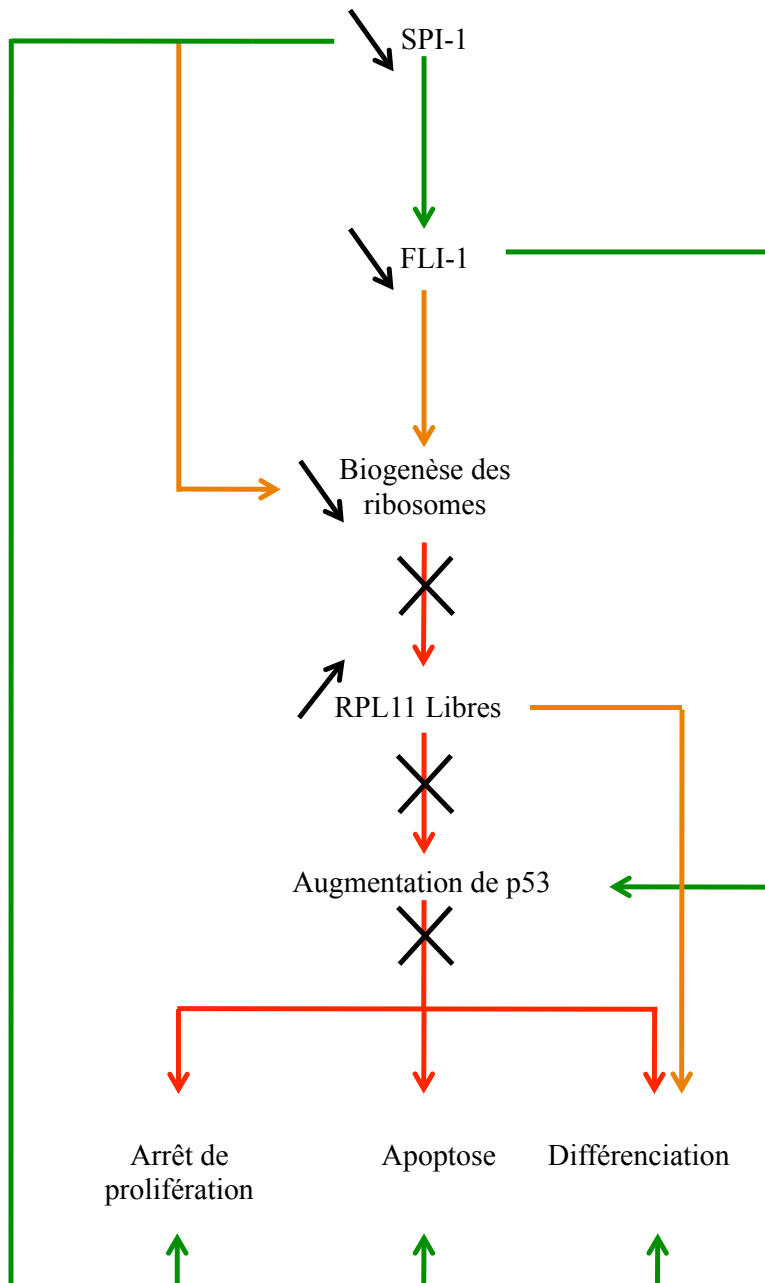


Figure 43 : Invalidation de l'hypothèse du stress ribosomique relayé par l'activation de p53

Les flèches vertes indiquent les liens démontrés par mes résultats.
 Les flèches oranges indiquent les liens suggérés par mes résultats.
 Les flèches rouges indiquent les liens invalidés par mes résultats.

TROISIÈME PARTIE : RECHERCHE DE NOUVELLES CIBLES DIRECTES

COMMUNES AUX FACTEURS DE TRANSCRIPTION FLI-1 ET SPI-1

I- Questions posées et stratégie expérimentale

A) Questions posées

En parallèle à la détermination de la contribution de la biogenèse des ribosomes dans les effets phénotypiques de FLI-1 et de SPI-1 sur la chromatine de cellules érythroleucémiques, nous avons cherché à déterminer s'il existait d'autres gènes cibles directs communs à FLI-1 et SPI-1 que ces gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes.

B) Stratégie expérimentale

Afin de répondre à cette question, nous avons entrepris d'inventorier l'ensemble des sites de recrutement de FLI-1 et SPI-1 dans les clones érythroleucémiques par la technique de ChIP-Seq qui consiste à réaliser un ChIP suivi d'un séquençage massif des fragments de chromatine immunoprécipités. D'autre part, et pour faciliter l'identification des sites de recrutement et des gènes cibles les plus pertinents pour leur participation au processus érythroleucémique, nous avons choisi d'élargir notre étude à plusieurs clones érythroleucémiques indépendants dans le cadre d'une collaboration établie avec C. Guillouf (Equipe de F. Moreau-Gachelin, Institut Curie, Paris) et le CNS (Centre National de Séquençage).

Le projet, présenté sur la figure 44, consiste à séquencer la chromatine issue de ChIP avec soit l'anticorps anti-FLI-1 (appelée par la suite chromatine FLI-1) soit l'anticorps anti-

SPI-1 (appelée par la suite chromatine SPI-1) réalisés à partir de trois clones érythroleucémiques indépendants :

- Le clone 745A #44 qui exprime SPI-1 et FLI-1 et dont le traitement par la doxycycline induit la répression de FLI-1
- Le clone NN10 #5 qui n'exprime que FLI-1 et dont le traitement par la doxycycline induit également la répression de FLI-1
- Un clone dérivé de souris transgénique SPI-1 qui exprime SPI-1 et dont le traitement par la doxycycline induit la répression de SPI-1

Par le choix de ces trois clones érythroleucémiques, nous avons ainsi la possibilité de corréler les données de ChIP-Seq FLI-1 ou SPI-1 aux conséquences de leur répression inductible sur le phénotype et le transcriptome des mêmes cellules et ce, dans trois contextes érythroleucémiques indépendants.

Dans le cadre de ce projet, mon travail consistait à préparer la quantité suffisante (20 ng) de chromatine FLI-1 à partir des cellules NN10 #5 et des cellules 745A #44 avec ou sans FLI-1 tandis que C. Guillouf était chargée de préparer la même quantité de chromatine SPI-1 dans les cellules 745A #44 et les cellules de souris transgéniques SPI-1. Enfin, le CNS s'occupe de séquencer les chromatines FLI-1 et SPI-1 et de réaliser l'alignement des séquences sur le génome.

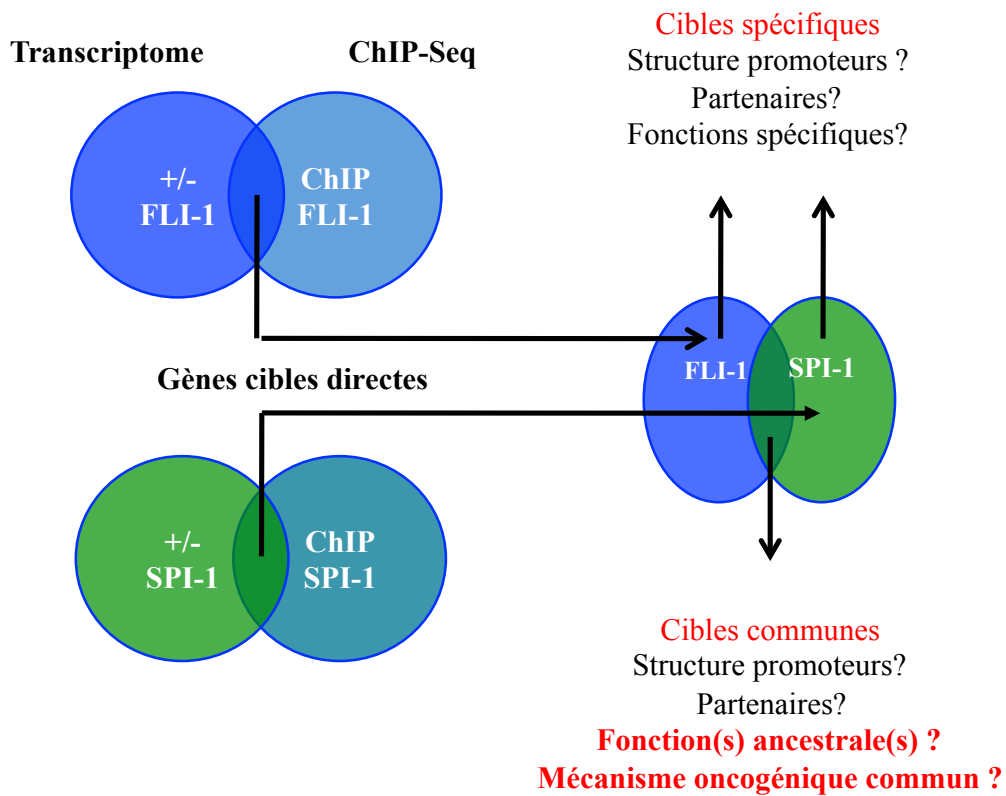
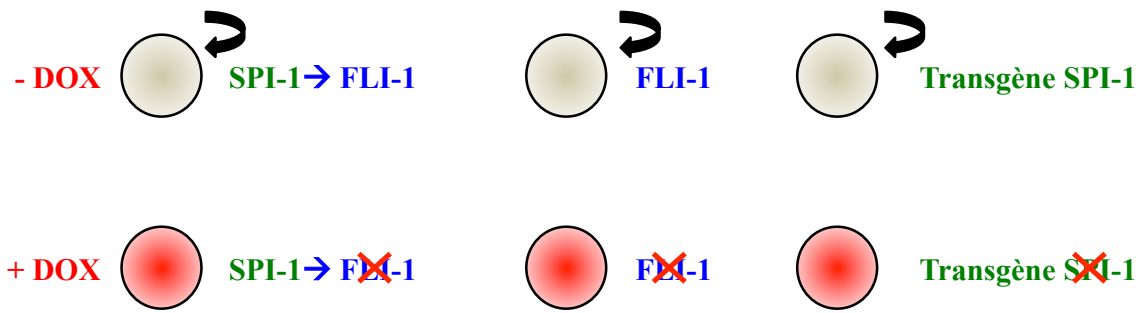


Figure 44 : Projet de ChIP-Seq FLI-1 et SPI-1 dans trois lignées érythroleucémiques

II- Préparation de la chromatine FLI-1 dans les cellules 745A #44 et les cellules NN10 #5

A) Obtention de la chromatine FLI-1 à partir des cellules NN10 #5 avec ou sans FLI-1

J'ai cultivé pendant deux jours les cellules NN10 #5 en absence ou en présence de doxycycline.

Dans un premier temps, j'ai testé la répression de FLI-1 en mesurant son taux de protéine par Western blot. La figure 45A montre que le traitement par la doxycycline conduit à une réduction de plus de 90 % du taux de protéine FLI-1 (Figure 45A : comparer puits 1 et 2).

Afin d'obtenir la quantité suffisante de chromatine FLI-1 (20 ng), j'ai cumulé la chromatine issue de 12 ChIPs réalisés chacun à partir de 8.10^6 cellules issues de trois cultures indépendantes. Pour chaque culture, j'ai mesuré la taille des fragments soniquée avant précipitation et contrôlé l'efficacité d'enrichissement par qPCR. Les résultats sont présentés sur les figures 45B et 45C.

Afin de mesurer la taille des fragments de chromatine soniquée, j'ai déposé sur un gel d'agarose 1 % un échantillon de chromatine non immunoprécipitée. La figure 45B montre des fragments mesurant en moyenne 600 pb qui est la taille de fragments optimale pour les ChIPs avec l'anticorps anti-FLI-1.

J'ai testé l'efficacité d'enrichissement des ChIP par des expériences de qPCR avec des oligonucléotides amplifiant des régions identifiées pour recruter FLI-1 ainsi que des régions contrôles afin de mesurer le bruit de fond. En parallèle aux ChIP FLI-1, j'ai également réalisé des ChIPs avec un anticorps contrôle anti-p27. Les résultats, correspondants à la moyenne des enrichissements obtenus à partir des 3 cultures, sont présentés sur la figure 45C. La figure

montre un signal 8 fois plus important avec les oligonucléotides amplifiant les promoteurs de *Nip7* et d'*Imp4* qu'avec les oligonucléotides contrôles amplifiant le promoteur de *Gapdh* et les régions intergéniques du locus de *Globine alpha*, *129k* et *153k* après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-FLI-1. Ce signal est perdu quand les cellules NN10 #5 sont traitées par la doxycycline et n'est pas observé avec l'anticorps anti-p27. Ces résultats montrent donc que les enrichissements obtenus sont spécifiques de FLI-1.

J'ai mesuré la quantité de chromatine obtenue à l'issue des 12 ChIPs par des mesures indirectes par PCR. Pour cela, j'ai dosé la quantité de chromatine non immunoprécipitée par spectrophotométrie UV à 260 nm. La proportion des chromatines immunoprécipitées par rapport à la chromatine non immunoprécipitée m'a permis d'estimer la quantité de chromatine totale. Ainsi, les 12 ChIPs FLI-1 m'ont permis d'obtenir 24,6 ng de chromatine à partir des cellules NN10 #5 non traitées et 19,8 ng à partir des cellules traitées par la doxycycline. J'ai donc obtenu une quantité suffisante de chromatine FLI-1 pour pouvoir la séquencer (**Figure 45D**).

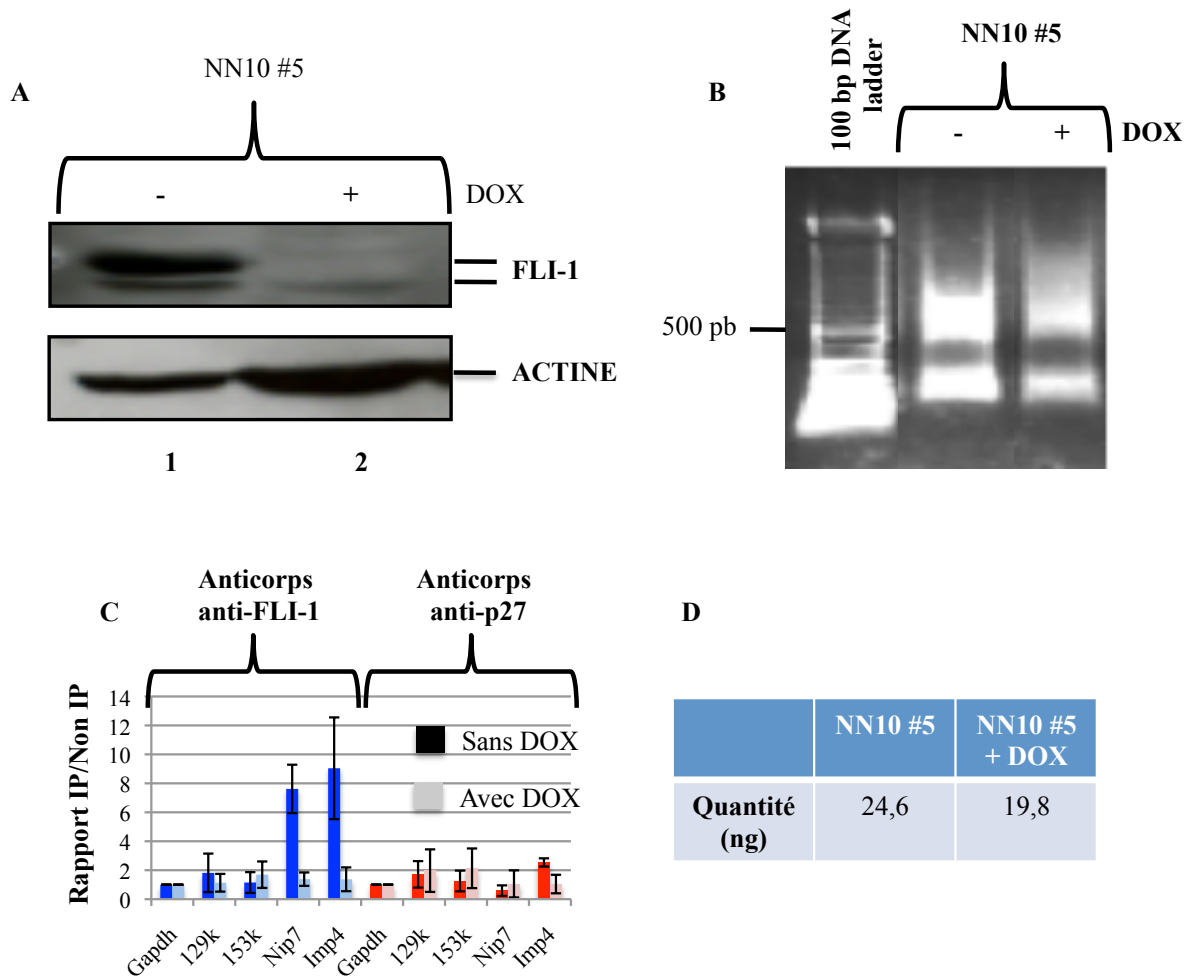


Figure 45 : Obtention de la chromatine FLI-1 des cellules NN10 #5

Les cellules NN10 #5 ont été cultivées pendant deux jours en absence ou en présence de doxycycline

A : Mesure du taux de protéine FLI-1 par Western blot. L'actine β est montrée en contrôle de charge.

B : Mesure de la taille moyenne des fragments de chromatine soniquée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Le marqueur de taille utilisé est le 100 bp DNA ladder (Invitrogen).

C : Mesure par PCRq des enrichissements de la chromatine obtenus avec l'anticorps anti-FLI-1 (en bleu) et avec l'anticorps contrôle anti-p27 (en rouge).

D : Calcul de la quantité de chromatine envoyée au séquençage par des mesures indirectes par PCR des concentrations d'ADN.

B) Obtention de la chromatine FLI-1 à partir des cellules 745A #44 avec ou sans FLI-1

Les cellules 745A #44 ont été cultivées en présence ou en absence de doxycycline pendant deux jours.

J'ai réalisé des extraits protéiques totaux afin de mesurer par Western blot le taux de protéine FLI-1. La figure 46A montre que le traitement des cellules 745A #44 réduit le taux de protéine FLI-1 de plus de 90 % (Figure 46A : comparer puits 1 et 2) indiquant que le traitement par la doxycycline a permis d'éliminer la majorité de la protéine FLI-1 des cellules 745A #44.

Afin d'obtenir la quantité suffisante de chromatine FLI-1 (20 ng), j'ai cumulé la chromatine de 8 ChIPs avec l'anticorps anti-FLI-1 à partir de 8.10^6 cellules issues de deux cultures indépendantes. Comme pour les cellules NN10 #5, la taille des fragments de chromatine soniquée avant immunoprécipitation et l'efficacité d'enrichissement pour chaque culture ont été testées. Les résultats sont présentés sur la figure 46B et C.

La figure 46B montre que les fragments de chromatine extraite des cellules 745A #44 traitées ou non par la doxycycline ont une taille moyenne de 600 pb.

Comme pour les cellules NN10 #5, j'ai réalisé en parallèle aux ChIPs Fli-1, des ChIP avec l'anticorps contrôle anti-p27 et mesuré l'enrichissement de la chromatine par qPCR avec des oligonucléotides amplifiant les régions décrites dans le paragraphe 1 de cette partie. La figure 46C montre un signal environ 6 à 8 fois plus important sur les régions promotrices de *nip7* et *imp4* avec l'anticorps anti-FLI-1 par rapport aux régions contrôles. Ce signal est perdu après traitement des cellules 745A #44 par la doxycycline et n'est pas observé avec l'anticorps anti-p27. Ces résultats indiquent que les enrichissements obtenus sont spécifiques de FLI-1.

J'ai mesuré la quantité de chromatine extraite à partir des cellules 745A #44 suivant la même méthode que pour les cellules NN10 #5. La figure 46D montre que les 8 ChIPs réalisés m'ont permis d'obtenir 22,6 ng de chromatine à partir des cellules 745A #44 non traitées et 20,4 ng de chromatine à partir des cellules 745A #44 traitées par la doxycycline. J'ai donc obtenu la quantité suffisante de chromatine pour pouvoir réaliser le séquençage.

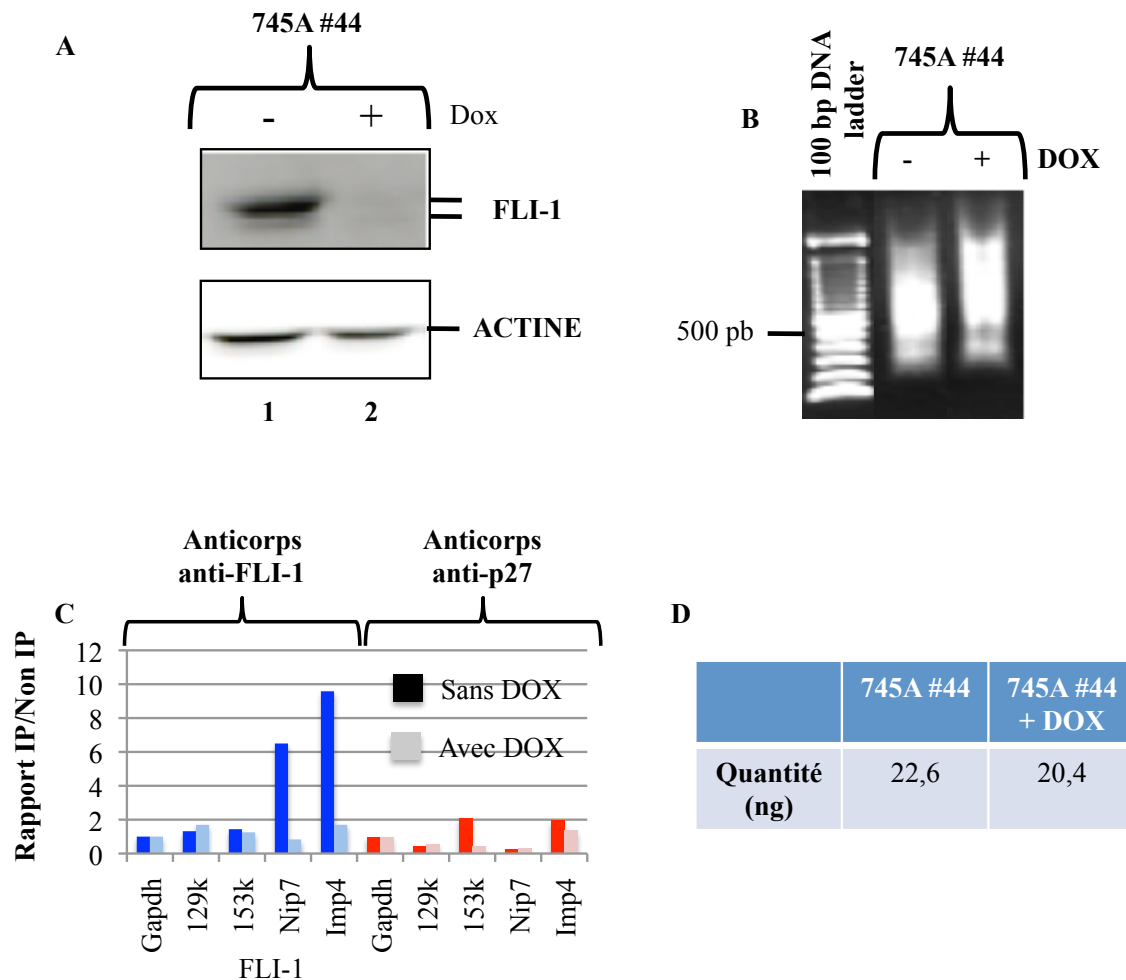


Figure 46 : Obtention de la chromatine FLI-1 des cellules 745A #44

Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours en absence ou en présence de doxycycline

A : Mesure du taux de protéine FLI-1 par Western blot. L'actine β est montrée en contrôle de charge.

B : Mesure de la taille moyenne des fragments de chromatine soniquée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Le marqueur de taille utilisé est le 100 bp DNA ladder (Invitrogen).

C : Mesure par PCRq des enrichissements de la chromatine obtenue avec l'anticorps anti-FLI-1 (en bleu) et avec l'anticorps contrôle anti-p27 (en rouge).

D : Calcul de la quantité de chromatine envoyée au séquençage par des mesures indirectes par PCR des concentrations d'ADN.

III- Analyse des séquences

A) Obtention des séquences et alignement sur le génome

Une fois obtenue, les chromatines FLI-1 et SPI-1 ont été envoyées au CNS. Elles ont été séquencées avec l'appareil SOLID System de chez Applied Biosystems. Cet appareil donne des lectures de 50 pb.

En plus du séquençage de la chromatine issue des ChIP FLI-1 et SPI-1 à partir des cellules mentionnées dans les paragraphes précédents, nous avons également séquencé les chromatines issues des ChIP SPI-1 faits à partir de cellules de la rate de souris transgéniques SPI-1 ayant développé ou non une érythroleucémie. Le séquençage de nos échantillons n'a pas nécessité la quantité totale de chromatine immunoprécipitée envoyée, excepté pour les chromatines FLI-1 dont l'excédent a été soumis à un deuxième run de séquençage dans le but d'augmenter la profondeur de séquençage. Les séquences obtenues après les deux runs de séquençage FLI-1 ont ensuite été cumulées. Enfin, en plus des contrôles de ChIP en absence des facteurs, les chromatines non immunoprécipitées des clones 745A #44 et 722 (clone érythroleucémique dérivé de souris transgéniques SPI-1) ainsi que celles obtenues à partir de rates de souris transgéniques SPI-1 saines et malades ont été séquencées. Le nombre de séquences obtenu pour chaque séquençage de chromatine est présenté sur le tableau 9. Ces runs de séquençage nous ont permis d'obtenir environ 10 millions de séquences pour chaque condition exceptée le ChIP-Seq FLI-1 pour lequel nous avons obtenu environ 20 millions de séquences.

Lignée	ChIP	Nombre de lectures totales	Nombre de lectures uniques non dupliquées alignées	% des lectures totales
663CG (1)	SPI-1	29198197	13422146	46
722 (2)	SPI-1	38374436	14424116	37,6
745A #44	SPI-1	33912233	13082533	38,6
745A #44	FLI-1*	28558919	9422350	33
745A #44	FLI-1*	26401501	8484327	32,1
NN10 #5	FLI-1*	39041866	10892013	27,9
NN10 #5	FLI-1*	37494947	10441517	27,8
722	INPUT	24395542	12441553	51
Rate Saine**	SPI-1	27927426	10829593	38,8
Rate Malade***	SPI-1	29177142	13008312	44,6
745A #44	INPUT	34509685	15961618	46,2
722 + DOX (2)	SPI-1	22305690	7858684	35,2
NN10 #5 + DOX	FLI-1	26010657	8634993	33,2
745A #44 + DOX	FLI-1	25141383	9322821	37,1
Rate Saine***	INPUT	24047849	10374079	43,1
Rate malade***	INPUT	24331750	10986870	45,1

Tableau 9 : Nombre de séquences alignées obtenues pour chaque condition

(1) : Clone érythroleucémique dérivé des souris transgéniques SPI-1

(2) : Clone érythroleucémique dérivé des souris transgéniques SPI-1 présentant une expression inductible par la doxycycline de shARNs dirigés contre l'ARNm du gène *spi-1*

* : 2 runs de séquençage ont été réalisés pour les ChIP FLI-1 dans les cellules NN10 #5 et 745A #44. Ils ont ensuite été cumulés pour l'analyse

** : Rate de souris transgéniques SPI-1 n'ayant pas développé d'érythroleucémie

*** : Rate de souris transgéniques SPI-1 atteintes d'érythroleucémie

Le CNS s'est ensuite chargé de l'alignement des séquences sur le génome de référence murin mm9 en utilisant l'outil BFAST v0.6.4c. (Homer et al., 2009). Les séquences dupliquées et les séquences ayant plusieurs localisations possibles sur le génome ont été éliminées. Le nombre et la proportion de lectures uniques non dupliquées alignées sont représentés sur le tableau 9. Entre environ 30 et 50 % des lectures totales ont pu être alignées avec cet outil. Les fichiers des alignements des séquences nous ont été envoyés par le CNS.

B) Détection de pics à l'aide du logiciel MACS

Le traitement bioinformatique des données de ChIP-Seq a été réalisé en collaboration avec Christian Gautier et Chlotilde Deschamps (PRABI, Villeurbanne). La détection de pics a été réalisée par le logiciel MACS (Model-based Analysis of ChIP-Seq) développé par le groupe de X.S. Liu (Zhang et al., 2008). Ce logiciel permet la détection de pics en comparant le fichier d'intérêt et un fichier contrôle. Un exemple de fichier obtenu par MACS est présenté sur la figure 47.

```

# This file is generated by MACS
# ARGUMENTS LIST:
# name = CI_mm_0_v1
# format = BAM
# ChIP-seq file = COLS_mm_0.bam
# control file = IOLS_mm_0.bam
# effective genome size = 1.87e+09
# band width = 500
# model fold = 10,30
# pvalue cutoff = 1.00e-05
# Range for calculating regional lambda is: 200 bps and 1000 bps

# tag size is determined as 50 bps
# unique tags in treatment: 8424243
# total tags in treatment: 8424243
# maximum duplicate tags at the same position = 2
# unique tags in control: 11402898
# total tags in control: 11402898
# Background redundant rate: 0.00
# d = 95

```

chr	start	end	length	summit	tags	#NOM?	fold_enrichme	FDR(%)
1	3128155	3128322	168	85	14	147.51	32.71	0.17
1	3436051	3436416	366	158	13	85.66	14.02	1.01
1	4308295	4308458	164	83	10	98.33	23.37	0.63
1	4847453	4847843	391	282	16	110.92	18.69	0.37
1	4848474	4849051	578	351	27	164.47	26.46	0.10
1	4897212	4897632	421	261	17	82.10	11.40	1.14
1	5211143	5211509	367	175	11	67.20	14.02	2.42
1	5737514	5737622	109	55	11	127.88	10.45	0.30
1	8659037	8659205	169	85	13	81.20	12.35	1.19
1	9131882	9132227	346	134	17	129.76	21.03	0.29
1	9207319	9207788	470	213	17	89.87	12.21	0.83
1	9272951	9273368	418	236	14	87.57	16.36	0.91
1	9295316	9295645	330	169	12	81.53	16.36	1.17
1	9592476	9592848	373	88	14	84.63	14.02	1.03
1	9663616	9664416	801	262	76	717.95	39.72	0.00
1	9734737	9735259	523	377	26	189.73	25.70	0.07

Figure 47 : Exemple de fichier donné par MACS

Après avoir lancé une détection de pics avec MACS, nous obtenons un fichier de ce type. Les lignes de commande fournies en début de programme sont indiquées sur le haut de la fenêtre du fichier. Le tableau indique les paramètres des pics détectés.

Chr : localisation chromosomique du pic

Start : Coordonnée du début du pic

End : Coordonnée de fin de pic

Length : Largeur du pic

Summit : Position du sommet du pic

Tags : Nombre de séquences sous le pic

#NOM? : $-10 \log_{10}$ (pvalue)

Fold enrichment : Enrichissement du pic

FDR (%) : Proportion de faux positifs exprimée en pourcentage

Afin de valider les pics, nous avons dans un premier temps comparé les séquences obtenues après ChIP-Seq FLI-1 dans les cellules NN10 #5 et 745A #44 non traitées et celles obtenues à partir des cellules traitées par la doxycycline servant à établir le bruit de fond. Nous avons ainsi pu détecter 9600 pics FLI-1 dans les cellules 745A #44 et 5680 pics dans les

cellules NN10 #5. La répartition des pics en fonction de leur largeur est représentée sur la figure 48A pour les cellules NN10 #5 et 48B pour les cellules 745A #44. Comme nous pouvons le constater, une forte proportion de pics de petite taille sont détectés par le logiciel MACS aussi bien dans les cellules NN10 #5 et les cellules 745A #44 (Figure 48A et B : courbes bleues). Ces petits pics correspondent à des empilements de séquences présentant un nombre important de mésappariements. Un exemple représentatif de ces pics est présenté sur la figure 49A. La figure montre un pic de moins de 100 pb obtenu après ChIP-Seq FLI-1 à partir des cellules 745A #44. En revanche, le logiciel MACS a également pu détecter des pics de plus grande taille (Figure 48A : 920 pics de plus de 250 pb détectés à partir des cellules NN10 #5). La figure 49B représente un pic de près de 1000 pb dans lequel nous pouvons observer un très petit nombre de séquences avec plus d'un mésappariement par rapport au génome de référence.

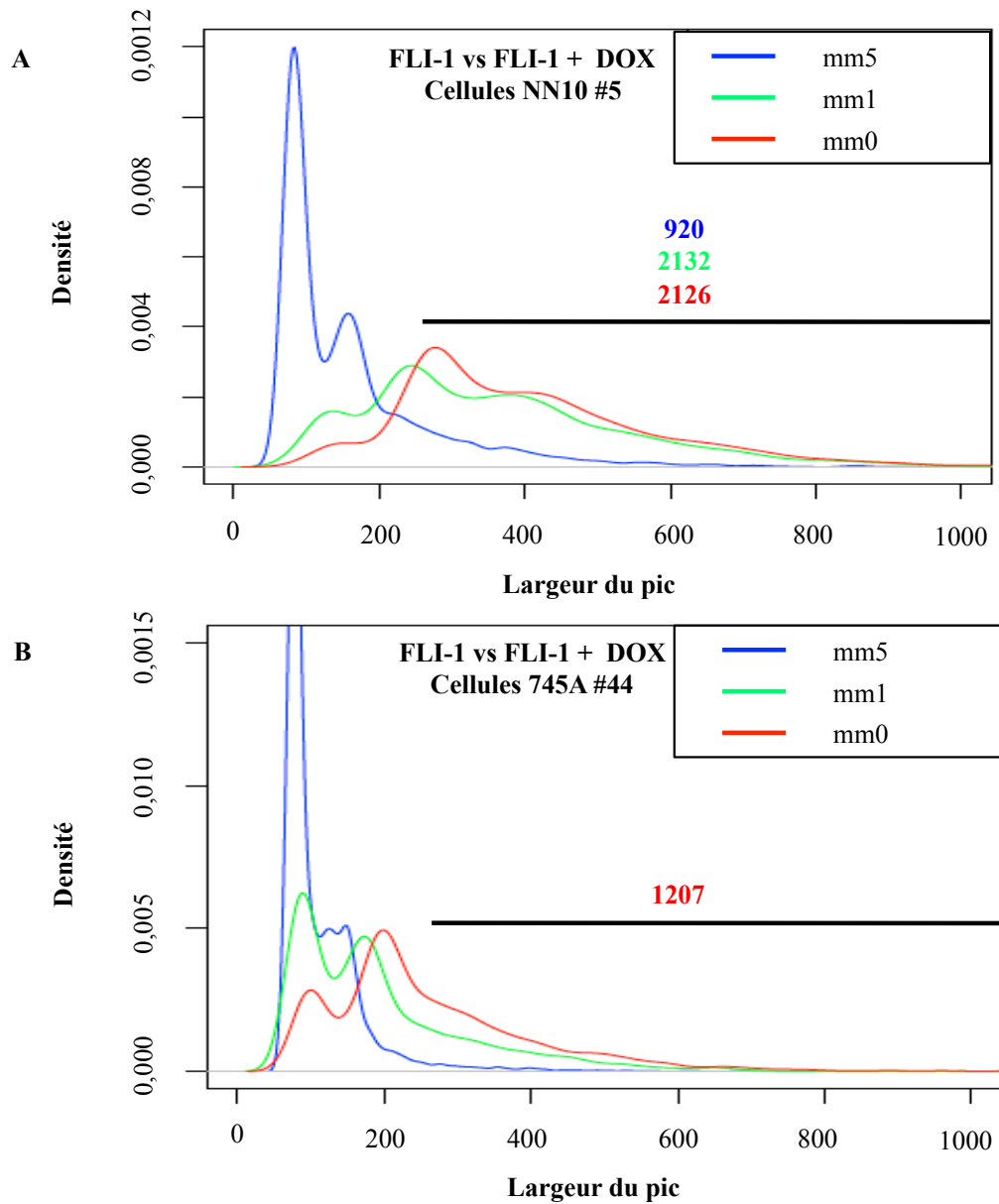


Figure 48 : Influence du nombre autorisé de mésappariements sur la détection de pics FLI-1

Les séquences issues des ChIP FLI-1 à partir des cellules NN10 #5 (**A**) et des cellules 745A #44 (**B**) ont été analysées avec le logiciel MACS qui permet la détection de pics FLI-1 et comparées aux ChIPs FLI-1 à partir des mêmes cellules traitées par la doxycycline.

Les graphiques représentent la densité des pics en fonction de leur taille. Les courbes bleues ont été obtenues sans limitation du nombre de mésappariements sur les séquences. Les courbes vertes ont été obtenues en éliminant toutes les séquences présentant au moins deux mésappariements (mm1). Enfin, les courbes rouges ont été obtenues en éliminant toutes les séquences présentant au moins un mésappariement (mm0).

Les chiffres en bleu correspondent au nombre de pics obtenus par MACS sans limitation de mésappariements dont la taille est supérieure à 250 pb. Les chiffres en vert sont ceux obtenus avec la limite mm1. Les chiffres en rouge sont ceux obtenus avec la limite mm0.

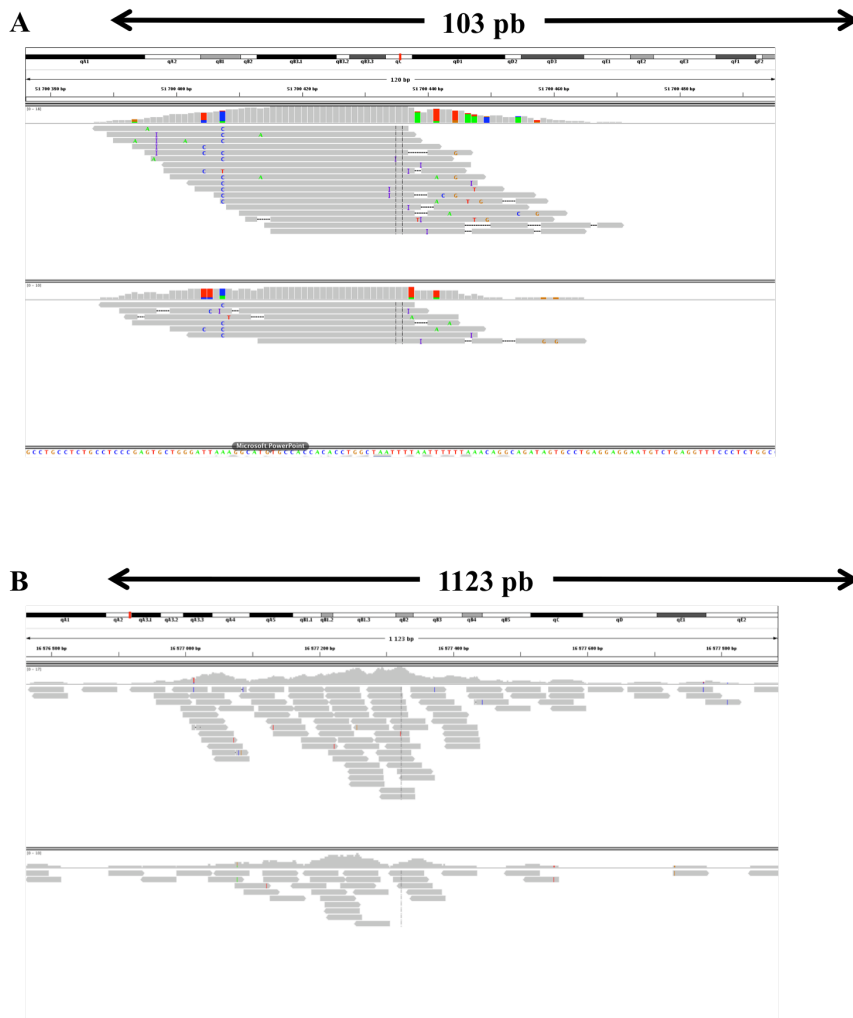


Figure 49 : Influence de la largeur des pics sur leur qualité

Images obtenues avec le logiciel IGV 5.0 montrant des pics FLI-1 obtenus après ChIP FLI-1 dans les cellules 745A #44 non traitées (partie supérieure) ou traitées (partie inférieure) par la doxycycline.

A : Pic FLI-1 dont la taille est inférieure à 100 pb. Les couleurs représentent des mésappariements.

B : Pic FLI-1 dont la taille est d'environ 1000 pb.

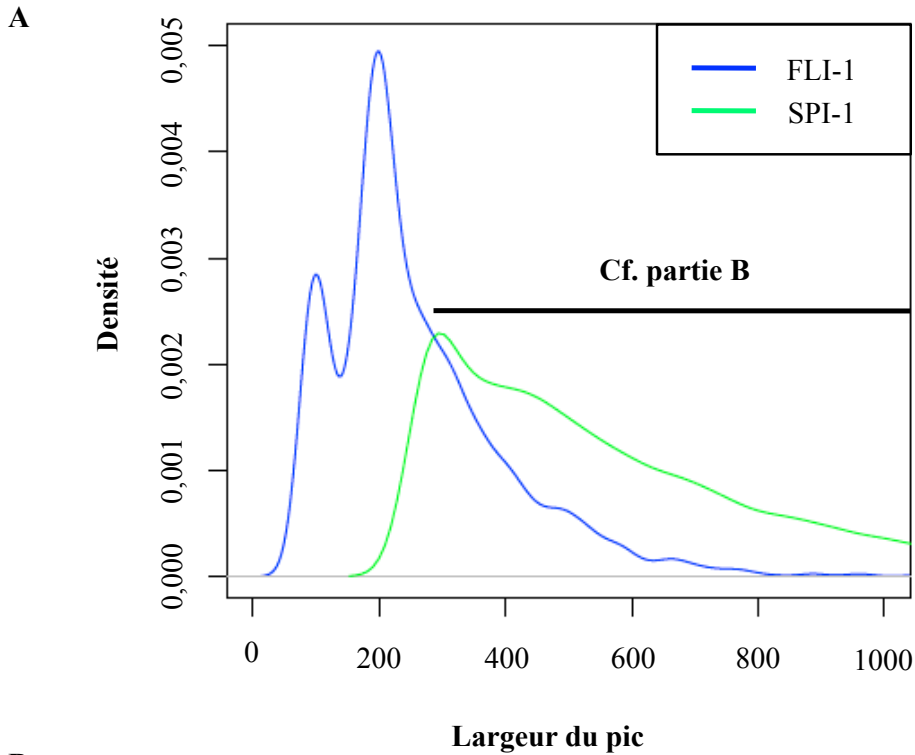
La détection de pics de petite taille est incohérente avec la taille de sonication de la chromatine suggérant que ceux-ci correspondent à des artefacts. D'autre part, la visualisation manuelle des pics de plus de 250 pb montre que la totalité de ces pics ont une distribution gaussienne attendue. Basé sur la faible quantité de séquences présentant des mésappariements

observée dans les grands pics, nous avons ensuite éliminé toutes les séquences présentant deux mésappariements ou plus issues des cellules NN10 #5 et 745A #44. Après élimination de ces séquences, le logiciel MACS a détecté 3860 pics FLI-1 à partir des cellules 745A #44 et 3150 pics FLI-1 à partir des cellules NN10 #5. Les figures 48A et B montrent que cette stringence a permis l'élimination d'une grande partie des pics de petite taille (moins de 250 pb) et a permis d'augmenter le nombre de pics dont la taille est supérieure à 250 pb (Figure 48A : 2132 pics de plus de 250 pb après élimination des séquences à plus d'un mésappariement contre 920 sans limitation dans les cellules NN10 #5).

Néanmoins, les pics de petite taille résiduels correspondent encore à des empilements de séquences présentant un mésappariement. Nous avons donc cherché à éliminer toutes les séquences comprenant au moins un mésappariement. Les figures 48A et B montrent que l'élimination de ces séquences a permis la perte d'une très grande majorité de pics de petite taille sans affecter le nombre de pics de grande taille (Figure 48A : 2126 pics de plus de 250 pb avec aucun mésappariement contre 2132 pics avec au plus un mésappariement dans les cellules NN10 #5).

L'ensemble de ces résultats nous ont conduit à focaliser nos analyses sur des pics de plus de 250 pb et dont les séquences ne contiennent aucun mésappariement. La répartition des pics FLI-1 et SPI-1 détectés à partir des cellules 745A #44 en fonction de leur taille ainsi que le nombre de pics dont la taille est supérieure à 250 pb sont présentés sur la figure 50. Nous avons ainsi pu détecter 1207 pics FLI-1 et 25375 pics SPI-1 à partir des cellules 745A #44 et 2126 pics FLI-1 à partir des cellules NN10 #5.

Répartition des pics pour Spi-1 et Fli-1 (mm=0)



B

	FLI-1	SPI-1
745A #44	1207	25375
NN10 #5	2126	X

Figure 50 : Nombre et répartition des pics en fonction de leur largeur

A : Répartition des pics obtenus par MACS pour SPI-1 (courbe verte) et pour FLI-1 (courbe bleue) après élimination des séquences contenant plus d'1 mésappariement en fonction de leur taille dans les cellules 745A #44.

B : Tableau montrant le nombre de pics obtenus pour FLI-1 et SPI-1 dont la taille est supérieure à 250 pb pour les cellules 745A #44 et NN10 #5.

C) Mécanismes de recrutement des facteurs de transcription FLI-1 et SPI-1

Dans un premier temps, nous avons focalisé notre étude sur les cellules 745A #44 afin de détecter des pics communs aux facteurs FLI-1 et SPI-1 et d'identifier des consensus pour ces facteurs.

1- Croisement des listes de pics SPI-1 et FLI-1

Afin de croiser les listes de pics FLI-1 et SPI-1, nous avons utilisé deux programmes développés par C. Deschamps qui nous permettent respectivement d'extraire la position des sommets des pics FLI-1 et SPI-1 et de croiser chaque fichier en définissant une distance maximale entre le sommet de chaque pic pour les considérer comme communs. La figure 51A montre l'influence de cette distance sur le nombre de pics communs détectés. Comme nous pouvons l'observer, le nombre de pics communs augmente de façon exponentielle jusqu'à une distance d'environ 200 pb puis cette augmentation est beaucoup moins importante avec des tailles supérieures.

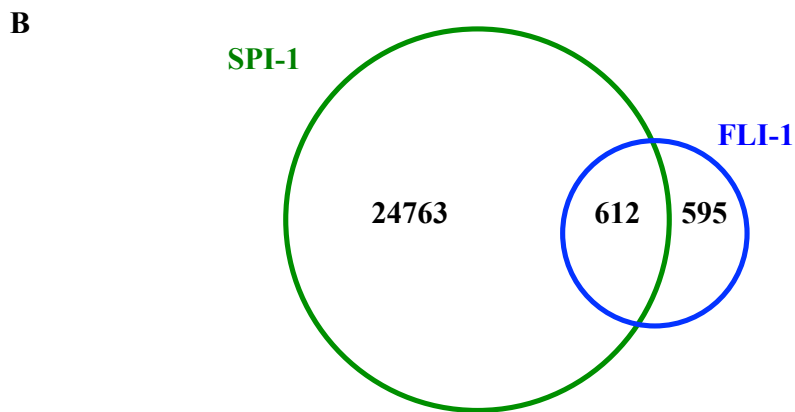
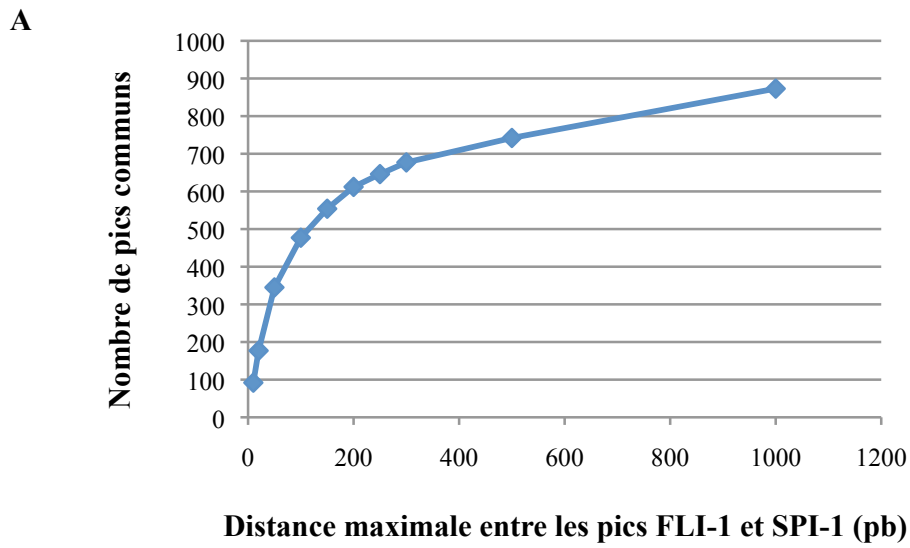


Figure 51 : Identification de pics communs à FLI-1 et à SPI-1 dans les cellules 745A

A : Graphique représentant le nombre de pics communs à FLI-1 et à SPI-1 en fonction de la distance en paires de bases autorisée entre les positions de chaque pic.

B : Représentation schématique du nombre de pics spécifiques à SPI-1, spécifiques à FLI-1 ou communs à FLI-1 et à SPI-1 avec une distance maximale autorisée de 200 pb.

Comme nous avons pu le voir dans la première partie de mes résultats, nous avons mis en évidence le recrutement de FLI-1 et de SPI-1 sur des régions communes. Une des questions à laquelle nous avons voulu répondre est de déterminer si ce recrutement est la conséquence de la reconnaissance d'un seul et même motif ou alors la reconnaissance de deux différents. Afin de trancher entre ces deux possibilités, nous avons fixé la distance maximale entre le sommet des pics FLI-1 et SPI-1 à 200 pb pour les considérer comme communs. A cette distance, nous avons détecté 612 pics communs à FLI-1 et à SPI-1 (**Figure 51B**).

2- Identification de motifs consensus pour les pics spécifiques de FLI-1 ou de SPI-1 ou communs aux deux facteurs

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier des motifs surreprésentés dans les séquences des pics spécifiques de SPI-1 et de FLI-1 ou des pics communs aux deux facteurs. Nous avons utilisé deux programmes permettant d'identifier ces motifs : le programme MEME développé par T.L. Bailey (Bailey et al., 2006) et le programme CisFinder développé par le groupe de M.S.H. Ko (Sharov et al., 2009). Nous avons donc soumis à ces deux programmes les régions comprenant les 200 pb de part et d'autre du pic et comme contrôle les régions situées à une distance de -2200/-1800 pb en amont de chaque pic. Les motifs ayant obtenu le score le plus fort sont représentés sur la figure 52.

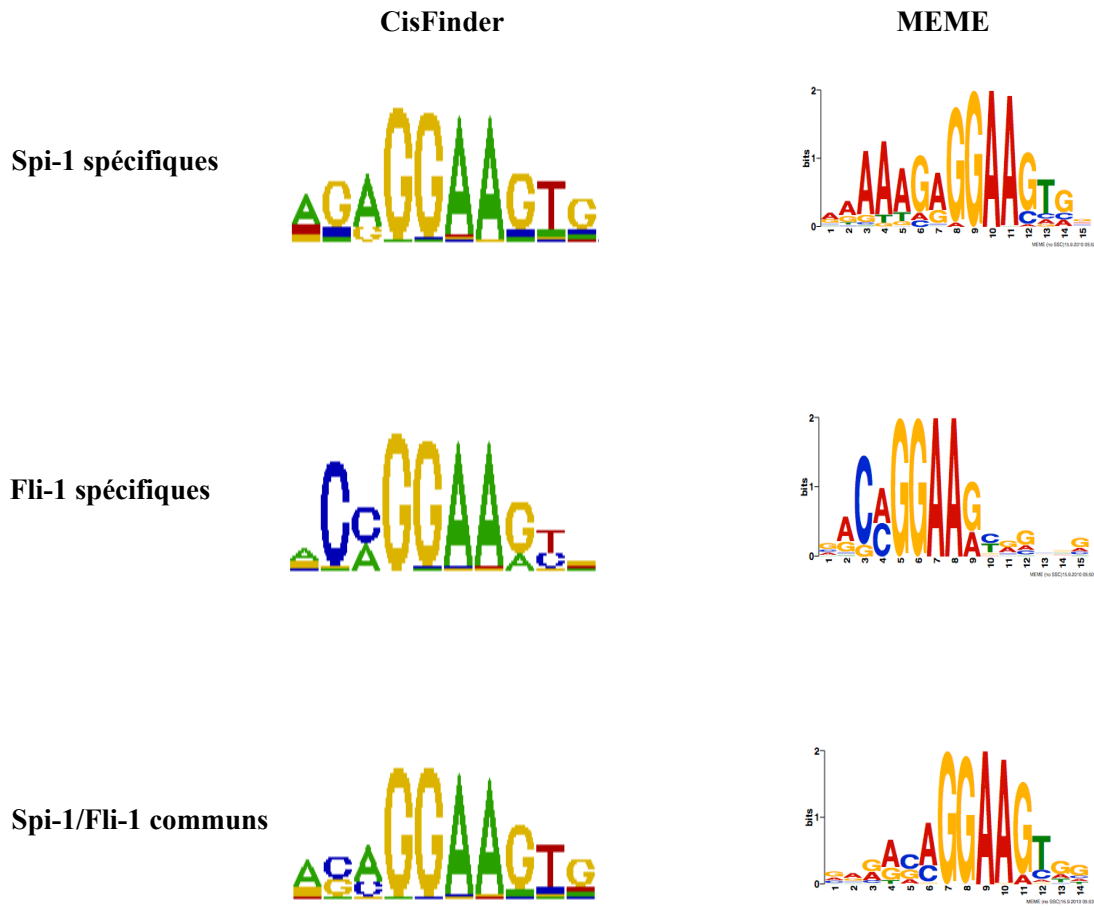


Figure 52 : Identification *de novo* de motifs consensus surreprésentés associés aux séquences sous les pics

Les séquences correspondant aux pics spécifiques à SPI-1 (partie supérieure), spécifiques à FLI-1 (partie médiane) et communs à FLI-1 et à SPI-1 (partie inférieure) ont été soumises aux logiciels CisFinder (partie gauche) et MEME (partie droite) afin d'identifier des motifs consensus. En parallèle, les séquences des régions -2200/-1800 pb en maont du pic SPI-1, FLI-1 ou commun ainsi que la séquence de 400 promoteurs choisis aléatoirement ont également été soumises à ces deux logiciels.

Les motifs représenté sur la figure correspondent au motif ayant le plus grand score donné par CisFinder et MEME.

Comme nous pouvons le constater, quelque soit la nature du pic, les programmes CisFinder et MEME donnent des motifs consensus très similaires. Le motif défini par ces deux programmes ayant le score le plus fort aussi bien pour les pics communs ou spécifiques de SPI-1 et FLI-1 comprend la séquence cœur reconnue par l'ensemble des facteurs de la famille ETS, GGAA. En revanche, les nucléotides bordant ce cœur sont différents pour les pics spécifiques de SPI-1 et ceux spécifiques de FLI-1. Ainsi, nous pouvons observer que le nucléotide situé en -2 par rapport au premier G de GGAA correspond majoritairement à un C pour le motif consensus FLI-1 alors qu'il correspond majoritairement à un G pour le motif consensus SPI-1. D'autre part, ces consensus sont similaires à ceux obtenus *in vitro* par le groupe de C.B. Thompson (Mao et al., 1994), par le groupe de F. Moreau-Gachelin (Ray-Gallet et al., 1995) et récemment par le groupe de J. Taipale (Wei et al., 2010). Seule une différence est à constater pour le consensus FLI-1 pour la base en -1 du GGAA. En effet, le consensus *in vitro* est composé majoritairement d'un C alors que notre consensus montre une équivalence entre un C et un A. Ces résultats suggèrent donc que FLI-1 et SPI-1 sont recrutés au niveau de consensus différents sur leurs régions de fixation spécifiques.

Enfin, le consensus commun à FLI-1 et à SPI-1 correspond à un consensus hybride des consensus spécifiques de SPI-1 et de FLI-1. Cette observation pourrait suggérer soit le recrutement de SPI-1 et de FLI-1 sur un même site hybride soit le recrutement indépendant sur deux sites distincts.

1- Composition des séquences en consensus FLI-1 et SPI-1 et localisation des consensus par rapport aux pics

Afin de trancher entre ces deux possibilités, nous avons ensuite déterminé la composition des séquences sous les pics spécifiques de SPI-1, de FLI-1 et communs en

consensus SPI-1 ou FLI-1 ainsi que la localisation de ces consensus par rapport aux pics en utilisant le programme CisFinder.

3-1 Pics spécifiques de FLI-1

Présence ou absence d'un consensus SPI-1 ou FLI-1

Dans un premier temps, nous avons déterminé si les séquences sous les 595 pics spécifiques de FLI-1 (pics FLI-1) contenaient au moins un consensus FLI-1 ou SPI-1. Nous avons donc comparé les régions comprenant les 200 pb de part et d'autre du pic FLI-1, la région située -2200/-1800 pb en amont de ces pics (régions -2kF) et les séquences de 600 promoteurs choisis au hasard (régions Pro). La figure 53A montre que les régions contrôles -2kF et Pro sont composées d'une proportion équivalente de séquences contenant au moins un consensus SPI-1 ou FLI-1 (Figure 53A : 296 séquences pour les régions contrôles -2kF et 286 séquences pour les régions Pro) et ne contenant pas de consensus (Figure 53A : 299 séquence pour les régions -2kF et 312 séquences pour les régions Pro). En revanche, les séquences sous les pics FLI-1 sont très nettement enrichies en séquence contenant au moins un consensus FLI-1 ou SPI-1 préalablement identifié (Figure 53A : 528 séquences contenant au moins un consensus contre 67 séquences n'en contenant pas). Nous ne pouvons pas exclure que les séquences ne contenant pas de consensus FLI-1 ou SPI-1 ne contiennent pas de motifs comprenant un GGAA mais dont l'environnement serait différent. Cette possibilité n'a pas été traitée dans notre étude.

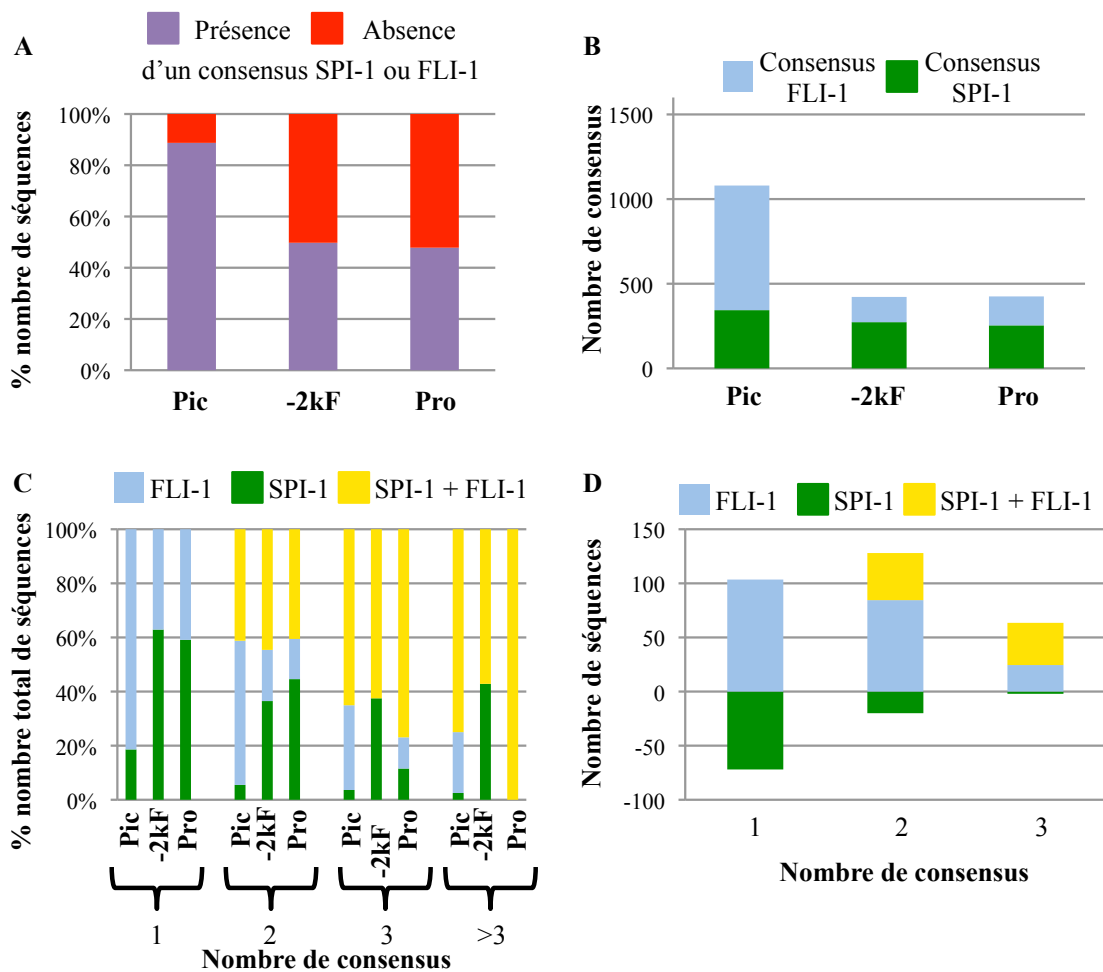


Figure 53 : Composition des séquences spécifiques à FLI-1 en consensus FLI-1 et SPI-1

Les séquences correspondant au 200 pb de part et d'autre des 595 pics spécifiques de FLI-1 (Pic), les séquences des régions -2200 pb/-1800 pb en amont de ces pics (-2kF) et les séquences de 600 promoteurs choisis aléatoirement (Pro) ont été analysées par CisFinder afin de déterminer leur composition en consensus FLI-1 et SPI-1.

A : Nombre de séquences contenant (barres violettes) ou pas (barres rouges) au moins un consensus SPI-1 ou un consensus FLI-1 exprimé en pourcentage du nombre total de séquences.

B : Nombre de consensus FLI-1 (barres bleues) et de consensus SPI-1 (barres vertes).

C : Nombre de séquences contenant 1 ou plusieurs consensus FLI-1 (barres bleues), SPI-1 (barres vertes) ou les 2 types de consensus (barres jaunes) exprimé en pourcentage du nombre total de séquences contenant au moins un consensus FLI-1 ou SPI-1.

D : Nombre de séquences contenant 1, 2 et/ou 3 consensus SPI-1 et FLI-1 auquel est soustrait la moyenne des nombres de séquences équivalentes des contrôles -2kF et Pro.

Nombre de consensus présents dans les séquences sous les pics FLI-1

La figure 53B montre le nombre de consensus FLI-1 ou SPI-1 contenus dans les séquences sous les pics FLI-1 et les régions -2kF et Pro. Comme nous pouvons l'observer, parmi les séquences contenant au moins un consensus, les séquences des régions -2kF et Pro sont composées d'une majorité de consensus SPI-1 par rapport aux consensus FLI-1 (Figure 53B : 273 consensus SPI-1 contre 149 consensus FLI-1 pour la région -2KF et 254 consensus SPI-1 contre 171 consensus FLI-1 pour la région Pro). En revanche, les pics FLI-1 sont très nettement enrichis en consensus FLI-1 (Figure 53B : 736 consensus FLI-1) alors que le nombre de consensus SPI-1 est très légèrement supérieur à celui des régions contrôles (Figure 53B : 374 consensus SPI-1). Ces résultats indiquent donc que les consensus FLI-1 sont fortement enrichis en consensus FLI-1 et à un degré moindre en consensus SPI-1.

Nombre de consensus par séquence sous les pics FLI-1

Nous avons ensuite déterminé le nombre de consensus contenus dans les séquences sous les pics FLI-1 et les régions -2kF et Pro. Les figures 53C et 53D montrent les résultats obtenus. Les séquences ont été classées selon qu'elles contiennent 1, 2, 3 ou plus de 3 consensus FLI-1 et/ou SPI-1 et un code couleur en fonction qu'elles contiennent exclusivement des consensus FLI-1 (couleur bleue), des consensus SPI-1 (couleur verte) ou alors les deux types de consensus (couleur jaune).

La figure 53D montre que les pics FLI-1 sont déplétés en séquences contenant exclusivement des consensus SPI-1 (Figure 53D : barres vertes). En revanche, les séquences sous les pics FLI-1 sont très majoritairement des séquences contenant exclusivement des consensus FLI-1 (Figure 53D : barres bleues). Enfin, nous pouvons observer également un enrichissement beaucoup moins important de séquences contenant les deux types de consensus (Figure 53D : barres jaunes).

Ces résultats suggèrent donc que FLI-1 est recrutée préférentiellement sur son consensus.

Localisation des consensus par rapport au sommet des pics

Si cette hypothèse est vraie, nous devrions pouvoir observer une localisation préférentielle des consensus FLI-1 sous le sommet des pics FLI-1. Nous nous sommes donc ensuite intéressés à la position des différents consensus SPI-1 ou FLI-1 par rapport au sommet des pics FLI-1 dont les séquences contiennent un consensus FLI-1 et un consensus SPI-1. Ainsi, nous pouvons observer que la courbe représentant la répartition des consensus FLI-1 sous les pics montre un maximum au niveau de 200 pb (Figure 54A : courbe bleue). La séquence que nous avons analysée avec CisFinder correspond aux 200 pb de part et d'autre du sommet du pic. Par conséquent, 200 pb correspond au sommet du pic FLI-1. En revanche, la courbe de répartition des consensus FLI-1 sur les régions -2kF (Figure 54A : courbe verte) ainsi que celles représentant la répartition des consensus SPI-1 par rapport aux Pics FLI-1 (Figure 54A : courbe rouge) et les régions contrôles -2kF (Figure 54A : courbe violette) ressemblent à la courbe de répartition aléatoire présentée sur la figure 54B. Ces résultats montrent que les consensus FLI-1 ont une localisation préférentielle sous le sommet du pic FLI-1. En revanche, les consensus SPI-1 sont répartis de manière aléatoire. Ces résultats montrent donc que FLI-1 est recrutée sur son propre consensus.

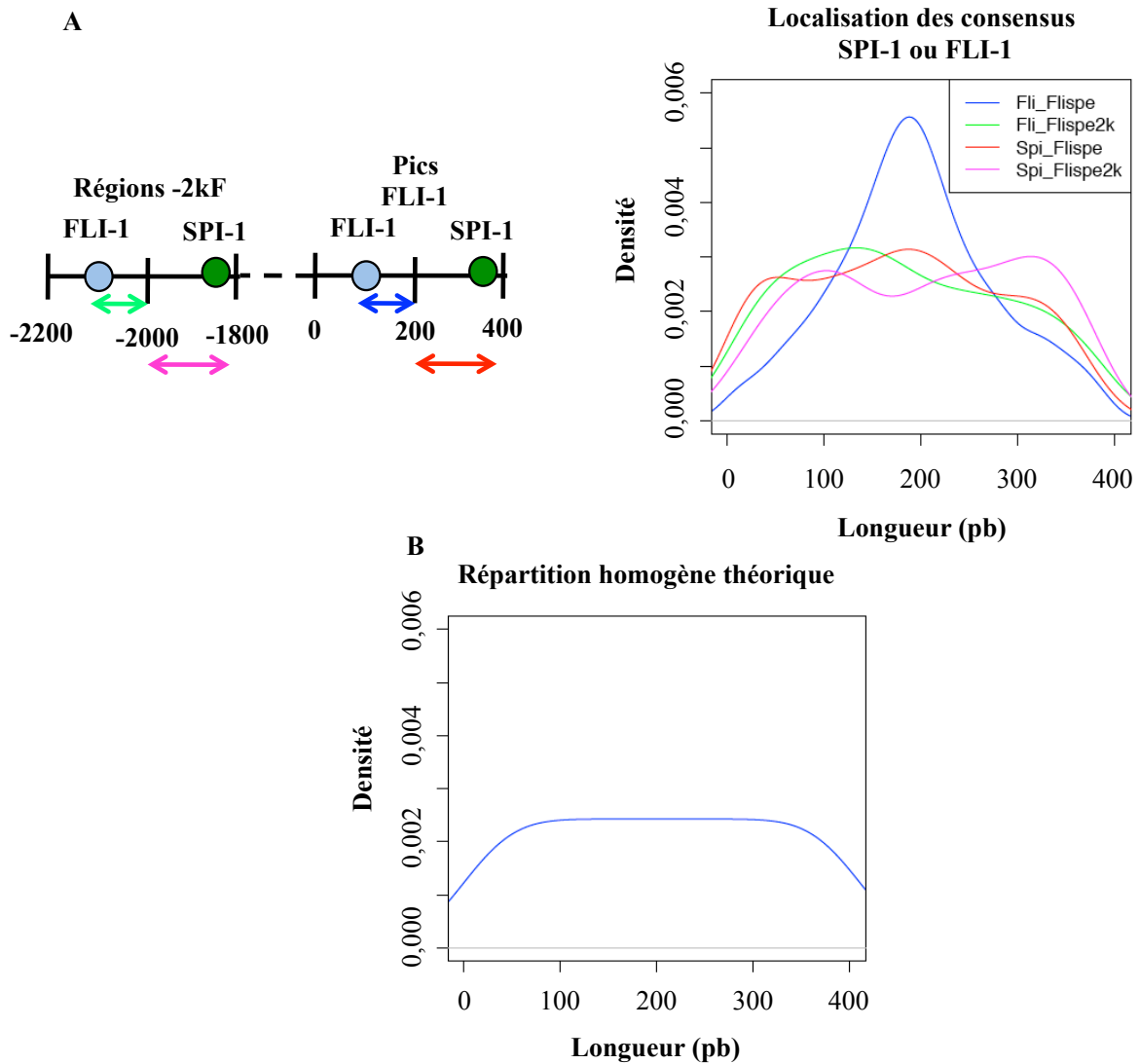


Figure 54 : Localisation des consensus SPI-1 ou FLI-1 par rapport au pic FLI-1 spécifique

A : A gauche, représentation schématique de la position du sommet du pic FLI-1 et -2kF et des consensus FLI-1 (rond bleu clair) et SPI-1 (rond vert). La double flèche bleue représente la distance entre le consensus FLI-1 et le sommet du pic FLI-1. La double flèche rouge représente la distance entre le consensus SPI-1 et le sommet du pic FLI-1. La double flèche verte représente la distance entre le consensus FLI-1 et la position -2000 des régions -2kF. Enfin, la double flèche rose représente la distance entre le consensus SPI-1 et le pic -2kF. A droite, localisation des consensus FLI-1 (courbes bleue et verte) ou SPI-1 (courbes rouge et rose) sur la région comprenant les 200 pb de part et d'autre du pic spécifique de FLI-1 (courbes bleue et rouge) ou sur la région -2200 pb/-1800 pb en amont du pic spécifique de FLI-1 (courbes verte et rose) pour les séquences contenant un consensus FLI-1 et un consensus SPI-1.

B : Exemple théorique de répartition homogène des consensus sur une région de 400 pb.

3-2 Pics spécifiques de SPI-1

Nous avons suivi la même stratégie décrite pour les pics FLI-1 pour déterminer la composition des séquences sous 600 pics SPI-1 choisis au hasard parmi les 24763 et la localisation des consensus par rapport à ces pics. Les résultats sont présentés sur les figures 55 et 56. Les valeurs pour les régions Pro présentés dans la figure 55 sont les mêmes que pour la figure 53.

Présence ou absence des consensus SPI-1 ou FLI-1 sous les pics SPI-1

Comme pour les pics FLI-1, les régions -2200 pb/-1800 pb en amont des pics SPI-1 (régions -2kS) sont autant composées de séquences contenant au moins un consensus FLI-1 ou SPI-1 que de séquences n'en contenant pas (Figure 55A : 285 séquences avec contre 315 séquences sans consensus). En revanche, les pics SPI-1 sont très majoritairement composés de séquences comportant au moins un consensus (Figure 55A : 588 avec contre 42 sans consensus).

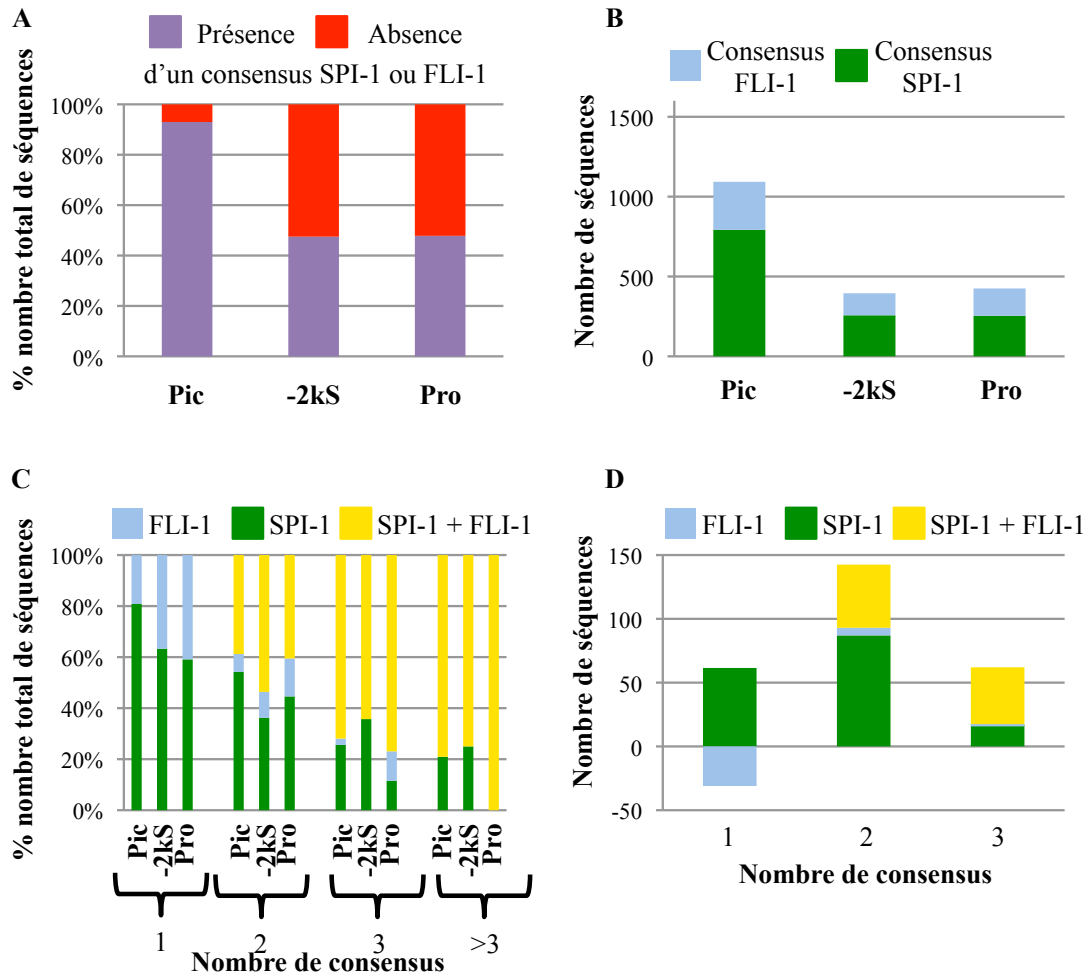


Figure 55 : Composition des séquences spécifiques à SPI-1 en consensus FLI-1 et SPI-1

Les séquences correspondant au 200 pb de part et d'autre de 600 pics choisis aléatoirement parmi les 24763 pics spécifiques de SPI-1 (Pic), les séquences des régions -2200 pb/-1800 pb en amont de ces pics (-2kS) et les séquences de 600 promoteurs choisis aléatoirement (Pro) ont été analysées par CisFinder afin de déterminer leur composition en consensus FLI-1 et SPI-1.

A : Nombre de séquences contenant (barres violettes) ou pas (barres rouges) au moins un consensus SPI-1 ou un consensus FLI-1 exprimé en pourcentage du nombre total de séquences.

B : Nombre de consensus FLI-1 (barres bleues) et de consensus SPI-1 (barres vertes).

C : Nombre de séquences contenant 1 ou plusieurs consensus FLI-1 (barres bleues), SPI-1 (barres vertes) ou les 2 types de consensus (barres jaunes) exprimé en pourcentage du nombre total de séquences contenant au moins un consensus FLI-1 ou SPI-1.

D : Nombre de séquences contenant 1, 2 et/ou 3 consensus SPI-1 et FLI-1 auquel est soustrait la moyenne des nombres de séquences équivalentes des contrôles -2kS et Pro.

Nombre de consensus présents dans les séquences sous les pics SPI-1

La figure 55B montre le nombre de consensus SPI-1 ou FLI-1 présents dans les séquences sous les pics SPI-1 et les régions -2kS. Comme pour les régions -2kF, le nombre de consensus SPI-1 dans les régions contrôles -2kS est supérieur à celui des consensus FLI-1 (Figure 55B : 257 consensus SPI-1 contre 138 consensus FLI-1). En revanche, le nombre de consensus SPI-1 contenus dans les séquences sous les pics SPI-1 est très largement supérieur à celui des régions contrôles -2kS ou des régions Pro (Figure 55B : 792 consensus SPI-1). Le nombre de consensus FLI-1 dans ces séquences est également supérieur à celui des régions contrôles (Figure 55B : 301 consensus). Ces résultats indiquent donc que les séquences sous les pics SPI-1 sont fortement enrichies en consensus SPI-1 et à un degré moindre en consensus FLI-1.

Nombre de consensus par séquence

Symétriquement à ce qui est observé pour les pics FLI-1, les séquences sous les pics SPI-1 composées d'un seul consensus sont très majoritairement des séquences contenant un consensus SPI-1, les séquences avec seulement un consensus FLI-1 étant déplétées par rapport aux régions contrôles (**Figure 55C et D**). Nous pouvons également observer un enrichissement de séquences contenant exclusivement des consensus SPI-1 pour celles contenant plus d'un consensus. Néanmoins, contrairement aux pics FLI-1 pour lesquels nous avons observé une déplétion de consensus SPI-1, les pics SPI-1 comportant deux consensus FLI-1 ne présentent pas de différences avec les régions contrôles.

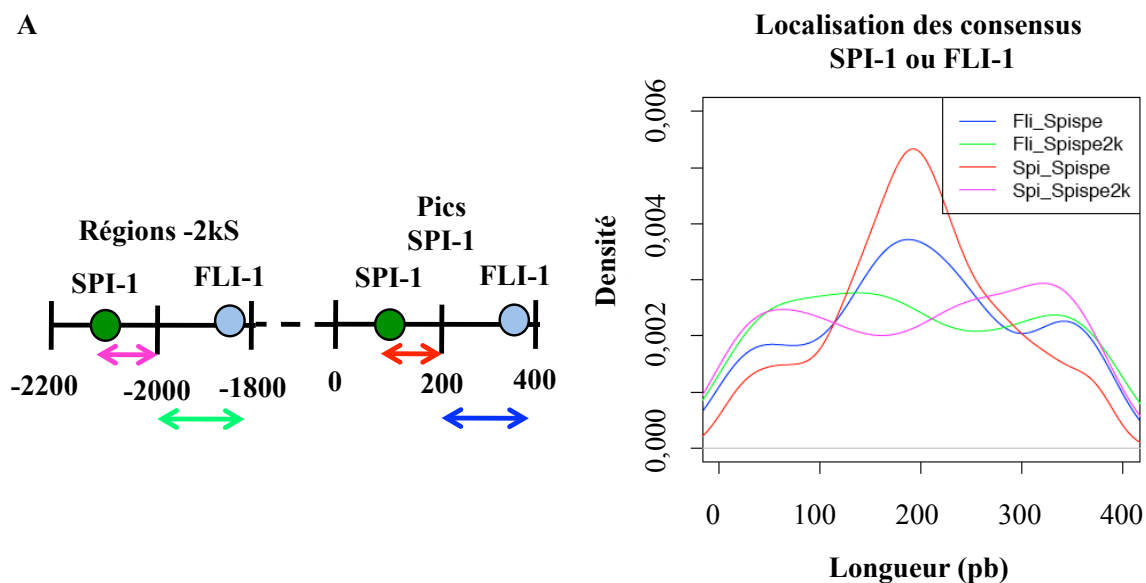
Localisation des consensus par rapport au sommet des pics SPI-1

Dans le but de déterminer si les consensus SPI-1 avaient une localisation préférentielle sous les pics SPI-1 comme les consensus FLI-1 pour les pics FLI-1, nous avons calculé les distances entre les consensus et le sommet des pics SPI-1 dont les séquences contiennent un consensus de chaque type. La figure 56A montre la répartition des consensus SPI-1 et FLI-1 dans les séquences présentes sous les pics SPI-1 ou les régions contrôles -2kS qui contiennent un consensus de chaque type. Comme nous pouvons l'observer, la courbe de répartition des consensus SPI-1 (Figure 56A : courbe rouge) présente un maximum au niveau de la coordonnée 200 correspondant au sommet du pic SPI-1 alors que les consensus SPI-1 sont répartis de manière uniforme dans les séquences présentes sous la région contrôle (-2kS) (Figure 56A : courbe violette). De façon plus inattendue, la courbe de répartition des consensus FLI-1 présente également un maximum sous le sommet du pic SPI-1 quoique moins prononcé que pour la courbe des consensus SPI-1 (Figure 56A : courbe bleue). Comme attendu, la répartition des consensus FLI-1 est aléatoire dans les séquences contrôles -2kS (Figure 56A : courbe verte).

Ces résultats montrent que les consensus SPI-1 et dans une moindre mesure FLI-1 sont localisés préférentiellement sous le sommet du pic SPI-1.

L'ensemble des résultats présentés dans ce paragraphe suggère que SPI-1 est recruté préférentiellement sur son consensus mais pourrait également l'être sur les consensus FLI-1.

A



B Répartition homogène théorique

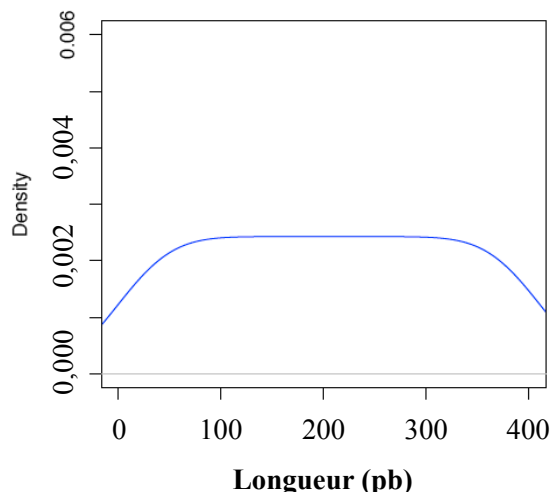


Figure 56 : Localisation des consensus SPI-1 ou FLI-1 par rapport au pic spécifique de SPI-1

A : A gauche, représentation schématique de la position du sommet du pic SPI-1 et -2kS et des consensus FLI-1 (rond bleu clair) et SPI-1 (rond vert). La double flèche bleue représente la distance entre le consensus FLI-1 et le sommet du pic SPI-1. La double flèche rouge représente la distance entre le consensus SPI-1 et le sommet du pic SPI-1. La double flèche verte représente la distance entre le consensus FLI-1 et la position -2000 de la région -2kS. Enfin, la double flèche rose représente la distance entre le consensus SPI-1 et le pic -2kS. A droite, localisation des consensus FLI-1 (courbes bleue et verte) ou SPI-1 (courbes rouge et rose) sur la région comprenant les 200 pb de part et d'autre du pic spécifique de SPI-1 (courbes bleue et rouge) ou sur la région -2200 pb/-1800 pb en amont du pic spécifique de SPI-1 (courbes verte et rose) pour les séquences contenant un consensus FLI-1 et un consensus SPI-1.

B : Exemple théorique de répartition homogène des consensus sur une région de 400 pb.

3-3 Pics communs à FLI-1 et à SPI-1

Les séquences sous les 612 pics communs à FLI-1 et SPI-1 ainsi que les régions situées -2200/-1800 pb en amont de ces pics (régions -2kC) ont été traitées de la même manière que les pics spécifiques. Les résultats sont présentés sur les figures 57 et 58. Les valeurs pour les régions Pro correspondent à celles montrées dans les figures 53 et 55.

Présence ou absence de consensus SPI-1 ou FLI-1

Comme pour les régions contrôles -2kS et -2kF, les régions -2kC sont composées d'autant de séquences contenant au moins un consensus que de séquences n'en contenant aucun (Figure 57A : 309 séquences avec contre 302 séquences sans consensus). En revanche, les pics communs sont composés très majoritairement de séquences contenant au moins un consensus FLI-1 ou SPI-1 (Figure 57A : 592 séquences avec contre seulement 19 séquences sans consensus).

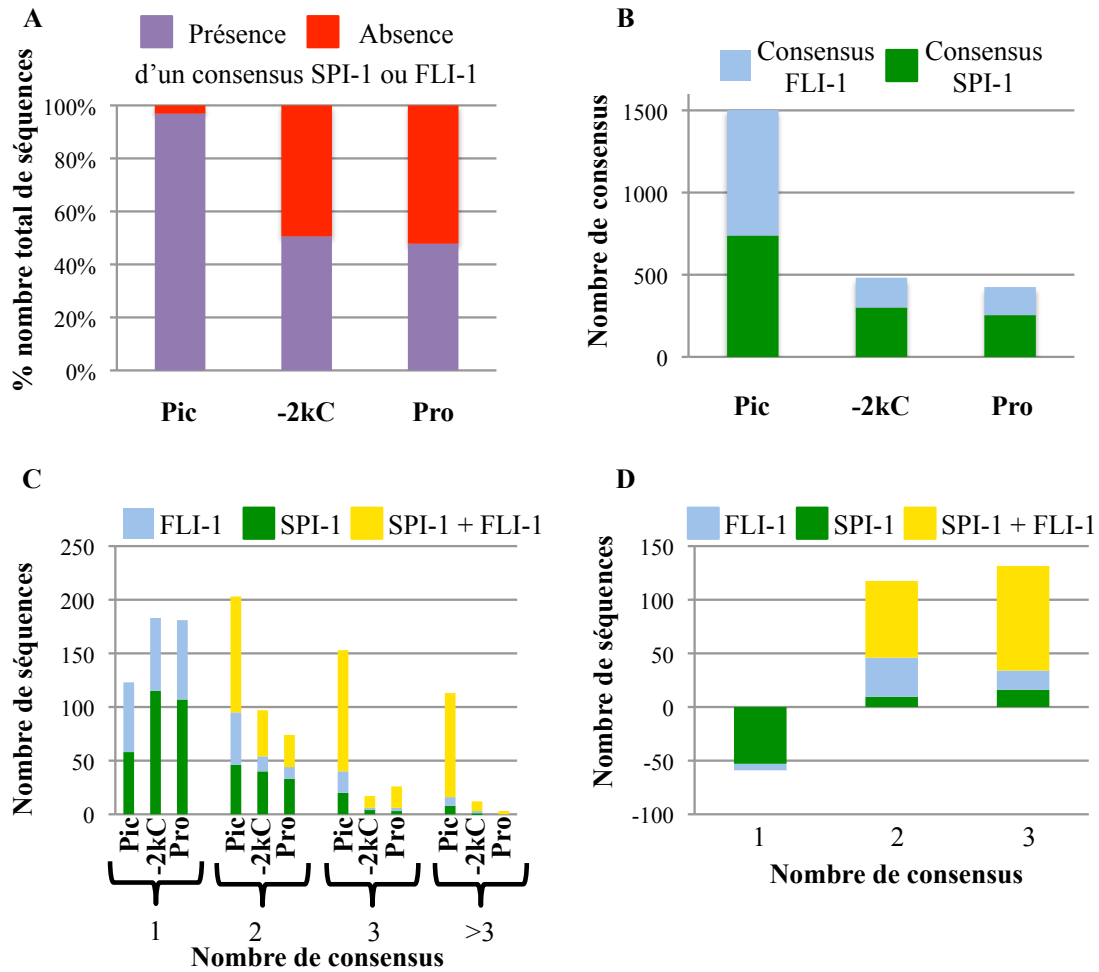


Figure 57 : Composition des séquences communes à FLI-1 et à SPI-1 en consensus FLI-1 et SPI-1

Les séquences correspondant au 200 pb de part et d'autre de 612 pics communs à FLI-1 et à SPI-1 (Pic), les séquences des régions -2200 pb/-1800 pb en amont de ces pics (-2kC) et les séquences de 600 promoteurs choisis aléatoirement (Pro) ont été analysées par CisFinder afin de déterminer leur composition en consensus FLI-1 et SPI-1.

A : Nombre de séquences contenant (barres violettes) ou pas (barres rouges) au moins un consensus SPI-1 ou un consensus FLI-1 exprimé en pourcentage du nombre total de séquences.

B : Nombre de consensus FLI-1 (barres bleues) et de consensus SPI-1 (barres vertes).

C : Nombre de séquences contenant 1 ou plusieurs consensus FLI-1 (barres bleues), SPI-1 (barres vertes) ou les 2 types de consensus (barres jaunes).

D : Nombre de séquences contenant 1, 2 et/ou 3 consensus SPI-1 et FLI-1 auquel est soustrait la moyenne des nombres de séquences équivalentes des contrôles -2kC et Pro.

Nombre de consensus présents dans les séquences sous les pics communs

La figure 57B montre la nature du consensus présent dans les séquences sous les pics communs et les régions contrôles -2kC contenant au moins un consensus. Les régions contrôles -2kC et Pro sont composées d'une majorité de séquences comprenant au moins un consensus SPI-1 (Figure 57B : 300 séquences avec consensus SPI-1 contre 182 séquences avec consensus FLI-1). Au contraire, les pics communs présentent un enrichissement en séquences contenant au moins un consensus FLI-1 (Figure 57B : 764 séquences) ou un consensus SPI-1 (Figure 57B : 738 séquences).

Nombre de consensus par séquences sous les pics communs

Les figures 57C et 57D montrent le nombre de séquences comportant 1, 2, 3 ou plus de 3 consensus SPI-1 et/ou FLI-1 sous les pics communs et les régions contrôles -2kC et Pro. De façon frappante, les pics communs présentent une sous représentation de séquences n'ayant qu'un seul consensus contrairement aux séquences des régions contrôles. D'autre part, la majorité des séquences sous les pics communs comportant au moins deux consensus correspondent à des séquences comportant les deux types de consensus.

Proximité des pics et des consensus FLI-1 et SPI-1

Une des questions que nous nous sommes posées est de savoir si les séquences contenues sous les pics communs à FLI-1 et à SPI-1 étaient composées de consensus proches l'un de l'autre. Nous avons dans un premier temps calculé la distance moyenne entre les pics FLI-1 et SPI-1 communs. De manière frappante, la figure 58A montre que les pics SPI-1 et FLI-1 sont distants de moins de 100 pb l'un de l'autre, que la distance maximale imposée pour les considérer comme communs soit de 200 pb (Figure 58A : courbe bleue) ou de 1000

pb (Figure 58A : courbe verte). Ces résultats indiquent donc que les pics FLI-1 et SPI-1 sont retrouvés majoritairement à proximité l'un de l'autre.

Afin de tester si cette proximité des sommets des pics FLI-1 et SPI-1 est due à la proximité des consensus FLI-1 et SPI-1, nous avons également calculé la distance moyenne entre ces consensus dans les séquences communes contenant un consensus de chaque type ainsi que dans les séquences de 600 promoteurs choisis au hasard. Comme nous pouvons l'observer, la majorité des séquences contenues sous les pics communs est composée de consensus FLI-1 et SPI-1 distants de moins de 100 pb (Figure 58B : courbe verte). Les consensus FLI-1 et SPI-1 des 600 séquences promotrices prises au hasard semblent également avoir une contrainte de proximité. Cependant, cette contrainte est beaucoup moins prononcée que celle observée sous les pics communs (Figure 58B : courbe noire).

L'ensemble de ces résultats indique donc que l'existence de pics considérés comme communs à FLI-1 et à SPI-1 est la conséquence de la proximité de leur consensus respectif.

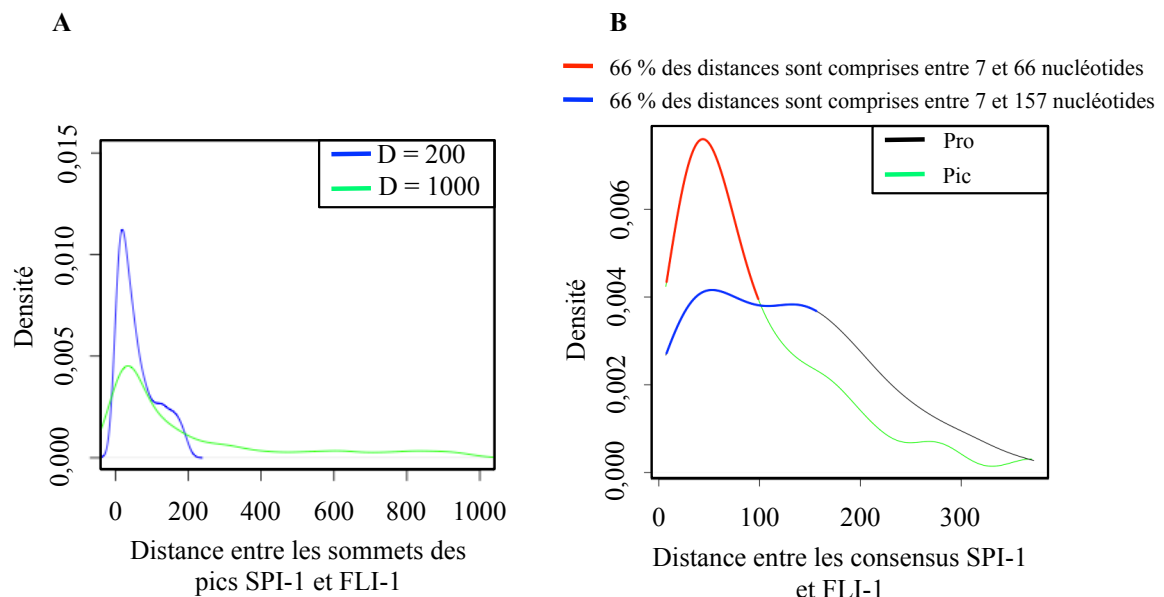


Figure 58 : Les pics et les consensus SPI-1 et FLI-1 sont à proximité l'un de l'autre pour les pics communs

A : Distance moyenne entre les pics SPI-1 et FLI-1 obtenus à partir du croisement des pics SPI-1 et FLI-1 après avoir imposé une distance maximale de 200 pb (courbe bleue) ou de 1000 pb (courbe verte).

B : Distance moyenne entre les consensus FLI-1 et SPI-1 dans les séquences sous les pics communs 228 contenant un consensus FLI-1 et un consensus SPI-1 (courbe verte) ou dans les séquences de 600 promoteurs (Pro) choisis de manière aléatoire (courbe noire).

Localisation des consensus SPI-1 et FLI-1 par rapport aux pics communs

Nous avons testé la localisation des consensus FLI-1 et SPI-1 par rapport aux pics FLI-1 et SPI-1 communs sous lesquels les séquences sont composées d'un consensus de chaque type. La figure 58 montre la répartition des distances entre les consensus SPI-1 (Figure 59A) ou FLI-1 (Figure 59B) par rapport aux pics FLI-1 et SPI-1 communs.

Comme nous pouvons l'observer sur la figure 59C, le consensus SPI-1 est localisé préférentiellement sous le sommet du pic SPI-1 (Figure 59C : courbe bleue). En revanche, le consensus SPI-1 est réparti de manière plus lâche de part et d'autre du pic FLI-1 (Figure 59C : courbe verte).

De la même manière, nous pouvons observer également un positionnement du consensus FLI-1 à courte distance du sommet du pic FLI-1 (Figure 59B : courbe bleue) ainsi qu'une répartition plus lâche de part et d'autre du sommet du pic SPI-1 (Figure 59B : courbe verte).

En d'autres termes, ces résultats indiquent donc que le consensus SPI-1 est davantage localisé à proximité du pic SPI-1 commun alors que le pic FLI-1 semble plutôt localisé proche du pic FLI-1. Ces observations suggèrent donc que FLI-1 et SPI-1 seraient recrutés sur leur consensus respectifs.

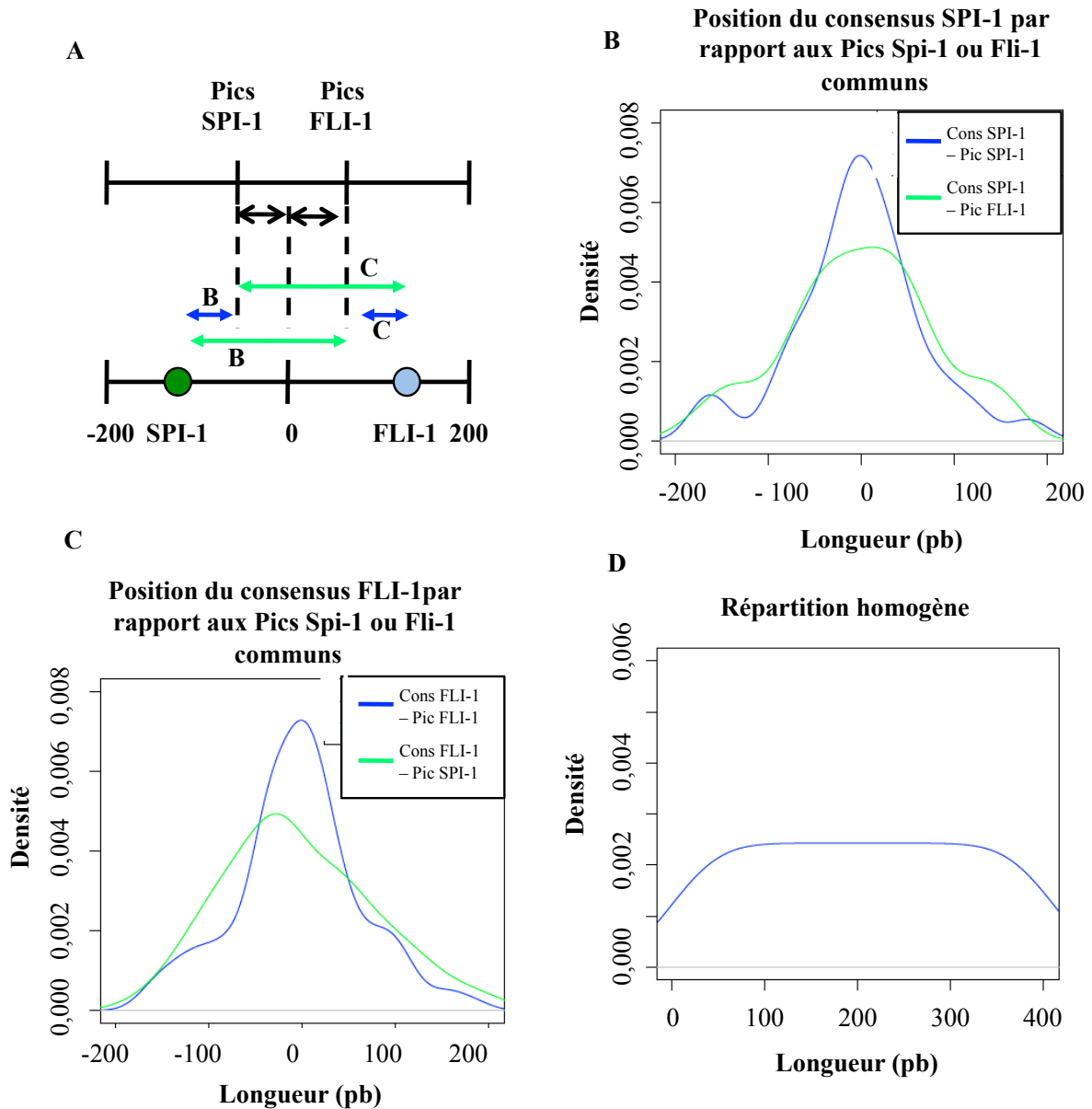


Figure 59 : Localisation des consensus SPI-1 ou FLI-1 par rapport au pic commun à FLI-1 et SPI-1

A : Schéma explicatif des graphiques A et B. Le point 0 correspond à la moitié de la distance entre les pics FLI-1 et SPI-1. Les flèches bleues représentent la distance entre le consensus et le pic du facteur correspondant. Les flèches vertes représentent les distances entre les consensus et le pic de l'autre facteur.

B : Distance en paire de bases entre le consensus SPI-1 et le pic SPI-1 (courbe bleue) ou le pic FLI-1 (courbe verte).

C : Distance en paire de bases entre le consensus FLI-1 et le pic FLI-1 (courbe bleue) ou le pic SPI-1 (courbe verte).

D : Exemple théorique de répartition homogène des consensus sur une région de 400 pb.

Conservation des consensus FLI-1 et SPI-1 des séquences sous les pics communs

Afin de déterminer si les consensus FLI-1 et SPI-1 des séquences des pics communs étaient conservés au cours de l'évolution, les séquences contenant deux consensus FLI-1 et SPI-1 contenues sous les pics communs et sous les régions contrôles ont été analysées avec rVISTA 2.0 pour détecter des conservations multi-espèces des consensus. La figure 60 montre que les séquences des régions contrôles sont composées de séquences ne contenant pas de consensus SPI-1 ou FLI-1 conservés, de séquences contenant un des deux consensus conservés ou des deux (Figure 60 : secteur de droite). En revanche, nous pouvons observer un très net enrichissement en séquences contenant deux consensus SPI-1 et FLI-1 conservés sous les pics communs (Figure 60 : secteur de gauche).

Autrement dit, ces résultats tendent à montrer une pression de sélection sur les séquences contenant un consensus FLI-1 et un consensus SPI-1 dans les séquences des pics communs aux facteurs FLI-1 et SPI-1.

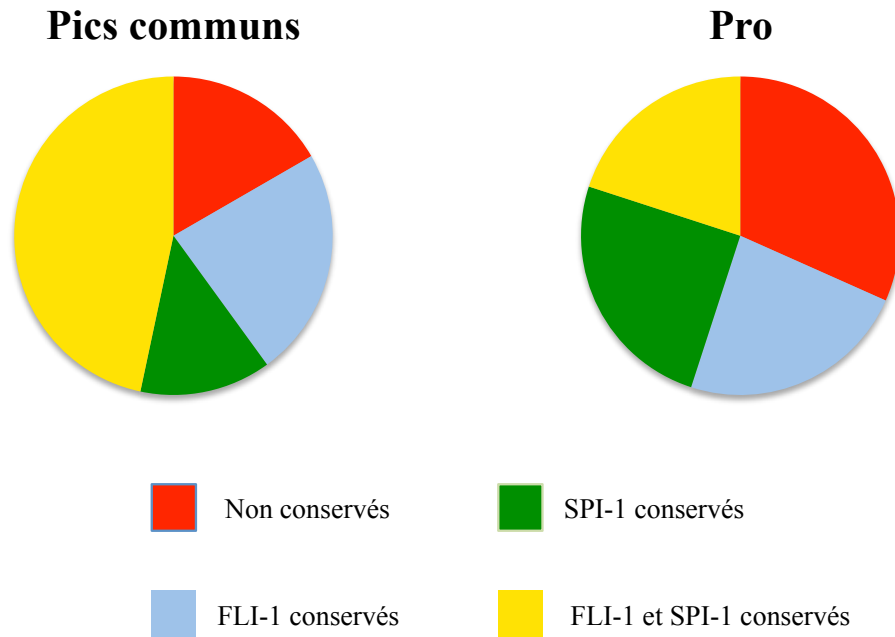


Figure 60 : Conservation des consensus FLI-1 et SPI-1 dans les séquences sous les pics communs

Secteurs montrant la proportion de consensus FLI-1 conservés (partie bleue), SPI-1 conservés (partie verte) ou les deux conservés (partie jaune) ou encore non conservés (partie rouge) dans les séquences sous les pics communs (secteur de gauche) ou contrôles (600 promoteurs au hasard) (secteur de droite) contenant un consensus FLI-1 et un consensus SPI-1.

Un consensus est considéré conservé s'il l'est dans au moins une des espèces suivantes par rapport à la souris : Homme, Chimpanzé, Macaque, Poulet et Chien.

D) Etude du recrutement de SPI-1 et de FLI-1 sur les promoteurs de gènes de biogénèse des ribosomes

- 1- Association des pics spécifiques et communs à des gènes de biogénèse des ribosomes

Nous avons ensuite focalisé notre étude sur l'ensemble des gènes de biogénèse des ribosomes recrutant SPI-1 et/ou FLI-1 sur leurs séquences régulatrices afin de déterminer dans un

premier temps si ces séquences sont majoritairement composées des deux types de consensus SPI-1 et FLI-1. Nous avons donc utilisé la liste des coordonnées de pics spécifiques à FLI-1 ou à SPI-1 ou communs aux deux facteurs et nous les avons soumis au programme GPAT (Genomic Position Annotation Tool) disponible sur internet. Ce programme développé par le groupe L. Tora (Krebs et al., 2008) détecte dans une fenêtre de distance par rapport aux gènes la présence de pics ou non. Pour notre analyse concernant les gènes de biogenèse des ribosomes, nous avons effectué une recherche de pics dans une distance de 5 kb de part et d'autre du point d'initiation de la transcription. Une fois la liste de gènes obtenue, nous avons cherché les gènes codant des protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes décrits par le groupe de J.J Diaz (Couté et al., 2006). La figure 61A montre que 128 pics spécifiques à SPI-1 sont associés à des gènes de biogenèse des ribosome contre seulement 16 pics spécifiques à FLI-1 et 18 pics communs. Cette faible représentation de pics communs associés aux gènes de biogenèse des ribosomes pourrait suggérer qu'une grande proportion de ces gènes ne recrute que SPI-1.

A

	SPI-1 spécifique	FLI-1 spécifique	Communs
Nombre de pics	128	16	18
Nombre total de pics	7304	282	238

B



Figure 61 : Association des pics spécifiques et communs aux gènes de biogenèse des ribosomes

A : Tableau représentant le nombre de pics associés par le programme GPAT aux gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes ou aux gènes totaux décrits par Couté et al. (Couté et al., 2006).

B : Représentation du motif consensus surreprésenté dans les séquences sous les pics spécifiques de SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes

- 2- Les séquences sous les 128 pics SPI-1 montrent une surreprésentation de consensus communs

Du fait du faible nombre de pics communs et spécifiques à FLI-1 associés à des gènes de biogenèse des ribosomes, nous avons focalisé notre étude sur les 128 pics spécifiques de SPI-1. Nous avons recherché des motifs surreprésentés dans les séquences présentes dans une région de 200 pb de part et d'autre du sommet de ces 128 pics par rapport aux régions contrôles situées 2 kb en amont (région -2kR) afin de tester si le motif surreprésenté dans la totalité des séquences sous les pics spécifiques à SPI-1 est le même pour les séquences

associées à la biogenèse des ribosomes. Pour rappel, le motif consensus identifié par CisFinder pour les pics spécifiques à SPI-1 est composé d'un motif cœur GGAA avec très majoritairement un G en position -2 par rapport à ce motif (Figure 52). En revanche, le motif surreprésenté dans les séquences sous les 128 pics associés à la biogenèse des ribosomes est strictement le même que celui identifié par cisFINDER pour les 612 pics communs (comparer figures 52 et 61B). Ces résultats suggèrent que les séquences sous les pics SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes se comportent comme les séquences sous les pics communs.

3- Composition des séquences en consensus FLI-1 et SPI-1

Dans le but de déterminer si les séquences sous les pics SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes présentent une signature de séquences communes, nous avons entrepris de déterminer la composition des 128 séquences en consensus FLI-1 et SPI-1 en suivant la même démarche que celle décrite dans la partie 3C.

Les pics SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes sont enrichis en séquences contenant au moins un consensus SPI-1 ou FLI-1

La figure 62A montre que les 128 pics SPI-1 sont très majoritairement composés de séquences contenant au moins un consensus FLI-1 ou SPI-1 (Figure 62A : 111 séquences avec contre 17 sans consensus). En revanche, les régions contrôles -2kR sont composées d'un très petit nombre de séquences contenant des consensus FLI-1 ou SPI-1 présentés sur la figure 54 (Figure 62A : 51 séquences avec contre 77 sans consensus). D'autre part, la figure 62B montre un enrichissement en consensus FLI-1 (Figure 62B : 118 consensus FLI-1 sous les pics SPI-1 contre 27 consensus dans les régions contrôles -2kR) ou en consensus SPI-1 (Figure 62B : 157 consensus SPI-1 sous les pics SPI-1 contre 45 dans les régions contrôles -2kR). Ces résultats indiquent donc que les séquences sous les pics SPI-1 associés à la

biogenèse des ribosomes sont enrichis en consensus FLI-1 et en consensus SPI-1 comme les séquences contenues sous la totalité des pics communs.

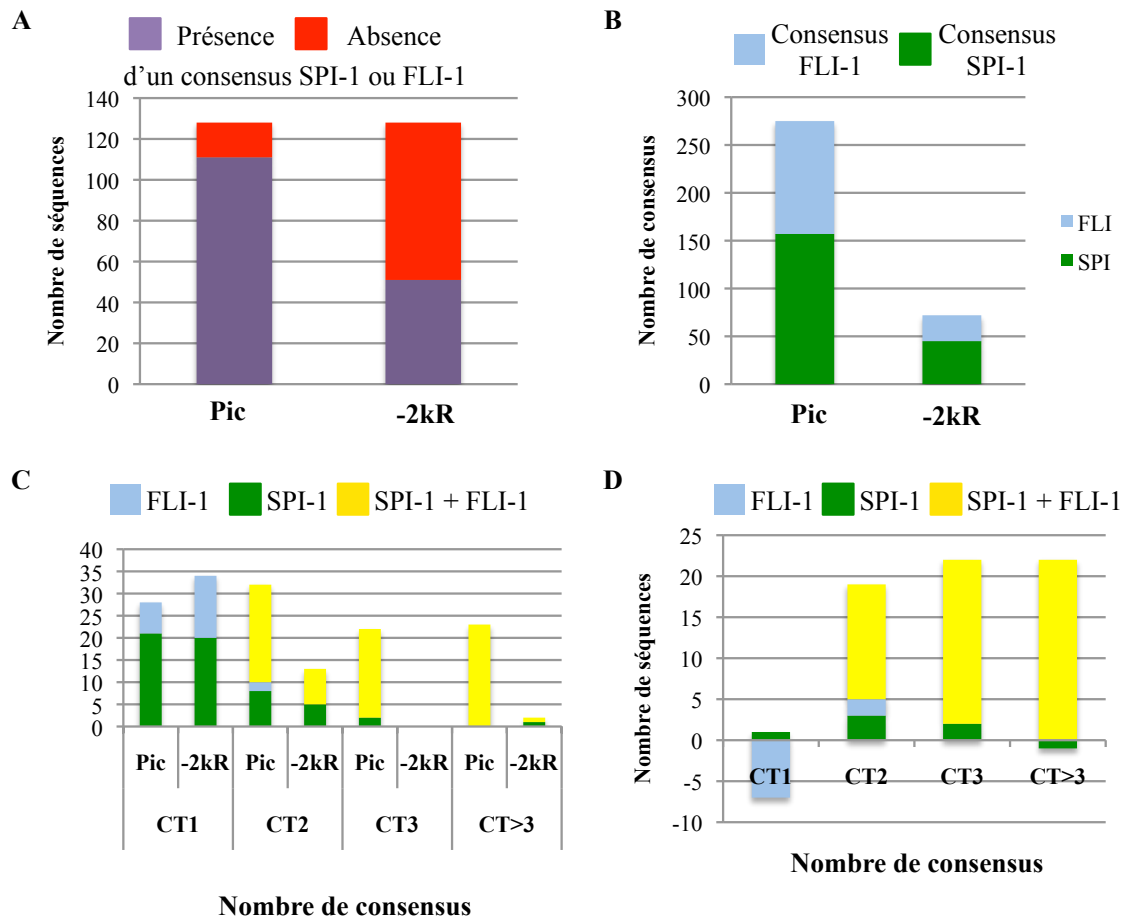


Figure 62 : Composition des séquences spécifiques à SPI-1 associées à la biogenèse des ribosomes en consensus FLI-1 et SPI-1

Les séquences correspondant au 200 pb de part et d'autre des pics communs à FLI-1 et à SPI-1 associés aux gènes de biogenèse des ribosomes (Pic) et les séquences des régions -2200 pb/-1800 pb en amont de ces pics (-2kR) ont été analysées par CisFinder afin de déterminer leur composition en consensus FLI-1 et SPI-1.

A : Nombre de séquences contenant (barres violettes) ou pas (barres rouges) au moins un consensus SPI-1 ou un consensus FLI-1.

B : Nombre de consensus FLI-1 (barres bleues) ou de consensus SPI-1 (barres vertes) dans les séquences sous les pics SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes.

C : Nombre de séquences contenant 1 ou plusieurs consensus FLI-1 (barres bleues), SPI-1 (barres vertes) ou les 2 types de consensus (barres jaunes).

D : Nombre de séquences contenant 1, 2 et/ou 3 consensus SPI-1 et FLI-1 auquel est soustrait le nombre de séquences équivalentes des contrôles-2kR.

Les pics SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes sont enrichis en séquences contenant au moins deux consensus

Nous avons ensuite déterminé le nombre de consensus par séquences contenues sous les 128 pics SPI-1 et les régions contrôles -2kR. Les figures 62C et 62D montrent que les pics SPI-1 sont majoritairement composés de séquences contenant au moins deux consensus SPI-1 ou FLI-1. D'autre part, les séquences contenant au moins deux consensus sont essentiellement des séquences contenant les deux types de consensus (Figure 62C et D : comparer les barres jaunes aux barres bleues et vertes). Ces résultats indiquent donc que les pics SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes sont enrichis en séquences contenant les deux types de consensus.

En d'autres termes, les pics spécifiques de SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes présentent une signature de séquences communes.

- 1- Position des pics par rapport au +1 de la transcription et lien avec la régulation des gènes de biogenèse des ribosomes

Localisation à proximité du +1 de transcription

Nous avons ensuite regardé le positionnement des pics par rapport aux gènes. Nous avons comparé les 128 pics SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes à 128 pics SPI-1 pris au hasard. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 63A, plus des 60 % des pics pris au hasard se situent en aval du +1 de transcription des gènes (Figure 63A : partie rouge du secteur supérieur). En revanche, même si les pics se trouvant dans le corps des gènes de biogenèse des ribosomes sont également majoritaires, la proportion de pics situés en amont du +1 de la transcription des gènes de biogenèse des ribosomes est plus importante que celle des gènes pris au hasard (Figure 63A : comparer partie bleue des secteurs du haut et du bas). Ces résultats suggèrent que le recrutement de SPI-1 et FLI-1 serait retrouvé plus fréquemment

dans le promoteur proximal des gènes de biogénese des ribosomes que pour un autre type de gène. Cette localisation au niveau des promoteurs proximaux a déjà été observée par le groupe de J. Taipale pour les pics communs aux membres de la famille ETS (Wei et al., 2010).

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la proximité des pics par rapport au +1 de transcription de ces mêmes gènes. La figure 63B montre une clusterisation des pics associés à la biogénese des ribosomes autour du +1 de transcription plus prononcée que pour les pics pris au hasard (Figure 63B : 50 % de séquences à 500 pb de part et d'autre du +1 de transcription pour les gènes de biogénese des ribosomes contre 32 % pour les gènes totaux). Ces résultats suggèrent donc que le recrutement de SPI-1 et FLI-1 à proximité des gènes de biogénese des ribosomes se fait préférentiellement autour du +1 de transcription.

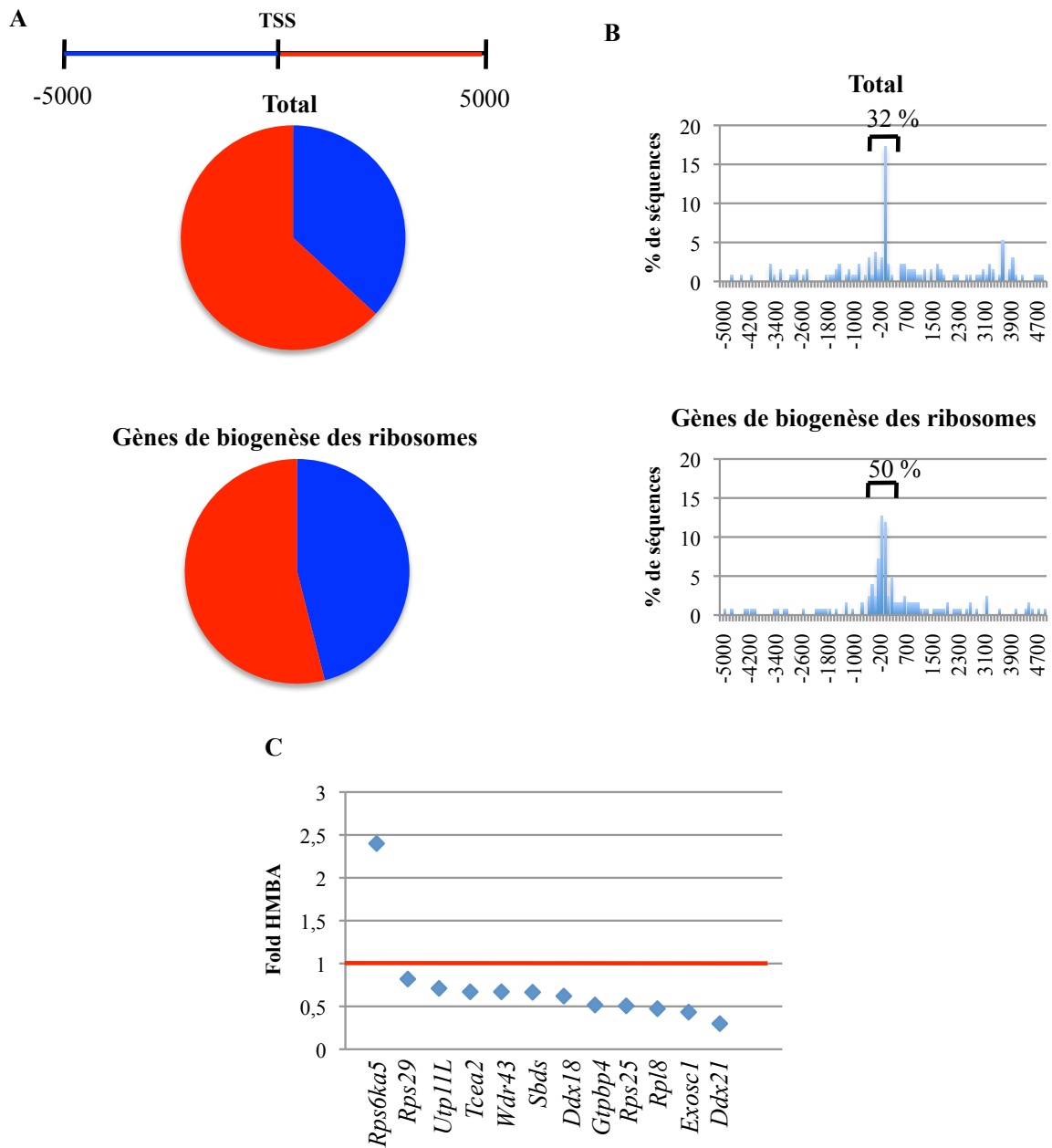


Figure 63 : Lien entre recrutement et régulation?

A : Proportion des 128 pics SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes (secteur du bas) ou associés à des gènes pris au hasard (secteur du haut) en amont du TSS (partie bleue) ou en aval du TSS (partie rouge).

B : Répartition des 128 pics SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes (graphique du bas) ou associés à des gènes pris au hasard (graphique du haut) par rapport au +1 de transcription. Les pourcentages indiqués correspondent à la proportion de séquences comprises entre -500 et +500 pb par rapport au +1 de transcription

C : Effet de l'HMBA sur l'expression des gènes de biogenèse des ribosomes situés à proximité des pics SPI-1.

Effet de l'HMBA sur l'expression des gènes de biogenèse de ribosomes associés à un pic SPI-1 ?

Nous avons ensuite testé l'importance du recrutement de SPI-1 et de FLI-1 sur l'expression des gènes de biogenèse des ribosomes. Pour répondre à cette question, nous avons testé l'effet de l'HMBA sur l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes se trouvant à proximité d'un pic SPI-1, présents dans les données de transcriptome et dont la p-value de l'effet de l'HMBA est inférieure à 5 %. Ainsi, seuls 12 gènes associés à un pic SPI-1 montrent une régulation statistiquement significative.

La figure 63C montre que l'HMBA a majoritairement un effet répresseur de l'expression de ces gènes quand cet effet est significatif excepté pour le gène *Rps6ka5* qui code une kinase décrite pour phosphoryler la protéine ribosomique RPS6 et dont l'expression est augmentée après traitement par l'HMBA.

C) Synthèse des résultats obtenus

Pour conclure cette partie, nous avons développé une approche originale permettant l'identification de gènes cibles directs par les facteurs de la famille ETS, FLI-1 et SPI-1 dans trois lignées érythroleucémiques indépendantes pour lesquelles des données de transcriptome sont ou pourront être disponibles après extinction d'un de ces deux facteurs. L'analyse bioinformatique de nos données nous a permis d'identifier des motifs consensus de recrutement spécifiques de FLI-1 et de SPI-1. D'autre part, la présence de pics communs à FLI-1 et à SPI-1 est la conséquence de la proximité de deux consensus FLI-1 et SPI-1 qui semblent être conservés au cours de l'évolution. La même analyse appliquée à la biogenèse des ribosomes nous a permis d'aboutir aux mêmes conclusions. Néanmoins, la faible proportion de gènes de biogenèse des ribosomes associés aux pics communs pourrait suggérer

un problème de détection des pics FLI-1 ou alors la reconnaissance des consensus FLI-1 par un autre facteur de la famille ETS.

Enfin, nous avons montré que les pics SPI-1 sont préférentiellement positionnés proches du +1 de la transcription. De plus, il semblerait que le recrutement de SPI-1 soit plutôt associé à une activation mais ces données nécessitent des analyses supplémentaires pour être validées.

DISCUSSION

I- Spécificité des phénotypes induits par la répression inductible de *fli-1*

De manière très frappante, la quasi-totalité des intégrations provirales du virus de Friend conduisant au développement d'érythroleucémies entraîne la surexpression d'un facteur de transcription de la famille ETS, SPI-1 ou FLI-1, reconnaissant un motif consensus minimal GGAA. De plus, notre équipe a montré que SPI-1 est un activateur transcriptionnel du gène *fli-1*. Cette observation suggère que la dérégulation des gènes activés ou réprimés par ces deux facteurs est quasi incontournable pour la transformation de la lignée érythrocytaire. Afin d'apprécier la signification de cette observation, mon objectif était dans premier temps de montrer que SPI-1 et FLI-1 contribuent au maintien de la prolifération, de la survie et du blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend. Si la contribution de SPI-1 à ces trois processus avait déjà été montrée par répression de son expression dans les cellules MEL (Atar et al., 2005), les seules études réalisées avant le début de ma thèse permettant de documenter le rôle de FLI-1 dans les érythroleucémies étaient des études de surexpression dans les cellules érythroleucémiques ou les érythroblastes aviaires (Starck et al., 1999 ; Pereira et al., 1999). Ces études ne permettaient pas d'établir formellement la contribution de la protéine FLI-1 endogène à la prolifération, à la survie et au blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend. J'ai donc testé la contribution de la protéine FLI-1 endogène à ces trois processus par répression inductible par interférence par l'ARN de son expression dans deux lignées érythroleucémiques induites par le virus SFFV (lignée 745A surexprimant *Spi-1* et *Fli-1*) ou par le virus F-MuLV (lignée NN10 surexprimant uniquement *Fli-1*).

J'ai ainsi pu montrer que la répression de *Fli-1* accélère l'arrêt de la prolifération et la différenciation des cellules 745A en réponse à l'HMBA et entraîne l'apparition de cellules apoptotiques. J'ai utilisé la même approche pour montrer que la répression de *Fli-1* dans les cellules NN10 entraîne les mêmes effets que ceux induits dans les cellules 745A.

J'ai montré que ces effets de la répression de *Fli-1* dans les cellules 745A et NN10 sont la conséquence de l'absence de FLI-1 et non celle d'un effet non spécifique des shARN produits dans ces clones. En effet, la production de shARN de séquence aléatoire n'a strictement aucun effet sur ces lignées de cellules érythroleucémiques. D'autre part, j'ai vérifié que l'expression d'aucun gène décrit pour être activés en réponse à la production d'interféron n'est augmentée par la production des shARN *Fli-1* ni dans les cellules 745A ni dans les cellules NN10. Enfin, la répression de *Fli-1* par l'un ou l'autre de deux shARN ciblant deux régions différentes de l'ARNm de *Fli-1* conduit aux mêmes phénotypes. Je déduis de ces résultats que la probabilité que l'arrêt de la prolifération, l'apoptose et la reprise de la différenciation des cellules NN10 et 745A ne soient pas la conséquence de la répression de *Fli-1* est extrêmement faible. La restauration du phénotype par une protéine FLI-1 exogène dont l'ADNc est insensible à la dégradation par le shARN permettrait d'asseoir de manière définitive cette démonstration. Pour l'instant, nous nous heurtons à une difficulté technique (Cf. annexe 2) dont nous pensons qu'elle est liée à une dynamique d'expression différente du gène *fli-1* exogène par rapport au gène *fli-1* endogène. Pour résoudre ce problème, il faudrait produire la protéine FLI-1 exogène dans les mêmes conditions que la protéine FLI-1 endogène. L'intégration de mutations silencieuses dans le gène *fli-1* endogène des cellules érythroleucémiques de Friend rendant insensible l'ARNm *Fli-1* à la dégradation par les shARN nous permettrait de répondre à cette question.

L'ensemble de ces résultats montre donc pour la première fois que la protéine FLI-1 endogène contribue au maintien de la prolifération, de la survie et au blocage de la

différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend et contribue de manière additive avec SPI-1 à ces processus. Toutefois, nous pouvons noter que l'absence de FLI-1 dans les cellules NN10 n'induit l'hémoglobination que d'une très faible proportion de cellules contrairement aux cellules 745A en présence d'HMBA et de doxycycline. Cette différence au niveau de la réversibilité du blocage de la différenciation en absence de FLI-1 ou de SPI-1 pourrait être la conséquence de l'accumulation de mutations qui pourraient avoir été sélectionnées lors de la propagation du clone NN10 soit dans son établissement initial du fait que, contrairement à SPI-1, FLI-1 à lui seul ne puisse pas conduire à la transformation des érythroblastes. Or, les données décrites dans la littérature semblent plutôt indiquer le contraire. En effet, alors que la surproduction de FLI-1 dans les érythroblastes aviaires est suffisante pour bloquer leur différenciation et maintenir leur prolifération et leur survie, la surproduction de SPI-1 dans ces mêmes érythroblastes nécessite la coopération d'un EpoR fonctionnel pour conduire aux mêmes phénotype (Pereira et al., 1999 ; Pereira et al., 2000).

Alternativement, la différence de réversibilité du blocage de la différenciation en absence de FLI-1 ou de SPI-1 pourrait être reliée à une différence dans le mode d'action de FLI-1 et de SPI-1. Ainsi par exemple, des données non publiées de Boris Guyot montrent que la répression simultanée de *Fli-1* par la doxycycline et des HDAC par la TSA (Trichostatin A) induit l'hémoglobination de plus de 50 % de ces cellules. De plus, Boris Guyot a également montré une interaction entre FLI-1 et HDAC1. Ces résultats suggèrent l'importance des HDAC dans le blocage de la différenciation des cellules NN10. Ces résultats suggèrent également que FLI-1 pourrait contribuer au blocage de la différenciation en laissant une empreinte qui ne peut être levée par la seule absence de FLI-1. La répression de *Fli-1* ainsi que celle des HDAC dans d'autres lignées F-MuLV surexprimant *Fli-1* pourrait être envisagée afin de tester ces différentes possibilités.

Pris ensemble, ces résultats montrent que SPI-1 et FLI-1 ont des contributions similaires comme ce qui est observée dans l'érythropoïèse normale (Back et al., 2004 ; Starck et al., 2010) mais également des contributions plus spécifiques notamment au niveau du blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend.

II- Lien entre FLI-1 et la biogenèse des ribosomes

Les analyses transcriptomiques réalisées à partir des cellules 745A traitées ou non par la doxycycline et/ou par l'HMBA nous ont permis de montrer qu'une proportion importante de gènes activés de manière additive par FLI-1 et SPI-1 était impliquée dans différentes étapes de la biogenèse des ribosomes et recrutent ces facteurs au niveau de leur séquence promotrice. Comme nous avons pu le voir dans la dernière partie de mon introduction bibliographique, la biogenèse des ribosomes consiste en l'assemblage de protéines ribosomiques avec quatre ARNr différents. Les protéines ribosomiques sont synthétisées en excès par rapport aux ARNr. Les protéines ribosomiques non intégrées sont rapidement dégradées, leur demi-vie étant de 40 minutes chez les mammifères (pour revue, Warner et al., 1989). En revanche, la synthèse et la maturation des ARNr constituent le facteur limitant de la biogenèse des ribosomes. De manière frappante, une majorité des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes dont l'expression est diminuée de manière additive en absence de FLI-1 et de SPI-1 sont justement impliquée dans le métabolisme des ARNr. Ainsi, nous pouvons noter la régulation directe d'une sous-unité commune des ARN polymérases I et III qui assurent la transcription des ARNr 28S, 5,8S, 5S et 18S ce qui pourrait suggérer une réduction de l'activité de ces deux ARN polymérases. De manière plus générale, cette observation intéressante nous a conduit à penser que la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 entraîne une réduction du nombre de ribosomes dans les cellules 745A.

L'ensemble des données que j'ai présentées dans ce manuscrit tendent à montrer qu'effectivement la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 entraîne une réduction du nombre de ribosomes. En effet, la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 conduit d'une part à la réduction du taux d'ARNr et d'autre part à la réduction du taux de protéine RPL11 et RPL24 dont la grande majorité se trouve dans les ribosomes.

III- La réversion du phénotype transformé des cellules érythroleucémiques de Friend induite par la déplétion de FLI-1 de SPI-1 ne s'explique pas par une augmentation de p53 provoquée par un stress ribosomique

A) p53 ne contribue pas aux effets de la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 dans les cellules érythroleucémiques

De nombreuses études présentées dans la quatrième partie de mon introduction bibliographique mettent en évidence que la biogenèse des ribosomes est ciblée par des oncogènes mais également par des suppresseurs de tumeurs suggérant une importance cruciale de cette biogenèse dans le développement de cancer. De plus, une grande proportion de cancers est associée à une stimulation de la biogenèse des ribosomes (pour revue, Ruggero et al., 2003). Il m'a donc paru très intéressant de relier fonctionnellement la réduction de la biogenèse des ribosomes observée en absence de FLI-1 et de SPI-1 à l'arrêt de la prolifération et à la différenciation qui lui sont associés. Une réduction de la biogenèse des ribosomes peut induire une voie de stress ribosomique entraînant la stabilisation de p53 via la répression de MDM-2 par certaines protéines ribosomiques. De manière intéressante, le groupe de P.A. Marks a montré que le traitement des cellules érythroleucémiques DS19 par de faibles doses d'actinomycine D conduit à la reprise de leur différenciation et à l'arrêt de leur prolifération (Terada et al., 1978). A faibles doses, l'actinomycine D bloque préférentiellement l'ARN

polymérase I. Ce traitement induit la stabilisation de p53 via cette voie de stress ribosomique (Choong et al., 2009 ; Dai et al., 2004). De la même manière, la surproduction d'une protéine p53 de conformation sauvage induit la différenciation des cellules érythroleucémiques DP16 au détriment de leur prolifération (Johnson et al., 1993). De plus, comme je l'ai mentionné dans la dernière partie de mon introduction bibliographique, l'empêchement d'un stress ribosomique semble être primordial pour le développement de cancer (Macias et al., 2010). Ces données nous ont conduit à proposer que la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 induirait un stress ribosomique et la stabilisation consécutive de p53 contribuant à l'arrêt de prolifération et à la reprise de la différenciation des cellules 745A et NN10.

Si cette hypothèse est vraie, nous devrions pouvoir montrer que (1) l'induction d'un stress ribosomique mime les effets de l'absence de FLI-1 et de SPI-1 dans les cellules NN10 et 745A et augmente le taux de protéine p53, (2) que l'absence de FLI-1 et de SPI-1 augmente le taux de protéine p53, (3) que la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 entraîne l'accumulation de protéines ribosomiques RPL11 libres qui induit la stabilisation de p53 et (4) que p53 contribue aux phénotypes des cellules 745A et NN10 après déplétion des deux facteurs ETS. Suivant cette stratégie, j'ai montré qu'effectivement l'induction d'un stress ribosomique par l'actinomycine D ou le 5-FU mime la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 et que la déplétion de ces deux facteurs comme le traitement par l'actinomycine D augmente le taux de protéine p53 dans les cellules NN10 et 745A. En revanche, j'ai montré que cette augmentation n'est pas dépendante de la protéine RPL11, médiateur essentiel d'un stress ribosomique (Lohrum et al., 2003 ; Zhang et al., 2003). De plus, la protéine p53 ne contribue pas à l'arrêt de prolifération et à la reprise de la différenciation des cellules érythroleucémiques induites par la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 ou par l'actinomycine D. Cette absence de contribution de p53 est cohérente avec le fait que la protéine p53 est mutée dans les cellules érythroleucémiques de Friend. Ainsi, les cellules 745A produisent une protéine p53 portant la mutation C269S qui

touche le domaine de liaison à l'ADN (Barnache et al., 1998). En revanche, aucune mutation de p53 dans les cellules NN10 n'a été documentée à ce jour. Il serait donc intéressant de séquencer l'ADNc de la protéine p53 de ces cellules afin de déterminer si effectivement p53 est mutée dans les cellules NN10 et de déterminer la nature de cette mutation.

De manière plus surprenante, le traitement des cellules 745A par l'HMBA seul entraîne une réduction drastique du taux de protéine p53. Cette réduction n'est pas la conséquence de la déplétion de SPI-1 puisque la répression de *Spi-1* par siARN n'induit pas d'effet sur le taux de protéine p53 (données non montrées). De plus, le taux de protéine MDM-2 n'est pas affecté par le traitement par l'HMBA (données non montrées). Le groupe de M.C. Hungt a montré que la phosphorylation de MDM-2 par la kinase Akt active ses fonctions ubiquitine ligase conduisant à la dégradation de p53 (Zhou et al., 2001). De plus, le groupe de B.M. Peterlin a montré que l'HMBA entraîne une activation transitoire de la kinase Akt (Contreras et al., 2007). Ces données nous laissent penser que la réduction de p53 en réponse à l'HMBA pourrait être la conséquence d'une exacerbation de l'activité de MDM-2 liée à l'activation d'Akt par l'HMBA. Une manière de tester cette hypothèse serait de traiter simultanément les cellules 745A par l'HMBA et par un inhibiteur d'Akt comme la périfosine ou la MK-2206 (Carrasco et al., 2010 ; Li et al., 2009).

D'autre part, comme je l'ai mentionné, l'absence de FLI-1 en présence d'HMBA augmente le taux de protéine p53 indépendamment d'un stress ribosomique. En effet, plusieurs groupes ont montré que la seule répression de *Rpl11* est suffisante pour atténuer l'augmentation du taux de protéine p53 induite par exemple par l'actinomycine D (Lindstrom et al., 2010 ; Barkic et al., 2009). Une question soulevée par ce résultat concerne le mécanisme conduisant à l'activation de p53 en absence de FLI-1. Il serait intéressant dans un premier temps de déterminer si cette augmentation est la conséquence d'une régulation traductionnelle

ou post-traductionnelle. Des expériences d'incorporation de méthionine marquée par le ^{35}S pourraient être envisagées.

B) L'absence de FLI-1 et de SPI-1 conduit-elle à un stress ribosomique?

Le stress ribosomique se caractérise par l'accumulation de protéines ribosomiques non associées aux ribosomes. J'ai donc testé la possibilité que l'absence de FLI-1 et de SPI-1 entraîne un stress ribosomique en dosant le taux de protéine RPL11 libres. J'ai ainsi pu montrer que le traitement par l'HMBA avec ou sans doxycycline n'entraîne pas d'augmentation détectable du taux de protéine RPL11 dans la fraction libre ce qui suggère que l'absence de FLI-1 et de SPI-1 n'induit pas un stress ribosomique.

Toutefois, j'ai pu montrer une contribution de la protéine RPL11 à la différenciation des cellules 745A induite par la déplétion de SPI-1 et de FLI-1. Cette contribution semble être liée à la fraction libre de RPL11 puisque le taux de protéine RPL11 totale n'est pas réduit par les siARN. Je n'ai pas pu tester l'effet du siARN sur le pool de protéine RPL11 libre car ce test nécessite un fractionnement des ribosomes qui requiert un nombre conséquent de cellules ne pouvant être atteint après transfection avec des siARN. D'autre part, j'ai montré que la protéine RPL24, dont le groupe de S. Volarevic a montré que sa répression induit un stress ribosomique (Barkic et al., 2009) n'a pas les mêmes contributions que RPL11 sur la différenciation des cellules 745A.

Le protocole de fractionnement de ribosomes que j'ai suivi a été utilisé par le groupe de S. Volarevic qui a détecté l'accumulation de protéines ribosomiques RPL11 libres en

présence de faibles doses d'actinomycine D ou de siARN dirigé contre l'ARNm de *Rpl24* (Barkic et al., 2009). Contrairement à ce que les auteurs ont observé, j'ai pu constater la présence d'un pool de protéines ribosomiques RPL11 libres dans les cellules non traitées. D'autre part, je n'ai pas pu observer d'augmentation du pool de protéines RPL11 dans la fraction libre des cellules traitées par de faibles doses d'actinomycine D. La divergence entre ces résultats et ceux du groupe de S. Volarevic pourrait suggérer que le pool de protéines RPL11 libres détecté en absence de traitement dans nos conditions résulte d'une altération des ribosomes en cours d'expérience. A ce stade de l'analyse, il est donc difficile d'exclure que l'absence de FLI-1 et de SPI-1 n'affecte pas le pool de RPL11 libre. D'autres méthodes comme le gradient de polysome ont été utilisées notamment par le groupe de H. Lu pour détecter le pool de protéine RPL11 libre en absence de RPL23 (Dai et al., 2004). Contrairement à la méthode que j'ai utilisée, cette technique ne nécessite pas de précipitation de la fraction libre avec laquelle j'ai été confronté à des problèmes solubilisation du culot. Des expériences similaires pourraient être envisagées dans nos cellules 745A. D'autre part, le test de l'interaction entre RPL11 et MDM-2 pourrait également être appréhendé par des expériences de co-immunoprécipitation.

Quoiqu'il en soit, si la déplétion de SPI-1 et de FLI-1 induit effectivement un stress ribosomique qui conduit à l'accumulation de RPL11 libres contribuant à la différenciation des cellules 745A, nous savons d'ores et déjà que cette différenciation ne résulte pas d'une augmentation de p53, y compris en présence d'actinomycine D qui induit également la différenciation des cellules 745A. Néanmoins, ce pool de protéines RPL11 libres pourrait conduire à l'activation d'une autre cible de l'ubiquitine ligase MDM-2. Parmi les cibles potentielles de cette protéine, il est intéressant de citer la protéine HEXIM-1 (HMBA inducible protein 1) (Lau et al., 2009). Cette protéine a été décrite pour la première fois comme induite par l'HMBA dans les cellules musculaires lisses vasculaires (pour revue, Dey

et al., 2007). Le groupe de L. Lania a également montré que le traitement des cellules MEL par l'HMBA ou le DMSO induit l'expression d'HEXIM-1 (Turano et al., 2006). Cette protéine agit en complexe avec le snARN 7SK pour réprimer les fonctions du facteur pTEF β (positive transcription elongation factor β) (Contreras et al., 2007 ; Yik et al., 2003). Ce facteur est un complexe composé de la cycline T1 et de la kinase CDK9 qui contribue à la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II favorisant l'élongation de la transcription (Wada et al., 1998 ; Yamaguchi et al., 1999). Le traitement des cellules MEL par l'HMBA induit l'interaction entre la protéine HEXIM-1 et la protéine CDK9 du complexe pTEF β corrélée avec l'arrêt de la prolifération et la reprise de la différenciation (He et al., 2006). De manière intéressante, le traitement des cellules MEL par le DRB (5,6-dichlorobenzimidazole), un inhibiteur de l'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II et de pTEF β , induit leur différenciation (Hensold et al., 1996). L'ensemble de ces études est compatible avec la possibilité que la protéine RPL11 libre pourrait contribuer au moins en partie à la différenciation des cellules 745A induite par la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 en activant la protéine HEXIM-1 par son action répressive sur la protéine MDM-2.

Comme j'ai déjà pu le mentionner, l'actinomycine D induit également la différenciation des cellules 745A et NN10 de manière indépendante de p53. Il serait donc important de réprimer Rpl11 en présence d'actinomycine D afin de tester la dépendance du phénotype induit par cette drogue vis à vis de RPL11. De plus, afin d'établir un lien entre stress ribosomique et HEXIM-1, il serait intéressant de comparer le niveau de phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II en présence d'actinomycine D avec ou sans RPL11.

C) Les effets induits par la déplétion de SPI-1 et de FLI-1 sont-ils relayés par une modification de la traduction ?

A ce stade de l'analyse, nous ne pouvons pas exclure une contribution autre de la réduction de la biogenèse des ribosomes à la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend. Des travaux du groupe de M. Von Lindern présentés lors du 17^{ème} congrès de l'Hemoglobin Switching (du 3 au 6 septembre 2010) montrent que la répression de la protéine RPL11 dans des érythroblastes $p53^{-/-}$ réduit leur différenciation induite par l'Epo. Cette répression est associée à la réduction de l'expression de deux gènes dont la traduction est dépendante d'IRES et dont ils ont montré la contribution à la différenciation par répression (Horos et al., Poster n°32 de la première session). Ces données laissent penser que les facteurs FLI-1 et SPI-1 pourraient favoriser une traduction coiffe-dépendante au détriment de la traduction IRES-dépendante. Des défauts de traduction dépendante de la présence d'IRES ont déjà été observés dans les cellules de lymphomes B dérivées des souris $E\mu$ -Myc surexprimant *c-Myc* (Barna et al., 2008) ou dans un modèle de progression tumorale étudié par le groupe de J.J. Diaz (Belin et al., 2009). Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant dans un premier temps de tester la qualité de la traduction après déplétion de SPI-1 et de FLI-1 induite par l'HMBA et par la doxycycline. La stratégie consisterait à mesurer l'activité d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'une IRES à partir de cellules 745A traitées ou non par la doxycycline et/ou par l'HMBA.

D) Sensibilité exacerbée de la lignée érythrocytaire au dérèglement de la biogenèse des ribosomes

De façon assez frappante, un nombre important de pathologies associées à une altération de la biogenèse des ribosomes affecte le lignage érythropoïétique. Ainsi, les patients atteints d'anémie de Diamond-Blackfan ou du syndrome MDS-5q- associés à une haploinsuffisance

en protéines ribosomiques sont anémiques. A l'inverse, nos travaux présentés dans cette thèse montrent que l'activation de gènes de biogenèse des ribosomes par les facteurs FLI-1 et SPI-1 est corrélée au développement d'érythroleucémies de Friend. La convergence de ces observations met en évidence une sensibilité particulière de la lignée érythrocytaire à des perturbations de la biogenèse des ribosomes.

Comme j'ai déjà pu le mentionner dans mon introduction bibliographique, l'érythropoïèse s'accompagne d'une réduction de la biogenèse des ribosomes (Smetana et al., 1975). A l'heure actuelle, la contribution de cette diminution à la différenciation terminale n'a pas été testée. Les modèles animaux de l'anémie de Diamond-Blackfan ou du syndrome MDS-5q- suggèrent la contribution de p53 probablement activée par une voie de stress ribosomique (Danilova et al., 2008 ; Mc Gowan et al., 2008 ; Barlow et al., 2010) mais qui n'a en tout état de cause jamais été documentée chez les patients. En revanche, des mécanismes indépendants de cette voie ont également été documentés notamment au cours du 51ème congrès de l'ASH.

Ces observations nous laissent penser que la réduction de la biogenèse des ribosomes observée au cours de l'érythropoïèse pourrait conduire à une voie de stress ribosomique dont les effets pourraient être relayés par p53 mais également par d'autres protéines jusqu'ici non décrites, telle que HEXIM1. Une des contributions de p53 est d'activer la voie mitochondriale de l'apoptose conduisant notamment à l'activation de la caspase 3. Comme je l'ai mentionné dans mon introduction bibliographique, l'activation de la caspase 3 est nécessaire à l'érythropoïèse (Zermati et al., 2009). Néanmoins, le mécanisme d'activation par la voie mitochondriale de cette caspase n'est pas connu. Cette voie de stress ribosomique relayée par p53 pourrait contribuer à l'activation de cette caspase au cours de l'érythropoïèse. L'empêchement ou l'exacerbation de cette voie de stress conduirait ainsi au développement de pathologies telles que l'érythroleucémie de Friend ou l'anémie de Diamond Blackfan

respectivement. Afin de tester cette hypothèse, il serait nécessaire dans un premier temps de déterminer à partir de quel stade de l'érythropoïèse *p53* est exprimé par des analyses par cytométrie de flux. D'autre part, afin d'établir une contribution de FLI-1 dans l'expression de *p53*, la comparaison de l'expression de ce gène entre les érythroblastes *fli-1* *+/+* et *fli-1* *-/-* dérivés des souris transgéniques développés par J. Starck pourrait également être envisagée. De plus, il serait pertinent de vérifier l'érythropoïèse des souris exprimant la protéine MDM-2 mutante qui atténue le stress ribosomique décrites par le groupe de Y. Zhang (Macias et al., 2010).

IV- Gènes cibles communs à FLI-1 et à SPI-1

Nous avons identifié des gènes cibles communs à FLI-1 et à SPI-1 impliqués dans différentes étapes de la biogenèse des ribosomes. Cette identification a soulevé différentes questions, notamment de savoir s'il existe d'autres gènes cibles directs communs à FLI-1 et à SPI-1 et quelle est leur particularité de recrutement sur des séquences spécifiques et communes.

Nous avons appréhendé ces différentes questions par une approche globale de ChIP-Seq FLI-1 et SPI-1 dans trois lignées érythroleucémiques indépendantes surexprimant *Spi-1* et/ou *Fli-1* en collaboration avec C. Guillouf (Equipe de F. Moreau-Gachelin, Institut Curie, Paris) et le CNS. L'une des originalités de ce projet réside dans la possibilité d'obtenir des données de transcriptome dans ces lignées avant et après extinction du facteur afin de pouvoir identifier des gènes pertinents dans le maintien du phénotype érythroleucémique.

Nous avons donc analysé les séquences obtenues à l'aide du logiciel MACS (Zhang et al., 2008). Ce logiciel détecte les pics en comparant le fichier d'intérêt à un fichier contrôle qui peut être soit la chromatine obtenue à partir des cellules sans le facteur et

immunoprécipitée avec l'anticorps anti-FLI-1 ou anti-SPI-1 soit la chromatine non immunoprécipitée. Le programme calcule ensuite un sommet de pic correspondant au site de recrutement du facteur. Une analyse comparative de 12 programmes de détection de pics à partir de séquences issues de CHIP-Seq pour trois facteurs de transcription (GABP α , NRSF et FoxA1) a montré que le programme MACS permet la détection d'un nombre de pics importants avec une probabilité de faux positifs faible (Wilbanks et al., 2010). L'utilisation de ce programme nous a permis de détecter un nombre de pics conséquents dont une partie correspond à des pics très étroits qui ne correspondent pas à la taille des fragments de sonication de la chromatine séquencée. Ces pics correspondent à des empilements de séquences sur une même position dans le génome. De plus, ils sont composés de séquences répétées autonomes (répétition GAGAGAGA ; données non montrées) contenant un nombre de mésappariements important par rapport au génome de référence. Ces pics sont interprétés comme le résultat de polymorphisme de séquences répétées entre le génome des cellules érythroleucémiques et le génome de référence utilisé qui se retrouve cartographiés par erreur sur les séquences répétées correspondantes du génome de référence. Nous avons donc décidé d'éliminer les séquences comprenant au moins un mésappariement et de faire nos analyses à partir des pics de plus de 250 pb qui correspondent à la taille minimale de chromatine séquencée. Nous avons donc obtenu 1200 pics FLI-1 et près de 25000 pics SPI-1 à partir de la chromatine des cellules 745A. Ce nombre important de pics SPI-1 a également été observé par le groupe de M.A. Lazar qui a réalisé des analyses de CHIP-Seq à partir de macrophages qui expriment aussi *Spi-1* (Lefterova et al., 2010).

Une des questions soulevées par le recrutement de SPI-1 et de FLI-1 sur des séquences communes est de savoir si ce recrutement commun est la conséquence de la reconnaissance d'un même motif consensus ou de la reconnaissance de consensus spécifiques proches l'un de l'autre. Afin de répondre à cette question, nous avons croisé les listes de pics SPI-1 et FLI-1

en imposant une courte distance de 200 pb entre les deux pics pour les considérer comme communs. A cette distance, la moitié des pics FLI-1 sont communs aux pics SPI-1. La recherche de motifs consensus surreprésentés dans les séquences contenues sous les pics SPI-1 et FLI-1 spécifiques par les programmes CisFinder et MEME nous a permis d'identifier des consensus spécifiques clairement distincts pour FLI-1 et pour SPI-1 et très similaires à ceux obtenus *in vitro* par les groupes de F. Moreau-Gachelin, J. Taipale et de C.B. Thompson (Ray-Galler et al., 1995, Wei et al., 2010, Mao et al., 1994). Toutefois, nous pouvons observer une différence notable entre les consensus obtenus *in vitro* et *in vivo* pour FLI-1. En effet, le consensus FLI-1 obtenu *in vitro* est très majoritairement composé d'un C en position -1 par rapport au premier G du cœur GGAA. En revanche, le consensus FLI-1 que nous avons identifié montre une déplétion en C à cette position. Cette déplétion pourrait être la conséquence de la déplétion en doublets CG du génome. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que le recrutement de FLI-1 sur son consensus soit sensible à la méthylation de celui-ci. La sensibilité à la méthylation du recrutement de facteurs de transcription sur leur motif consensus a également été observé par le groupe de R.S.Y. Foo pour 17 facteurs de transcription (Choy et al., 2010). Des données non montrées du groupe de C. Bonifer suggèrent que FLI-1 est incapable d'être recrutée sur l'enhancer -3,9 kb du lysozyme quand celui-ci est méthylé ce qui est en faveur d'une sensibilité de FLI-1 à la méthylation de son consensus (Lefevre et al., 2003). Il faudrait dans un premier temps déterminer si la déplétion en séquences contenant un consensus FLI-1 avec un C est proportionnelle à la déplétion des doublets CG dans le génome. Si ce n'est pas le cas, cela supposerait une sensibilité à la méthylation du recrutement de FLI-1. Pour tester cette hypothèse, des expériences de retard de migration sur gel d'électrophorèse pourraient être entreprises en utilisant des oligonucléotides contenant un motif méthylé ou non.

Le motif consensus identifié à partir des pics communs correspond à un motif hybride ressemblant à un mélange des consensus FLI-1 et SPI-1. Cette observation peut suggérer le recrutement de SPI-1 et de FLI-1 sur un même motif hybride ou alors sur leur consensus spécifique. L'analyse de la composition des séquences présentes sous les pics spécifiques de FLI-1, de SPI-1 ou communs aux deux facteurs nous a permis de montrer que ces deux facteurs étaient recrutés sur leur consensus respectif pour les pics spécifiques mais également pour les pics communs. D'autre part, nos données indiquent une pression de sélection pour les séquences composées de consensus FLI-1 et SPI-1 se trouvant à proximité l'un de l'autre. Ces résultats indiquent donc que l'existence de gènes cibles communs à FLI-1 et à SPI-1 semble être plutôt la conséquence de la proximité de deux consensus suggérant que les facteurs FLI-1 et SPI-1 sont recrutés de manière indépendante sur la chromatine. La formation d'hétérodimères entre des facteurs de la famille ETS a déjà été observée *in vitro* entre les facteurs ERG et FLI-1 ainsi qu'entre ERG et SPI-1 (Carrere et al., 1998). Il est envisageable que FLI-1 et SPI-1 puissent agir en hétérodimères pour réguler leurs gènes cibles communs. Dans un premier temps, il serait intéressant de tester l'interaction protéique entre ces deux facteurs par des expériences de co-immunoprécipitation.

Nous avons ensuite focalisé notre étude sur les gènes de biogenèse des ribosomes décrits par le groupe de J.J. Diaz (Couté et al., 2006). De façon surprenante, nous n'avons observé qu'une faible proportion de pics communs associés à la biogenèse des ribosomes alors que le nombre de pics spécifiques à SPI-1 associés à ces gènes est beaucoup plus important, ce qui pourrait suggérer que les gènes de biogenèse des ribosomes recrutent préférentiellement SPI-1. Néanmoins, l'analyse des séquences sous ces pics SPI-1 par CisFinder nous a permis d'identifier le même motif hybride que le motif surreprésenté dans les séquences sous les pics communs. D'autre part, nous avons pu montrer que la majorité de ces séquences sont composées de deux consensus FLI-1 et SPI-1, soit comme les séquences

présentes sous l'intégralité des pics communs. Une des possibilités pouvant expliquer que ces séquences ne sont pas détectées sous les pics communs pourrait être qu'un autre facteur de la famille ETS pourrait reconnaître le motif consensus FLI-1. En effet, le groupe de J. Taipale a montré que d'autres facteurs reconnaissent le même motif consensus *in vitro* que FLI-1. Une autre raison pourrait être liée à la faible efficacité d'immunoprécipitation de l'anticorps anti-FLI-1 qui aurait pour conséquence l'absence de détection de pics FLI-1 par MACS. Cette explication est renforcée par le fait que le recrutement de FLI-1 et de SPI-1 sur certaines séquences promotrices de gènes de biogenèse des ribosomes que nous avons identifiées par ChIP suivie d'une qPCR n'a pas été identifié dans nos analyses (*Rpl18*, *Rpo1-3*). Cette observation suggère que nous sous-estimons très certainement le nombre de pics FLI-1 dans nos analyses. Ces résultats favorisent plutôt l'interprétation que ces pics associés à la biogenèse des ribosomes sont des pics communs et donc que les gènes de biogenèse des ribosomes recrutent FLI-1 et SPI-1. Le groupe d'E. Barillot a développé un nouvel algorithme appelé MICSA (Motif Identification for ChIP-Seq Analyses). Ce programme permet d'intégrer la présence de consensus pour restaurer la détection de pics de faible enrichissement. Il permet la détection des pics du facteur de transcription d'intérêt sur la base de la présence de son motif consensus de recrutement. La comparaison de ce programme avec une dizaine d'autres programmes de détection de pics ChIP-Seq a permis aux auteurs de montrer que MICSA détecte entre 15 et 20 % de pics supplémentaires par rapport à ces autres programmes (Boeva et al., 2010). Basé sur cet article, afin d'optimiser la détection de pics FLI-1, nous pourrions procéder de la même manière à partir de nos données. D'autre part, certaines des régions sous les pics SPI-1 associés à la biogenèse des ribosomes pourraient être validées par de nouvelles expériences de ChIP à partir des cellules 745A #44 avec les anticorps anti-FLI-1 et anti-SPI-1. Si cette hypothèse est confirmée par nos analyses, ce manque de sensibilité dans la détection des pics FLI-1 pourrait expliquer le faible

enrichissement en consensus FLI-1 et la localisation de ces consensus à proximité des pics SPI-1.

De façon intéressante, des expériences de ChIP-Seq menées par le groupe de B. Göttgens à partir de la lignée de cellules souches hématopoïétiques HPC-7 ont également montré qu'une grande proportion de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes que nous avons identifié recrute également les facteurs SPI-1, FLI-1 et ERG, un autre membre de la famille ETS (Watson et al., 2010). D'autre part, le groupe de B.J. Graves a également montré dans les cellules Jurkat le recrutement des facteurs de la famille ETS ETS-1, GABP α et ELK-1 sur le promoteur de gènes de biogenèse des ribosomes (Hollenhorst et al., 2007). Ces données suggèrent que la régulation de la biogenèse des ribosomes par des membres de la famille ETS est une fonction générique de cette famille. Les membres de cette famille sont issus d'un ancêtre commun. La régulation de la biogenèse des ribosomes par plusieurs facteurs ETS pourrait résulter des fonctions de cet ancêtre commun qui contenait le domaine de liaison à l'ADN commun aux membres des facteurs ETS. La proximité des consensus FLI-1 et SPI-1 que nous avons mis en évidence et qui est conservée au cours de l'évolution pourrait être la conséquence de la nécessité de cet ancêtre à agir en homodimères ou en hétérodimères pour réguler ses gènes cibles comme le fait par exemple le facteur TEL, un membre de la famille ETS (Green et al., 2010).

De façon intéressante, les pics SPI-1 sont retrouvés préférentiellement proches du +1 de transcription. D'autre part, même si une majorité de pics se trouve dans le corps du gène, cette majorité n'est pas aussi franche que pour des gènes pris au hasard et retrouvés à proximité de pics SPI-1. Ces résultats suggèrent que SPI-1 et FLI-1 pourraient être recrutées sur le promoteur proximal de ces gènes de biogenèse des ribosomes de façon plus fréquente que pour d'autres gènes. Cette suggestion est renforcée par les résultats du groupe de J. Taipale

qui a montré que les pics communs aux facteurs de la famille ETS sont retrouvés préférentiellement dans les promoteurs (Wei et al., 2010).

Enfin, nous avons testé l'effet de l'HMBA sur l'expression des gènes de biogenèse de ribosomes se trouvant à proximité des pics SPI-1 d'après nos analyses de transcriptome des cellules 745A #44 déjà disponibles dans l'équipe. Nous avons filtré nos données sur la base d'une p-value inférieure à 5 %. Seuls 12 gènes de biogenèse des ribosomes régulés de manière significative par l'HMBA sont retrouvés à proximité de pics SPI-1. De manière frappante, plus de 90 % de ces gènes sont réprimés par l'HMBA ce qui est cohérent avec les résultats déjà obtenus dans le papier MCB (Annexe 1). Contrairement aux 11 autres gènes, le gène *Rps6ka5* est surexprimé en présence d'HMBA. D'autres gènes non associés à un pic SPI-1 à proximité sont également activés par l'HMBA comme par exemple MPP6 (données non montrées). La régulation de ces gènes soulève la question de déterminer si la régulation de ce type de gène implique des particularités par rapport à ceux réprimés par les facteurs ETS. Des particularités de séquences ont été mises en évidence pour les promoteurs de gènes codant les protéines ribosomiques pour lesquels la surreprésentation en consensus pour le facteur ETS GABP α peut être associée ou non à la présence d'une boîte TATA (Perry, 2005) ou encore pour les promoteurs de gènes de snoARN (Preti et al., 2010). L'analyse des régions régulatrices de ces gènes se révèle être intéressante pour répondre à cette question.

Ces résultats soulignent également qu'une grande proportion de gènes de biogenèse des ribosomes associés à un pic SPI-1 ne présentent pas une régulation par l'HMBA statistiquement significative. Cette absence de significativité pourrait être la conséquence de l'absence de régulation ou alors d'un manque de fiabilité des données de transcriptome dont nous disposons. Des analyses de RNA-Seq pourraient être envisagées à partir d'ADNc des cellules érythroleucémiques en absence ou en présence des facteurs SPI-1 et FLI-1. Ces analyses consistent à séquencer massivement les ADNc des cellules dans chaque condition.

Ces analyses présentent le double avantage d'être pan-génomique contrairement à nos données de transcriptome qui ne couvrent que 2/3 du génome.

CONCLUSIONS

En conclusion, par rapport aux questions que je m'étais posées au départ, j'ai pu montrer (1) que la protéine FLI-1 endogène contribue à la fois au maintien de la prolifération, de la survie et du blocage de la différenciation des cellules érythroleucémiques NN10 surexprimant *Fli-1*, (2) que les facteurs SPI-1 et FLI-1 contribuent de manière additive au phénotype des cellules érythroleucémiques 745A surexprimant *Fli-1* et *Spi-1*, (3) que ces contributions additives sont associées à la dérégulation de gènes cibles directs communs à ces deux facteurs dont une grande proportion est impliquée dans différentes étapes de la biogenèse des ribosomes, (4) que le recrutement de SPI-1 et de FLI-1 sur des séquences communes y compris celles à proximité des gènes de biogenèse de ribosomes est la conséquence de la proximité conservée au cours de l'évolution des consensus FLI-1 et SPI-1 spécifiques, (5) que la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 conduit à une réduction de la biogenèse des ribosomes et (6) que la déplétion de FLI-1 et de SPI-1 n'induit pas une voie de stress ribosomique classique conduisant à la stabilisation consécutive de p53.

En revanche, j'ai pu mettre en évidence la contribution de la protéine ribosomique RPL11, médiateur d'un stress ribosomique, dans la différenciation des cellules 745A. Ce dernier résultat ouvre de nouvelles perspectives quant à la possibilité d'une voie de stress ribosomique alternative à p53 qui pourrait contribuer aux effets de l'absence de FLI-1 et de SPI-1 dans la transformation du lignage érythrocytaire.

Enfin, les données dont nous disposons nous permettront d'identifier d'autres gènes cibles directs communs à FLI-1 et à SPI-1.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I- Vecteur d'expression de shARN de séquence aléatoire

Le vecteur pGJ10 permettant l'expression inductible par la doxycycline des shARN possède 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 décrit sur la figure 16. Ce vecteur a été amplifié à partir du vecteur pTER (Van de Wetering et al., 2003). Il contient deux sites uniques de coupure d'endonucléases de restriction BglII et NotI permettant l'introduction d'oligonucléotides codant des shARN ainsi qu'un gène de résistance au G418.

Pour construire le vecteur pGJ10/shSCR, 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 pGJ10 préalablement digéré par les endonucléases BglII et NotI. Les séquences des oligonucléotides utilisées sont les suivantes : 5'-GATCCCACAAGATGAAGAGCACCAATTCAAGAGATTGGTGCTCTTCATCTTGTTT TTTGGAAA -3' et 5'-GGCCTTTCCAAAAACAAGATGAAGAGC ACCAATCTCTTGAATTGGTGCTCTTCATCTTGTTG-3'.

II- Culture cellulaire

A) Les clones dérivés de la lignée érythroleucémique NN10

1- Description des clones et de leur condition de culture

La lignée érythroleucémique NN10 est une lignée obtenue à partir de souris infectées par le virus F-MuLV du complexe de Friend (Choppin et al., 1985 ; Starck et al., 1999). Elle a été cultivée dans du milieu IMDM (PAA) contenant 10 % de SVF (PAA) et 10000 IU / L de pénicilline-streptomycine (PAA).

La lignée NN10/TR est une lignée NN10 produisant de manière stable la protéine bactérienne TETR. Elle a été obtenue par Gaëtan Juban après transfection de la lignée NN10 par le vecteur pcDNA6/TR-EF1 α qui apporte le gène de résistance à la blasticidine.

Les lignées NN10 #5, shfli-2 #10 et shfli-2 #23 sont trois lignées NN10 présentant une expression inductible par la doxycycline de 2 shARN différents dirigés contre l'ARNm du gène *fli-1*. Elles ont été obtenues par Gaëtan Juban après transfection de la lignée NN10/TR par les vecteurs pGJ10/shfli-1 (NN10 #5) et pGJ10/shfli-2 (shfli-2 #10 et #23) qui apportent le gène de résistance au G418 (Juban et al., 2009).

Les lignées NN10 #3B10, NN10 #3E9 et NN10 #1C6 sont trois lignées NN10 présentant une expression inductible par la doxycycline d'un shARN de séquence aléatoire. Elles ont été obtenues après transfection de la lignée NN10/TR par le vecteur pGJ10/shSCR.

La lignée bcl-2 #22 est une lignée NN10 présentant une expression inductible par la doxycycline de shARN dirigés contre l'ARNm du gène *fli-1* et une expression constitutive du gène codant la protéine anti-apoptotique BCL-2. Elle a été obtenue après transfection de la lignée NN10 #5 par le vecteur d'expression du gène *bcl-2* humain placé sous le contrôle du

promoteur du cytomégalo virus (donné par M. Moulin de l'équipe d'A.P. Arrigo au CGMC, Villeurbanne) et le plasmide pcDNA4/TO (Invitrogen) portant le gène de résistance à la zéocine dans un rapport 3/1 en faveur du vecteur d'expression de *bcl-2*.

Toutes les lignées transgéniques dérivées à partir de la lignée NN10 ont été 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 (PAA) et/ou 400 µg/mL zéocine (Cayla). L'expression des shARN a été induite grâce à un traitement de 2 jours par 100 ng/mL de doxycycline.

2- Mesure de la mortalité cellulaire

Le taux de cellules mortes a été déterminé par comptage après dilution au demi de la suspension cellulaire dans une solution de bleu trypan (Sigma Aldrich).

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 selon les recommandations du fournisseur (AbCys).

3- Mesure de la différenciation érythroïde

Le taux de cellules produisant de l'hémoglobine a été déterminé après coloration en présence de benzidine acide (1 volume de culture cellulaire mélangé à 1/10 de volume de Benzidine 1 % / Acide Acétique 0,5 M / 5 % H₂O₂).

4- Transfection des cellules NN10

La transfection des cellules NN10 avec les différents plasmides s'est faite soit avec du Fugene 6 (Roche, 3 μ L de FuGENE 6 pour 1 μ g ADN) soit par nucleofection en utilisant le kit Nucleofection kit solution V (Lonza) et le programme G16 du nucleofector AMAXA selon les recommandations du fournisseur ($5 \cdot 10^6$ cellules transfectées avec 5 μ g ADN).

La transfection des cellules NN10 #5 avec les siARN a été réalisée par nucleofection en utilisant le kit Nucleofection kit Solution V (Lonza) et le programme G16 du nucleofector AMAXA selon les recommandations du fournisseur. $2 \cdot 10^5$ cellules sont transfectées avec 120 pmoles de siARN et ensemencées dans 1 mL d'IMDM contenant 10 % de SVF sans pénicilline-streptomycine.

B) Les clones dérivés de la lignée 745A

1- Description des clones et des conditions de culture

La lignée érythroleucémique 745A, communément appelée MEL, est une lignée obtenue à partir de souris infectées par le virus SFFV du complexe de Friend (Starck et al., 1999). Elle a été cultivée dans du milieu IMDM (PAA) contenant 10 % SVF (PAA) et 10000 IU / L de pénicilline-streptomycine (PAA).

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

Les lignées 745A #44, shfli-2 #1 sont deux lignées 745A présentant une expression inductible par la doxycycline de 2 shARN différents dirigés contre l'ARNm du gène *fli-1*.

Elles ont été obtenues par Gaëtan Juban après transfection de la lignée 745A/TR par les vecteurs pGJ10/shfli-1 (745A #44) et pGJ10/shfli-2 (shfli-2 #1) (Juban et al., 2009).

Les lignées 745A #1A1, 745A #1D10 et 745A #1F8 sont trois lignées 745A présentant une expression inductible par la doxycycline d'un shARN de séquence aléatoire. Elles ont été obtenues après transfection de la lignée 745A/TR par le vecteur pGJ10/shSCR.

La description du clone znfli-1 #11 ainsi que ses conditions de culture ont été décrites par notre équipe (Starck et al., 1999).

Toutes les lignées transgéniques dérivées à partir de la lignée 745A ont été 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 (PAA). L'expression des shARN a été induite grâce à un traitement de 2 jours par 100 ng/mL de doxycycline.

2- Induction de la différenciation érythroïde

La différenciation érythroïde des lignées transgéniques issues de la lignée 745A a été induite grâce à un traitement des cellules par 5 mM d'HMBA. Lors de toutes les expériences, les cellules ont été cultivées pendant deux jours en présence ou en absence de 100 ng/mL de doxycycline avant le traitement par l'HMBA et la doxycycline a été maintenue pendant toute la durée du traitement.

3- Mesure de la clonogénicité

Les cellules ont été cultivées pendant deux 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. Les colonies ont été comptées après cinq jours de culture.

4- Analyse du cycle cellulaire

1.10^6 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 étapes du cycle cellulaire a ensuite été déterminée par cytométrie de flux (FACSCalibur, Becton Dickinson).

5- Transfection des cellules 745A

La lignée 745A a été transfectée soit à l'aide du DAC30 (Eurogentec, 5 μg de DAC30 pour 1 μg d'ADN) soit à l'aide du nucleofector AMAXA avec le Nucleofection kit Solution V et le programme G16 selon les recommandations du fournisseur (Lonza, 5.10^6 cellules transfectées avec 5 μg d'ADN).

La transfection des cellules 745A #44 avec des siARN s'est faite à l'aide de l'oligofectamine (Invitrogen). 2.10^5 cellules sontensemencées dans une plaque 24 puits dans 800 μL d'IMDM contenant 10 % de SVF sans antibiotique et incubées à 37 °C. 80 pmoles de siARN sont mis en présence de 185 μL d'IMDM sans SVF et sans antibiotique pendant 5 minutes à température ambiante. 4 μL oligofectamine sont ensuite ajoutés. Le mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante puis ajouté aux cellules. Les séquences sens des siARN utilisés sont les suivantes : siARN p53 (Dharmacon) ;
GAAAGGGCAGUCGGAAGAAUTT (siARN Rpl24) ;

CGUACGCGGAAUACUUCGATT (siARN Luc) ; CGUCCAAUGCAUGACUAUUU
(siARN Spi-1) ; AAGGUGCGGGAGUAUGAGUUGTT (siARN Rpl11).

III- 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 -mercaptoethanol (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 (Perkin Elmer) qui a ensuite été bloquée 20 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 deux heures en présence d'un anticorps primaire puis elle a subi 3 lavages de 10 minutes dans une solution de rinçage (0,01 M Tris-HCl pH 7,6 ; 0,3M NaCl ; 0,1 % Tween 20). Après une incubation de 1 h en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et 3 nouveaux lavages, la membrane a été révélée par chemiluminescence grâce au Kit Western LightningTM Plus ECL (Perkin Elmer).

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : polyclonal de lapin anti-FLI-1 (dilution 1/200^{ème}, sc-356, Santa Cruz, Figures 17, 21 et 24) ; polyclonal de lapin anti-FLI-1 (dilution 1/500^{ème}, ab-15289-500, AbCAM, Figure 20) ; polyclonal de mouton anti-FLI-1 (dilution 1/500^{ème}, F0176, Sigma, Figure 35) ; monoclonal de souris anti-p53 (dilution 1/100^{ème} (745A #44), dilution 1/500^{ème} (NN10 #5), sc-99, Santa Cruz) ; monoclonal de souris anti-actine β (dilution 1/20000^{ème}, MAB1501R, Millipore) ; polyclonal de lapin anti-RPL24 (dilution 1/1000^{ème}, SAB1100502, Sigma) ; polyclonal de lapin anti-RPL11 (dilution 1/1000^{ème}, ab-79352, AbCAM) ; monoclonal de souris anti-GRB2 (dilution 1 / 200^{ème}, sc-

17813, Santa Cruz) ; polyclonal de lapin anti-SPI-1 (dilution 1/200^{ème}, sc-352, Santa Cruz) ; polyclonal de lapin anti-ERK (dilution 1/1000^{ème}, sc-93, Santa Cruz) ; monoclonal de souris anti-BCL-2 (dilution 1/200^{ème}, sc-7382).

Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants : polyclonal de chèvre anti-IgG de souris ou de lapin (dilution 1/5000^{ème}, Biorad) ; polyclonal de singe anti-IgG de mouton (dilution 1/5000^{ème}, A3515, Sigma).

IV- RT-PCR quantitative

L'ARN total de cellules a été extrait grâce au kit RNeasy Plus Mini ou Micro (QIAGEN). L'ARN total a ensuite été rétro-transcrit pendant une heure à 37 °C grâce à des hexamères de séquence aléatoire dans un volume final de 20 µL contenant 200 unités de Reverse-Transcriptase du virus M-MLV (Invitrogen). Les ADNc ont été quantifiés par PCR quantitative grâce au kit Light Cycler 480 SyBR Green I Master (Roche) sur un thermocycleur Mx3000p (Stratagene) en utilisant les couples d'oligonucléotides présentés dans le tableau ci-dessous :

ARNm	Oligonucléotide sens	Oligonucléotide antisens
Rpl24	GTGAGTCAGCATTCTTTCC	CCAGTGATGGCTCGTTGGAA
Rpl11	TCCTTTGGCATCCGGAGAAA	CCCAGGTCAATGTGTTCTTG
P53	TCCCGAGTATCTGGAAGACAGG	CACAAACACGAACCTCAAAGC
Ddx21	GAAAAGGAAATACCTGTGGAGCAG	CCGCATTTCGTTCAATCTGACC
Imp4	TTCAGGAGAAGAAGGAGCGAGTC	GCAAACATTTTCAGGCGAGAAC
Nhp2L1	GCGTTTCAGTCCCTCTTGAGTTG	TGATGGTAACAGAACAGGCGATG
Nip7	TTACCAAGACCCACAAGTTCCG	CATACAAGAAGGACTGCTCTGCTCC
Nol6	TTCCACTCCACCTTGCTTCG	CAGCCCGTCTTTGTCCTGTAAG
Nolc1	TTCCAGCGACCTTTATCCCCTTG	TTGGTGGACCTGTTGAGCCAGAAG
Npm1	CCTGTGGTCTTACGGTTGAAGTG	GCATTTTTGGCTGGGGTATCTC
RpL18	GATGTGCGGATTCTGGAAGTTC	GGGTTAGTTTTTGTAGCCTCTGCTG
Rpo1-3	TCGGTGGTTTTCTTCCTTCCTGC	TTCCTCTCGCCTTCAGCCATTG
Globine alpha	CTGGGGAAGACAAAAGCAAC	GCCGTGGCTTACATCAAAGT
b-actin	TGGGAATGGGTCAGAAGGACTC	CTGGGTCATCTTTTCACGGTTG
ARNr 18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT
Snhg1	CTGGTGACAAATCTCAGGCATTC	CAAGTATGGCACTGCTAACAGAACC
Snrpb	TGGGCAAGAGCAGCAAGATG	AAGCAACACCAGACCAAGGACTC
Eif4g1	TGTGTCGTGAGTTCTTCTGGG	CATCAAAGGTGGTCTTCCATTGC
Gnb2L1	CTGAGTGGCTTTGCTGAAATCC	CGAACCAACTTACACAGAAACGG
Tcp1	GACATTGTTCTGGTGCCTTATG	CATGCCTTTAATCCCAGCACTC
Hspa8	CTGTAAGATTCGCTGTGATGATGG	TCAATACCAAGGGAAAGAGGAGTG
ARNr 45S	CTCTTGTTCTGTGTCTGCC	CCCGCTGGCAGAACGAGAAG
Globine beta majeur	GCACCTGACTGATGCTGAGA	CTGGGTCCAAGGGTAGACAA
Fli-1 total	CAACCAGCCAGTGAGAGTCA	GTTTCGTTGGTGGTCATGTTG

Les signaux spécifiques pour chaque ARNm sont normalisés sur les signaux pour l'ARNr 18S (Tableau 5 et 6) ou l'actine β (autres figures).

V- Immunoprécipitation de la chromatine

4.10^7 cellules sont fixées pendant 15 minutes à température ambiante en ajoutant 1 % de formaldéhyde directement dans le milieu de culture. La fixation est stoppée par l'addition de 0,125 M de glycine suivie de deux lavages dans du PBS 1X froid. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du tampon de lyse (50 mM Tris-HCl [pH 8,1] ; 10 mM EDTA ; 1 % SDS contenant 1/20 d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Roche)) puis la chromatine est fragmentée dans la glace 3 fois 2 minutes par sonication (Vibra Cell 72405

sonicator ; Bioblock). La taille des fragments d'ADN fragmentés est mesurée à cette étape en déposant l'ADN sur un gel d'agarose 1 % (environ 500 pb). Les préparations de chromatine fragmentée (correspondant à $8 \cdot 10^6$ cellules) ont d'abord été diluées dans 10 volumes de tampon de dilution (16,7 mM Tris [pH 8] ; 1,2 mM EDTA ; 167 mM NaCl ; 1,1 % Triton X-100, 0,01 % SDS contenant 1/20 d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA [Roche]) puis clarifiées par l'addition de 60 μ L de billes d'agarose couplées à la protéine A et bloquées par de l'ADN de sperme de saumon et de la BSA (Upstate) pendant 1 h à 4 °C sur roue tournante. 120 μ L de chromatine est alors prélevée afin de constituer la fraction non immunoprécipitée (ADN « Input »). Les immunoprécipitations ont été réalisées par l'ajout de 3 μ g d'anticorps pendant la nuit à 4 °C sur roue tournante (les anticorps utilisés sont les suivants : polyclonal de lapin anti-FLI-1 (sc-356, Santa Cruz ou ab-15-289-500, AbCAM) ; polyclonal de lapin anti-SPI-1 (sc-352, Santa Cruz) ; polyclonal de lapin anti-UBC9 (sc-10759, Santa Cruz) ; polyclonal de lapin anti-p27 (sc-776, Santa Cruz)). 20 μ L de billes d'agarose couplées à la protéine A sont ajoutées aux 2 mL d'immunoprécipitations et l'incubation est poursuivie 1h30 à 4 °C sur roue tournante. Les billes sont lavées six fois dans les tampons suivants (incubation de 2 minutes dans la glace entre chaque lavage) : deux fois dans 500 μ L dans du tampon faiblement concentré en sel (20 mM Tris [pH 8] ; 2 mM EDTA ; 150 mM NaCl ; 0,1 % SDS ; 1 % Triton X-100), une fois dans 1 mL de tampon fortement concentré en sel (20 mM Tris [pH 8] ; 2 mM EDTA ; 500 mM NaCl ; 0,1 % SDS ; 1 % Triton X-100), une fois dans 1 mL de tampon LiCl (10 mM Tris [pH 8] ; 1 mM EDTA ; 1 % NP-40 ; 1 % deoxycholate de sodium ; 0,25 M LiCl) et deux fois dans 1 mL de tampon TE (10 mM Tris [pH 8] ; 1 mM EDTA). Entre les deux lavages avec le tampon TE, le tube eppendorf est changé afin d'éliminer la chromatine spécifiquement adsorbée sur les parois du tube. La chromatine est ensuite éluée deux fois par l'addition de 250 μ L de tampon d'éluion (100 mM NaHCO₃ ; 1 % SDS) et une incubation pendant 15 minutes à température ambiante sur roue

tournante. La fixation est ensuite reversée par une incubation de 4 h à 65 °C. L'ADN est finalement traité par la protéinase K pendant 1 h à 45 °C puis purifié avec du phénol-chloroforme et enfin précipité par l'isopropanol. Les ADN immunoprécipités et les ADN « input » sont quantifiés par PCR en temps réel en utilisant le kit Light Cycler 480 SYBRgreen Master I (Roche) et les couples d'oligonucléotides présentés dans le tableau ci-dessous :

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
Ddx21	TGCGGAAGTGACGAATAGGC	ATTCAGCAGCAGCTTCTCAGGC
Imp4	GAATCCGATGGCTACCAAAGTC	TCACGAGTCCCAACTCTTCTGG
Nhp2	GGTGAAAATCCAAATCCCGTG	TCTTAGCAACTACAACCTCCGTCCC
Nhp2L1	AGGAAAAAGGAGCGGAAATCAC	ACATCCAAAGATGACTTCAGCACTC
Nip7	CGCAAAGATCACGGAGAATTAGG	CGGGTCTCTTCTTCAGTCAAGGG
Nol6	CACAAAACCCCATCACACCG	AAGGTCCGCCGATTTACAGC
Nolc1	CAGTAGGAAGAAGCCCATTACGC	GGGAGGAGAGACCCAGACTAAATC
Npm1	GTCCTTTCCTTGCGTGATTC	ATATCCATCGAGTCTTCCATGAGG
Rcl1	GGTGTCTAGTCGCTCTGTCTTCTG	AATCCTGCGGATCTTGACCG
RpL18	ATAGAGTGTCCCGCATTGCG	TCAGCGAGCTTACCATGATGG
Rpo1-3	TCATCCGCTTCTTCCGTCG	GCTCCTGATCGTCTTCCATCG
Snhg1	TACCCGCAGTGAGTAAGAACCG	CCCGAACAAGGAAAAATGAGG
Snrpb	AAAGTCTCCGCTGGAGTGCTTG	GCATGAGGGTGTGCATATACCTG
Hspa8	CGAGCGTTCTGGCTTTCATTAG	GACGACGAGACCACACAAATGC
Gnb2l1	AGGTTGCGTGGCAGAAGAAAC	TGGAGAAAAAGAAAGAGCGGC
Tcp1	ACTAACAAGCTCCCTGGTGCTG	ACGCTGGGTCAACTAGAGACAGTAG

Les oligonucléotides utilisés pour amplifier le promoteur de *gapdh* et les régions HS129k et HS153k (locus de *globine alpha*) ont été publiés dans l'article suivant : Anguita *et al.*, EMBO J. 2004 23 (14) 2841-52.

VI- Fractionnement des ribosomes

Les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours en présence ou en absence de doxycycline puis leur différenciation a été induite par l'ajout de 5 mM d'HMBA deux jours avant l'analyse. En parallèle, les cellules 745A #44 ont été cultivées en présence de 5 ng/mL d'ActD 36 h avant analyse. 90.10^6 de cellules ont été lavées deux fois dans du PBS 1X froid puis lysées la nuit à 4 °C sur balancelle dans 2,1 mL de tampon de lyse (2 mM Tris [pH 7,4] ; 10 mM MgCl₂ ; 25 mM KCl ; 0,5 % NP-40 ; 5 mM DTT ; 200 U / mL RNaseOUT (Invitrogen) ; 1/10^{ème} d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA [Roche]). Les cellules sont ensuite soniquées 10 fois 30 secondes en position HIGH avec un temps de repos de 30 secondes entre chaque cycle de sonication (Bioruptor™ *NextGen*, Diagenode). Les membranes cellulaires et les mitochondries sont ensuite éliminées par une centrifugation à 12000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Les lysats cellulaires sont déposés sur 1 mL de coussin de sucrose 1M (3,5 g sucrose ; 10 mM KCl ; 5 mM MgCl₂ ; 50 mM Tris [pH 7,4]) puis ultracentrifugés 2 h à 75000 rpm à 4 °C (Optima™ MAX-XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter®). Le culot correspondant aux ribosomes est repris dans du tampon lyse. Le surnageant est resoumis à une nouvelle ultracentrifugation 2 h à 75000 rpm à 4 °C. 200 µL du surnageant (équivalent à $5,8.10^6$ cellules) est précipité par l'ajout de 20 % d'acide trichloroacétique et incubé pendant 10 minutes dans la glace. Il est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 13300 rpm à 4 °C puis le culot est lavé 2 fois avec de l'acétone froide. Après une nouvelle centrifugation, le culot est séché sous hotte chimique puis repris dans 20 µL de bleu de Laemmli 4X et enfin bouilli 5 minutes. Le volume de ribosomes correspondant au même nombre de cellules que le surnageant est prélevé et complété avec du bleu de Laemmli 4X puis bouilli pendant 5 minutes. Le tout est déposé sur un gel SDS-PAGE 10 %.

VII- ChIP-Seq

1- Obtention de la chromatine FLI-1

Les cellules NN10 #5 et les cellules 745A #44 ont été cultivées pendant deux jours en absence ou en présence de doxycycline. Pour obtenir 20 ng de chromatine FLI-1, la chromatine issue de 10 ChIP réalisés à partir de 8.10^6 cellules NN10 #5 issues de trois cultures indépendantes et 8 ChIPs réalisés à partir du même nombre de cellules 745A #44 issues de deux cultures indépendantes a été cumulée selon le protocole détaillé dans la partie V en utilisant les solutions et les billes du kit Chromatin Immunoprecipitation Assay (Millipore).

2- Séquençage des chromatines

Toute la partie séquençage a été prise en charge par le CNS. Les chromatines ont été amplifiées avec le kit SOLID ChIP-Seq (Applied Biosystem) selon les recommandations du fournisseur. Une fois traitées, les chromatines ont été séquencées avec l'appareil SOLID v3 (Applied Biosystem).

3- Alignements des séquences sur le génome

L'alignement des séquences sur le génome de référence mm9 a été pris en charge par le CNS. Ils ont utilisé le programme BFAST v06.4c. développé par le groupe de S.F. Nelson (Homer et al., 2009).

4- Détection des pics pour le programme MACS

Une fois les séquences obtenues et alignées, les pics ont été détectés en utilisant la version 1.4 du logiciel MACS (Zhang et al., 2008) soit à partir des conditions par défaut de limitation de mésappariement (mm5), soit en n'autorisant qu'un seul mésappariement (mm1) soit aucun mésappariement (mm0). Le fichier contrôle utilisé dans nos analyses est le fichier correspondant aux séquences obtenues à partir de la chromatine non immunoprécipitée. Les paramètres par défaut ont été utilisés exceptés les paramètres bw (taille des fragments) qui a été fixé à 500 pb et mfold (model fold) qui a été fixé à 5,15 pour le ChIP-Seq FLI-1 dans les cellules 745A #44.

5- Croisement des listes de pics

Le croisement des listes de pics obtenues par MACS a été réalisé à l'aide deux programmes développés par C. Deschamps (PRABI, Villeurbanne). Le programme ChIPSeq_Peak permet à partir d'un fichier MACS d'extraire les coordonnées de chaque pic sous la forme « chromosome : sommet du pic ». Les deux fichiers générés par ChIPSeq_Peak sont ensuite traités par le programme ChIPSeq_Results pour lequel une contrainte de distance entre les deux pics est imposée (pour les analyses présentées dans ce manuscrit, la distance maximale autorisée est de 200 pb entre les pics SPI-1 et FLI-1). A partir des deux fichiers ChIPSeq_Peak, le programme ChIPSeq_Results génère trois fichiers correspondant aux pics communs et aux pics spécifiques.

6- Identification de motifs consensus associés aux séquences sous les pics et localisation par rapport au pic

Les séquences sous les pics ont été obtenues à l'aide du Genome Browser de UCSC sur l'adresse <http://genome.ucsc.edu/>.

L'identification des motifs consensus associés aux séquences situées sous les pics ainsi obtenues a été réalisée à l'aide de deux programmes disponibles sur internet : le programme MEME disponible sur l'adresse http://meme.sdsc.edu/meme4_4_0/intro.html et le logiciel CisFinder situé sur l'adresse <http://lgsun.grc.nia.nih.gov/CisFinder/> en utilisant les paramètres par défaut des programmes.

7- Analyse de la composition des séquences contenues sous les pics

La recherche des motifs consensus dans les séquences présentes sous les pics spécifiques à FLI-1, SPI-1 ou communs aux deux facteurs a été réalisée à l'aide du programme CisFinder et l'option « Search motif ».

8- Association des pics aux gènes se trouvant à proximité

L'association des pics aux gènes se trouvant à proximité a été réalisée à l'aide du programme GPAT (Genomic Position Annotation Tool) disponible sur l'adresse internet http://bips.u-strasbg.fr/GPAT/Gpat_home.html développé par le groupe de L. Tora (Krebs et al., 2008). Les coordonnées du pic sont fournies au programme sous le format GFF. La

recherche des gènes associés à ces pics a été faite dans une distance de 5 kb de part et d'autre du +1 de la transcription.

ANNEXE 2 : REMPLACEMENT DE LA PROTÉINE FLI-1 ENDOGENÈ DES CELLULES NN10 PAR UNE PROTÉINE FLI-1 BIOTINYLÉES

I- Obtention d'un clone NN10 produisant une protéine FLI-1 biotinylée *in vivo* en quantités équivalentes de la protéine FLI-1 endogène

A) Objectifs

Au moment de commencer ce projet, l'inventaire des sites de recrutement basé sur le séquençage nécessitait le clonage des fragments de chromatine dans des vecteurs limitant ainsi le nombre de séquences. C'est notamment le cas du CHIP-PET (Paired End Ditags). Cette technique consiste à convertir les chromatines enrichies en dimères de séquences représentant les extrémités 5' et 3' des séquences. Ces dimères sont ensuite concatémérisés et placés dans un même vecteur. Ainsi, pour le séquençage d'un même clone, cette technique permet d'avoir l'information sur plusieurs séquences (**Figure S1**). Cette technique a été utilisée pour inventorier les sites de recrutement du facteur de transcription p53 dans les cellules humaines HCT116 (Wei et al., 2006).

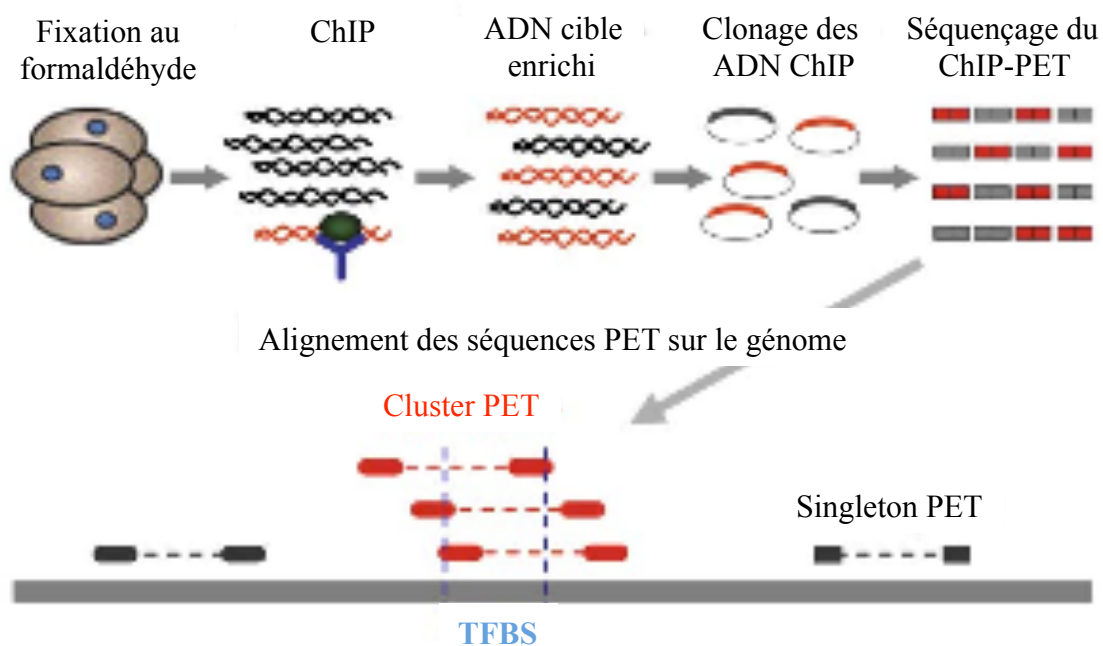


Figure S1 : Principe du ChIP-PET (d'après Wei, 2006)

Compte tenu du nombre de séquences pouvant raisonnablement être collecté pour cette technique, celle-ci permet de mesurer des enrichissements de l'ordre de 50 à 100 fois. Or, l'anticorps anti-FLI-1 commercial que nous avons à notre disposition ne permet pas d'atteindre de tels enrichissements. Il nous paraissait donc exclu de réaliser l'inventaire des sites de recrutement de FLI-1 en utilisant cet anticorps avec la technique de ChIP-PET. Afin de remédier à ce problème, j'ai tenté de remplacer cet anticorps par le couple de très haute affinité biotine streptavidine dont nous pensions qu'il nous permettrait d'atteindre des enrichissements compatibles avec le ChIP-PET. L'utilisation de ce couple pour des ChIPs a été décrite par le groupe de V. Ogryzko (Viens et al., 2004) et permet effectivement d'obtenir des enrichissements compatibles avec le ChIP-PET.

J'ai donc entrepris de produire une protéine FLI-1 biotinylée dans les cellules NN10 et de réaliser l'inventaire des sites de recrutement de FLI-1 par ChIP-PET avec la streptavidine

au lieu de l'anticorps anti-FLI-1. J'ai utilisé la propriété du clone NN10 #5 d'éteindre la quasi-totalité de la protéine FLI-1 endogène pour tenter de la remplacer par des quantités équivalentes de protéine FLI-1 exogène biotinylée capable de remplacer fonctionnellement la protéine FLI-1 endogène, c'est-à-dire de maintenir l'expression des gènes cibles de la protéine FLI-1 endogène, d'être recrutée sur les promoteurs cibles de la protéine FLI-1 (gènes de biogenèse des ribosomes) et enfin de maintenir la prolifération, la survie et le blocage de la différenciation des cellules NN10 en absence de protéine FLI-1 endogène. L'utilisation de cette protéine FLI-1 biotinylée aurait également pu servir pour inventorier les partenaires protéiques de la protéine FLI-1 comme cela a été réalisé pour le facteur de transcription GATA-1 par le groupe de J. Strouboulis (Grosveld et al., 2005 ; Rodriguez et al., 2006).

B) Obtention d'un clone NN10 produisant la protéine FLI-1 biotinylable et biotinylée *in vivo*

1- Déstabilisation de la protéine FLI-1 par l'étiquette placée à l'extrémité C-terminale

Afin d'obtenir ce clone NN10 produisant la protéine FLI-1 biotinylée, j'ai construit des vecteurs d'expression de la protéine FLI-1 fusionnée en C-terminal à un peptide de biotinylation reconnu par la biotine ligase BirA d'*E.Coli* soit à partir d'un promoteur constitutif EF1 α (vecteur pEF/Fli-1Bio) soit à partir d'un promoteur CMV inducible par la doxycycline (vecteur pcDNA4/TO/Fli-1Bio). L'ADNc de cette protéine, représenté de manière schématique sur la figure S2A, porte deux mutations silencieuses au niveau de la séquence reconnue par les shARN produits dans les cellules NN10 #5, rendant insensible l'ARNm produit à l'action de ces shARN. En parallèle à ces vecteurs, nous avons également

fait produire un lentivirus permettant la coexpression de cette protéine FLI-1 avec la biotine ligase BirA d'*E.Coli* (pTRIP/Fli-1Bio/BirAGFP). La figure S2B représente de manière schématique les différentes constructions.

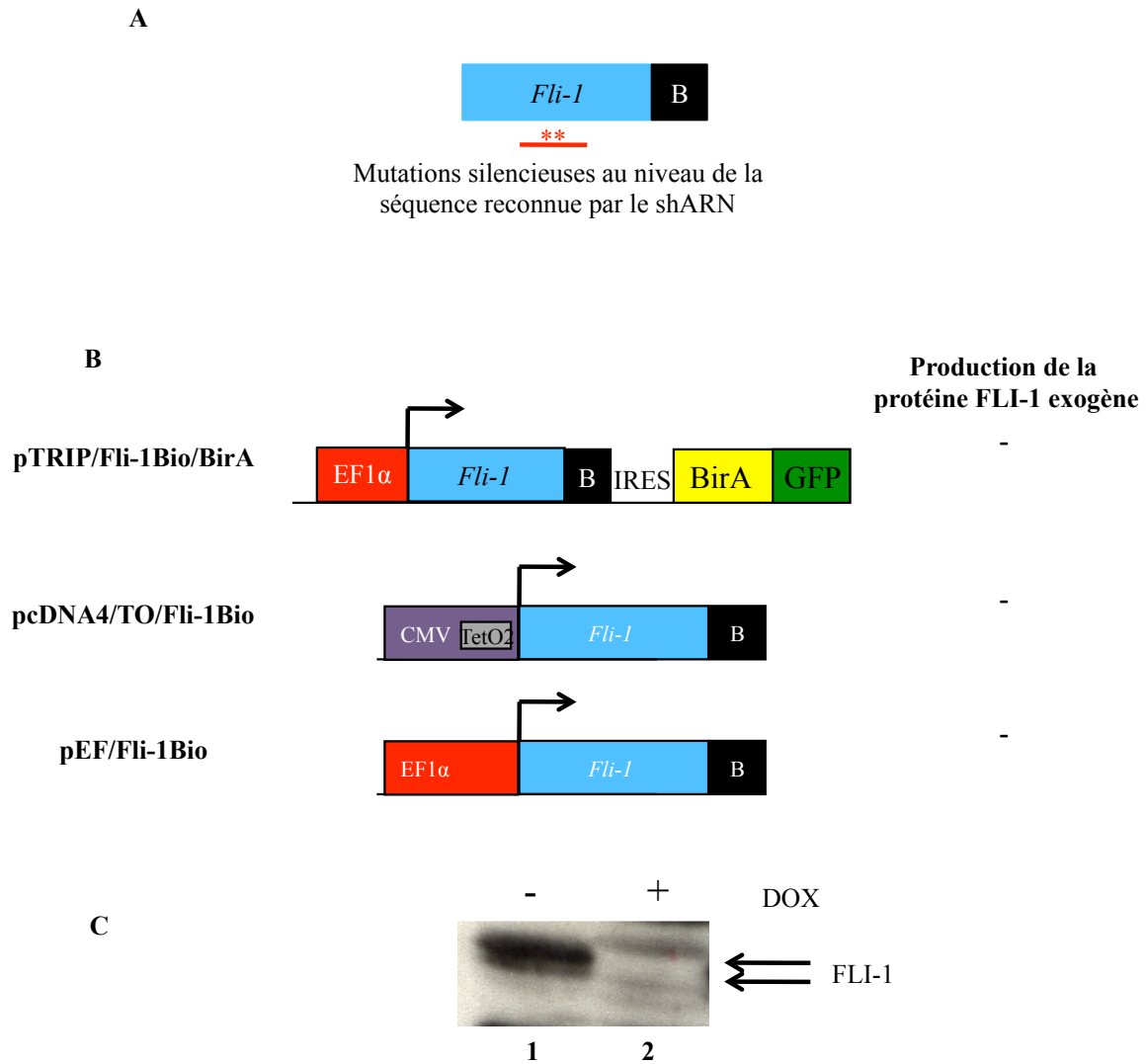


Figure S2 : Remplacement de la protéine FLI-1 des cellules NN10 #5 par une protéine FLI-1 exogène biotinylable *in vivo*

A : Représentation schématique de l'ADNc de la protéine FLI-1 fusionnée en C-terminal au peptide de biotinylation (B) reconnu par la biotine ligase BirA. Cet ADNc porte deux mutations silencieuses au niveau de la séquence reconnue par les shARN produits dans les cellules NN10 #5 rendant ainsi insensible l'ARNm codant cette protéine à la dégradation par ces shARN.

B : Représentation schématique des différentes constructions utilisées pour produire la protéine FLI-1 biotinylable dans les cellules NN10 #5 et le promoteur sous lequel est placée l'ADNc de cette protéine. - : Absence de production de la protéine FLI-1 biotinylable.

C : Analyse par Western blot du taux de protéine FLI-1 d'un sous-clone NN10 #5 obtenu après transfection avec le vecteur au promoteur CMV traité (puits 2) ou non (puits 1) par la DOX pendant deux jours.

J'ai donc infecté ou transfecté les cellules NN10 #5 avec ces constructions dans le but d'obtenir des clones stables. Cependant, aucun des clones obtenus n'exprimait la protéine FLI-1 exogène biotinylable *in vivo*. La figure S2C montre un exemple de clone caractéristique de l'ensemble des clones obtenus. Cette figure montre qu'en présence de DOX, la protéine FLI-1 totale est réduite et aucune bande correspondant à la protéine FLI-1 exogène n'apparaît.

Afin de comprendre pourquoi la protéine FLI-1 exogène n'est pas produite dans les clones que j'ai obtenus, j'ai transfecté de manière transitoire les cellules HEK humaines n'exprimant pas FLI-1 soit avec le vecteur pEF/Fli-1Bio soit avec le vecteur d'expression d'une protéine FLI-1 exogène portant le même ADNc que la protéine FLI-1 biotinylable mais qui n'est pas fusionné à la séquence codant le peptide de biotinylation (pEF/flishmut). L'expression de cet ADNc est également dirigée par un promoteur EF1 α . J'ai alors mesuré le taux de protéine FLI-1 produit par ces deux vecteurs par Western blot. Les résultats sont présentés sur la figure S3A. Comme nous pouvons l'observer, la transfection des cellules HEK par le vecteur pEF/flishmut conduit à la production de la protéine FLI-1. En revanche, même si la protéine FLI-1 est produite après transfection des cellules HEK par le vecteur pEF/Fli-1Bio, le taux de protéine FLI-1 est très nettement inférieur à celui produit par le vecteur pEF/flishmut.

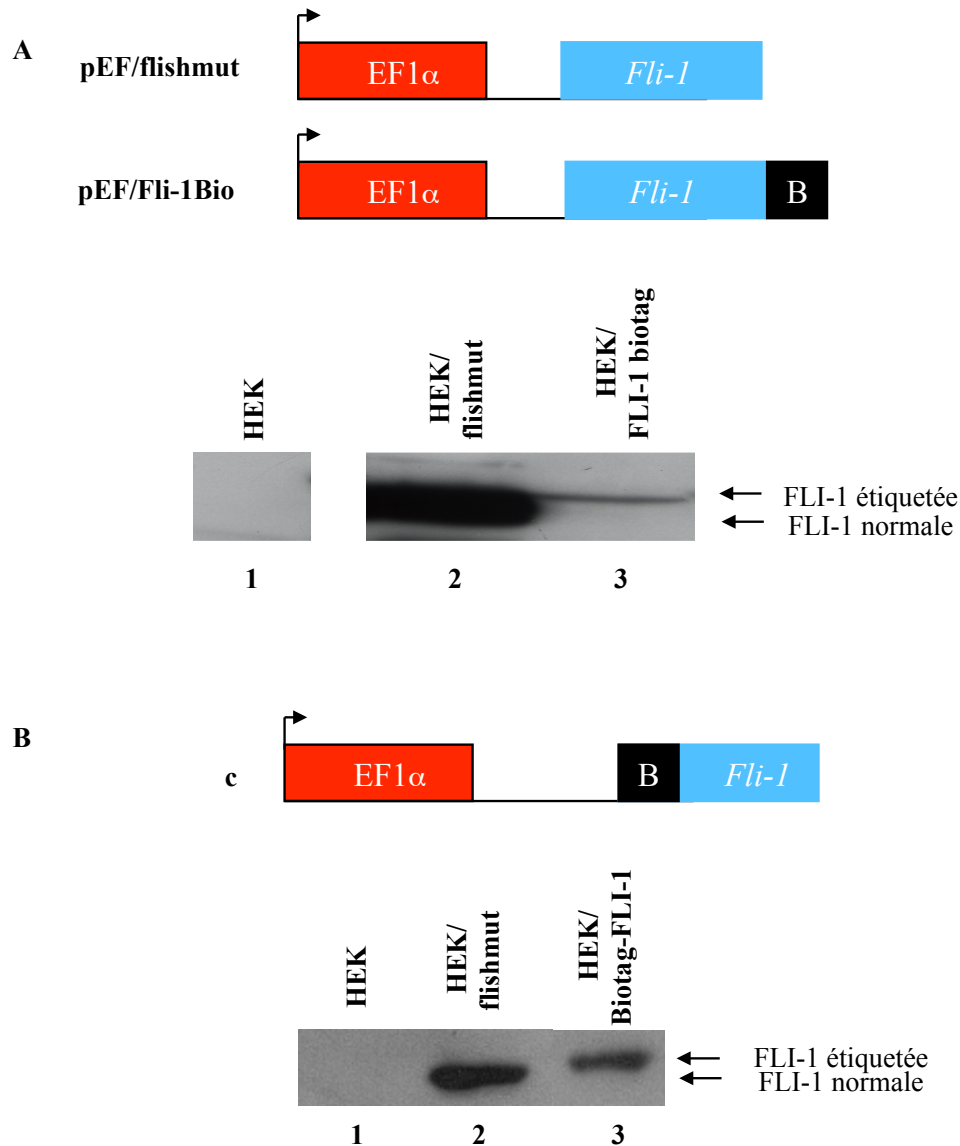


Figure S3 : Déstabilisation de la protéine FLI-1 par une étiquette placée à l'extrémité C-Terminal

A : Analyse par Western blot de la production de la protéine FLI-1 exogène révélée avec un anticorps anti-FLI-1 dans les cellules HEK non transfectées (Puits 1) ou transfectées avec le vecteur d'expression d'une protéine FLI-1 non étiquetée (vecteur a; Puits 2) ou d'une protéine étiquetée à l'extrémité C-Terminal par le peptide de biotinylation (vecteur b ; puits 3).

B : Analyse par Western blot de la production de la protéine FLI-1 exogène dans les cellules HEK non transfectées (Puits 1) ou transfectées avec le vecteur d'expression d'une protéine FLI-1 non étiquetée (vecteur a; Puits 2) ou d'une protéine étiquetée à l'extrémité N-Terminal par le peptide de biotinylation (vecteur c ; puits 3).

Ces résultats suggèrent que l'étiquetage de la protéine FLI-1 sur son extrémité C-terminal induit sa déstabilisation.

- 1- Obtention d'un clone NN10 produisant la protéine FLI-1 biotinylable en quantités équivalentes de la protéine FLI-1 endogène

J'ai tenté de résoudre ce problème de déstabilisation de la protéine FLI-1 par le peptide de biotinylation en plaçant l'étiquette à l'extrémité N-terminal. J'ai décidé de placer l'ADNc de cette protéine sous le contrôle d'un vecteur EF1 α (pEF/BioFli-1) plutôt qu'un promoteur CMV car ce promoteur CMV n'est pas fonctionnel dans toutes les phases du cycle cellulaire. En effet, il ne permet pas l'expression du transgène pendant la phase G1 (De Boer et al., 2004).

Afin de tester si l'étiquette cette fois-ci placée sur l'extrémité N-terminal déstabilise la protéine FLI-1, j'ai réalisé une nouvelle transfection des cellules HEK soit avec le vecteur pEF/fli-1mut soit avec le vecteur pEF/BioFli-1 et analysé le taux de protéine FLI-1 par Western blot. La figure S3B montre que le taux de protéine FLI-1 obtenu après transfection des cellules HEK avec le vecteur pEF/BioFli-1 est également inférieur à celui obtenu après transfection avec le vecteur pEF/fli-1mut suggérant une déstabilisation de la protéine. Néanmoins, la déstabilisation est nettement moins importante que lorsque l'étiquette est placée en C-terminal.

Ces résultats m'ont conduit à transfecter les cellules NN10 #5 avec le vecteur pEF/BioFli-1. J'ai criblé les clones en fonction de l'expression de la protéine FLI-1. J'ai ainsi obtenu le clone BioFli-1 #4E12 qui comme nous pouvons le voir sur la figure S4A produit la protéine FLI-1 exogène en quantité équivalente à celle de la protéine FLI-1 endogène. J'ai testé la répression de *fli-1* endogène par la DOX en analysant son taux de transcrits par RT-

qPCR à l'aide d'un couple d'amorces situé dans la partie 5'UTR de l'ADNc du gène *fli-1* endogène absente de l'ADNc du gène *fli-1* exogène (**Figure S4B**). La figure S4C montre que la DOX réduit le taux de transcrits du gène *fli-1* endogène d'environ 4 fois. En revanche, le taux de transcrit total du gène *fli-1* correspondant donc au transcrit endogène et exogène est réduit d'environ deux fois (**Figure S4D**). J'ai ensuite testé la localisation de la protéine FLI-1 exogène par des fractionnements cellulaires. La figure S4A montre que la protéine FLI-1 exogène est retrouvée comme la protéine FLI-1 endogène dans le noyau et dans le cytoplasme.

En conclusion, j'ai obtenu le clone BioFli-1 #4E12 qui produit une protéine FLI-1 biotinylable *in vivo* en quantités équivalentes à la protéine FLI-1 endogène.

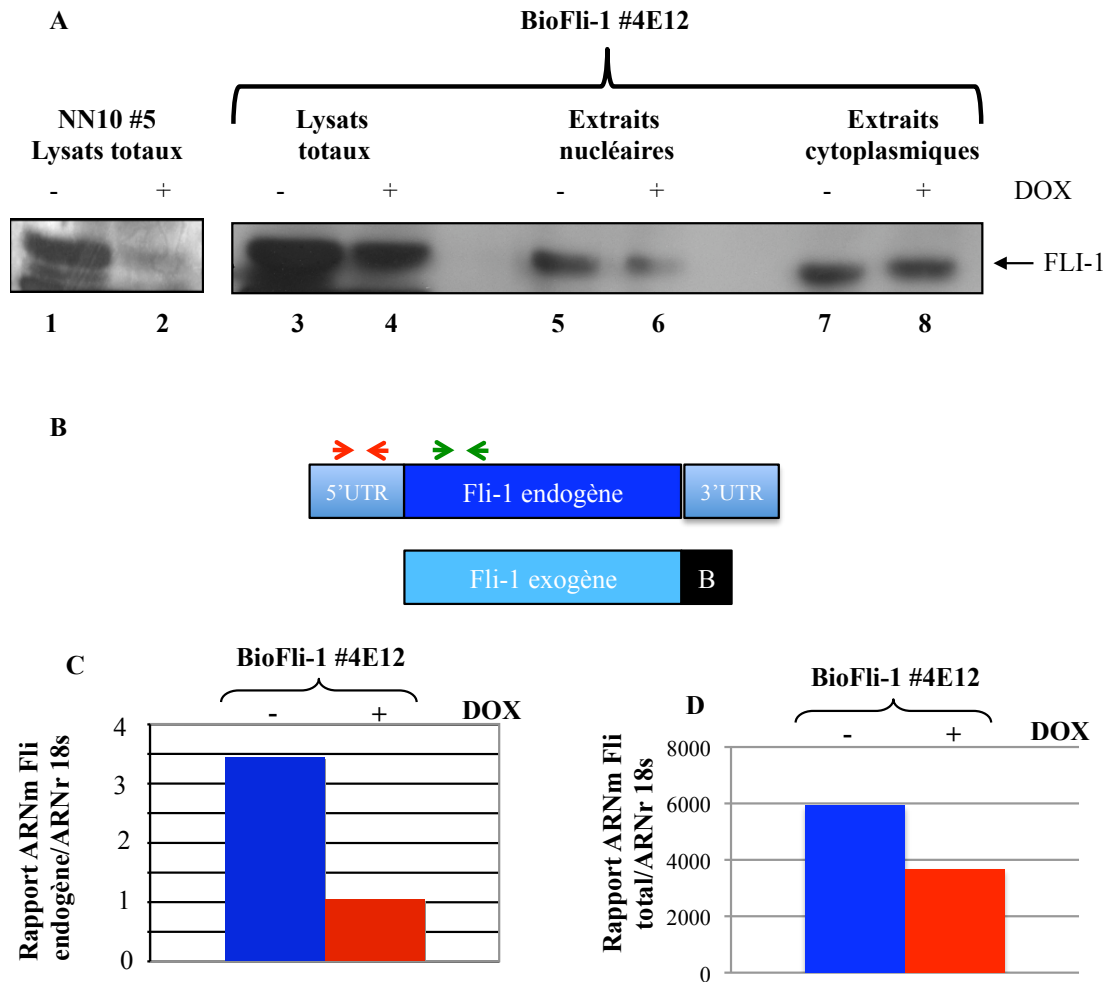


Figure S4 : Obtention d'un clone produisant la protéine FLI-1 exogène biotinylable *in vivo*

A : Analyse par Western blot avec un anticorps anti-FLI-1 de la production de la protéine FLI-1 exogène dans les cellules NN10 #5 (puits 1 et 2), dans les cellules BioFli-1 #4E12 cultivées pendant deux jours en absence (puits 1, 3, 5 et 7) ou en présence de doxycycline (DOX) (puits 2, 4, 6 et 8).

B : Représentation schématique des ADNc des protéines FLI-1 endogène (en bleu foncé) et exogène (bleu clair). Le couple de flèches rouges représentent les amorces utilisées pour quantifier le taux de transcrits *fli-1 endogène* par RT-qPCR des cellules BioFli-1 #4E12 traitées (barres rouges) ou non (barres bleues) par la doxycycline (DOX) pendant deux jours (C). Le couple de flèches vertes représentent les amorces utilisées pour quantifier le taux de transcrits *fli-1 total* des mêmes cellules (D). Les valeurs représentées sont des valeurs relatives standardisées par l'ARNr 18S.

1- Obtention d'un clone NN10 produisant une protéine FLI-1
biotinylée *in vivo*

J'ai donc utilisé le clone BioFli-1 #4E12 afin de biotinyler la protéine FLI-1 exogène. J'ai transfecté ce clone avec le vecteur d'expression de la protéine BirA d'*E.Coli*. J'ai criblé les clones en fonction de la capacité de cette biotine ligase à biotinyler la protéine FLI-1 exogène.

J'ai ainsi obtenu les clones BioFli-1/BirA #2C1 et #3A3 qui expriment la biotine ligase BirA et la protéine FLI-1 biotinylable. Afin de déterminer si cette protéine FLI-1 exogène est biotinylée, j'ai réalisé un blot avec la streptavidine à partir d'extraits totaux des cellules BioFli-1 #4E12, BioFli-1/BirA #2C1 et #3A3. Les résultats sont présentés sur la figure S5A. Alors que le taux de protéine FLI-1 totales est équivalent dans ces trois clones, le blot streptavidine met en évidence une bande qui est absente dans les cellules BioFli-1 #4E12 et présente dans les clones BioFli-1/BirA #2C1 et 3A3 traitées par la DOX et qui correspond à la taille attendue pour la protéine FLI-1 exogène biotinylée. Ces résultats montrent donc que la biotine ligase BirA biotinyle la protéine FLI-1 exogène des cellules BioFli-1/BirA #2C1 et 3A3.

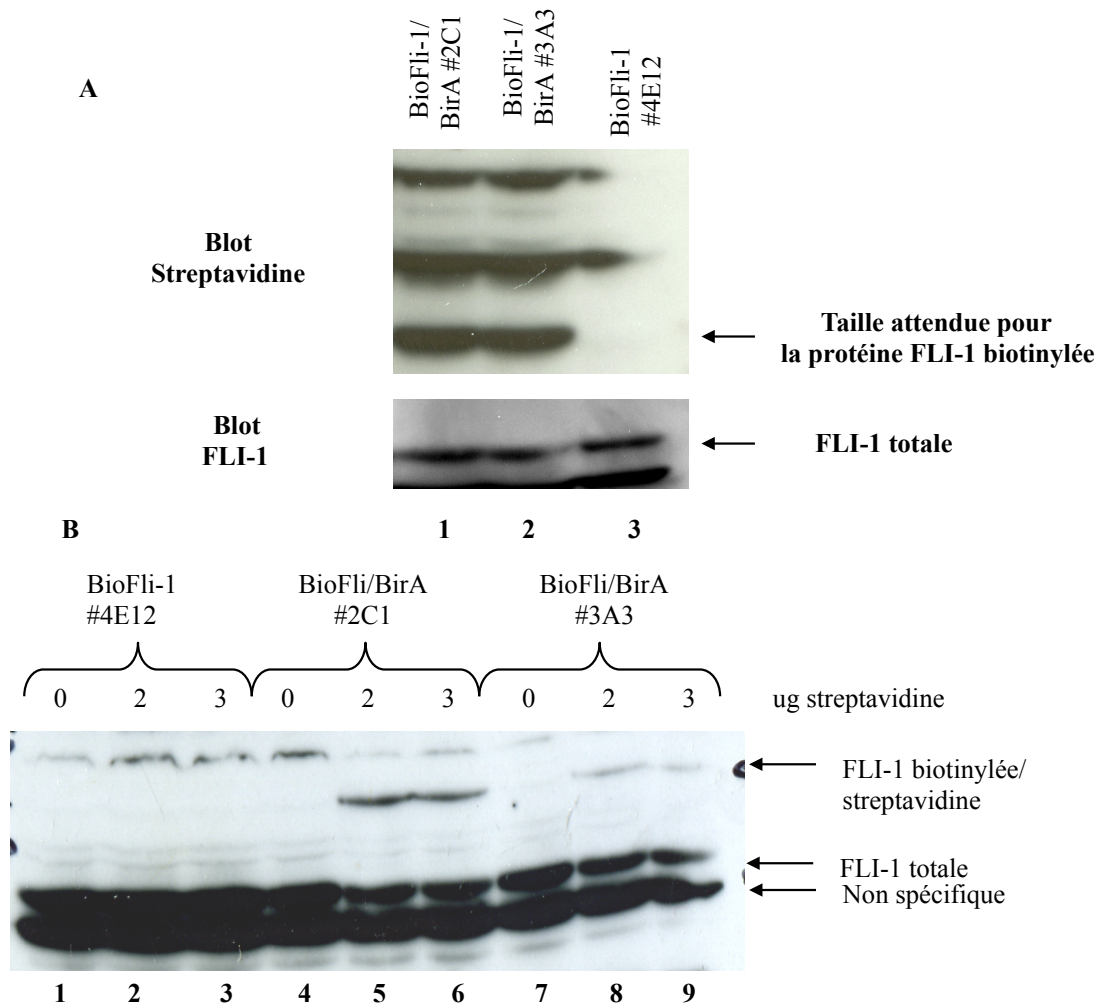


Figure S5 : Obtention d'un clone produisant la protéine FLI-1 biotinylée *in vivo*

A : Analyse par Western blot du taux de protéine FLI-1 totale (blot inférieur) ou de protéines biotinylées (blot supérieur) des cellules BioFli-1/BirA #2C1 (puits 1) ou BioFli-1/BirA #3A3 (puits 2) ou BioFli-1 #4E12 (Puits 3) traitées par la doxycycline.

B : Les extraits totaux des cellules BioFli-1 #4E12 (puits 1 à 3), BioFli-1/BirA #2C1 (puits 4 à 6) et BioFli-1/BirA #3A3 (puits 7 à 9) traitées par la doxycycline ont été pré-incubés avec 0 (puits 1, 4 et 7), 2 (puits 2, 5 et 8) ou 3 µg (puits 3, 6 et 9) de streptavidine puis ont été déposés sur gel SDS-PAGE et révélés par l'anticorps anti-FLI-1. La présence de protéine FLI-1 biotinylée est objectivée par l'obtention de complexes FLI-1 biotinylable/streptavidine présentant une migration retardée et d'une diminution du signal correspondant aux protéines FLI-1 totales (FLI-1 normale + FLI-1 biotinylée).

Enfin, j'ai voulu déterminer la proportion de protéine FLI-1 exogène biotinylée. J'ai réalisé des extraits totaux à partir des cellules BioFli-1 #4E12 et BioFli-1/BirA #2C1 et 3A3 traitées par la DOX et je les ai pré-incubés pendant dix minutes avec 0, 2 ou 3 μg de streptavidine de manière à pouvoir identifier les protéines biotinylées par retard de migration (Viens et al., 2004). J'ai déposé le mélange sur un gel SDS-PAGE et révélé avec l'anticorps anti-FLI-1. La figure S5B montre que la streptavidine n'a aucun effet sur la migration de la protéine FLI-1 des cellules BioFli-1 #4E12. En revanche, en présence de 2 ou 3 μg de streptavidine, nous pouvons observer l'apparition d'une bande d'une intensité plus importante dans les cellules BioFli-1/BirA #2C1 que dans les cellules BioFli-1/BirA # 3A3 et correspondant aux complexes FLI-1 biotinylée/streptavidine. Nous pouvons également constater une réduction du signal de la bande correspondant à la protéine FLI-1 totale d'environ deux fois en présence de 2 ou 3 μg de streptavidine dans les cellules BioFli-1/BirA #2C1 alors que la réduction est beaucoup plus faible dans les cellules BioFli-1/BirA #3A3.

Ces résultats permettent d'estimer qu'environ 50 % de la protéine FLI-1 exogène totale est biotinylée dans les cellules BioFli-1/BirA #2C1. J'ai donc choisi ce clone pour poursuivre mon étude.

II- Invalidation du clone BioFli-1/BirA #2C1

La pertinence de ce modèle pour son utilisation pour l'inventaire des sites de recrutement de FLI-1 à l'échelle du génome est jugée sur la capacité du peptide de biotinylation de ne pas perturber les fonctions de la protéine FLI-1 exogène. Par conséquent, l'objectif que me suis fixé pour me servir de ce modèle est que la protéine FLI-1 exogène biotinylée puisse d'une part maintenir la prolifération, la survie et le blocage de la

différenciation des cellules NN10 en absence de protéine FLI-1 endogène et d'autre part que cette protéine FLI-1 régule et se fixe sur ses promoteurs cibles connus.

A) La protéine FLI-1 exogène ne restaure pas le phénotype des cellules NN10 en absence de protéines FLI-1 endogène

Afin de déterminer si la protéine FLI-1 exogène restaure le phénotype des cellules NN10 en absence de protéine FLI-1 endogène, j'ai cultivé les cellules NN10/TR, NN10 #5, BioFli-1 #4E12 et BioFli-1/BirA #2C1 en présence ou en absence de DOX pendant cinq jours et j'ai mesuré leur mortalité, leur prolifération et leur différenciation. Les résultats sont présentés sur la figure S6.

Comme attendu, le traitement par la doxycycline des cellules NN10 #5 conduit à l'apparition d'environ 25 % de cellules mortes (**Figure S6A**), à une réduction de près de 80 % du nombre total de cellules (**Figure S6B**) et à l'apparition d'environ 2 % de cellules hémoglobinisées (**Figure S6C**) alors que le traitement des cellules NN10/TR par la DOX n'induit aucun de ces phénotypes. Contrairement à ce qui était attendu, le traitement par la doxycycline des cellules BioFli-1 #4E12 et BioFli-1/BirA #2C1 conduit aux mêmes effets que le traitement des cellules NN10 #5.

Ces résultats montrent donc que la protéine FLI-1 exogène biotinylable et/ou biotinylée n'est pas capable de maintenir la prolifération, la survie et le blocage de la différenciation des cellules NN10 en absence de protéine FLI-1 endogène.

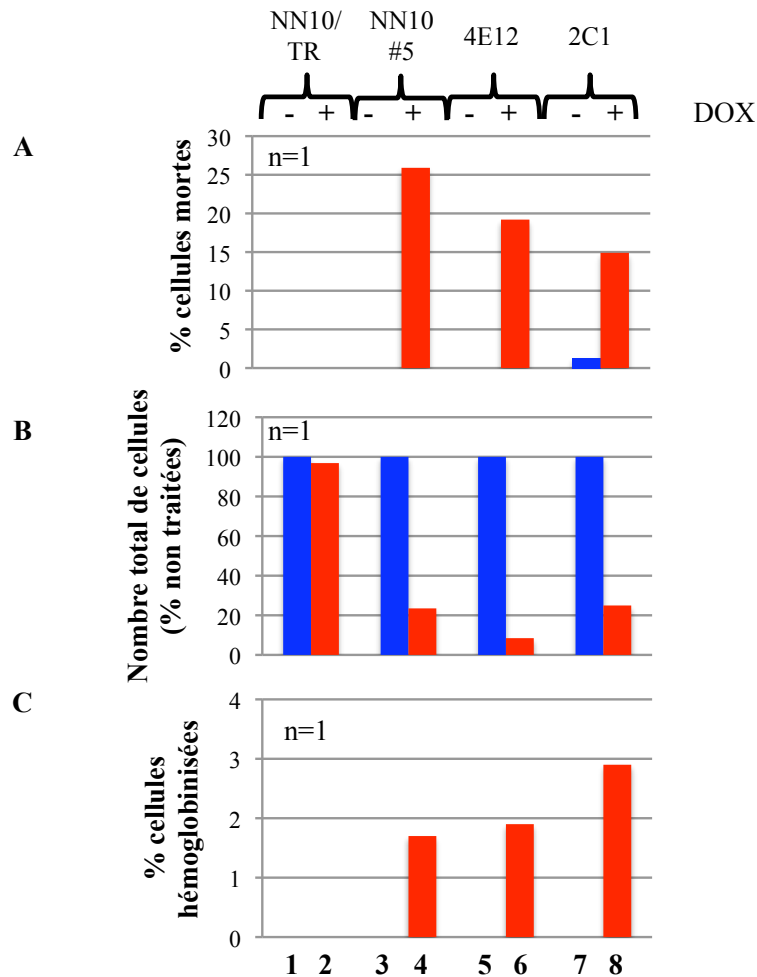


Figure S6 : La protéine FLI-1 exogène étiquetée ne restaure pas le phénotype des cellules NN10 en absence de la protéine FLI-1 endogène

Les cellules NN10/TR (pistes 1 et 2), NN10 #5 (pistes 3 et 4), BioFli-1 #4E12 (pistes 5 et 6) et BioFli-1/BirA #2C1 (pistes 7 et 8) ont été cultivées pendant cinq jours en absence (barres bleues) ou en présence (barres rouges) de doxycycline (DOX).

A : Mesure de la mortalité par comptage des cellules colorées par le bleu trypan.

B : Mesure du nombre total des cellules en fin de culture. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du nombre total de cellules obtenues en l'absence de traitement.

C : Mesure de la différenciation par des comptages de cellules colorées par la benzidine.

A) La protéine FLI-1 exogène ne maintient pas l'expression des gènes cibles de FLI-1 et n'est pas recrutée sur ses promoteurs cibles

Afin de déterminer si cette absence de restauration du phénotype par la protéine FLI-1 exogène était la conséquence de l'absence de régulation des gènes cibles directs de FLI-1, j'ai dans un premier temps mesuré par des expériences de RT-qPCR le taux de transcrits de trois des gènes cibles directs de FLI-1 identifiés dans la première partie de mes résultats dans les cellules BioFli-1 #4E12 et BioFli-1/BirA #2C1 traitées ou non par la DOX pendant deux jours. Les figures S7A, S7B et S7C montrent que le traitement des cellules BioFli-1 #4E12 comme celui des cellules BioFli-1/BirA #2C1 induit la réduction du taux de transcrits des gènes *Rpo1-3*, *Ddx21* et *Imp4*. Ces résultats indiquent que la protéine FLI-1 exogène ne maintient pas l'expression des gènes cibles de la protéine FLI-1 endogène en absence de cette dernière.

J'ai enfin mesuré le recrutement de la protéine FLI-1 exogène sur les promoteurs cibles connus de la protéine FLI-1 endogène. J'ai donc réalisé des expériences de CHIP soit avec l'anticorps anti-FLI-1 soit avec l'anticorps anti-HA comme contrôle négatif à partir des cellules BioFli-1 #4E12 traitées ou non pendant deux jours par la DOX et des cellules BioFli-1/BirA #2C1 traitées pendant deux jours par la DOX. Comme attendu, dans les cellules BioFli-1 #4E12 non traitées, la figure S7D montre un enrichissement du signal avec les oligonucléotides amplifiant les séquences promotrices des gènes *Nip7*, *Imp4* et *Rpo1-3* par rapport aux régions contrôles (promoteur de *gapdh*, 129k et 153k) signant le recrutement de la protéine FLI-1 sur ces régions. En revanche, ces enrichissements sont perdus après traitement par la DOX des cellules BioFli-1 #4E12 et cellules BioFli-1/BirA #2C1.

Ces résultats indiquent donc que la protéine FLI-1 exogène n'est pas recrutée sur les promoteurs cibles de la protéine FLI-1 endogène.

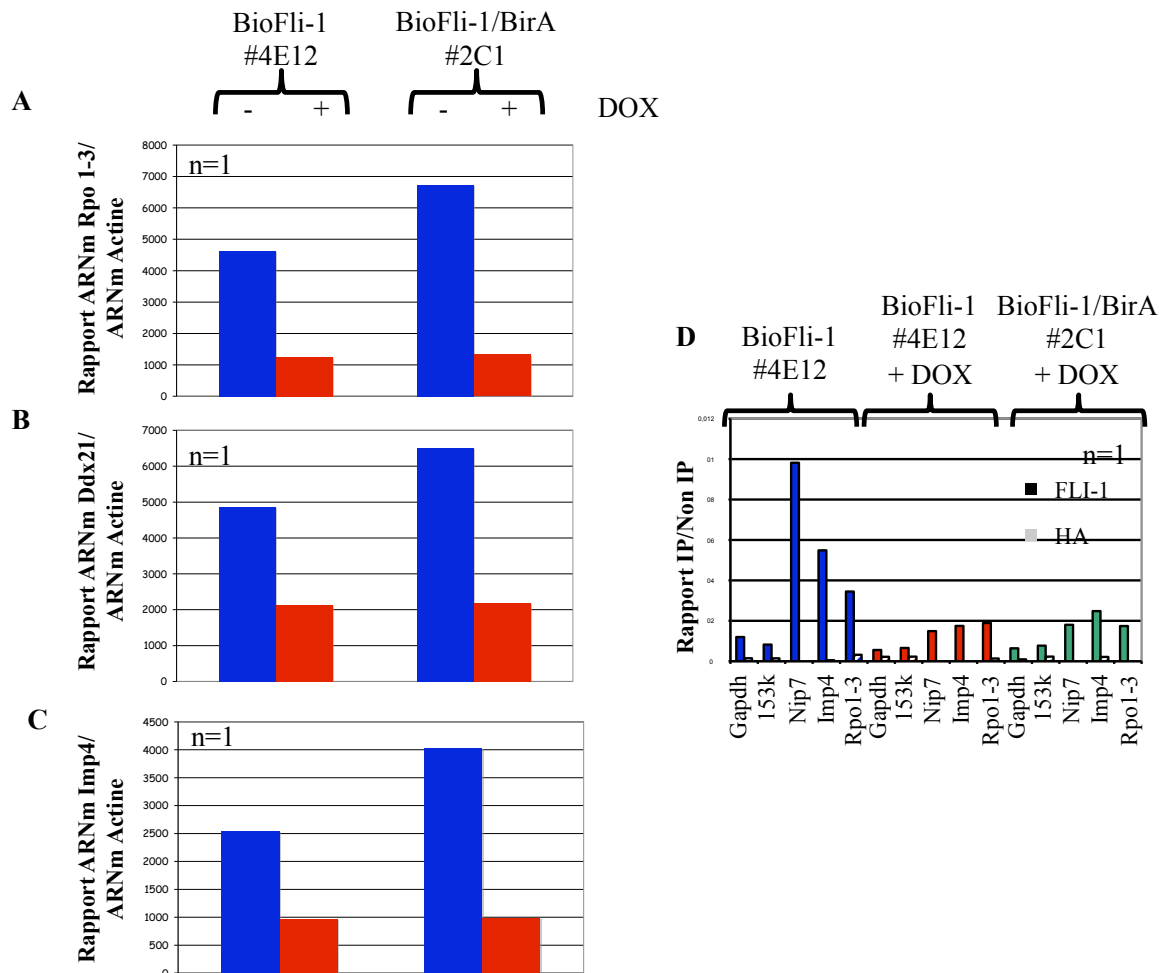


Figure S7: La protéine FLI-1 exogène ne maintient pas l'expression des gènes cibles de la protéine endogène et n'est pas recrutée sur les promoteurs cibles de celle-ci

Analyse par RT-qPCR du taux de transcrits des gènes codant les protéines RPO1-3 (A), DDX21 (B) et IMP4 (C) des cellules BioFli-1 #4E12 et BioFli-1/BirA #2C1 cultivées pendant deux jours en présence (barres rouges) ou en absence (barres bleues) de doxycycline (DOX). Les valeurs présentées sont des valeurs relatives standardisées par rapport à l'ARNm *actine*.

D : Analyse par PCRq des enrichissements (rapport IP/Non IP) obtenus par ChIP après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-FLI-1 (barres foncées) ou l'anticorps contrôle anti-HA (barres claires) à partir des cellules BioFli-1 # 4E12 traitées (barres rouges) ou non (barres bleues) par la doxycycline et des cellules BioFli-1/BirA #2C1 (barres vertes) traitées pendant deux jours par la doxycycline (DOX). Le nom des régions analysées est indiqué sous l'histogramme.

III- Une protéine FLI-1 exogène non étiquetée ne compense pas non plus l'absence de la protéine FLI-1 endogène dans les cellules NN10

Les résultats précédents peuvent suggérer que la présence d'une étiquette sur FLI-1 altère ses fonctions. Pour tester cette hypothèse, j'ai remplacé la protéine FLI-1 endogène des cellules NN10 par une quantité équivalente de protéine FLI-1 exogène non étiquetée.

A) La protéine FLI-1 exogène ne restaure pas le phénotype des cellules NN10 en absence de protéine FLI-1 endogène

J'ai donc transfecté les cellules NN10 #5 avec le vecteur pEF/flishmut qui permet l'expression constitutive de FLI-1 à partir d'un promoteur EF1 α . J'ai obtenu le clone Flish #1 qui, comme nous pouvons le voir sur les figures S8A et S8B, réprime l'expression du gène *fli-1* endogène et produit la protéine FLI-1 exogène en quantités équivalentes de la protéine FLI-1 endogène (Figure S8A : comparer puits 1 et 4).

J'ai donc cultivé les cellules NN10 #5 et Flish #1 pendant cinq jours en absence ou en présence de DOX puis j'ai mesuré la prolifération, la mortalité et la différenciation de ces cellules.

Les figures S8C, S8D et S8E montrent qu'à l'instar du traitement des cellules NN10 #5, le traitement des cellules Flish #1 par la DOX entraîne l'apparition d'environ 40 % de cellules mortes (**Figure S8C**), la réduction de près de 80 % du nombre total de cellules (**Figure S8D**) et l'apparition d'environ 10 % de cellules hémoglobinisées (**Figure S8E**).

Ces résultats démontrent que la protéine FLI-1 exogène ne maintient pas la survie, la prolifération et le blocage de la différenciation des cellules NN10 en absence de protéine FLI-1 endogène.

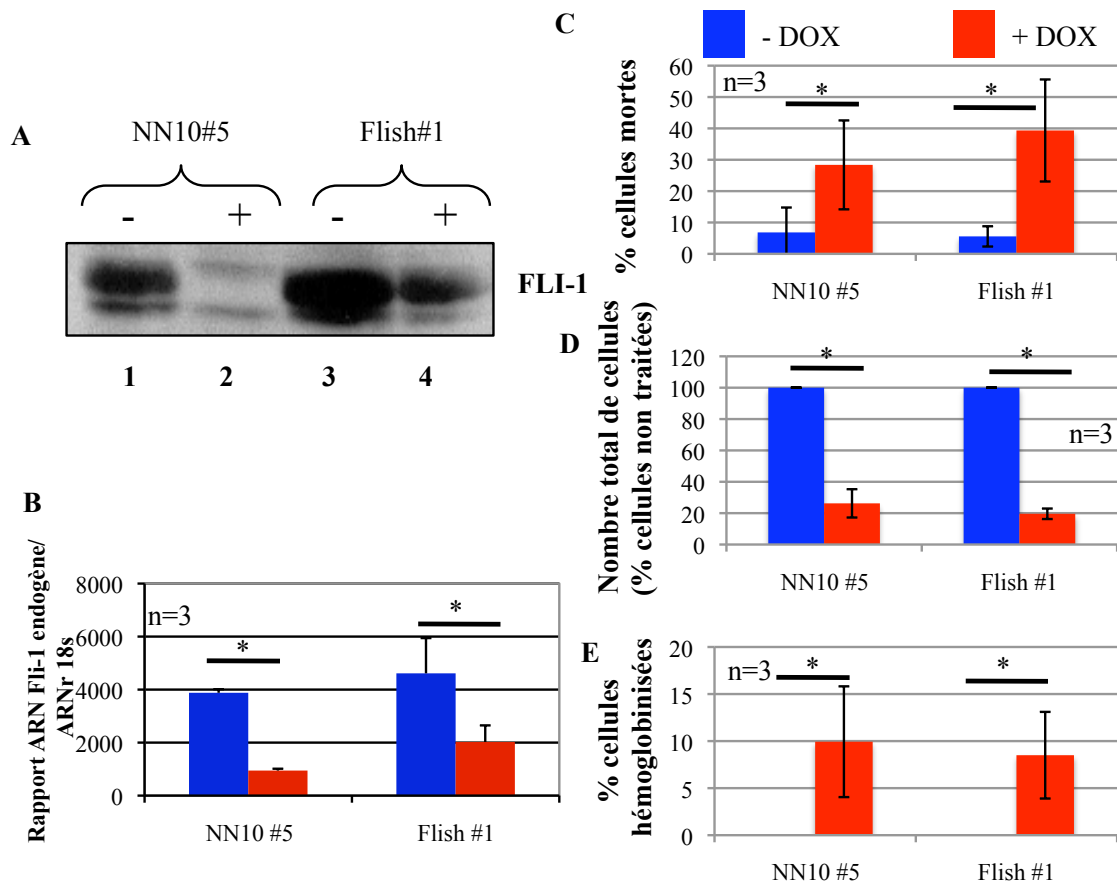


Figure S8 : Une protéine FLI-1 exogène non étiquetée ne restaure pas non plus le phénotype des cellules NN10 en absence de FLI-1 endogène

Les cellules NN10 #5 et Flish #1 ont été cultivées en absence ou en présence de doxycycline (DOX) pendant cinq jours.

A : Analyse par Western blot du taux de protéine FLI-1 révélé par l'anticorps anti-FLI.

B : Analyse par RT-qPCR du taux de transcrits du gène *fli-1* endogène. * : $p < 0,05$.

C : Mesure de la mortalité cellulaire par des comptages de cellules colorées par le bleu trypan. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : $p < 0,05$

D : Mesure de la prolifération par des comptages de cellules sur cellules de Malassez. Les valeurs, exprimées en pourcentage des cellules non traitées, représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : $p < 0,05$

E : Mesure de l'hémoglobinisation des cellules par des comptages de cellules colorées par la benzidine. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * : $p < 0,05$

B) La protéine Fli-1 exogène ne maintient pas l'expression des gènes cibles directs de la protéine FLI-1 endogène

J'ai ensuite voulu déterminer si la protéine FLI-1 exogène non étiquetée pouvait maintenir l'expression des gènes cibles directs de la protéine FLI-1 endogène. J'ai donc analysé le taux de transcrits du gène *rpoI-3* dans les cellules NN10 #5 et les cellules Flish #1. La figure S9A montre que le traitement des cellules Flish #1 par la DOX comme celui des cellules NN10 #5 réduit d'environ 40 % le taux de transcrits *RpoI-3*. Ces résultats indiquent donc que la protéine FLI-1 exogène ne maintient pas l'expression de gènes cibles de la protéine FLI-1 endogène.

J'ai enfin testé le recrutement de la protéine FLI-1 exogène sur des promoteurs cibles de la protéine FLI-1 endogène par des expériences de ChIP avec l'anticorps anti-FLI-1 ou l'anticorps contrôle anti-UBC9 à partir des cellules Flish #1 traitées ou non par la DOX pendant deux jours. La figure S9B montre que le ChIP FLI-1 à partir des cellules non traitées entraîne un enrichissement du signal avec deux couples d'oligonucléotides amplifiant des régions cibles de FLI-1 comparé aux régions contrôles (129k et 153k). En revanche, cet enrichissement est perdu après traitement par la DOX.

Ces résultats démontrent que la protéine FLI-1 exogène n'est pas recrutée sur les régions cibles de la protéine FLI-1 endogène.

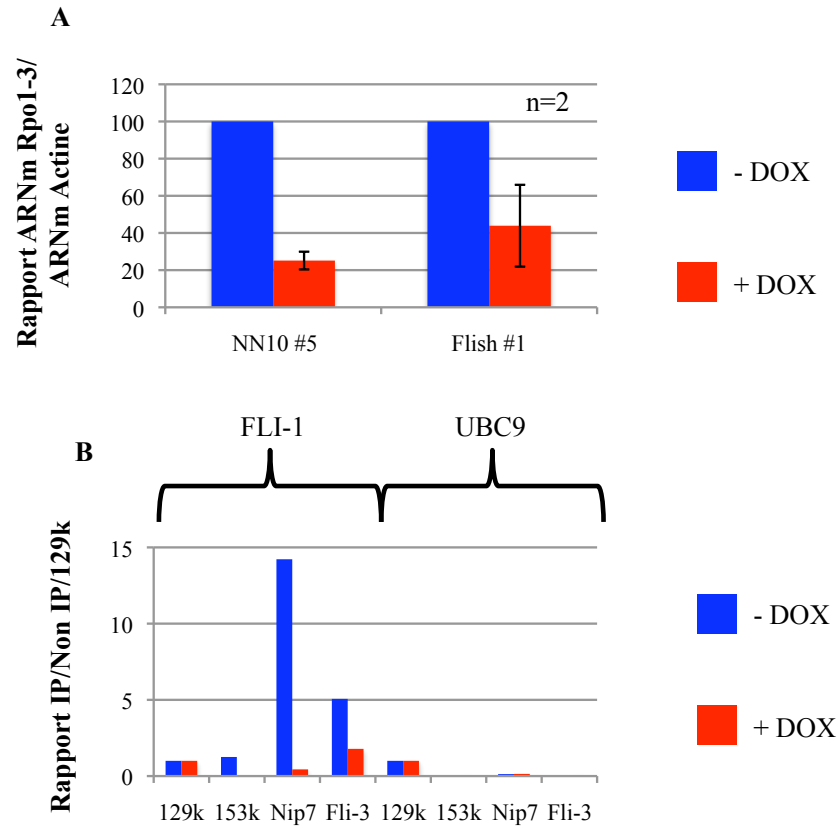


Figure S9 : La protéine FLI-1 exogène non étiquetée ne maintient pas l'expression des gènes cibles de la protéine FLI-1 endogène

A : Analyse par RT-qPCR du taux de transcrits du gène *Rpo1-3* des cellules NN10 #5 et Flish #1 cultivées en absence (barres bleues) ou en présence (barres rouges) de doxycycline (DOX). Les valeurs, exprimées en pourcentage du taux de transcrits des cellules non traitées représentent les moyennes de deux expériences indépendantes.

B : Analyse par PCRq de l'enrichissement obtenu par ChIP après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-FLI-1 et l'anticorps contrôle anti-UBC9 à partir des cellules Flish #1 cultivées pendant deux jours en absence (barres bleues) ou en présence (barres rouges) de doxycycline (DOX). Les valeurs sont rapportées aux valeurs de la chromatine non immunoprécipitée (Non IP) et aux valeurs obtenues avec les oligonucléotides 129k.

IV- Conclusion – Discussion

J'ai donc obtenu un clone NN10 produisant une protéine FLI-1 exogène biotinylable et biotinylée *in vivo* en quantités équivalentes de la protéine FLI-1 endogène. Cependant, cette protéine n'est pas capable de compenser fonctionnellement la protéine FLI-1 endogène. En effet, j'ai pu montrer que la protéine FLI-1 exogène biotinylable et biotinylée ne maintient pas la prolifération, la survie et le blocage de la différenciation des cellules NN10 en absence de protéine FLI-1 endogène. De plus, cette protéine FLI-1 exogène biotinylable et biotinylée ne maintient pas non plus l'expression de gènes cibles directs de la protéine FLI-1 endogène et n'est pas recrutée sur ses promoteurs cibles. Ces résultats invalident notre modèle cellulaire pour l'inventaire des sites de recrutement et des partenaires protéiques de FLI-1.

Une des hypothèses pouvant expliquer que la protéine FLI-1 exogène portant le peptide de biotinylation ne compense pas fonctionnellement la protéine FLI-1 endogène dans les cellules NN10 est une altération des fonctions de cette protéine par l'étiquette. J'ai testé cette hypothèse en remplaçant la protéine FLI-1 endogène des cellules NN10 par des quantités équivalentes de protéines FLI-1 exogène non étiquetée. Comme la protéine FLI-1 exogène portant le peptide de biotinylation, la protéine FLI-1 non étiquetée ne compense pas non plus l'absence de la protéine FLI-1 endogène dans les cellules NN10. Ces résultats indiquent donc que l'absence de compensation fonctionnelle par la protéine FLI-1 exogène n'est pas la conséquence d'une altération de sa fonction par l'étiquette.

Ces résultats soulèvent la question de la spécificité des shARN produits dans les cellules NN10 #5. J'ai construit des clones de cellules NN10 exprimant de manière inducible des shARN de séquence aléatoire ne ciblant aucun gène endogène. La production de ces shARN ne conduit à aucun phénotype induit par la doxycycline dans les cellules NN10 #5. De plus, j'ai également pu montrer que la production des shARN produits dans les cellules NN10 # 5

n'entraîne pas l'activation de gènes en réponse à l'interféron, réponse pouvant être déclenchée par la présence d'ARN double brin. J'ai également pu montrer que la production de shARN ciblant une région de l'ARNm du gène *fli-1* différente de celle ciblée dans les cellules NN10 #5 conduit aux mêmes phénotypes que les cellules NN10 #5 après traitement par la DOX. Enfin, la production de shARN dirigés contre l'ARNm de *fli-1* et présentant des mutations sur un des deux brins, qui sont décrits pour réduire une réponse de type interféron (Akashi et al., 2005), conduit également aux mêmes phénotypes que les cellules NN10 #5 après traitement similaire (données non montrées). L'ensemble de ces résultats nous a conduit à écarter la possibilité d'un effet non spécifique des shARN qui aurait pu expliquer l'absence de compensation du phénotype des cellules NN10 en présence de doxycycline.

L'hypothèse que nous privilégions serait que la protéine FLI-1 exogène n'est pas produite de la même manière que la protéine FLI-1 endogène au cours du cycle cellulaire. La production de la protéine FLI-1 exogène dans les mêmes conditions que la protéine FLI-1 endogène nous permettrait de tester cette hypothèse. Une stratégie plausible serait d'introduire dans le gène *Fli-1* endogène des cellules NN10 #5 des mutations silencieuses rendant insensible son ARNm à la dégradation par les shARN.

Les résultats présentés dans cette annexe m'a également permis de mettre en évidence que la protéine FLI-1 est déstabilisée quand elle est étiquetée sur son extrémité C-terminal. Cette déstabilisation n'est pas spécifique du peptide de biotinylation puisque l'étiquette HA placée également en C-terminale de la protéine FLI-1 conduit également à sa déstabilisation (données non montrées). Ces résultats pourraient suggérer une régulation de la stabilité de la protéine FLI-1 sur l'extrémité C-Terminal jusqu'ici non décrite.

V- Matériel et méthodes

A) Culture cellulaire

Le clone BioFli-1 #4E12 a été obtenu en transfectant les cellules NN10 #5 avec le vecteur pEF/BioFli-1 qui permet la production de la protéine FLI-1 exogène étiquetée en N-terminal par le peptide de biotinylation et qui apporte le gène de résistance à la zéocyne. L'ADNc de cette protéine porte deux mutations au niveau de la séquence reconnue par le shARN produit dans les cellules NN10 #5 le rendant ainsi insensible à la dégradation par ce shARN.

Le clone BioFli-1/BirA #2C1 a été obtenu en transfectant les cellules BioFli-1 #4E12 avec le vecteur pEV/Puro/BirA qui permet la production de la biotine ligase BirA d'*E.Coli* et qui apporte le gène de résistance à la puromycine.

Le clone fli-1 #1 a été obtenu en transfectant les cellules NN10 #5 avec le vecteur pEF/fli-1mut qui permet la production d'une protéine FLI-1 exogène dont l'ADNc est insensible à la dégradation par les shARN produits dans le clone NN10 #5 parental et qui apporte le gène de résistance à la zéocyne.

Les différents clones ont été cultivés dans de l'IMDM (PAA) contenant 10 % de SVF (PAA) et 10000 IU/L de pénicilline-streptomycine (PAA) en présence des antibiotiques ayant permis leur sélection, à savoir 1 mg/mL de G418 (PAA), 30 µg/mL de blasticidine (PAA), 400 µg/mL zéocyne (Cayla) et/ou 10 µg/mL de puromycine (Invitrogen).

B) Transfection

Les transfections ayant permis d'obtenir les clones décrits précédemment ont été réalisées par nucleofection en utilisant le kit Nucleofection kit solution V et le programme

G16 du nucleofector AMAXA selon les recommandations du fournisseur (Lonza). 5.10^6 de cellules ont été transfectées avec 5 µg de vecteur.

C) Vecteurs

Le vecteur pTRIP/FLI-1bio/BirAEGFP a été obtenu en intégrant l'ADNc FLI-1bio obtenu par Gaëtan Juban et digéré par BglII dans le vecteur pTRIP/BiotagIRESBirAEGFP (donné par P.H. Roméo, CEA, Fontenay aux Roses) préalablement digéré par BamHI.

Le vecteur pcDNA4/TO/FLI-1bio a été obtenu en intégrant l'insert FLI-1Biotag sorti du vecteur pTRIP par la digestion XhoI/KpnI dans le vecteur pcDNA4/TO préalablement digéré par XhoI/KpnI.

Le vecteur pEF/FLI-1bio a été obtenu en intégrant l'ADNc FLI-1bio du vecteur pTRIP/FLI-1bio/BirAEGFP dans le vecteur pEFzeo préalablement digéré par l'enzyme de restriction NotI (Sigma). Pour cela, le vecteur pTRIP/FLI-1bio/BirAEGFP a été digéré par les enzymes XhoI (Fermentas)/BamHI (Roche). L'insert a ensuite été purifié sur gel par le kit MinElute Gel Extraction (QIAGEN) puis les extrémités ont été transformées en bouts francs.

Le vecteur pEF/fliishmut a été obtenu en intégrant l'ADNc de la protéine FLI-1 exogène insensible aux shARN et non étiquetée du vecteur pcDNA4/TO/fliishmut (G. Juban) dans le vecteur pEFzeo préalablement digéré par l'enzyme de restriction NotI (Sigma). Le vecteur pcDNA4/TO/fliishmut a été digéré par les enzymes XhoI/HindIII (Fermentas) puis les extrémités de l'insert ont été convertie en bouts francs après purification comme précédemment.

Le vecteur pEF/BioFli-1 a été obtenu en intégrant l'ADNc de la protéine FLI-1 étiquetée en N-terminal dans le vecteur pEFzeo préalablement digéré par l'enzyme NotI

(Sigma). Cet ADNc a été obtenu par PCR en utilisant comme matrice le vecteur pEF/fliShmut, 5 U de pfu (Fermentas) et le couple d'oligonucléotides suivant :

5'GAGATCTAGAATGGCCTCTTCCCTGAGACAGATCCTCGACAGCCAGAAGATGG
AGTGGCGCTCCAACGCAGGAGGCTCTATGGACGGGACTATTAAGGAG3' et

5' GAGAGATCTAGACTAGTAGTAGCTGCCTAAGTGTGAAGG3'. Le programme PCR est le suivant : 5' à 95 °C puis 25 cycles des étapes suivantes : 1' à 95 °C, 1' à 60 °C et 2' à 72 °C puis 10' à 72 °C. Le produit de la PCR a été purifié par le kit MinElute PCR Purification (QIAGEN) puis digéré par l'enzyme XbaI (Invitrogen) avant d'être ligué dans le vecteur pEFzéo.

Tous les vecteurs décrits dans cette partie ont été amplifiés par des maxicultures de bactéries DH5α (Invitrogen) dans du milieu LB Broth (Roth).

D) Western blot

Les Western blot présentés dans cette annexe ont été réalisés selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes de la partie résultats.

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : polyclonal de lapin anti-FLI-1 (dilution au 1/500^{ème}, ab-15289-200, abcam, figure S4 polyclonal de lapin anti-FLI-1 (dilution au 1/200^{ème}, sc-356, Santa Cruz Biotechnology ; Figure S8) ; streptavidine couplée à la peroxydase (dilution au 1/10000^{ème}, NEL750, Perkin Elmer).

Les anticorps secondaires utilisées sont : chèvre anti-lapin (1/5000^{ème}, Biorad).

E) Retard de migration

Les cellules ont directement été lysées dans du bleu de Laemmli. Les extraits protéiques ont été incubés en présence de Streptavidine (Sigma) pendant 10 minutes à température ambiante puis ils ont été bouillis pendant 5 minutes et enfin déposés sur gel SDS-PAGE 10 %.

F) RT-PCR en temps réel

Les expériences de RT-qPCR ont été réalisées selon le protocole détaillé dans le matériel et méthodes de ma partie résultat.

Les couples d'oligonucléotides ayant servi à doser le taux de transcrits *fli-1* total (indiqués en vert sur la figure S4) et endogène (indiqués en rouge sur la figure S4) sont les suivants :

Oligonucléotides	Séquence Sens	Séquence antisens
Fli-1 total	CAACCAGCCAGTGAGAGTCA	GTTCGTTGGTGGTCATGTTG
Fli-1 endogène	CCGCTACAACAACAAACGTG	ACCTCGTAGCCCCTTCAGAT

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adeyemi, B.F., Kolude, B.M., Akang, E.E. & Lawoyin, J.O. A study of the utility of silver nucleolar organizer regions in categorization and prognosis of salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **102**, 513-20 (2006).
2. Adolfsson, J. et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306 (2005).
3. Aizawa, S. et al. Env-derived gp55 gene of Friend spleen focus-forming virus specifically induces neoplastic proliferation of erythroid progenitor cells. *EMBO J* **9**, 2107-16 (1990).
4. Akashi, H. et al. Escape from the interferon response associated with RNA interference using vectors that encode long modified hairpin-RNA. *Mol Biosyst* **1**, 382-390 (2005).
5. Albiñ, A., Johnsen, J.I. & Henriksson, M.A. MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv. Cancer Res* **107**, 163-224 (2010).
6. Alex, R., Sozeri, O., Meyer, S. & Dildrop, R. Determination of the DNA sequence recognized by the bHLH-zip domain of the N-Myc protein. *Nucleic Acids Res* **20**, 2257-63 (1992).
7. Amsterdam, A. et al. Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol* **2**, E139 (2004).
8. Andersen, J.S. et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* **12**, 1-11 (2002).
9. Andersen, J.S. et al. Nucleolar proteome dynamics. *Nature* **433**, 77-83 (2005).
10. Andrews, N.C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M.B., Tempst, P. & Orkin, S.H. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* **362**, 722-8 (1993).
11. Anguita, E. et al. Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *EMBO J* **23**, 2841-2852 (2004).
12. Apicelli, A.J. et al. A non-tumor suppressor role for basal p19ARF in maintaining nucleolar structure and function. *Mol Cell Biol* **28**, 1068-80 (2008).
13. Arabi, A. et al. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* **7**, 303-10 (2005).
14. Arcasoy, M.O. & Jiang, X. Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. *Br J Haematol* **130**, 121-9 (2005).
15. Ashman, L.K. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1037-51 (1999).
16. Atar, O. & Levi, B.Z. PU.1 silencing leads to terminal differentiation of erythroleukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 1288-92 (2005).
17. Athanasiou, M., Mavrothalassitis, G., Sun-Hoffman, L. & Blair, D.G. FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells. *Leukemia* **14**, 439-45 (2000).
18. Axelrad, A. Genetic and cellular basis of susceptibility or resistance to Friend leukemia virus infection in mice. *Proc Can Cancer Conf* **8**, 313-43 (1969).
19. Ayrault, O., Andrique, L., Larsen, C.J. & Seite, P. Human Arf tumor suppressor specifically interacts with chromatin containing the promoter of rRNA genes. *Oncogene* **23**, 8097-104 (2004).

20. Back, J., Dierich, A., Bronn, C., Kastner, P. & Chan, S. PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells. *Blood* **103**, 3615-23 (2004).
21. Badhai, J. et al. Posttranscriptional down-regulation of small ribosomal subunit proteins correlates with reduction of 18S rRNA in RPS19 deficiency. *FEBS Lett* **583**, 2049-53 (2009).
22. Bailey, T.L. Discovering novel sequence motifs with MEME. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 2**, Unit 2.4 (2002).
23. Barkić, M. et al. The p53 tumor suppressor causes congenital malformations in Rpl24-deficient mice and promotes their survival. *Mol. Cell. Biol* **29**, 2489-2504 (2009).
24. Barlow, J.L. et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med* **16**, 59-66 (2010).
25. Barna, M. et al. Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature* **456**, 971-5 (2008).
26. Barnache, S. et al. Spi-1 transgenic mice develop a clonal erythroleukemia which does not depend on p53 mutation. *Oncogene* **16**, 2989-2995 (1998).
27. Belin, S. et al. Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS One* **4**, e7147 (2009).
28. Ben David, Y., Prideaux, V.R., Chow, V., Benchimol, S. & Bernstein, A. Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. *Oncogene* **3**, 179-185 (1988).
29. Ben-David, Y., Giddens, E.B. & Bernstein, A. Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1332-6 (1990).
30. Ben-David, Y., Giddens, E.B., Letwin, K. & Bernstein, A. Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. *Genes Dev* **5**, 908-18 (1991).
31. Ben-David, Y., Bani, M.R., Chabot, B., De Koven, A. & Bernstein, A. Retroviral insertions downstream of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 gene in erythroleukemia cells: evidence that A1 is not essential for cell growth. *Mol Cell Biol* **12**, 4449-55 (1992).
32. Ben-David, Y. & Bernstein, A. Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. *Cell* **66**, 831-4 (1991).
33. Bernstein, K.A., Bleichert, F., Bean, J.M., Cross, F.R. & Baserga, S.J. Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint. *Mol Biol Cell* **18**, 953-64 (2007).
34. Bhat, K.P., Itahana, K., Jin, A. & Zhang, Y. Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *EMBO J* **23**, 2402-12 (2004).
35. Bilanges, B. & Stokoe, D. Mechanisms of translational deregulation in human tumors and therapeutic intervention strategies. *Oncogene* **26**, 5973-5990 (2007).
36. Blaybel, R., Theoleyre, O., Douablin, A. & Baklouti, F. Downregulation of the Spi-1/PU.1 oncogene induces the expression of TRIM10/HERF1, a key factor required for terminal erythroid cell differentiation and survival. *Cell Res* **18**, 834-45 (2008).
37. Boeva, V. et al. De novo motif identification improves the accuracy of predicting transcription factor binding sites in ChIP-Seq data analysis. *Nucleic Acids Res* **38**, e126 (2010).
38. Boon, K. et al. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J* **20**, 1383-93 (2001).
39. Boros, J. et al. Overlapping promoter targeting by Elk-1 and other divergent ETS-domain transcription factor family members. *Nucleic Acids Res* **37**, 7368-80 (2009).

40. Bouilloux, F. et al. EKLF restricts megakaryocytic differentiation at the benefit of erythrocytic differentiation. *Blood* **112**, 576-84 (2008).
41. Boultonwood, J., Pellagatti, A., McKenzie, A.N. & Wainscoat, J.S. Advances in the 5q-syndrome. *Blood* (2010).doi:10.1182/blood-2010-04-273771
42. Bowman, L.H., Rabin, B. & Schlessinger, D. Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **9**, 4951-66 (1981).
43. Bowman, L.H., Goldman, W.E., Goldberg, G.I., Hebert, M.B. & Schlessinger, D. Location of the initial cleavage sites in mouse pre-rRNA. *Mol Cell Biol* **3**, 1501-10 (1983).
44. Bozzini, C.E. et al. The biology of stress erythropoiesis and erythropoietin production. *Ann N Y Acad Sci* **718**, 83-92; discussion 92-3 (1994).
45. Breig, O., Theoleyre, O., Douablin, A. & Baklouti, F. Subtle distinct regulations of late erythroid molecular events by PI3K/AKT-mediated activation of Spi-1/PU.1 oncogene autoregulation loop. *Oncogene* **29**, 2807-16 (2010).
46. Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. & Iggo, R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet* **34**, 263-264 (2003).
47. Brown, G. & Ceredig, R. Lineage determination in haematopoiesis: quo vadis? *Trends Immunol* **30**, 465-6 (2009).
48. Budde, A. & Grummt, I. p53 represses ribosomal gene transcription. *Oncogene* **18**, 1119-24 (1999).
49. Burger, K. et al. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem* **285**, 12416-25 (2010).
50. Campagnoli, M.F. et al. RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat* **29**, 911-920 (2008).
51. Carlile, G.W., Smith, D.H. & Wiedmann, M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* **103**, 4310-6 (2004).
52. Carlile, G., Smith, D.H. & Wiedmann, M. A non-apoptotic role for Fas/FasL in erythropoiesis. *FEBS Lett* (2009).à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19640469>
53. Carrasco, M.P., Jiménez-López, J.M., Ríos-Marco, P., Segovia, J.L. & Marco, C. Disruption of cellular cholesterol transport and homeostasis as a novel mechanism of action of membrane-targeted alkylphospholipid analogues. *Br. J. Pharmacol* **160**, 355-366 (2010).
54. Carrère, S., Verger, A., Flourens, A., Stehelin, D. & Duterque-Coquillaud, M. Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene* **16**, 3261-3268 (1998).
55. Ceredig, R., Rolink, A.G. & Brown, G. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol* **9**, 293-300 (2009).
56. Chakraborty, A., Uechi, T., Higa, S., Torihara, H. & Kenmochi, N. Loss of ribosomal protein L11 affects zebrafish embryonic development through a p53-dependent apoptotic response. *PLoS One* **4**, e4152 (2009).
57. Chan, S. & Slack, F.J. Ribosomal protein RPS-14 modulates let-7 microRNA function in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol* **334**, 152-160 (2009).
58. Chasis, J.A. & Mohandas, N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* **112**, 470-8 (2008).
59. Chesnokov, I., Chu, W.M., Botchan, M.R. & Schmid, C.W. p53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner. *Mol Cell Biol* **16**, 7084-8 (1996).

60. Choe, K.S. et al. Reversal of tumorigenicity and the block to differentiation in erythroleukemia cells by GATA-1. *Cancer Res* **63**, 6363-9 (2003).
61. Choe, K.S., Ujhelly, O., Wontakal, S.N. & Skoultchi, A.I. PU.1 directly regulates cdk6 gene expression, linking the cell proliferation and differentiation programs in erythroid cells. *J Biol Chem* **285**, 3044-52 (2010).
62. Choemsel, V. et al. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* **109**, 1275-83 (2007).
63. Choemsel, V. et al. Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum Mol Genet* **17**, 1253-63 (2008).
64. Choisy-Rossi, C. & Yonish-Rouach, E. Apoptosis and the cell cycle: the p53 connection. *Cell Death Differ* **5**, 129-31 (1998).
65. Choong, M.L., Yang, H., Lee, M.A. & Lane, D.P. Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. *Cell Cycle* **8**, 2810-2818 (2009).
66. Choppin, J. et al. Production of erythropoietin by cloned malignant murine erythroid cells. *Exp. Hematol* **13**, 610-615 (1985).
67. Chow, V., Ben-David, Y., Bernstein, A., Benchimol, S. & Mowat, M. Multistage Friend erythroleukemia: independent origin of tumor clones with normal or rearranged p53 cellular oncogenes. *J Virol* **61**, 2777-81 (1987).
68. Choy, M. et al. Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated. *BMC Genomics* **11**, 519 (2010).
69. Chylicki, K., Ehinger, M., Svedberg, H. & Gullberg, U. Characterization of the molecular mechanisms for p53-mediated differentiation. *Cell Growth Differ* **11**, 561-71 (2000).
70. Clark, S.P. & Mak, T.W. Fluidity of a retrovirus genome. *J Virol* **50**, 759-65 (1984).
71. Cmejla, R. et al. Identification of mutations in the ribosomal protein L5 (RPL5) and ribosomal protein L11 (RPL11) genes in Czech patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* **30**, 321-7 (2009).
72. Coghill, E. et al. Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) coordinates erythroid cell proliferation and hemoglobinization in cell lines derived from EKLF null mice. *Blood* **97**, 1861-1868 (2001).
73. Coleman, D.L., Russell, E.S. & Levin, E.Y. Enzymatic studies of the hemopoietic defect in flexed mice. *Genetics* **61**, 631-42 (1969).
74. Constantinescu, S.N. et al. The anemic Friend virus gp55 envelope protein induces erythroid differentiation in fetal liver colony-forming units-erythroid. *Blood* **91**, 1163-72 (1998).
75. Constantinescu, S.N., Ghaffari, S. & Lodish, H.F. The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol Metab* **10**, 18-23 (1999).
76. Contreras, X., Barboric, M., Lenasi, T. & Peterlin, B.M. HMBA releases P-TEFb from HEXIM1 and 7SK snRNA via PI3K/Akt and activates HIV transcription. *PLoS Pathog* **3**, 1459-1469 (2007).
77. Couté, Y. et al. Deciphering the human nucleolar proteome. *Mass Spectrom Rev* **25**, 215-234 (2006).
78. Cui, J.W. et al. Retroviral insertional activation of the Fli-3 locus in erythroleukemias encoding a cluster of microRNAs that convert Epo-induced differentiation to proliferation. *Blood* **110**, 2631-40 (2007).

79. Cui, J.W., Vecchiarelli-Federico, L.M., Li, Y.J., Wang, G.J. & Ben-David, Y. Continuous Fli-1 expression plays an essential role in the proliferation and survival of F-MuLV-induced erythroleukemia and human erythroleukemia. *Leukemia* **23**, 1311-9 (2009).
80. D'Andrea, A.D. The interaction of the erythropoietin receptor and gp55. *Cancer Surv* **15**, 19-36 (1992).
81. Da Costa, L. et al. Diamond-Blackfan anemia, ribosome and erythropoiesis. *Transfus Clin Biol* (2010).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20655265>
82. Dai, M.S. et al. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* **24**, 7654-68 (2004).
83. Dai, M.S., Arnold, H., Sun, X.X., Sears, R. & Lu, H. Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *EMBO J* **26**, 3332-45 (2007).
84. Dai, M. & Lu, H. Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *J. Cell. Biochem* **105**, 670-677 (2008).
85. Daly, N.L. et al. Deregulation of RNA polymerase III transcription in cervical epithelium in response to high-risk human papillomavirus. *Oncogene* **24**, 880-888 (2005).
86. Danilova, N., Sakamoto, K.M. & Lin, S. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood* **112**, 5228-37 (2008).
87. De Maria, R. et al. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* **93**, 796-803 (1999).
88. De Maria, R. et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **401**, 489-93 (1999).
89. Deisenroth, C. & Zhang, Y. Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene* **29**, 4253-4260 (2010).
90. DeKoter, R.P., Kamath, M.B. & Houston, I.B. Analysis of concentration-dependent functions of PU.1 in hematopoiesis using mouse models. *Blood Cells Mol. Dis* **39**, 316-320 (2007).
91. Delva, L. et al. Multiple functional domains of the oncoproteins Spi-1/PU.1 and TLS are involved in their opposite splicing effects in erythroleukemic cells. *Oncogene* **23**, 4389-99 (2004).
92. Dey, A., Chao, S. & Lane, D.P. HEXIM1 and the control of transcription elongation: from cancer and inflammation to AIDS and cardiac hypertrophy. *Cell Cycle* **6**, 1856-1863 (2007).
93. Di Bacco, A.M. & Cotter, T.G. p53 expression in K562 cells is associated with caspase-mediated cleavage of c-ABL and BCR-ABL protein kinases. *Br J Haematol* **117**, 588-97 (2002).
94. Dieci, G. et al. Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 489-93 (2009).
95. Doherty, L. et al. Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet* **86**, 222-8 (2010).
96. Dolznig, H., Grebien, F., Sauer, T., Beug, H. & Mullner, E.W. Evidence for a size-sensing mechanism in animal cells. *Nat Cell Biol* **6**, 899-905 (2004).
97. Donehower, L.A. et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-221 (1992).

98. Draptchinskaia, N. et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* **21**, 169-75 (1999).
99. Ebert, B.L. et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* **451**, 335-9 (2008).
100. Edling, C.E. & Hallberg, B. c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1995-8 (2007).
101. Farrar, J.E. et al. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* **112**, 1582-92 (2008).
102. Finch, R.A., Revankar, G.R. & Chan, P.K. Structural and functional relationships of toyocamycin on NPM-translocation. *Anticancer Drug Des* **12**, 205-15 (1997).
103. Finkelstein, L.D., Ney, P.A., Liu, Q.P., Paulson, R.F. & Correll, P.H. Sf-Stk kinase activity and the Grb2 binding site are required for Epo-independent growth of primary erythroblasts infected with Friend virus. *Oncogene* **21**, 3562-70 (2002).
104. Fisher, R.C. et al. PU.1 supports proliferation of immature erythroid progenitors. *Leuk Res* **28**, 83-9 (2004).
105. Flygare, J. et al. Deficiency of ribosomal protein S19 in CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* **105**, 4627-4634 (2005).
106. Friend, C. Leukemia of adult mice caused by a transmissible agent. *Ann N Y Acad Sci* **68**, 522-32 (1957).
107. Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C. & Fasiolo, F. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**, 17-42 (2003).
108. Frontelo, P. et al. Novel role for EKLF in megakaryocyte lineage commitment. *Blood* **110**, 3871-3880 (2007).
109. Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C. & Orkin, S.H. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12355-8 (1996).
110. Fumagalli, S. et al. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol* **11**, 501-8 (2009).
111. Ganguli, G., Back, J., Sengupta, S. & Wasylyk, B. The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors. *EMBO Rep* **3**, 569-74 (2002).
112. Gazda, H.T. et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet* **83**, 769-80 (2008).
113. Ge, J. et al. Dyskerin ablation in mouse liver inhibits rRNA processing and cell division. *Mol Cell Biol* **30**, 413-22 (2010).
114. Gleizes, P.E. et al. Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J Cell Biol* **155**, 923-36 (2001).
115. Goebel, M.K. The PU.1 transcription factor is the product of the putative oncogene Spi-1. *Cell* **61**, 1165-6 (1990).
116. Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N. & White, R.J. Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* **421**, 290-4 (2003).
117. Grandori, C. et al. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat. Cell Biol* **7**, 311-318 (2005).
118. Grebien, F. et al. Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood* **111**, 4511-22 (2008).

119. Green, S.M., Coyne, H.J., McIntosh, L.P. & Graves, B.J. DNA binding by the ETS protein TEL (ETV6) is regulated by autoinhibition and self-association. *J. Biol. Chem* **285**, 18496-18504 (2010).
120. Gregory, T. et al. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* **94**, 87-96 (1999).
121. Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B. & Pandolfi, P.P. Nucleophosmin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 493-505 (2006).
122. Grosveld, F. et al. Isolation and characterization of hematopoietic transcription factor complexes by in vivo biotinylation tagging and mass spectrometry. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1054**, 55-67 (2005).
123. Guillouf, C., Gallais, I. & Moreau-Gachelin, F. Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner. *J Biol Chem* **281**, 19145-55 (2006).
124. Gustavsson, P. et al. Diamond-Blackfan anaemia: genetic homogeneity for a gene on chromosome 19q13 restricted to 1.8 Mb. *Nat. Genet* **16**, 368-371 (1997).
125. Gustavsson, P. et al. Diamond-Blackfan anaemia in a girl with a de novo balanced reciprocal X;19 translocation. *J. Med. Genet* **34**, 779-782 (1997).
126. Hadjiolova, K.V., Nicoloso, M., Mazan, S., Hadjiolov, A.A. & Bachellerie, J.P. Alternative pre-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis. *Eur. J. Biochem* **212**, 211-215 (1993).
127. Hallier, M., Tavitian, A. & Moreau-Gachelin, F. The transcription factor Spi-1/PU.1 binds RNA and interferes with the RNA-binding protein p54nrb. *J Biol Chem* **271**, 11177-81 (1996).
128. Hallier, M., Lerga, A., Barnache, S., Tavitian, A. & Moreau-Gachelin, F. The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem* **273**, 4838-42 (1998).
129. Hamma, T. & Ferré-D'Amaré, A.R. The box H/ACA ribonucleoprotein complex: interplay of RNA and protein structures in post-transcriptional RNA modification. *J. Biol. Chem* **285**, 805-809 (2010).
130. Hannan, K.M. et al. RNA polymerase I transcription in confluent cells: Rb downregulates rDNA transcription during confluence-induced cell cycle arrest. *Oncogene* **19**, 3487-3497 (2000).
131. Hannan, K.M. et al. Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1. *Oncogene* **19**, 4988-4999 (2000).
132. Hayashita, Y. et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* **65**, 9628-32 (2005).
133. He, L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828-33 (2005).
134. He, N., Pezda, A.C. & Zhou, Q. Modulation of a P-TEFb functional equilibrium for the global control of cell growth and differentiation. *Mol. Cell. Biol* **26**, 7068-7076 (2006).
135. Henry, J.L., Coggin, D.L. & King, C.R. High-level expression of the ribosomal protein L19 in human breast tumors that overexpress erbB-2. *Cancer Res* **53**, 1403-8 (1993).
136. Hensold, J.O., Barth, D. & Stratton, C.A. RNA polymerase II inhibitor, 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) causes erythroleukemic differentiation and transcriptional activation of erythroid genes. *J. Cell. Physiol* **168**, 105-113 (1996).
137. Herrera, J.E., Savkur, R. & Olson, M.O. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res* **23**, 3974-9 (1995).
138. Hoatlin, M.E. et al. Activation of erythropoietin receptors by Friend viral gp55 and by erythropoietin and down-modulation by the murine Fv-2r resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9985-9 (1990).

139. Hodge, D.R., Li, D., Qi, S.M. & Farrar, W.L. IL-6 induces expression of the Fli-1 proto-oncogene via STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 287-91 (2002).
140. Hodge, D. et al. A global role for EKLf in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood* **107**, 3359-3370 (2006).
141. Hollenhorst, P.C., Shah, A.A., Hopkins, C. & Graves, B.J. Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes Dev* **21**, 1882-94 (2007).
142. Homer, N., Merriman, B. & Nelson, S.F. BFAST: an alignment tool for large scale genome resequencing. *PLoS ONE* **4**, e7767 (2009).
143. Horn, H.F. & Vousden, K.H. Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene* **27**, 5774-5784 (2008).
144. Howard, J.C., Yousefi, S., Cheong, G., Bernstein, A. & Ben-David, Y. Temporal order and functional analysis of mutations within the Fli-1 and p53 genes during the erythroleukemias induced by F-MuLV. *Oncogene* **8**, 2721-9 (1993).
145. Howard, J.C., Berger, L., Bani, M.R., Hawley, R.G. & Ben-David, Y. Activation of the erythropoietin gene in the majority of F-MuLV-induced erythroleukemias results in growth factor independence and enhanced tumorigenicity. *Oncogene* **12**, 1405-15 (1996).
146. Hromas, R. et al. Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood* **82**, 2998-3004 (1993).
147. Hurt, E. et al. A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *J Cell Biol* **144**, 389-401 (1999).
148. Igarashi, K. et al. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature* **367**, 568-72 (1994).
149. Iritani, B.M. & Eisenman, R.N. c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13180-5 (1999).
150. Itahana, K. et al. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* **12**, 1151-64 (2003).
151. Jackson, A.L. et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol* **21**, 635-637 (2003).
152. Jayshree, R.S., Sreenivas, A., Tessy, M. & Krishna, S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J. Med. Res* **130**, 286-295 (2009).
153. Jelacic, T.M. et al. The tyrosine kinase sf-Stk and its downstream signals are required for maintenance of friend spleen focus-forming virus-induced fibroblast transformation. *J Virol* **82**, 419-27 (2008).
154. Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K. & Zhang, Y. Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol* **24**, 7669-80 (2004).
155. Johnson, P., Chung, S. & Benchimol, S. Growth suppression of Friend virus-transformed erythroleukemia cells by p53 protein is accompanied by hemoglobin production and is sensitive to erythropoietin. *Mol Cell Biol* **13**, 1456-63 (1993).
156. Johnston, G.C., Pringle, J.R. & Hartwell, L.H. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* **105**, 79-98 (1977).
157. Jones, N.C. et al. Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat Med* **14**, 125-33 (2008).
158. Jorgensen, P. et al. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* **18**, 2491-505 (2004).
159. Juban, G. et al. Spi-1 and Fli-1 directly activate common target genes involved in ribosome biogenesis in Friend erythroleukemic cells. *Mol. Cell. Biol* **29**, 2852-2864 (2009).

160. Kawada, H. et al. Defective megakaryopoiesis and abnormal erythroid development in Fli-1 gene-targeted mice. *Int J Hematol* **73**, 463-8 (2001).
161. Kawamoto, H., Wada, H. & Katsura, Y. A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. *Int Immunol* **22**, 65-70 (2010).
162. Kim, S., Li, Q., Dang, C.V. & Lee, L.A. Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11198-202 (2000).
163. Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M. & Kiss, T. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* **85**, 1077-88 (1996).
164. Krebs, A., Frontini, M. & Tora, L. GPAT: retrieval of genomic annotation from large genomic position datasets. *BMC Bioinformatics* **9**, 533 (2008).
165. Kressler, D., Hurt, E. & Bassler, J. Driving ribosome assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 673-683 (2010).
166. Lafontaine, D.L. & Tollervey, D. Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNPs. *Mol Cell Biol* **20**, 2650-9 (2000).
167. Lai, K. et al. Many ribosomal protein mutations are associated with growth impairment and tumor predisposition in zebrafish. *Dev. Dyn* **238**, 76-85 (2009).
168. Lai, M. & Xu, J. Ribosomal proteins and colorectal cancer. *Curr. Genomics* **8**, 43-49 (2007).
169. Lakhanpal, G.K. et al. The inositol phosphatase SHIP-1 is negatively regulated by Fli-1 and its loss accelerates leukemogenesis. *Blood* **116**, 428-36 (2010).
170. Lane, B.G., Ofengand, J. & Gray, M.W. Pseudouridine and O²'-methylated nucleosides. Significance of their selective occurrence in rRNA domains that function in ribosome-catalyzed synthesis of the peptide bonds in proteins. *Biochimie* **77**, 7-15 (1995).
171. Lau, J. et al. Ubiquitination of HEXIM1 by HDM2. *Cell Cycle* **8**, 2247-2254 (2009).
172. Lebigot, I. et al. Up-regulation of SLAP in FLI-1-transformed erythroblasts interferes with EpoR signaling. *Blood* **102**, 4555-62 (2003).
173. Lefevre, P., Melnik, S., Wilson, N., Riggs, A.D. & Bonifer, C. Developmentally regulated recruitment of transcription factors and chromatin modification activities to chicken lysozyme cis-regulatory elements in vivo. *Mol. Cell. Biol* **23**, 4386-4400 (2003).
174. Lefterova, M.I. et al. Cell-specific determinants of peroxisome proliferator-activated receptor gamma function in adipocytes and macrophages. *Mol. Cell. Biol* **30**, 2078-2089 (2010).
175. Lenox, L.E., Perry, J.M. & Paulson, R.F. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood* **105**, 2741-8 (2005).
176. Lesault, I., Quang, C.T., Frampton, J. & Ghysdael, J. Direct regulation of BCL-2 by FLI-1 is involved in the survival of FLI-1-transformed erythroblasts. *EMBO J* **21**, 694-703 (2002).
177. Lesault, Isabelle Quang, Christine Tran Frampton, Jon Ghysdael, Jacques Research.
178. Rearrangement of the FLI-1 locus with ensuing overexpression of FLI-1 is an earl.
179. query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11847117. à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11847117>
180. Lessard, F. et al. The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I. *Mol Cell* **38**, 539-50 (2010).
181. Levin, J. et al. Pathophysiology of thrombocytopenia and anemia in mice lacking transcription factor NF-E2. *Blood* **94**, 3037-47 (1999).

182. Li, Y.J. et al. p45(NFE2) is a negative regulator of erythroid proliferation which contributes to the progression of Friend virus-induced erythroleukemias. *Mol Cell Biol* **21**, 73-80 (2001).
183. Li, Z., Boone, D. & Hann, S.R. Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 18794-18799 (2008).
184. Li, H., Kim, J. & Waldman, T. Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiat Oncol* **4**, 43 (2009).
185. Lin, C.S., Lim, S.K., D'Agati, V. & Costantini, F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* **10**, 154-64 (1996).
186. Lindström, M.S. Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **379**, 167-170 (2009).
187. Lindstrom, M.S., Jin, A., Deisenroth, C., White Wolf, G. & Zhang, Y. Cancer-associated mutations in the MDM2 zinc finger domain disrupt ribosomal protein interaction and attenuate MDM2-induced p53 degradation. *Mol Cell Biol* **27**, 1056-68 (2007).
188. Lindstrom, M.S. & Nister, M. Silencing of ribosomal protein S9 elicits a multitude of cellular responses inhibiting the growth of cancer cells subsequent to p53 activation. *PLoS One* **5**, e9578 (2010).
189. Lipton, J.M. Diamond blackfan anemia: New paradigms for a "not so pure" inherited red cell aplasia. *Semin Hematol* **43**, 167-77 (2006).
190. Liu, Y. et al. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* **108**, 123-33 (2006).
191. Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M. & Vousden, K.H. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* **3**, 577-87 (2003).
192. Long, E.O. & Dawid, I.B. Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **49**, 727-64 (1980).
193. Lu, S.J., Rowan, S., Bani, M.R. & Ben-David, Y. Retroviral integration within the Fli-2 locus results in inactivation of the erythroid transcription factor NF-E2 in Friend erythroleukemias: evidence that NF-E2 is essential for globin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8398-402 (1994).
194. Maandag, E.C. et al. Developmental rescue of an embryonic-lethal mutation in the retinoblastoma gene in chimeric mice. *EMBO J* **13**, 4260-8 (1994).
195. MacDonald, M.E., Mak, T.W. & Bernstein, A. Erythroleukemia induction by replication-competent type C viruses cloned from the anemia- and polycythemia-inducing isolates of Friend leukemia virus. *J. Exp. Med* **151**, 1493-1503 (1980).
196. Macias, E. et al. An ARF-Independent c-MYC-Activated Tumor Suppression Pathway Mediated by Ribosomal Protein-Mdm2 Interaction. *Cancer Cell* **18**, 231-243 (2010).
197. Maden, B.E. The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **39**, 241-303 (1990).
198. Mao, X., Miesfeldt, S., Yang, H., Leiden, J.M. & Thompson, C.B. The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities. *J Biol Chem* **269**, 18216-22 (1994).
199. Marchal, J.A. et al. Actinomycin D treatment leads to differentiation and inhibits proliferation in rhabdomyosarcoma cells. *J Lab Clin Med* **130**, 42-50 (1997).
200. Marqués-García, F. et al. p73 plays a role in erythroid differentiation through GATA1 induction. *J. Biol. Chem* **284**, 21139-21156 (2009).
201. Marshall, L., Kenneth, N.S. & White, R.J. Elevated tRNA(iMet) synthesis can drive cell proliferation and oncogenic transformation. *Cell* **133**, 78-89 (2008).

202. Matsuda, R. et al. Expression of the c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol* **142**, 339-46 (1993).
203. Matsumoto, S., Miyagishi, M., Akashi, H., Nagai, R. & Taira, K. Analysis of double-stranded RNA-induced apoptosis pathways using interferon-response noninducible small interfering RNA expression vector library. *J. Biol. Chem* **280**, 25687-25696 (2005).
204. Matushansky, I., Radparvar, F. & Skoultchi, A.I. CDK6 blocks differentiation: coupling cell proliferation to the block to differentiation in leukemic cells. *Oncogene* **22**, 4143-9 (2003).
205. Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X. & Grummt, I. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* **18**, 423-34 (2004).
206. Mayer, C. & Grummt, I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* **25**, 6384-6391 (2006).
207. McGowan, K.A. et al. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet* **40**, 963-70 (2008).
208. McKercher, S.R. et al. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* **15**, 5647-58 (1996).
209. Meier, U.T. & Blobel, G. NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J Cell Biol* **127**, 1505-14 (1994).
210. Mendell, J.T. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* **133**, 217-222 (2008).
211. Menssen, A. & Hermeking, H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 6274-6279 (2002).
212. Merchionne, F. & Dammacco, F. Biological functions and therapeutic use of erythropoiesis-stimulating agents: perplexities and perspectives. *Br. J. Haematol* **146**, 127-141 (2009).
213. Mirand, E.A., Hoffman, J.G., Grace, J.T. & Trudel, P.J. Modification of the Friend virus disease by splenectomy. *Proc Soc Exp Biol Med* **107**, 824-8 (1961).
214. Miyake, K. et al. Development of cellular models for ribosomal protein S19 (RPS19)-deficient diamond-blackfan anemia using inducible expression of siRNA against RPS19. *Mol. Ther* **11**, 627-637 (2005).
215. Montagne, J. et al. Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* **285**, 2126-9 (1999).
216. Montanaro, L. et al. Different effects of ribosome biogenesis inhibition on cell proliferation in retinoblastoma protein- and p53-deficient and proficient human osteosarcoma cell lines. *Cell Prolif* **40**, 532-49 (2007).
217. Moreau-Gachelin, F. Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. *Retrovirology* **5**, 99 (2008).
218. Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A. & Tambourin, P. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* **331**, 277-80 (1988).
219. Moreau-Gachelin, F., Ray, D., Mattei, M.G., Tambourin, P. & Tavitian, A. The putative oncogene Spi-1: murine chromosomal localization and transcriptional activation in murine acute erythroleukemias. *Oncogene* **4**, 1449-56 (1989).
220. Moreau-Gachelin, F. et al. Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol Cell Biol* **16**, 2453-63 (1996).
221. Mosgoeller, W. et al. Ribosomal gene transcription is organized in foci within nucleolar components. *Histochem Cell Biol* **109**, 111-8 (1998).

222. Munroe, D.G., Rovinski, B., Bernstein, A. & Benchimol, S. Loss of a highly conserved domain on p53 as a result of gene deletion during Friend virus-induced erythroleukemia. *Oncogene* **2**, 621-4 (1988).
223. Munroe, D.G., Peacock, J.W. & Benchimol, S. Inactivation of the cellular p53 gene is a common feature of Friend virus-induced erythroleukemia: relationship of inactivation to dominant transforming alleles. *Mol Cell Biol* **10**, 3307-13 (1990).
224. Munugalavadla, V. & Kapur, R. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol* **54**, 63-75 (2005).
225. Narla, A. & Ebert, B.L. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* **115**, 3196-205 (2010).
226. Nerlov, C., Querfurth, E., Kulesa, H. & Graf, T. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* **95**, 2543-51 (2000).
227. Ney, P.A. & D'Andrea, A.D. Friend erythroleukemia revisited. *Blood* **96**, 3675-80 (2000).
228. Ni, J., Tien, A.L. & Fournier, M.J. Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* **89**, 565-73 (1997).
229. Nishigaki, K., Thompson, D., Hanson, C., Yugawa, T. & Ruscetti, S. The envelope glycoprotein of friend spleen focus-forming virus covalently interacts with and constitutively activates a truncated form of the receptor tyrosine kinase Stk. *J Virol* **75**, 7893-903 (2001).
230. Noguchi, C.T., Wang, L., Rogers, H.M., Teng, R. & Jia, Y. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage. *Expert Rev Mol Med* **10**, e36 (2008).
231. O'Donohue, M., Choessel, V., Faubladiere, M., Fichant, G. & Gleizes, P. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *J. Cell Biol* **190**, 853-866 (2010).
232. Olson, M.O., Wallace, M.O., Herrera, A.H., Marshall-Carlson, L. & Hunt, R.C. Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. *Biochemistry* **25**, 484-91 (1986).
233. Ozenne, P., Eymin, B., Brambilla, E. & Gazzeri, S. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int. J. Cancer* **127**, 2239-2247 (2010).
234. Pebernard, S. & Iggo, R.D. Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation* **72**, 103-111 (2004).
235. Peller, S. et al. The onset of p53-dependent apoptosis plays a role in terminal differentiation of human normoblasts. *Oncogene* **22**, 4648-55 (2003).
236. Pereira, R. et al. FLI-1 inhibits differentiation and induces proliferation of primary erythroblasts. *Oncogene* **18**, 1597-608 (1999).
237. Pereira, R., Raingeaud, J., Pironin, M., Ghysdael, J. & Quang, C.T. SPI-1 transforming properties depend upon specifically activated forms of the EPOR. *Oncogene* **19**, 5106-10 (2000).
238. Perry, R.P. The architecture of mammalian ribosomal protein promoters. *BMC Evol. Biol* **5**, 15 (2005).
239. Perry, J.M., Harandi, O.F. & Paulson, R.F. BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood* **109**, 4494-502 (2007).
240. Perry, J.M. et al. Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. *Blood* **113**, 911-918 (2009).
241. Persons, D.A. et al. Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase. *Nat Genet* **23**, 159-65 (1999).

242. Pestov, D.G., Strezoska, Z. & Lau, L.F. Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol* **21**, 4246-55 (2001).
243. Pich, A., Chiusa, L. & Margaria, E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* **31**, 133-41 (2000).
244. Pinol-Roma, S. & Dreyfuss, G. Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science* **253**, 312-4 (1991).
245. Ploton, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* **18**, 5-14 (1986).
246. Polevoda, B. & Sherman, F. Methylation of proteins involved in translation. *Mol. Microbiol* **65**, 590-606 (2007).
247. Powers, T. & Walter, P. Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**, 987-1000 (1999).
248. Prasher, J.M., Elenitoba-Johnson, K.S. & Kelley, L.L. Loss of p53 tumor suppressor function is required for in vivo progression of Friend erythroleukemia. *Oncogene* **20**, 2946-55 (2001).
249. Preti, M. et al. The telomere-binding protein Tbf1 demarcates snoRNA gene promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **38**, 614-620 (2010).
250. Quang, C.T., Wessely, O., Pironin, M., Beug, H. & Ghysdael, J. Cooperation of Spi-1/PU.1 with an activated erythropoietin receptor inhibits apoptosis and Epo-dependent differentiation in primary erythroblasts and induces their Kit ligand-dependent proliferation. *EMBO J* **16**, 5639-53 (1997).
251. Quarello, P. et al. Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica* **95**, 206-13 (2010).
252. Raska, I., Koberna, K., Malinsky, J., Fidlerova, H. & Masata, M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* **96**, 579-94 (2004).
253. Ray-Gallet, D., Mao, C., Tavitian, A. & Moreau-Gachelin, F. DNA binding specificities of Spi-1/PU.1 and Spi-B transcription factors and identification of a Spi-1/Spi-B binding site in the *c-fes/c-fps* promoter. *Oncogene* **11**, 303-313 (1995).
254. Reiter, A.K., Anthony, T.G., Anthony, J.C., Jefferson, L.S. & Kimball, S.R. The mTOR signaling pathway mediates control of ribosomal protein mRNA translation in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2169-79 (2004).
255. Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T. & Skoultchi, A.I. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* **13**, 1398-411 (1999).
256. Rekhtman, N. et al. PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 7460-74 (2003).
257. Rey, M.A. et al. Enhanced alternative splicing of the FLVCR1 gene in Diamond Blackfan anemia disrupts FLVCR1 expression and function that are critical for erythropoiesis. *Haematologica* **93**, 1617-1626 (2008).
258. Ribeil, J.A. et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102-5 (2007).
259. Rimmelé, P. et al. Spi-1/PU.1 oncogene accelerates DNA replication fork elongation and promotes genetic instability in the absence of DNA breakage. *Cancer Res* **70**, 6757-6766 (2010).
260. Rodriguez, P. et al. Isolation of transcription factor complexes by in vivo biotinylation tagging and direct binding to streptavidin beads. *Methods Mol. Biol* **338**, 305-323 (2006).

261. Rouquette, J., Choismel, V. & Gleizes, P.E. Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *EMBO J* **24**, 2862-72 (2005).
262. Rout, M.P., Blobel, G. & Aitchison, J.D. A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* **89**, 715-25 (1997).
263. Rubbi, C.P. & Milner, J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J* **22**, 6068-77 (2003).
264. Ruggero, D. & Pandolfi, P.P. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* **3**, 179-92 (2003).
265. Ruscetti, S.K. Deregulation of erythropoiesis by the Friend spleen focus-forming virus. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1089-109 (1999).
266. Ruscetti, S.K., Feild, J.A. & Scolnick, E.M. Polycythaemia- and anaemia-inducing strains of spleen focus-forming virus differ in post-translational processing of envelope-related glycoproteins. *Nature* **294**, 663-5 (1981).
267. Ruvinsky, I. et al. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev* **19**, 2199-211 (2005).
268. Savkur, R.S. & Olson, M.O. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* **26**, 4508-15 (1998).
269. Scheer, U. & Hock, R. Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 385-90 (1999).
270. Scherl, A. et al. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell* **13**, 4100-9 (2002).
271. Schuetze, S., Stenberg, P.E. & Kabat, D. The Ets-related transcription factor PU.1 immortalizes erythroblasts. *Mol Cell Biol* **13**, 5670-8 (1993).
272. Scott, E.W. et al. PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity* **6**, 437-47 (1997).
273. Sels, F.T. et al. Friend murine leukaemia virus is integrated at a common site in most primary spleen tumours of erythroleukaemic animals. *Oncogene* **7**, 643-652 (1992).
274. Sharov, A.A. & Ko, M.S.H. Exhaustive search for over-represented DNA sequence motifs with CisFinder. *DNA Res* **16**, 261-273 (2009).
275. Shibuya, T. & Mak, T.W. Isolation and induction of erythroleukemic cell lines with properties of erythroid progenitor burst-forming cell (BFU-E) and erythroid precursor cell (CFU-E). *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3721-5 (1983).
276. Sieff, C.A., Yang, J., Merida-Long, L.B. & Lodish, H.F. Pathogenesis of the erythroid failure in Diamond Blackfan anaemia. *Br. J. Haematol* **148**, 611-622 (2010).
277. Silvera, D., Formenti, S.C. & Schneider, R.J. Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 254-266 (2010).
278. Sitbon, M., Evans, L., Nishio, J., Wehrly, K. & Chesebro, B. Analysis of two strains of Friend murine leukemia viruses differing in ability to induce early splenomegaly: lack of relationship with generation of recombinant mink cell focus-forming viruses. *J Virol* **57**, 389-93 (1986).
279. Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. & Williams, B.R.G. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol* **5**, 834-839 (2003).
280. Smetana, K., Gyorkey, F., Gyorkey, P. & Busch, H. Studies on nucleoli of maturing human erythroblasts. *Exp Cell Res* **91**, 143-51 (1975).
281. Song, M.J. et al. A novel initiation codon mutation in the ribosomal protein S17 gene (RPS17) in a patient with Diamond-Blackfan anemia. *Pediatr Blood Cancer* **54**, 629-31 (2010).

282. Spyropoulos, D.D. et al. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* **20**, 5643-52 (2000).
283. Starck, J. et al. Spi-1/PU.1 is a positive regulator of the Fli-1 gene involved in inhibition of erythroid differentiation in friend erythroleukemic cell lines. *Mol Cell Biol* **19**, 121-35 (1999).
284. Starck, J. et al. Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol Cell Biol* **23**, 1390-402 (2003).
285. Starck, J. et al. Inducible fli-1 gene deletion in adult mice modifies several myeloid lineage commitment decisions and accelerates proliferation arrest and terminal erythrocytic differentiation. *Blood* (2010).doi:10.1182/blood-2010-02-270405
286. Starczynowski, D.T. et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med* **16**, 49-58 (2010).
287. Starczynowski, D.T. & Karsan, A. Deregulation of innate immune signaling in myelodysplastic syndromes is associated with deletion of chromosome arm 5q. *Cell Cycle* **9**, 855-6 (2010).
288. Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. & Schreiber, R.D. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem* **67**, 227-264 (1998).
289. Stopka, T., Amanatullah, D.F., Papetti, M. & Skoultschi, A.I. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J* **24**, 3712-23 (2005).
290. Stott, F.J. et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* **17**, 5001-14 (1998).
291. Stoykova, A.S., Dabeva, M.D., Dimova, R.N. & Hadjiolov, A.A. Ribosome biogenesis and nucleolar ultrastructure in neuronal and oligodendroglial rat brain cells. *J Neurochem* **45**, 1667-76 (1985).
292. Strimpakos, A.S., Karapanagiotou, E.M., Saif, M.W. & Syrigos, K.N. The role of mTOR in the management of solid tumors: an overview. *Cancer Treat. Rev* **35**, 148-159 (2009).
293. Subramanian, A., Teal, H.E., Correll, P.H. & Paulson, R.F. Resistance to friend virus-induced erythroleukemia in W/W(v) mice is caused by a spleen-specific defect which results in a severe reduction in target cells and a lack of Sf-Stk expression. *J Virol* **79**, 14586-94 (2005).
294. Subramanian, A. et al. Friend virus utilizes the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway to induce erythroleukemia. *J Virol* **82**, 382-93 (2008).
295. Sugimoto, M., Kuo, M.L., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol Cell* **11**, 415-24 (2003).
296. Sun, X.X., Dai, M.S. & Lu, H. 5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction. *J Biol Chem* **282**, 8052-9 (2007).
297. Sundqvist, A., Liu, G., Mirsaliotis, A. & Xirodimas, D.P. Regulation of nucleolar signalling to p53 through NEDDylation of L11. *EMBO Rep* **10**, 1132-1139 (2009).
298. Tambourin, P.E., Gallien-Lartigue, O., Wendling, F. & Huaulme, D. Erythrocyte production in mice infected by the polycythaemia-inducing Friend virus or by the anaemia-inducing Friend virus. *Br J Haematol* **24**, 511-24 (1973).
299. Tamir, A. et al. Fli-1, an Ets-related transcription factor, regulates erythropoietin-induced erythroid proliferation and differentiation: evidence for direct transcriptional repression of the Rb gene during differentiation. *Mol Cell Biol* **19**, 4452-64 (1999).
300. Tamir, A. et al. Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: a role for p27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest. *Cell Growth Differ* **11**, 269-77 (2000).

301. Terada, M. et al. Induction of murine erythroleukemia differentiation by actinomycin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **75**, 2795-2799 (1978).
302. Theoleyre, O. et al. Spi-1/PU.1 but not Fli-1 inhibits erythroid-specific alternative splicing of 4.1R pre-mRNA in murine erythroleukemia cells. *Oncogene* **23**, 920-7 (2004).
303. Truong, A.H., Cervi, D., Lee, J. & Ben-David, Y. Direct transcriptional regulation of MDM2 by Fli-1. *Oncogene* **24**, 962-9 (2005).
304. Truong, A.H. & Ben-David, Y. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* **19**, 6482-6489 (2000).
305. Tsang, C.K., Liu, H. & Zheng, X.F. mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. *Cell Cycle* **9**, 953-7 (2010).
306. Tschan, M.P. et al. PU.1 binding to the p53 family of tumor suppressors impairs their transcriptional activity. *Oncogene* **27**, 3489-93 (2008).
307. Turano, M. et al. Increased HEXIM1 expression during erythroleukemia and neuroblastoma cell differentiation. *J. Cell. Physiol* **206**, 603-610 (2006).
308. Vaarala, M.H. et al. Several genes encoding ribosomal proteins are over-expressed in prostate-cancer cell lines: confirmation of L7a and L37 over-expression in prostate-cancer tissue samples. *Int J Cancer* **78**, 27-32 (1998).
309. Valdez, B.C., Henning, D., So, R.B., Dixon, J. & Dixon, M.J. The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 10709-10714 (2004).
310. van de Wetering, M. et al. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* **4**, 609-615 (2003).
311. van Riggelen, J., Yetil, A. & Felsher, D.W. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 301-309 (2010).
312. Viens, A., Mechold, U., Lehrmann, H., Harel-Bellan, A. & Ogryzko, V. Use of protein biotinylation in vivo for chromatin immunoprecipitation. *Anal. Biochem* **325**, 68-76 (2004).
313. Voit, R., Schäfer, K. & Grummt, I. Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol* **17**, 4230-4237 (1997).
314. Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D. & Handa, H. Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *EMBO J* **17**, 7395-7403 (1998).
315. Warner, J.R. Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev* **53**, 256-271 (1989).
316. Warner, J.R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* **24**, 437-40 (1999).
317. Warner, J.R. & Johnson, S.P. Molecular inventory control in ribosome biosynthesis. *Microbiol. Sci* **3**, 341-344 (1986).
318. Warner, J.R. & McIntosh, K.B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol. Cell* **34**, 3-11 (2009).
319. Wasylyk, B., Hahn, S.L. & Giovane, A. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* **211**, 7-18 (1993).
320. Weber, J.D. et al. p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* **14**, 2358-65 (2000).
321. Wei, C. et al. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* **124**, 207-219 (2006).
322. Wei, G.H. et al. Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo. *EMBO J* **29**, 2147-60 (2010).

323. Welch, J.J. et al. Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood* **104**, 3136-47 (2004).
324. Wilbanks, E.G. & Facciotti, M.T. Evaluation of algorithm performance in ChIP-seq peak detection. *PLoS ONE* **5**, e11471 (2010).
325. Wilson, N.K. et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* **7**, 532-544 (2010).
326. Winning, R.S. & Browder, L.W. Changes in heat shock protein synthesis and hsp70 gene transcription during erythropoiesis of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **128**, 111-20 (1988).
327. Wojchowski, D.M. et al. Erythropoietin-dependent erythropoiesis: New insights and questions. *Blood Cells Mol. Dis* **36**, 232-238 (2006).
328. Wong, K.S., Li, Y.J., Howard, J. & Ben-David, Y. Loss of p53 in F-MuLV induced-erythroleukemias accelerates the acquisition of mutational events that confers immortality and growth factor independence. *Oncogene* **18**, 5525-34 (1999).
329. Wu, H., Klingmuller, U., Besmer, P. & Lodish, H.F. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* **377**, 242-6 (1995).
330. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. & Lodish, H.F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83**, 59-67 (1995).
331. Xirodimas, D.P. et al. Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO Rep* **9**, 280-286 (2008).
332. Xu, D., Dwyer, J., Li, H., Duan, W. & Liu, J. Ets2 maintains hTERT gene expression and breast cancer cell proliferation by interacting with c-Myc. *J. Biol. Chem* **283**, 23567-23580 (2008).
333. Yamaguchi, Y. et al. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* **97**, 41-51 (1999).
334. Yik, J.H.N. et al. Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol. Cell* **12**, 971-982 (2003).
335. Yu, Y. et al. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol Cell Biol* **26**, 3798-809 (2006).
336. Zebarjadian, Y., King, T., Fournier, M.J., Clarke, L. & Carbon, J. Point mutations in yeast CBF5 can abolish in vivo pseudouridylation of rRNA. *Mol Cell Biol* **19**, 7461-72 (1999).
337. Zemp, I. & Kutay, U. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett* **581**, 2783-2793 (2007).
338. Zermati, Y. et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* **193**, 247-54 (2001).
339. Zeuner, A. et al. The Notch2-Jagged1 interaction mediates stem cell factor signaling in erythropoiesis. *Cell Death Differ* (2010).doi:10.1038/cdd.2010.110
340. Zhai, W. & Comai, L. Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* **20**, 5930-8 (2000).
341. Zhang, L. et al. An immunological renal disease in transgenic mice that overexpress Fli-1, a member of the ets family of transcription factor genes. *Mol Cell Biol* **15**, 6961-70 (1995).
342. Zhang, Y. et al. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* **23**, 8902-12 (2003).

343. Zhang, Y. et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* **9**, R137 (2008).
344. Zhang, Y. & Lu, H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* **16**, 369-377 (2009).
345. Zhang, Y. & Xiong, Y. Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol Cell* **3**, 579-91 (1999).
346. Zhou, B.P. et al. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol* **3**, 973-982 (2001).
347. Zindy, F. et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* **12**, 2424-33 (1998).

DISCIPLINE : Biologie cellulaire et moléculaire

TITRE : Mise en évidence de gènes cibles directs communs à FLI-1 et à SPI-1/PU.1 dans les érythroleucémies de Friend

RÉSUMÉ en français

Les facteurs de transcription FLI-1 et SPI-1/PU.1 appartiennent à la famille ETS et reconnaissent le même motif sur l'ADN GGAA. Leur activation est observée de manière récurrente dans les érythroleucémies murines induites par le virus de Friend. Ces observations suggèrent un rôle crucial de ces deux facteurs dans la transformation de la lignée érythrocytaire potentiellement par la dérégulation de gènes cibles communs. Mon travail de thèse a consisté à tester la contribution de ces deux facteurs au phénotype des cellules érythroleucémiques et à rechercher les gènes cibles directs communs.

Nous avons pu montrer que FLI-1 et SPI-1/PU.1 ont des contributions additives au phénotype des cellules érythroleucémiques surexprimant les deux facteurs. Par une approche transcriptomique, nous avons identifié une grande proportion de gènes cibles directs communs à FLI-1 et à SPI-1/PU.1 impliqués dans différentes étapes de la biogenèse des ribosomes. La déplétion de ces facteurs induit une réduction de la biogenèse des ribosomes qui n'induit pas de stress ribosomique stabilisant p53. Néanmoins, nous avons mis en évidence une contribution spécifique de RPL11, un médiateur essentiel du stress ribosomique, à la différenciation des cellules érythroleucémiques induites par l'absence de ces facteurs.

Nous avons mené en parallèle l'inventaire par ChIP-Seq des sites de recrutement de FLI-1 et de SPI-1/PU.1 sur le génome entier de 3 lignées érythroleucémiques indépendantes. Cette stratégie nous a permis de montrer que les régions de recrutement communes sont la conséquence de la proximité de consensus spécifiques et distincts et du recrutement de FLI-1 et de SPI-1/PU.1 sur leur propre consensus.

MOTS CLÉS : Érythroleucémie, Friend, Famille ETS, Facteurs de transcription, Ribosome, Immunoprécipitation de la chromatine

TITRE en anglais : FLI-1 and SPI-1/PU.1 ETS transcription factors share common direct target genes in Friend erythroleukemia

RÉSUMÉ en anglais

The transcription factors FLI-1 and SPI-1/PU.1 belong to the ETS family and recognize the same DNA motif GGAA. Their activation is recurrently observed in murine erythroleukemia induced by Friend virus. These observations suggest a crucial role of these two factors in erythroid lineage transformation potentially by deregulating common target genes. My thesis work consisted of testing both factors contribution to the phenotype of erythroleukemia cells and of searching for common direct target genes.

We showed that FLI-1 and SPI-1/PU.1 have additive contributions to the phenotype of erythroleukemia cells overexpressing both factors. By a transcriptomic approach, we identified a high proportion of common direct target genes of FLI-1 and SPI-1/PU.1 involved in ribosome biogenesis at different levels. The déplétion of these factors induced a decrease of ribosome number which doesn't induce a ribosomal stress leading to the p53 stabilization. However, we highlighted a specific contribution of RPL11, an essential ribosomal stress mediator, in erythroleukemia cell differentiation induced by depletion of both factors.

In parallel, we mapped at whole genome scale by ChIP-Seq the recruitment site of FLI-1 and SPI-1/PU.1 in 3 independent erythroleukemia cell lines. This strategy allowed us to show that the common recruitment regions are the consequence of a very close association of clearly distinct and specific consensus binding sites for FLI-1 and SPI-1/PU.1 and that each of those factor is recruited to its own consensus.

Spi-1 and Fli-1 Directly Activate Common Target Genes Involved in Ribosome Biogenesis in Friend Erythroleukemic Cells^{∇†}

Gaëtan Juban,¹§ Guillaume Giraud,¹§ Boris Guyot,¹ Stéphane Belin,¹ Jean-Jacques Diaz,¹ Joëlle Starck,¹ Christel Guillouf,² Françoise Moreau-Gachelin,² and François Morlé^{1*}

Université de Lyon, Lyon F-69003, Université Lyon 1, Lyon F-69003, and CNRS, UMR5534, Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Villeurbanne F-69622, France,¹ and INSERM U830, Section de Recherche, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris F-75248, France²

Received 11 September 2008/Returned for modification 1 November 2008/Accepted 3 March 2009

Spi-1 and Fli-1 are ETS transcription factors recurrently deregulated in mouse erythroleukemia induced by Friend viruses. Since they share the same core DNA binding site, we investigated whether they may contribute to erythroleukemia by common mechanisms. Using inducible knockdown, we demonstrated that Fli-1 contributes to proliferation, survival, and differentiation arrest of erythroleukemic cells harboring an activated *fli-1* locus. Similarly, we used inducible Fli-1 knockdown and either hexamethylenebisacetamide (HMBA)- or small interfering RNA-mediated Spi-1 knockdown to investigate their respective contributions in erythroleukemic cells harboring an activated *spi-1* locus. In these cells, simple or double knockdown of both Spi-1 and Fli-1 additively contributed to induce proliferation arrest and differentiation. Transcriptome profiling revealed that virtually all transcripts affected by both Fli-1 knockdown and HMBA are affected in an additive manner. Among these additively downregulated transcripts, more than 20% encode proteins involved in ribosome biogenesis, and conserved ETS binding sites are present in their gene promoters. Through chromatin immunoprecipitation, we demonstrated the association of Spi-1 and Fli-1 on these promoters in Friend erythroleukemic cells. These data lead us to propose that the oncogenicity of Spi-1, Fli-1, and possibly other ETS transcription factors may involve their ability to stimulate ribosome biogenesis.

Friend erythroleukemia has been a powerful model for dissection of how multiple oncogenes cooperate to initiate and maintain leukemic transformation. The Friend viral complex contains a replication-defective spleen focus-forming virus (SFFV) and a replication-competent Friend murine leukemia virus (F-MuLV). It induces a multistep erythroleukemic process in susceptible mice (8, 33, 50). SFFV virus is the pathogenic component responsible for this acute erythroleukemia. During the early stage of the disease, the product of the SFFV *env* gene, gp55, interacts with the erythropoietin receptor (Epo-R) and constitutively activates signaling pathways allowing the proliferation of proerythroblasts still able to differentiate in the absence of Epo. During this early step, the activation of signaling pathways allowing proerythroblast proliferation is also strictly dependent on the c-Kit receptor and on the small form of the STK receptor tyrosine kinase (20, 57). The second stage of the disease is characterized by a clonal population outgrowth of leukemic proerythroblasts blocked in their differentiation and able to grow as permanent cell lines in vitro. Virtually all tumors display SFFV proviral integration upstream of the *Spi-1/PU.1* gene, leading to overexpression of the normal transcription factor Spi-1/PU.1 (hereinafter called Spi-1). It is now well established that the dysregulation of Spi-1 expression is a critical event in the process of SFFV-induced erythroleukemia.

Indeed, the terminal erythroid differentiation can be reinitiated in Friend tumor cells by chemical inducers such as hexamethylenebisacetamide (HMBA). This differentiation is associated with a decrease in Spi-1 levels (18, 24, 27, 51), and it can be reversed by Spi-1-enforced expression (43, 64). Similarly, enforced expression of Spi-1 together with both gp55 and constitutively activated Epo-R inhibits differentiation of avian erythroid progenitors (42). Furthermore, transgenic mice overexpressing *Spi-1* spontaneously develop an erythroleukemia characterized by an Epo-dependent proliferation of proerythroblasts blocked in their differentiation (38). Spi-1 knockdown induced by RNA interference is sufficient to inhibit proliferation and restore terminal erythroid differentiation of erythroleukemic cell lines established from either SFFV-infected (4) or Spi-1 transgenic mice (47). At least one contribution of Spi-1 overexpression to erythroleukemia is through the inhibition of GATA-1 transcriptional activity (39, 45, 46, 67). Indeed, enforced expression of GATA-1 is sufficient to restore the differentiation of SFFV-infected erythroleukemic cells (13, 45, 46). Recent data have shown that Spi-1 inhibits expression of some GATA-1 target genes by binding to GATA-1 on transcriptional promoters and creating a repressive chromatin structure through the recruitment of pRB, the histone methylase SUV39h, and the heterochromatin protein HP1 α (55). However, although this mechanism might explain the contribution of Spi-1 to the repression of erythroid-specific GATA-1-dependent gene transcription, the contribution of Spi-1 to the proliferation of erythroleukemic cells remains poorly understood.

The replication-competent F-MuLV itself also induces clonal erythroleukemia when injected into newborn mice. In 75% of these tumors, F-MuLV provirus integrates upstream of the *Fli-1* gene, leading to Fli-1 transcription factor overexpression (9, 62).

* Corresponding author. Mailing address: Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 5534, Université Lyon 1, 16 rue Dubois, 69 622 Villeurbanne, France. Phone: 33 (0)4 72 43 36 37. Fax: 33 (0)4 72 43 26 85. E-mail: morle@univ-lyon1.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

§ Contributed equally to this work.

∇ Published ahead of print on 16 March 2009.

We and others have shown that enforced expression of Fli-1 in erythroleukemic cell lines is sufficient to inhibit proliferation arrest and terminal differentiation induced either by chemicals or by SCF withdrawal (54, 60, 68). Others have also shown that enforced expression of Fli-1 in avian erythroid progenitors induces their survival and proliferation and impedes their differentiation in response to Epo (3, 34, 40). These data strongly suggest that Fli-1 contributes to survival and proliferation of F-MuLV-infected erythroleukemic cells blocked in their differentiation. The antiapoptotic *bcl2* gene, known as a direct target gene of Fli-1, may contribute to the survival of erythroleukemic cells that overexpress Fli-1 (34). Furthermore, several studies suggest that Fli-1 overexpression in erythroid cells interferes with Epo-R signaling (32). Our own studies have shown that *Fli-1* is a direct transcriptional target for Spi-1 in SFFV-infected erythroleukemic cells (54) and that Fli-1 behaves as a functional antagonist of EKLF in transactivation assays, further suggesting that Fli-1 might also contribute to the inhibition of erythroid differentiation through the repression of EKLF target genes (53). Altogether, these data indicate that either Spi-1 or Fli-1 overexpression can induce survival and proliferation and inhibit the differentiation of erythroid precursors.

Ribosome biogenesis is a highly ordered process responsible for the production of ribosome, the central protein synthesis factory of the cell (22). This process involves many different events taking place in the nucleolus: the transcription of rRNA genes by RNA polymerases I and III, the cleavage of primary rRNA transcripts into mature rRNA, their modification by methylation or pseudouridylation at more than 150 specific positions, and their assembly with ribosomal proteins (26). All of these events require the coordinated action of more than 170 nucleolar proteins mainly involved in ribosomal rRNA synthesis, cleavage, and posttranscriptional modifications (15) with the help of many snoRNAs. According to our present knowledge, the rate of ribosome biogenesis is determined mainly by the rate of rRNA synthesis and maturation, whereas ribosomal proteins that are produced in excess are rapidly degraded by the proteasome (15). Most cancer cells are characterized by increased ribosome biogenesis, as evidenced by the frequent observation of hypertrophied nucleoli. Although it was initially considered only a consequence of the high proliferation rate of cancer cells, increasing evidence indicates that increased ribosome biogenesis can actively contribute to cell transformation (37, 49). This possibility is supported by the recent demonstration that well-known antioncogenes, like those encoding p53 and RB, as well as proto-oncogenes, like that encoding c-Myc, either repress or activate ribosome biogenesis, respectively. For example, c-Myc not only directly stimulates RNA polymerase I and III activity but also directly activates the transcription of most of the genes involved in ribosome biogenesis through its direct binding to their proximal promoters (16). Furthermore, a very recent study showed that c-Myc oncogenicity can be reversed by ribosomal protein haploinsufficiency (6). Interestingly, ribosomal protein gene promoters are also characterized by an overrepresentation of binding sites for YY1, SP1, and ETS family transcription factors (41). More recently, whole-genome chromatin immunoprecipitation (ChIP)-chip analyses with human cells revealed that many ribosome-related gene promoters are indeed bound

by YY1 (63) and SP1 (44) and by three members of the ETS family (ETS1, ELF1, and GABP α) (28).

Remarkably, Spi-1 and Fli-1, which are both recurrently involved in erythroleukemia, belong to the same ETS family. As such, they recognize the same core DNA binding motif, GGAA/G, raising the intriguing possibility that their contribution to erythroleukemia might be mediated through the transcriptional deregulation of a common set of genes. In the present study, we addressed this possibility by exploring the consequences of simple or double Spi-1 and Fli-1 knockdown for the proliferation, survival, and differentiation of F-MuLV- or SFFV-induced erythroleukemic cells. We found that Spi-1 and Fli-1 knockdowns additively contribute to induce proliferation arrest and differentiation in SFFV cells. By combining transcriptome profiling and chromatin immunoprecipitation analyses, we determined that this additive effect of Spi-1 and Fli-1 is associated with the additive decrease in the expression of a common set of genes involved in ribosome biogenesis whose promoters are bound by both Spi-1 and Fli-1 in SFFV cells and by Fli-1 in F-MuLV cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, culture, and transfection. Mouse erythroleukemic cell clone 745A, harboring SFFV proviral integration upstream of *Spi-1* (54), mouse erythroleukemic cell clone NN10, harboring F-MuLV proviral integration upstream of *Fli-1* (14, 54), and all of their derivatives were cultured at 37°C under 5% CO₂ in a humidified incubator and in Iscove's modified Dulbecco's medium (PAA Laboratories, Les Mureaux, France) supplemented with 10% fetal calf serum (PAA Laboratories) and antibiotics. The NN10/TR and 745A/TR cell lines, stably expressing high levels of the Tet^r repressor, were established by transfection of NN10 or 745A cells with the pcDNA6-TR-EF-1 α vector (47) followed by blasticidin selection. NN10 clones harboring doxycycline (Dox)-inducible expression of either one of two short hairpin RNAs (shRNAs) (*fli1_749* or *fli1_1508*) targeting two different specific regions of Fli-1 mRNA (with no homology to any other ETS mRNA) or of control shRNA (SCR) with scrambled sequence were established by transfection of NN10/TR cells with pGJ10/sh*fli1_749* (NN10 clone 5), pGJ10/sh*fli1_1508* (NN10 clones 10 and 23), or pGJ10/scr vector (NN10 clones 3B10, 3E9, and 1C6), followed by G418 selection. Similarly, 745A clones harboring Dox-inducible shRNA were established by transfection of 745A/TR cells with pGJ10/sh*fli1_749* (745A clone 44), pGJ10/sh*fli1_1508* (745A clone 1), or pGJ10/scr vector (745A clones 1A1, 1D10, and 1F8), followed by G418 selection. Clone *bcl2* 22 was derived from NN10 5 cells following cotransfection with a 3:1 mix of human *bcl2* gene expression vector and pcDNA4/TO (Invitrogen, Cergy Pointoise, France) carrying a zeocin resistance gene, followed by zeocin selection. Transfections were performed either by lipofection using FuGENE 6 (Roche, Meylan, France) or by nucleofection using the Nucleofector Kit V and program G-16 on a Nucleofector electroporation device (Amaxa, Cologne, Germany). shRNA production was induced by adding 100 ng/ml of Dox (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France). Erythroid differentiation was induced by 5 mM HMBA (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), and hemoglobin-containing differentiated cells were numbered by benzidine staining (54). Cell death was determined by trypan blue exclusion. Colony assays were performed in quadruplicate by seeding 50 cells/well in 500 μ l of 0.8% methylcellulose in Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 10% fetal calf serum in 24-well culture plates.

Plasmid constructs. pcDNA6/TR-EF-1 α (47) and pGJ10 have already been described (19). pGJ10/sh*fli1_749* and pGJ10/sh*fli1_1508* were obtained by cloning double-stranded oligonucleotides encoding shRNA directed against murine *Fli-1* mRNA into BglII and NotI sites of pGJ10. Similarly, pGJ10/scr was obtained by cloning double-stranded oligonucleotides encoding shRNA with scrambled sequence into the same sites of pGJ10. An expression vector of human *Bcl2* (a gift of M. Moulin, Villeurbanne) was obtained by cloning human *bcl2* cDNA under the control of the cytomegalovirus promoter. Oligonucleotide sequences are given in Table S1 in the supplemental material.

Western blot analyses. Western blot analyses were performed on total cell lysates as described previously (53, 54) using the following antibodies: anti-Fli-1 (sc-356; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (see Fig. 1, 5, and 8), anti-Fli-1 (Ab-15-289-500; Abcam, Paris, France) (see Fig. 4), anti-Spi-1 (sc-352; Santa Cruz,

TABLE 1. Phenotype induced by Fli-1 knockdown in NN10 cells^a

shRNA used	Cell clone	Relative no. of cells, day 4		% Dead cells, day 3		% Benzidine-positive cells, day 5		Fold change in mRNA (+Dox/-Dox), day 2			
		-Dox	+Dox	-Dox	+Dox	-Dox	+Dox	<i>Bcl2</i>	<i>Alas2</i>	<i>Ahsp</i>	α -globin
None	TR	100	96.4 (17.6)	<3	<3	0	0	1.16 (0.12)	1.2	1.4	0.9 (0.78)
SCR	3B10	100	110	<3	<3	0	0	ND	ND	ND	ND
	3E9	100	87	<3	<3	0	0	ND	ND	ND	ND
	1C6	100	98	<3	<3	0	0	ND	ND	ND	ND
Fli1_749	5	100	30.8 (13.4)	1 (1.1)	13.2 (7.3)	0	6.4 (5.3)	0.34 (0.22)	3.2 (0.4)	2.7 (0.6)	12.5 (5)
	10	100	61	<3	15.7	0	4.8	ND	ND	ND	ND
	23	100	73	<3	11.8	0	2.8	ND	ND	ND	ND

^a Means and standard deviations (in parentheses) from three independent experiments. ND, not determined; -Dox, no treatment; +Dox, Dox treatment. Statistically significant Dox effects are indicated in bold.

antiactin (MAB1501; Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), and anti-Bcl2 (sc-7382; Santa Cruz).

Quantitative reverse transcription (RT)-PCR. Total RNA was extracted using the Rneasy PLUS minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Total RNA (100 to 500 ng) was retrotranscribed in duplicate using the Quantitect reverse transcription kit (Qiagen) or Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by random priming. Quantitative PCR was performed using the QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen) on a LightCycler LC480 PCR system (Roche) and oligonucleotides indicated in Table S1 in the supplemental material. mRNA-specific signals were normalized to that of 18S rRNA (Tables 1 and 2) or β -actin mRNA (see Fig. 8 and 9).

ChIP. For ChIP assays, 4×10^7 cells were fixed for 15 min at room temperature by adding 1% of formaldehyde directly to the culture medium. Fixation was stopped by adding 0.125 M glycine, followed by two washes in cold phosphate-buffered saline (PBS). Cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.1], 10 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate [SDS] containing a 1/20 volume of EDTA free protease inhibitor cocktail [Roche]), and chromatin fragmentation was performed on ice by sonication (Vibra Cell 72405 sonicator; Bioblock, Illkirch, France). The mean length of fragmented DNA was controlled at this step (around 300 bp). Sonicated chromatin preparations (corresponding to 8×10^6 cells) were first diluted in 10 volumes of dilution buffer (16.7 mM Tris [pH 8.0], 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 1.1% Triton X-100, 0.01% SDS containing a 1/20 volume of EDTA free protease inhibitors cocktail [Roche]) and precleared by adding 60 μ l of salmon sperm DNA-protein A agarose beads (Upstate, Lake Placid, NY) for 1 h at 4°C on a rolling wheel. Immunoprecipitation was performed overnight at 4°C on a rolling wheel using 3 μ g of antibody (antibodies used were anti-Fli-1 [ab-15-289-500 {Abcam} or sc-356 {Santa-Cruz}], anti-Spi-1 [sc-352 {Santa Cruz}], and anti-UBC9 [sc-10759 {Santa Cruz}]). Twenty microliters of protein A agarose beads were added to 2 ml of immunoprecipitations, and the incubation was pursued for 90 min at 4°C. Beads were washed six times (2 min each on ice) in the following buffers: twice in 500 μ l of low-salt buffer (20 mM Tris [pH 8.0], 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100), once in 1 ml of high-salt buffer (10 mM Tris [pH 8.0], 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100), once in 1 ml of LiCl buffer (10 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.25 M LiCl), and twice in 1 ml of TE buffer (10 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA). Chromatin samples were eluted in a final volume of 500 μ l by two successive incubations of the beads (15 min at room temperature) in 250 μ l of

elution buffer (100 mM NaHCO₃, 1% SDS). The cross-link was reversed by 4 h of incubation at 65°C in the presence of 200 mM NaCl. DNA was finally treated by proteinase K (1 h at 45°C), extracted with phenol-chloroform, and precipitated. Immunoprecipitated and input DNA (prepared from aliquots taken before the immunoprecipitation step) were quantified by real-time PCR using a SYBR green PCR kit and the oligonucleotides indicated in Table S1 in the supplemental material.

Flow cytometry analyses. Proportions of apoptotic cells were determined by flow cytometry performed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) after double labeling using an annexin V-fluorescein isothiocyanate kit (AbCys, Paris, France) 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 μ g/ml RNase A (Sigma), and propidium iodide (50 μ g/ml; Sigma) was added before fluorescence-activated cell sorting analysis.

siRNA transfection. 745A/TR/shf11_749#44 cells (2×10^5) were transfected with 80 pmol of a double-stranded RNA oligonucleotide targeting Spi-1 (Dharmacon) or a control double-stranded RNA oligonucleotide targeting the luciferase mRNA (Eurogentec, Angers, France) using Oligofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Transfections were repeated every 12 h during 2 days. Small interfering RNA (siRNA) sequences are indicated in Table S1 in the supplemental material.

Whole-transcriptome profiling and analysis. 745A/TR/shf11_749#44 cells were grown for 2 days in the presence or absence of Dox to induce Fli-1 knockdown and then for one additional day in the presence of HMBA (still in the presence or absence of Dox) to induce erythroid differentiation associated with Spi-1 knockdown. Whole-transcriptome profiles under these four different conditions were then determined by two-color microarrays experiments using the same universal mouse RNA reference (Clontech) and murine cDNA microarrays representing 17106 mouse unigene clusters (IGBMC, Strasbourg, France). Normalized data were analyzed using the GeneSpring GX 7.3 software program (Agilent, CA) to select all transcripts (879) that were statistically downregulated ($P < 0.05$) by at least twofold in response to HMBA in the presence of Dox. Among this list, 128 transcripts were found to be statistically ($P < 0.05$) affected by Dox by at least 1.3-fold, and 117 of these 128 transcripts (corresponding to the list given in Table S3 in the supplemental material) were also downregulated by Dox, thus indicating the additive effect of Dox and HMBA. Symmetrically, we

TABLE 2. Phenotype induced by Fli-1 knockdown in 745A cells^a

shRNA used	Cell clone	Relative no. of colonies		% Dead cells, day 4 in HMBA		% Benzidine-positive cells, day 2 in HMBA		Fold change in mRNA (+Dox/-Dox), day 2 in HMBA			
		-Dox	+Dox	-Dox	+Dox	-	+Dox	<i>Bcl2</i>	<i>Alas2</i>	<i>Ahsp</i>	α -globin
None	TR	100	98 (11.7)	3.1 (0.9)	3.4 (0.7)	10.3 (1.1)	7.9 (0.9)	1 (0.1)	0.82 (0.20)	0.87 (0.28)	1 (0.3)
SCR	1A1	100	94.8 (26.3)	<3	<3	11 (2.1)	5.7 (4.6)	ND	ND	ND	ND
	1D10	100	112.0 (28.9)	<3	<3	8.6 (1.7)	7.1 (3.1)	ND	ND	ND	ND
	1F8	100	90.0 (30.2)	<3	<3	7.4 (4.9)	5.9 (2.9)	ND	ND	ND	ND
Fli1_749	44	100	54.1 (6.1)	4.2 (1.7)	38.0 (9.2)	9.2 (4.5)	28.2 (10.5)	1,1 (0,1)	4.9 (2.1)	3.4 (1.1)	2.3 (0.7)
	1	100	73.8 (7.7)	4.2 (1.7)	28.8 (5.7)	16.8 (1.5)	40.5 (9.9)	1,2 (0,2)	ND	ND	2,7 (0,1)

^a Means and standard deviations (in parentheses) from three independent experiments. ND, not determined; -Dox, no treatment; +Dox, Dox treatment. Statistically significant Dox effects are indicated in bold.

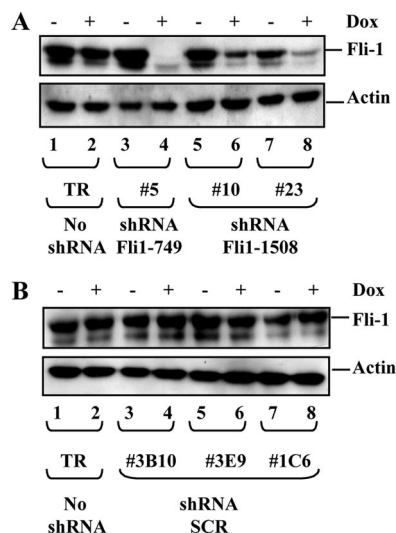


FIG. 1. Dox-inducible Fli-1 knockdown in NN10 cells. Western blot analysis of the Fli-1 protein in individual clones after 2 days of culture in the presence or absence of Dox. (A) Parental NN10/TR cells (lanes 1 and 2) and three independent clones expressing either Fli1_749 (lanes 3 and 4) or Fli1_1508 shRNA (lanes 5 to 8). (B) Parental NN10/TR cells (lanes 1 and 2) and three randomly chosen clones expressing control shRNA (lanes 3 to 8). The two bands revealed by the Fli-1-specific antibody correspond to the major (51-kDa) and minor (48-kDa) isoforms of Fli-1. The β -actin protein is shown as a loading control.

identified 560 transcripts that are significantly ($P < 0.05$) upregulated by HMBA in the presence of Dox. Among this list, 164 were significantly affected by Dox by at least 1.3-fold, and most of them (146 transcripts, corresponding to the list given in Table S4 in the supplemental material) were also upregulated by Dox, indicating the additive effect of HMBA and Dox. Transcripts that appear several times in Tables S3 and S4 in the supplemental material correspond to transcripts for which several probes were present on the microarrays. Gene set enrichment analysis was performed using the software program GSEA v2.0 (56).

RESULTS

Fli-1 knockdown in F-MuLV-infected erythroleukemic cells.

To address the role of Fli-1 in F-MuLV-infected erythroleukemic cells, we decided to knock down Fli-1 in the NN10 erythroleukemic cell line using Dox-inducible shRNA expression. NN10/TR cells expressing high levels of the Tet^r repressor were first established and then transfected with vectors allowing Dox-inducible expression of either one of two shRNAs (fli1_749 or fli1_1508) targeting two different regions of Fli-1 mRNA or of control shRNA (SCR) with scrambled sequence. Fli-1 levels were analyzed by Western blotting in individual clones grown for 2 days in the presence or absence of Dox (Fig. 1). Clone 5 (expressing shRNA fli1_749), which displayed a 95% reduction of Fli-1 in response to Dox (Fig. 1A, lanes 3 and 4), and clones 10 and 23 (expressing shRNA fli1_1508), with smaller Fli-1 reductions (65% and 85%, respectively; Fig. 1B, lanes 5 to 8), were retained for further studies. Importantly, Fli-1 levels did not change significantly in response to Dox either in parental NN10/TR cells (Fig. 1A and B, lanes 1 and 2) or in three randomly chosen clones expressing control shRNA (Fig. 1B, lanes 3 to 8).

Dox did not affect the growth rate, viability, or differentiation status of parental NN10/TR cells (Fig. 2, right). In con-

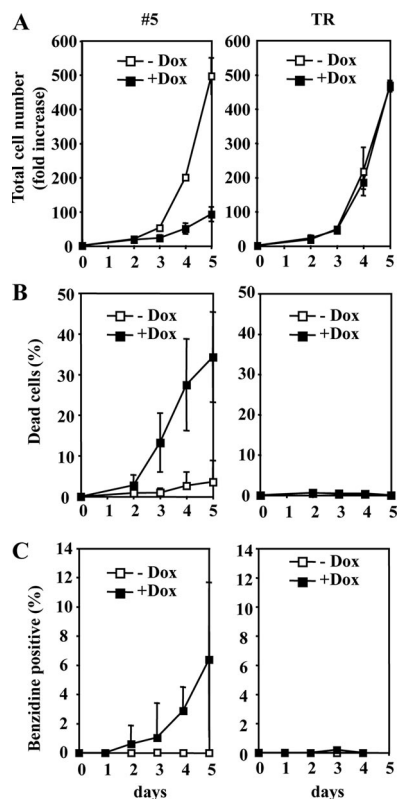


FIG. 2. Fli-1 knockdown reduces proliferation and survival and induces differentiation of NN10 cells. NN10/TR and NN10/TR/shfli1_749#5 cells were treated with Dox or not treated for 5 days. The evolution of the increase in the total cell number (viable and dead cells) (A), the percentages of dead cells determined by Trypan blue exclusion (B), and the percentages of hemoglobin-containing differentiated cells determined by benzidine staining (C) are shown (means and standard deviations from three independent experiments are indicated).

trast, the growth rate of clone 5 was strongly reduced in the presence of Dox in association with an increase in the percentage of dead cells (trypan blue positive) and differentiated cells (benzidine positive) (Fig. 2, left). After 5 days in the presence of Dox, the total number of cells in clone 5 cultures was reduced more than fivefold, which included >35% of dead cells and around 6% of differentiated cells. Confirming the induction of erythroid differentiation, the levels of several erythroid-specific transcripts, such as *Alas2*, *Ahsp*, and *α -globin*, were increased at as early as 2 days of Dox treatment (3.2-, 2.7-, and 12.5-fold increases, respectively) (Table 1). No Dox effect on proliferation, survival, or differentiation was observed in the three clones expressing control shRNA (Table 1). In contrast, similar but slightly less pronounced Dox effects were observed in clones 10 and 23 (Table 1), displaying a smaller Fli-1 reduction (Fig. 1B).

We determined that increased cell death was due to apoptosis, as evidenced by an increased proportion of hypodiploid cells (sub-G₁) (Fig. 3A) and annexin-positive/propidium-negative cells (Fig. 3B). Fli-1 has been described (34) as a direct transcriptional activator of the *bcl2* gene in F-MuLV-induced erythroleukemic cells. As expected, *bcl2* transcripts in clone 5 decreased by threefold at as early as 2 days of Dox treatment

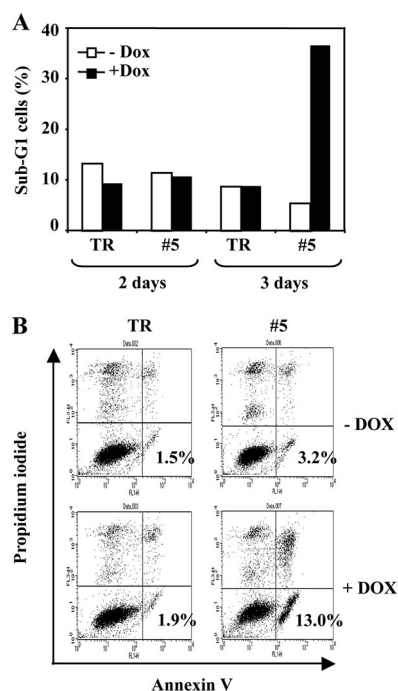


FIG. 3. Fli-1 knockdown induces apoptosis of NN10 cells. NN10/TR and NN10/TR/shfli1_749#5 cells were treated with Dox or not treated for 3 days. After 2 and 3 days, the percentages of hypodiploid cells (sub-G₁) were determined by flow cytometry after propidium iodide labeling (A). After 3 days, cells were labeled with annexin V and propidium iodide and the percentage of annexin V-positive/propidium-negative apoptotic cells was determined by flow cytometry (B). Typical results from two different experiments are shown.

(Table 1). This prompted us to enforce Bcl2 expression in clone 5 to reduce cell death in the presence of Dox and to determine if the growth rate was still affected. We thus selected clone 22, which expresses high levels of the exogenous human Bcl2 protein when Fli-1 expression is reduced in the presence of Dox (Fig. 4A). Despite a strong reduction of Dox-induced mortality in clone 22 (Fig. 4C), Dox-induced cell growth reduction remains similar to that of clone 5 (Fig. 4B). This result indicates that effects of Dox on cell proliferation and cell death occur independently. Altogether, these data demonstrate that Fli-1 knockdown in NN10 cells independently reduces cell proliferation and viability and concomitantly allows a small proportion of cells to reinitiate terminal erythroid differentiation.

Fli-1 knockdown in SFFV-infected erythroleukemic cells. To address the role of Fli-1 in SFFV-infected erythroleukemic cells, we decided to knock down Fli-1 in the 745A erythroleukemic cell line. As described above, 745A/TR cells expressing high levels of the Tet^r repressor were transfected with vectors allowing Dox-inducible expression of either one of the two shRNAs targeting Fli-1 mRNA or control shRNA. We identified clone 44 (expressing shRNA fli1_749) and clone 1 (expressing shRNA fli1_1508), which display a 90% and 80% decrease of Fli-1 protein levels in the presence of Dox (Fig. 5A, lanes 3 to 6), respectively. Such a decrease in the Fli-1 protein was observed neither in parental 745A/TR cells (Fig. 5A and B, lanes 1 and 2) nor in three randomly chosen clones expressing

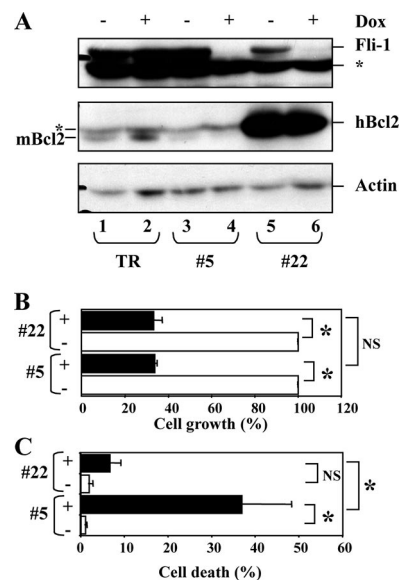


FIG. 4. Fli-1 knockdown reduces the proliferation of NN10 cells independently of cell death induction. Clone bcl2 22 was derived from NN10/TR/shfli1_749#5 by transfection with a human Bcl2 expression vector. NN10/TR/shfli1_749#5 and bcl2 22 cells were grown for 5 days with or without Dox before analysis. (A) Western blot analysis of the Fli-1, human Bcl2 (hBcl2), and murine Bcl2 (mBcl2) proteins. An unspecific band revealed by the Bcl2 antibody and which comigrates with hBcl2 is indicated by an asterisk. β -Actin revealed on the same membranes is shown as a loading control. (B) Relative cell growth, expressed as the percentages of total cells (viable and dead cells) in the presence of Dox (black bars) and in its the absence (white bars). (C) Percentages of dead cells determined by trypan blue in the presence (black bars) or absence (white bars) of Dox, respectively. (Means and standard deviations from three independent experiments are shown). Significant ($P < 0.05$) and nonsignificant differences are indicated by asterisks and NS, respectively.

control shRNA (Fig. 5B, lanes 3 to 8). Dox did not induce cell death or differentiation and did not change significantly the growth rate of clones 44 and 1 under standard liquid culture conditions (data not shown). However, in semisolid medium with Dox, clones 44 and 1 generated colonies in reduced number, of smaller size (45% and 25% reduction, respectively; Fig. 6A and Table 2), and composed of undifferentiated cells. The number and size of colonies generated by clone 745/TR or clones expressing control shRNA were not affected (Fig. 6A and Table 2). The absence of spontaneous erythroid differentiation in Dox-treated clones 44 and 1 most probably reflects the dominant effect of endogenous Spi-1, such as inhibition of GATA-1 (55), but does not exclude a putative contribution of Fli-1 to the inhibition of differentiation. We previously observed that whereas Spi-1 expression was abolished, Fli-1 expression was moderately reduced during HMBA-induced differentiation of 745A cells (54). Thus, we investigated the effect of Fli-1 knockdown in clones 44 and 1 grown for 2 days in the presence or absence of Dox before HMBA addition in culture medium. The kinetic of differentiation was examined through G₁ arrest (Fig. 6B) and an increase in benzidine-positive differentiated cells (Fig. 6C). After only 2 days in HMBA, Dox-induced Fli-1 knockdown causes an increase in G₁-blocked and benzidine-positive cells. Accelerated differentiation was further confirmed by a marked increase in several erythroid tran-

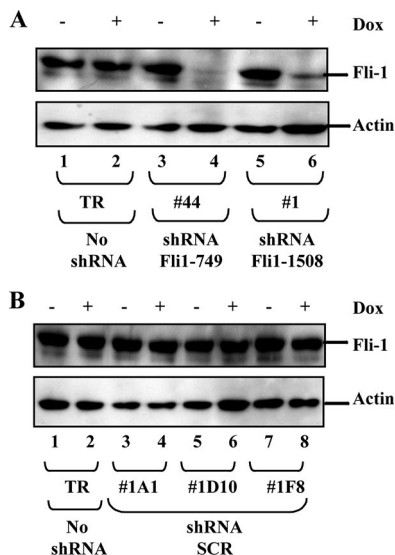


FIG. 5. Dox-inducible *fli-1* knockdown in 745A cells. Western blot analysis of the Fli-1 protein in individual clones after 2 days of culture in the presence or absence of Dox. (A) Parental 745/TR cells (lanes 1 and 2) and two clones expressing either *fli1_749* (lanes 3 and 4) or *fli1_1508* shRNA (lanes 5 and 6). (B) Parental cells (lanes 1 and 2) and three independent clones expressing control shRNA (lanes 3 to 8). The β -actin protein is shown as a loading control.

scripts, such as *Alas2*, *Ahsp*, or α -*globin* (Table 2). Concomitantly, cell viability was markedly and specifically affected by Dox, as deduced from the progressive increase in the number of dead cells, reaching 30% and 40% after 4 days in the presence of both HMBA and Dox (Fig. 6D). This cell death increase was due to apoptosis, as indicated by the increased number of hypodiploid cells (Fig. 7A) and propidium iodide-negative/annexin-positive cells (Fig. 7B). These effects were not observed either in 745/TR cells or in clones expressing control shRNA. Altogether, these results indicated that Fli-1 knockdown reduces cell clonogenicity, induces apoptosis, and accelerates the HMBA-induced differentiation of 745A erythroleukemic cells.

Additive effects of Spi-1 and Fli-1 knockdown in SFFV-infected erythroleukemic cells. Since HMBA suppresses Spi-1 expression, the additive effects of Fli-1 knockdown and HMBA on proliferation arrest and differentiation of clone #44 and clone 1 cells could result from the combined loss of Spi-1 and Fli-1. To test this possibility, we combined Dox-inducible Fli-1 knockdown with siRNA-mediated Spi-1 knockdown. Clone 44 cells were transfected two times a day for 2 days with Spi-1 siRNA in the presence or absence of Dox and analyzed 60 h after the first transfection (Fig. 8). Spi-1 siRNA transfection suppressed most Spi-1 protein expression (Fig. 8A, lane 3) and induced the differentiation of around 10% of the cells (Fig. 8B). Simultaneous knockdown of Spi-1 and Fli-1 expression (Fig. 8A, lane 6) increased the percentage of differentiated cells up to 25%. Clonogenicity was markedly reduced by Spi-1 knockdown and almost completely suppressed by concomitant Fli-1 knockdown induced by Dox (Fig. 8C). Finally, a threefold increase in cell death could be observed after Spi-1 and Fli-1 double knockdown compared to results with Spi-1 or Fli-1 simple knockdown. None of these effects could be observed

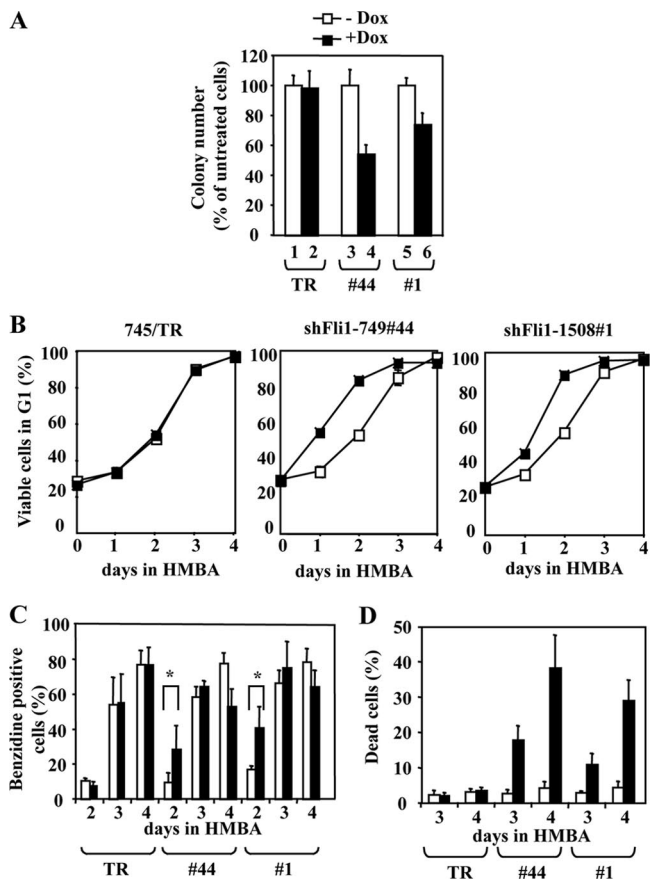


FIG. 6. Fli-1 knockdown reduces the clonogenicity and increases the differentiation and death of 745A cells in the presence of HMBA. 745A/TR, 745A/TR/shfii1_749#44, and 745A/TR/shfii1_1508#1 cells were treated with Dox or not treated for 2 days and reseeded either in semisolid medium or in liquid medium supplemented with 5 mM HMBA to induce their differentiation. (A) Relative numbers of clones obtained in semisolid medium; (B) evolution of the percentage of viable cells in G₁ phase; (C) evolution of the percentage of hemoglobin-containing (benzidine-positive) differentiated cells; (D) evolution of the percentage of dead cells (trypan blue positive). Means and standard deviations of each parameter from three independent experiments are shown. Statistically significant differences ($P < 0.05$ in paired Student test) are indicated by asterisks.

following transfection with control siRNA (Fig. 8D). These results indicated that losses of Spi-1 and Fli-1 contribute in an additive manner to the proliferation arrest and differentiation of 745A cells, whereas cell death is induced only in the absence of both factors.

Spi-1 and Fli-1 directly activate a common set of genes involved in ribosome biogenesis. Spi-1 and Fli-1 recognize similar core DNA binding sites, suggesting the interesting possibility that they may deregulate a common set of genes. This prompted us to look for a set of common target genes which could at least partially explain the additive effects of their loss of expression on the proliferation and differentiation of clone 44. To address this question, we used microarrays harboring 17106 murine cDNAs to perform a gene expression profiling analysis with clone 44 cells grown for 2 days in the presence or absence of Dox (allowing Fli-1 downregulation) and then for 1 day in the presence or absence of HMBA (allowing Spi-1

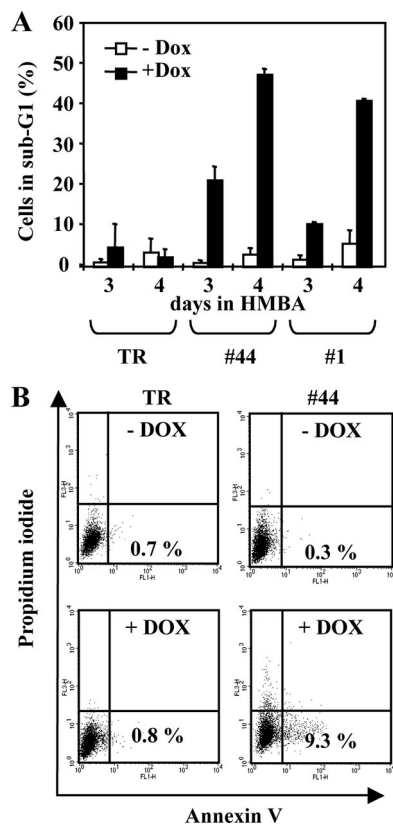


FIG. 7. Fli-1 knockdown induces apoptosis in 745A cells. 745A/TR (TR), 745A/TR/shfli1_749#44 (#44), and 745A/TR/shfli-2#1 (#1) cells were treated with Dox or not treated for 2 days, and erythroid differentiation was then induced by adding 5 mM HMBA for 3 or 4 days before analysis. (A) Percentages of hypodiploid cells (sub-G₁) determined by flow cytometry after propidium iodide labeling (means and standard deviations from three independent experiments). (B) Annexin V/propidium iodide flow cytometer diagrams obtained 2 days after the addition of HMBA. The percentages of annexin V-positive and propidium iodide-negative apoptotic cells are indicated (typical results from two different experiments).

downregulation). From this analysis, we identified two groups of transcripts whose expression was increased or decreased by at least twofold by HMBA and further significantly increased or decreased in the same way by Dox (see Tables S4 and S3, respectively, in the supplemental material).

Consistent with the additive contribution of Spi-1 and Fli-1 knockdown to the stimulation of differentiation of clone 44, several transcripts characteristic of erythroid differentiation, such as *alas 2*, α -*globin*, *ftl1*, and *fech*, were increased by both HMBA and Dox treatment (see Table S4 in the supplemental material). Besides this erythroid signature, we found that a strikingly high proportion of transcripts (22%) which were significantly decreased by both HMBA and Dox treatment corresponded to genes encoding proteins involved in ribosome biogenesis (see Table S3 in the supplemental material). These genes include, notably, two genes (*Myc* and *Rpo1-3*) involved in rRNA transcription, eight genes (*Ddx21*, *Imp4*, *Nhp211*, *Nip7*, *Nol6*, *Nolc1*, *Npm1*, and *Rcl1*) involved in different steps of rRNA maturation, one ribosomal protein gene (*Rpl18*), and eight snoRNA host genes involved in posttranscriptional rRNA

modifications (*Cct6a*, *Gnb2L1*, *Hspa8*, *Snord22*, *Eif4g1*, *Snrpb*, *Mbd2*, and *Tcp1*). These results prompted us to list all ribosome-related genes present on our microarrays and to perform gene set enrichment analysis in response to HMBA and Dox. This analysis allowed us to identify two sets of genes that are indeed significantly enriched among genes that are the most downregulated in response to HMBA and Dox (93 genes involved in different steps of rRNA transcription and maturation and 35 H/ACA box snoRNA host genes) (see Fig S1 in the supplemental material). Most members of two other sets of genes (32 C/D box snoRNA host genes and 66 genes encoding ribosomal proteins) are also downregulated in response to either HMBA or Dox, although in that case the enrichment is not statistically significant (see Fig S1 in the supplemental material).

Nine of the ribosome-related genes individually identified by microarray analysis as putative common target genes of Spi-1 and Fli-1 were randomly selected for further investigation. Quantitative RT-PCR analyses confirmed that the transcript levels from all of these ribosome-related genes decreased in an additive manner in response to HMBA and Dox in clone 44 cells (Fig. 9B) whereas they decreased in response to HMBA only in control 745A/TR cells (Fig. 9A). Interestingly, each one of these genes displays at least one highly conserved putative ETS binding site (GGAA) located less than 100 bp from the known transcription initiation site (data not shown). We thus investigated whether Spi-1 and Fli-1 interact directly with these gene promoter regions in erythroleukemic cells through chromatin immunoprecipitation assays using Spi-1 or Fli-1 antibody. Except for the *Npm1* gene, significant enrichments indicating Spi-1 (Fig. 9C) and Fli-1 (Fig. 9D) occupancy in clone 44 cells were identified for all of them. Further RT-PCR and chromatin immunoprecipitation analyses performed on five additional snoRNA host genes confirmed their additive downregulation in response to HMBA and Dox and both Spi-1 and Fli-1 occupancy in the proximal promoter region of three of them (Fig. 10). Similar analyses were then performed in clone 5 to determine if Fli-1 might be involved in the direct activation of the same set of genes in F-MuLV-infected erythroleukemic cells harboring a *fli-1*-activated locus. Except for *Rpl18*, *Npm1*, or *Nolc1*, the transcript levels for all other ribosome-related genes analyzed were significantly decreased in response to Dox in clone 5 but not in parental NN10/TR cells (Fig. 11A). Control *Gata1*, *p45 Nfe2*, and *Scl* gene transcripts were not affected by Dox treatment either in clone 5 or in parental NN10/TR cells. Furthermore, except for *Npm1*, as in clone 44, significant enrichments indicating Fli-1 occupancy at all other gene promoters were clearly detected in clone 5 (Fig. 11B). Taken together, these data indicate that in correlation with their contribution to proliferation and inhibition of differentiation in Friend erythroleukemic cells, Spi-1 and Fli-1 directly activate a significant number of common target genes involved in ribosome biogenesis through their direct binding to highly conserved ETS binding sites located in the proximal promoters of these genes.

DISCUSSION

We showed in this study that Fli-1 knockdown induced proliferation arrest, massive apoptosis, and limited differentiation

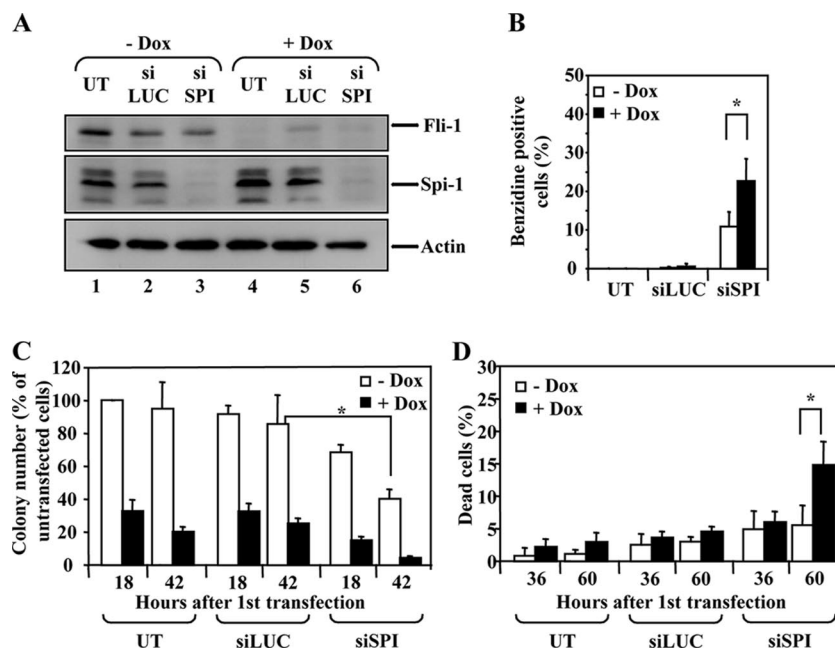


FIG. 8. Additive effects of Spi-1 and Fli-1 knockdown in 745A cells. 745A/TR/shfli1_749#44 cells were grown in the presence or absence of Dox for 2 days. Cells were then left untransfected (UT) or transfected every 12 h during 2 days with either control siRNA directed against luciferase (siLUC) or siRNA directed against Spi-1 (siSPI). (A) Western blot analysis of the Fli-1 and Spi-1 proteins performed 60 h after the first siRNA transfection. β -Actin is shown as a loading control. (B) Percentages of benzidine-positive cells determined 60 h after the first siRNA transfection. (C) Clonogenicity determined as for Fig. 5A. (D) Percentages of dead cells (trypan blue positive). Results in panels B, C, and D represent means and standard deviations from three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences ($P < 0.05$ in paired Student test).

in F-MuLV-infected erythroleukemic cells. While Fli-1 knockdown had a very limited effect in SFFV-infected cells in the presence of Spi-1, Fli-1 knockdown markedly enhanced proliferation arrest and differentiation induced by Spi-1 knockdown. Most importantly, this additive effect of Spi-1 and Fli-1 knockdown was correlated with an additive negative effect on the expression of many genes involved in ribosome biogenesis whose promoters are occupied by both Spi-1 and Fli-1 in SFFV cells and by Fli-1 in F-MuLV cells.

The association of decreased *bcl2* expression with cell death induced by Fli-1 knockdown in F-MuLV cells is in agreement with results in previous studies (34). Although viability of F-MuLV cells could be rescued by enforced expression of Bcl2, further investigations are still required to determine if Fli-1-mediated expression of Bcl2 is really required for their survival. More surprisingly, Spi-1 knockdown did not induce cell death in SFFV cells, contrasting with apoptosis induced in Spi-1 transgenic cell lines (47). This apparent discrepancy might be explained by different Epo-R signaling due to the gp55 protein being expressed only in SFFV cells. Our other observation that cell death occurred only after both Spi-1 and Fli-1 knockdown indicates that Spi-1 and Fli-1 are redundantly involved in SFFV cell survival. However, contrary to what could be expected from our results with F-MuLV cells, we found no evidence for *bcl2* gene regulation by either Spi-1 or Fli-1 in SFFV cells (data not shown).

Spi-1 and Fli-1 directly activate common target genes involved in ribosome biogenesis. Our conclusion that Spi-1 and Fli-1 directly activate common ribosome-related target genes is based on several concordant observations: (i) the expression of

these genes decreased in response to Fli-1 knockdown in F-MuLV cells and decreased in an additive manner in response to Spi-1 and Fli-1 knockdown in SFFV cells, (ii) as previously noticed by others for ribosomal protein genes (41), most of these genes display highly conserved consensus ETS binding sites in their promoter regions, and (iii) with very few exceptions, these promoter regions are bound by Fli-1 in F-MuLV cells and by both Spi-1 and Fli-1 in SFFV cells. We also determined using transient expression assays that mouse *imp4* gene promoter activity is reduced by 40% by the mutation of a conserved ETS binding site located at position -45 (data not shown). A few other transcription factors, such as YY1, SP1, and mainly c-Myc, have already been identified as direct transcriptional activators of ribosome-related genes (41). Interestingly, c-Myc expression also decreased in an additive manner in response to Spi-1 and Fli-1 knockdown (see Table S3 in the supplemental material), and this decrease in c-Myc might therefore also contribute, with Spi-1 and Fli-1 knockdown itself, to the decrease in ribosome-related gene expression. According to this possibility, Spi-1, Fli-1, and c-Myc seem to belong to the same regulatory network, allowing the stimulation of genes involved in ribosome biogenesis.

Remarkably, ribosome-related target genes of Spi-1 and Fli-1 appear to be involved in all different steps of ribosome biogenesis, including rRNA synthesis, maturation, and post-transcriptional modifications, as well as ribosomal protein synthesis. Accordingly, a significant impact on ribosome biogenesis can be expected from Spi-1 and Fli-1 knockdown. Indeed, previous studies already reported a decrease in ribosomal DNA gene transcription in HMBA-treated SFFV cells (21). In

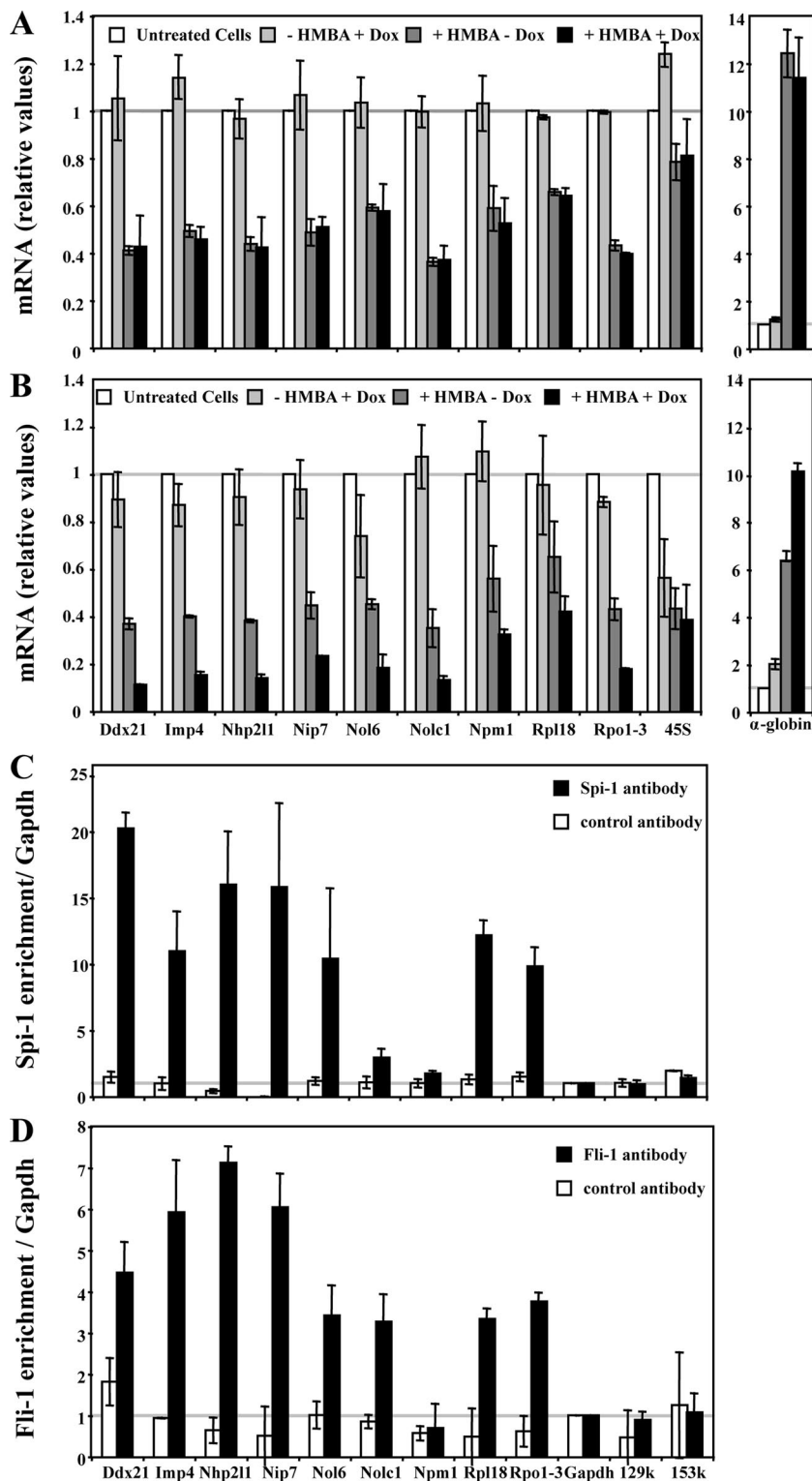


FIG. 9. Spi-1 and Fli-1 directly activate a common set of genes involved in ribosome biogenesis in 745A cells. 745A/TR and 745A/TR/shflii_749#44 cells were treated with Dox or left untreated for 2 days, and differentiation was induced by adding 5 mM HMBA for 1 day before performing quantitative RT-PCR analyses of the indicated gene transcripts (45S corresponds to 45S rRNA precursor). (A) Relative levels of transcripts determined in 745A/TR cells (means and standard deviations from three independent experiments). (B) Same as panel A but for 745A/TR/shflii_749#44 cells. (C) Spi-1 chromatin occupancy of the indicated gene promoters determined by chromatin immunoprecipitation on untreated 745A/TR/shflii_749#44 cells using Spi-1-specific or control Ubc9 antibody. *Gapdh* promoter and α -globin gene 129k and 153k regions (2) were used as negative controls. Results are expressed as relative proportions of the input chromatin which has been precipitated by antibodies standardized to the background levels determined on the *Gapdh* gene promoter (means and standard deviations from three independent experiments). (D) Fli-1 chromatin occupancy of the indicated gene promoters, determined as in panel C by chromatin immunoprecipitation on untreated 745A/TR/shflii_749#44 cells using Fli-1 antibody.

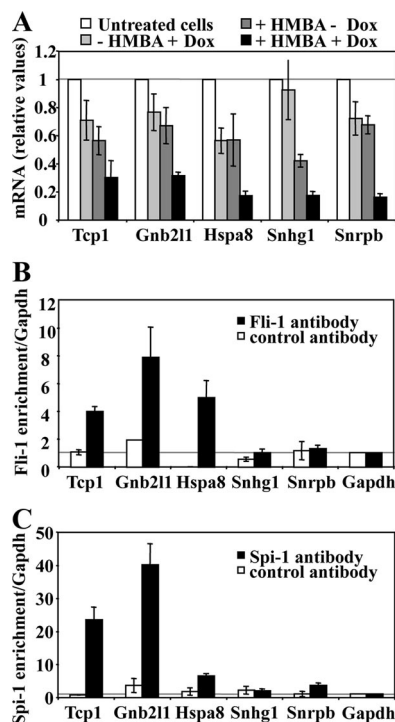


FIG. 10. Spi-1 and Fli-1 directly activate several snoRNA host genes in 745A cells. 745A/TR/shfli_749#44 cells were treated with Dox for 2 days or left untreated, and differentiation was induced by adding 5 mM HMBA for 1 day before performing quantitative RT-PCR analyses of the indicated gene transcripts. (A) Relative levels of transcripts determined in 745A/TR/shfli_749#44 cells (means and standard deviations from three independent experiments). (B) Fli-1 chromatin occupancy of the indicated gene promoters, determined by chromatin immunoprecipitation on untreated 745A/TR/shfli_749#44 cells using Fli-1-specific (black bars) or control Ubc9 antibody. The *Gapdh* promoter was used as a negative control. Results are expressed as relative proportions of the input chromatin which has been precipitated by antibodies standardized to the background levels determined on the *Gapdh* gene promoter (means and standard deviations from three independent experiments). (C) Spi-1 chromatin occupancy of the indicated gene promoters, determined as in panel B by chromatin immunoprecipitation on untreated 745A/TR/shfli_749#44 cells using Spi-1 antibody.

agreement with these studies, we observed a marked decrease in the size of nucleoli (data not shown) and in the level of 45S rRNA precursors in SFFV cells in response to HMBA treatment or Fli-1 knockdown (Fig. 9A and B). We suggest that this decrease in ribosomal DNA gene transcription might be at least partially explained by the decreased expression of the RNA polymerase I subunit RPO1-3, but this remains to be formally established.

Can the decrease in ribosome-related gene expression contribute to the proliferation arrest and differentiation induced by Spi-1 and Fli-1 knockdown? The decrease in ribosome-related gene expression could be the simple consequence of the terminal differentiation process allowed by Spi-1 and Fli-1 knockdown. This terminal differentiation process itself is potentially mediated by the deregulation of many Spi-1 and Fli-1 target genes. Among interesting candidates, we noticed the additive decrease in the expression of *c-Myc* (see Table S3 in the supplemental material) and the additive increase of *Btg2*

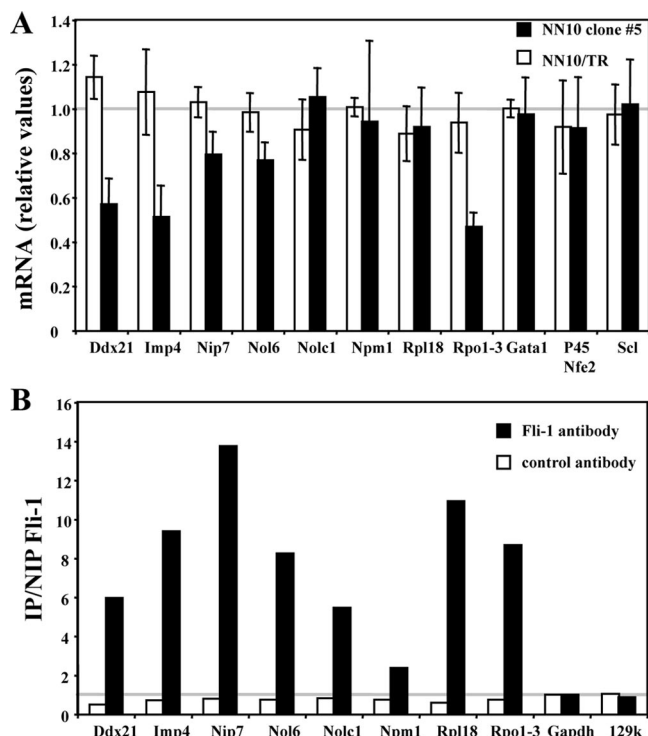


FIG. 11. Fli-1 directly activates the same set of genes involved in ribosome biogenesis in NN10 cells as do Spi-1 and Fli-1 in 745A cells. NN10/TR and NN10/TR/shfli_749#5 cells were treated with Dox or not treated for 2 days before quantitative RT-PCR analyses of the indicated gene transcripts were performed. (A) Dox-induced *n*-fold changes in the indicated gene transcripts levels in NN10/TR (white bars) or NN10/TR/shfli_749#5 (black bars) cells (means and standard deviations from three different experiments). (B) Fli-1 chromatin occupancy of the indicated gene promoters, determined by chromatin immunoprecipitation on untreated NN10/TR/shfli_749#5 cells. See the legend for Fig. 8C and D (typical result from two different experiments are shown).

(35) (see Table S4 in the supplemental material), known as a prooncogene and an antioncogene, respectively. Furthermore, according to the known Gata-1/Spi-1 (55) and Fli-1/Eklf (23, 53) functional antagonisms, the derepression of critical Gata-1 and/or Eklf target genes most probably also contributes to the induction of terminal differentiation. However, independently of these possibilities, the identification of ribosome-related genes as being direct target genes representing more than 20% of common target genes of Spi-1 and Fli-1 strongly favors the other possibility that their decreased expression may at least partially contribute to the effect of Spi-1 and Fli-1 knockdown on differentiation and/or proliferation arrest. Indeed, increasing evidence indicates that ribosome biogenesis per se is actively involved in cell cycle control either through the control of protein translation (16, 37, 49) or through the p53 pathway (25, 36). For example, in several situations known as situations of ribosomal or nucleolar stress, free ribosomal proteins, such as RPS7 (12), RPL5, RPL11, or RPL23, directly interact with MDM2, leading to the stabilization of p53 and/or derepression of p73 activity and cell cycle arrest (17, 29, 59, 66). This stress pathway can be activated by many different chemicals affecting nucleolar organization, such as low doses of actinomycin D,

specifically inhibiting RNA polymerase I activity, or 5-fluorouracyl (59). Interestingly, low doses of actinomycin D have already been reported to induce proliferation arrest and differentiation of SFFV cells (61). In our work, we found that not only treatment with actinomycin D but also 5-fluorouracyl treatment nicely reproduced Spi-1 and Fli-1 knockdown in 745A cells and Fli-1 knockdown in NN10 cells by inducing proliferation arrest and differentiation in both cases (see Table S2 in the supplemental material). Intriguingly, the fact that P53 is inactivated in 745A and NN10 cells (7) would preclude the possibility of a nucleolar stress response in these cells. However, several other proteins, such as p73 or FOXO3a, which is known to be very important in terminal erythroid differentiation (5), are also regulated by MDM2 (65) and remain interesting signaling candidates in response to nucleolar stress potentially induced by Spi-1 and Fli-1 knockdown. Alternatively, we cannot presently exclude the possibility that Spi-1 and Fli-1 knockdown also contribute to terminal differentiation by altering protein translation through the production either of a reduced number or of altered ribosomes. All these possibilities justify further investigations of the incidence of Spi-1 and Fli-1 expression levels on ribosome biogenesis not only in established erythroleukemic cells but also in native erythrocytic progenitors in order to fully understand how their involvement in ribosome-related gene activation may contribute, as already reported for c-Myc (6, 16), to their oncogenic potential.

Control of ribosome biogenesis as a common redundant and ancestral function of ETS transcription factors. Our present study is reminiscent of a recent genome-wide analysis of promoter occupancy which showed that three other ETS proteins (Ets1, Elf1, and Gabp α) occupy a common set of gene promoters in the human Jurkat lymphoid cell line (28). Strikingly, the promoter regions of most ribosome-related target genes of Spi-1 and Fli-1 identified in the present study were also identified as being bound by at least one of these three other ETS factors. These convergent results strengthen the emerging concept that transcriptional regulation of genes involved in ribosome biogenesis is most probably a generic property shared by many members of the ETS family (28). Interestingly, many ETS factors are oncogenic (52). For example, prostate cancers are frequently associated with deregulated expression of ETS factors (1, 31, 48), and the active contribution of at least ETS2 (11) and ERG (30, 58) to the transformed phenotype has been clearly established. Furthermore, we found that promoters of several ribosome-related genes are also bound by ETS1 or ETS2 in the two prostate cancer cell lines PC3 and DU145, respectively (data not shown). Together, these data raise the interesting possibility that, as for c-Myc, deregulation of ribosome biogenesis might be a common mechanism contributing to the oncogenic potential of several ETS factors.

Ribosome biogenesis is a highly sophisticated process involving many genes, suggesting a high degree of coordinated expression and a strong selection pressure on their transcriptional regulation (10). This strong selection pressure is highlighted by the strikingly high conservation of ETS DNA binding sites that we and others (28) noticed in the proximal promoters of genes involved in ribosome biogenesis. We suggest that the ancestral ETS gene was already involved in this function and that this ancestral function has been conserved in most successive members which appeared later during evolu-

tion by duplication of the ancestral ETS gene. This could confer the interesting property of current ETS factors to coordinate such ancestral housekeeping functions with other more recently acquired tissue-specific functions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Colette Gonnet for excellent technical assistance in DNA cloning, Laure Granger for DNA sequencing facilities, Céline Keime and Aurélie Landreau for their valuable help in the use of GeneSpring software on the PRABI (Pôle Rhône-Alpin de Bioinformatique) platform, and Edouard Bertrand for his help in the identification of snoRNA host genes.

This work was supported by grants from the CNRS and Université Lyon 1 and by specific grants from the following associations: Fondation de France (no. 2003005020), Ligue contre le Cancer (Labelisation 2005, CIT program, and salaries to G.G., S.B., and G.J.), and the Société Française d'Hématologie (salary to G.J.). F.M., J.-J.D., F.M.-G., and C.G. are members of the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). B.G. and J.S. are members of the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique).

REFERENCES

- Alipov, G., T. Nakayama, M. Ito, K. Kawai, S. Naito, M. Nakashima, D. Niino, and I. Sekine. 2005. Overexpression of Ets-1 proto-oncogene in latent and clinical prostatic carcinomas. *Histopathology* **46**:202–208.
- Anguita, E., J. Hughes, C. Heyworth, G. A. Blobel, W. G. Wood, and D. R. Higgs. 2004. Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *EMBO J.* **23**:2841–2852.
- Ano, S., R. Pereira, M. Pironin, I. Lesault, C. Milley, I. Lebigot, C. T. Quang, and J. Ghysdael. 2004. Erythroblast transformation by FLI-1 depends upon its specific DNA binding and transcriptional activation properties. *J. Biol. Chem.* **279**:2993–3002.
- Atar, O., and B. Z. Levi. 2005. PU.1 silencing leads to terminal differentiation of erythroleukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**:1288–1292.
- Bakker, W. J., T. B. van Dijk, M. Parren-van Amelsvoort, A. Kolbus, K. Yamamoto, P. Steinlein, R. G. Verhaak, T. W. Mak, H. Beug, B. Lowenberg, and M. von Lindern. 2007. Differential regulation of Foxo3a target genes in erythropoiesis. *Mol. Cell. Biol.* **27**:3839–3854.
- Barna, M., A. Pusic, O. Zollo, M. Costa, N. Kondrashov, E. Rego, P. H. Rao, and D. Ruggero. 2008. Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature* **456**:971–975.
- Barnache, S., F. Wendling, C. Lacombe, N. Denis, M. Titeux, W. Vainchenker, and F. Moreau-Gachelin. 1998. Spi-1 transgenic mice develop a clonal erythroleukemia which does not depend on p53 mutation. *Oncogene* **16**:2989–2995.
- Ben-David, Y., and A. Bernstein. 1991. Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. *Cell* **66**:831–834.
- Ben-David, Y., E. B. Giddens, and A. Bernstein. 1990. Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1332–1336.
- Brown, S. J., M. D. Cole, and A. J. Erives. 2008. Evolution of the holozoan ribosome biogenesis regulon. *BMC Genomics* **9**:442.
- Carbone, G. M., S. Napoli, A. Valentini, F. Cavalli, D. K. Watson, and C. V. Catapano. 2004. Triplex DNA-mediated downregulation of Ets2 expression results in growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **32**:4358–4367.
- Chen, D., Z. Zhang, M. Li, W. Wang, Y. Li, E. R. Rayburn, D. L. Hill, H. Wang, and R. Zhang. 2007. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* **26**:5029–5037.
- Choe, K. S., F. Radparvar, I. Matushansky, N. Rekhtman, X. Han, and A. I. Skoultschi. 2003. Reversal of tumorigenicity and the block to differentiation in erythroleukemia cells by GATA-1. *Cancer Res.* **63**:6363–6369.
- Choppin, J., N. Casadevall, C. Lacombe, F. Wendling, E. Goldwasser, R. Berger, P. Tambourin, and B. Varet. 1985. Production of erythropoietin by cloned malignant murine erythroid cells. *Exp. Hematol.* **13**:610–615.
- Coute, Y., J. A. Burgess, J. J. Diaz, C. Chichester, F. Lisacek, A. Greco, and J. C. Sanchez. 2006. Deciphering the human nucleolar proteome. *Mass Spectrom. Rev.* **25**:215–234.
- Dai, M. S., and H. Lu. 2008. Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *J. Cell Biochem.* **105**:670–677.
- Dai, M. S., S. X. Zeng, Y. Jin, X. X. Sun, L. David, and H. Lu. 2004. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in re-

- sponse to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol. Cell Biol.* **24**:7654–7668.
18. **Delgado, M. D., M. Hallier, P. Meneceur, A. Tavitian, and F. Moreau-Gachelin.** 1994. Inhibition of Friend cells proliferation by spi-1 antisense oligodeoxynucleotides. *Oncogene* **9**:1723–1727.
 19. **Demers, C., C. P. Chaturvedi, J. A. Ranish, G. Juban, P. Lai, F. Morle, R. Aebersold, F. J. Dilworth, M. Groudine, and M. Brand.** 2007. Activator-mediated recruitment of the MLL2 methyltransferase complex to the beta-globin locus. *Mol. Cell* **27**:573–584.
 20. **Finkelstein, L. D., P. A. Ney, Q. P. Liu, R. F. Paulson, and P. H. Correll.** 2002. sf-Stk kinase activity and the Grb2 binding site are required for Epo-independent growth of primary erythroblasts infected with Friend virus. *Oncogene* **21**:3562–3570.
 21. **Fraser, P. J., and P. J. Curtis.** 1987. Specific pattern of gene expression during induction of mouse erythroleukemia cells. *Genes Dev.* **1**:855–861.
 22. **Fromont-Racine, M., B. Senger, C. Saveanu, and F. Fasiolo.** 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**:17–42.
 23. **Frontelo, P., D. Manwani, M. Galdass, H. Karsunky, F. Lohmann, P. G. Gallagher, and J. J. Bieker.** 2007. Novel role for EKLF in megakaryocyte lineage commitment. *Blood* **110**:3871–3880.
 24. **Galsou, D. L., J. O. Hensold, T. R. Bishop, M. Schalling, A. D. D'Andrea, C. Jones, P. E. Auron, and D. E. Housman.** 1993. Mouse beta-globin DNA-binding protein B1 is identical to a proto-oncogene, the transcription factor Spi-1/PU. 1, and is restricted in expression to hematopoietic cells and the testis. *Mol. Cell Biol.* **13**:2929–2941.
 25. **Gilkes, D. M., L. Chen, and J. Chen.** 2006. MDMX regulation of p53 response to ribosomal stress. *EMBO J.* **25**:5614–5625.
 26. **Henras, A. K., J. Soudet, M. Gerus, S. Lebaron, M. Caizergues-Ferrer, A. Mouglin, and Y. Henry.** 2008. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* **65**:2334–2359.
 27. **Hensold, J. O., C. A. Stratton, D. Barth, and D. L. Galsou.** 1996. Expression of the transcription factor, Spi-1 (PU. 1), in differentiating murine erythroleukemia cells is regulated post-transcriptionally. Evidence for differential stability of transcription factor mRNAs following inducer exposure. *J. Biol. Chem.* **171**:3385–3391.
 28. **Hollenhorst, P. C., A. A. Shah, C. Hopkins, and B. J. Graves.** 2007. Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes Dev.* **21**:1882–1894.
 29. **Horn, H. F., and K. H. Vousden.** 2008. Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene* **27**:5774–5784.
 30. **Klezovitch, O., M. Risk, I. Coleman, J. M. Lucas, M. Null, L. D. True, P. S. Nelson, and V. Vasioukhin.** 2008. A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:2105–2110.
 31. **Kumar-Sinha, C., S. A. Tomlins, and A. M. Chinnaiyan.** 2008. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**:497–511.
 32. **Lebigot, I., P. Gardellin, L. Lefebvre, H. Beug, J. Ghysdael, and C. T. Quang.** 2003. Up-regulation of SLAP in FLI-1-transformed erythroblasts interferes with EpoR signaling. *Blood* **102**:4555–4562.
 33. **Lee, C. R., D. Cervi, A. H. Truong, Y. J. Li, A. Sarkar, and Y. Ben-David.** 2003. Friend virus-induced erythroleukemias: a unique and well-defined mouse model for the development of leukemia. *Anticancer Res.* **23**:2159–2166.
 34. **Lesault, I., C. T. Quang, J. Frampton, and J. Ghysdael.** 2002. Direct regulation of BCL-2 by FLI-1 is involved in the survival of FLI-1-transformed erythroblasts. *EMBO J.* **21**:694–703.
 35. **Lim, I. K.** 2006. TIS21 (BTG2/PC3) as a link between ageing and cancer: cell cycle regulator and endogenous cell death molecule. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **132**:417–426.
 36. **Lindstrom, M. S., C. Deisenroth, and Y. Zhang.** 2007. Putting a finger on growth surveillance: insight into MDM2 zinc finger-ribosomal protein interactions. *Cell Cycle* **6**:434–437.
 37. **Montanaro, L., D. Trere, and M. Derenzini.** 2008. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am. J. Pathol.* **173**:301–310.
 38. **Moreau-Gachelin, F., F. Wendling, T. Molina, N. Denis, M. Titeux, G. Grimber, P. Briand, W. Vainchenker, and A. Tavitian.** 1996. Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol. Cell Biol.* **16**:2453–2463.
 39. **Nerlov, C., E. Querfurth, H. Kulessa, and T. Graf.** 2000. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* **95**:2543–2551.
 40. **Pereira, R., C. T. Quang, I. Lesault, H. Holznic, H. Beug, and J. Ghysdael.** 1999. FLI-1 inhibits differentiation and induces proliferation of primary erythroblasts. *Oncogene* **18**:1597–1608.
 41. **Perry, R. P.** 2005. The architecture of mammalian ribosomal protein promoters. *BMC Evol. Biol.* **5**:15.
 42. **Quang, C. T., O. Wessely, M. Pironin, H. Beug, and J. Ghysdael.** 1997. Cooperation of Spi-1/PU.1 with an activated erythropoietin receptor inhibits apoptosis and Epo-dependent differentiation in primary erythroblasts and induces their Kit ligand-dependent proliferation. *EMBO J.* **16**:5639–5653.
 43. **Rao, G., N. Rekhman, G. Cheng, T. Krasikov, and A. I. Skoultschi.** 1997. Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. *Oncogene* **14**:123–131.
 44. **Reed, B. D., A. E. Charos, A. M. Szelely, S. M. Weissman, and M. Snyder.** 2008. Genome-wide occupancy of SREBP1 and its partners NFY and SP1 reveals novel functional roles and combinatorial regulation of distinct classes of genes. *PLoS Genet.* **4**:e1000133.
 45. **Rekhman, N., K. S. Choe, I. Matushansky, S. Murray, T. Stopka, and A. I. Skoultschi.** 2003. PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol. Cell Biol.* **23**:7460–7474.
 46. **Rekhman, N., F. Radparvar, T. Evans, and A. I. Skoultschi.** 1999. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev.* **13**:1398–1411.
 47. **Rimmele, P., O. Kosmider, P. Mayeux, F. Moreau-Gachelin, and C. Guillouf.** 2007. Spi-1/PU.1 participates in erythroleukemogenesis by inhibiting apoptosis in cooperation with Epo signaling and by blocking erythroid differentiation. *Blood* **109**:3007–3014.
 48. **Rostad, K., M. Mannelqvist, O. J. Halvorsen, A. M. Oyan, T. H. Bo, L. Stordrange, S. Olsen, S. A. Haukaas, B. Lin, L. Hood, I. Jonassen, L. A. Akslen, and K. H. Kalland.** 2007. ERG upregulation and related ETS transcription factors in prostate cancer. *Int. J. Oncol.* **30**:19–32.
 49. **Ruggero, D., and P. P. Pandolfi.** 2003. Does the ribosome translate cancer? *Nat. Rev. Cancer* **3**:179–192.
 50. **Ruscetti, S. K.** 1999. Deregulation of erythropoiesis by the Friend spleen focus-forming virus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**:1089–1109.
 51. **Schuetze, S., R. Paul, B. C. Gliniak, and D. Kabat.** 1992. Role of the PU.1 transcription factor in controlling differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Mol. Cell Biol.* **12**:2967–2975.
 52. **Seth, A., and D. K. Watson.** 2005. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur. J. Cancer* **41**:2462–2478.
 53. **Starck, J., N. Cohet, C. Gonnet, S. Sarrazin, Z. Doubeikovskaia, A. Doubeikovski, A. Verger, M. Duterque-Coquillaud, and F. Morle.** 2003. Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol. Cell Biol.* **23**:1390–1402.
 54. **Starck, J., A. Doubeikovski, S. Sarrazin, C. Gonnet, G. Rao, A. Skoultschi, J. Godet, I. Dusanter-Fourt, and F. Morle.** 1999. Spi-1/PU.1 is a positive regulator of the Fli-1 gene involved in inhibition of erythroid differentiation in Friend erythroleukemic cell lines. *Mol. Cell Biol.* **19**:121–135.
 55. **Stopka, T., D. F. Amanatullah, M. Papetti, and A. I. Skoultschi.** 2005. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J.* **24**:3712–3723.
 56. **Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, and J. P. Mesirov.** 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:15545–15550.
 57. **Subramanian, A., H. E. Teal, P. H. Correll, and R. F. Paulson.** 2005. Resistance to friend virus-induced erythroleukemia in W/W(v) mice is caused by a spleen-specific defect which results in a severe reduction in target cells and a lack of Sf-Stk expression. *J. Virol.* **79**:14586–14594.
 58. **Sun, C., A. Dobi, A. Mohamed, H. Li, R. L. Thangapazham, B. Furusato, S. Shaheduzzaman, S. H. Tan, G. Vaidyanathan, E. Whitman, D. J. Hawksworth, Y. Chen, M. Nau, V. Patel, M. Vahey, J. S. Gutkind, T. Sreenath, G. Petrovics, I. A. Sesterhenn, D. G. McLeod, and S. Srivastava.** 2008. TM-PRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation. *Oncogene* **27**:5348–5353.
 59. **Sun, X. X., M. S. Dai, and H. Lu.** 2007. 5-Fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction. *J. Biol. Chem.* **282**:8052–8059.
 60. **Tamir, A., J. Howard, R. R. Higgins, Y. J. Li, L. Berger, E. Zacksenhaus, M. Reis, and Y. Ben-David.** 1999. Fli-1, an Ets-related transcription factor, regulates erythropoietin-induced erythroid proliferation and differentiation: evidence for direct transcriptional repression of the Rb gene during differentiation. *Mol. Cell Biol.* **9**:4452–4464.
 61. **Terada, M., E. Epner, U. Nudel, J. Salmon, E. Fibach, R. A. Rifkind, and P. A. Marks.** 1978. Induction of murine erythroleukemia differentiation by actinomycin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:2795–2799.
 62. **Truong, A. H., and Y. Ben-David.** 2000. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* **19**:6482–6489.
 63. **Xi, H., Y. Yu, Y. Fu, J. Foley, A. Halees, and Z. Weng.** 2007. Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. *Genome Res.* **17**:798–806.
 64. **Yamada, T., N. Kondoh, M. Matsumoto, M. Yoshida, A. Maekawa, and T. Oikawa.** 1997. Overexpression of PU.1 induces growth and differentiation inhibition and apoptotic cell death in murine erythroleukemia cells. *Blood* **89**:1383–1393.
 65. **Yang, J. Y., C. S. Zong, W. Xia, H. Yamaguchi, Q. Ding, X. Xie, J. Y. Lang, C. C. Lai, C. J. Chang, W. C. Huang, H. Huang, H. P. Kuo, D. F. Lee, L. Y. Li, H. C. Lien, X. Cheng, K. J. Chang, C. D. Hsiao, F. J. Tsai, C. H. Tsai, A. A. Sahin, W. J. Muller, G. B. Mills, D. Yu, G. N. Hortobagyi, and M. C.**

- Hung.** 2008. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat. Cell Biol.* **10**:138–148.
66. **Zeng, X., L. Chen, C. A. Jost, R. Maya, D. Keller, X. Wang, W. G. Kaelin, Jr., M. Oren, J. Chen, and H. Lu.** 1999. MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol. Cell. Biol.* **19**:3257–3266.
67. **Zhang, P., G. Behre, J. Pan, A. Iwama, N. Wara-Aswapati, H. S. Radomska, P. E. Auron, D. G. Tenen, and Z. Sun.** 1999. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:8705–8710.
68. **Zochodne, B., A. H. Truong, K. Stetler, R. R. Higgins, J. Howard, D. Dumont, S. A. Berger, and Y. Ben-David.** 2000. Epo regulates erythroid proliferation and differentiation through distinct signaling pathways: implication for erythropoiesis and Friend virus-induced erythroleukemia. *Oncogene* **9**:2296–2304.