



HAL
open science

Identification des gènes impliqués dans la coopération oncogénique avec BCR-ABL1 dans la Leucémie Myéloïde Chronique

Emilie Rousseau

► **To cite this version:**

Emilie Rousseau. Identification des gènes impliqués dans la coopération oncogénique avec BCR-ABL1 dans la Leucémie Myéloïde Chronique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0281 . tel-03198642

HAL Id: tel-03198642

<https://theses.hal.science/tel-03198642>

Submitted on 15 Apr 2021

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.

THÈSE PRESENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École Doctorale SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité : **GÉNÉTIQUE**

Par Emilie ROUSSEAU

**Identification des gènes impliqués dans la coopération
oncogénique avec BCR-ABL1 dans la Leucémie Myéloïde
Chronique**

Sous la direction du Pr Martin TEICHMANN

Soutenu le 29 Novembre 2018

Membres du jury :

Pr. François DOIGNON	Bordeaux	Président
Dr. Fabienne MEGGETTO	Toulouse	Rapporteur
Dr. Florence LARMINAT	Toulouse	Rapporteur
Pr. François MOREAU-GAUDRY	Bordeaux	Examinateur

La leucémie myéloïde chronique (LMC) a été le premier cancer humain associé à une anomalie chromosomique : le chromosome de Philadelphie. Le gène de fusion BCR-ABL1 résultant code pour une tyrosine kinase ayant une activité dérégulée. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs), qui inactivent la protéine BCR-ABL1, représentent la thérapie ciblée la plus efficace pour la LMC en phase chronique. Cependant, la LMC en phase avancée ne répond pas bien au traitement par les ITKs. Les mécanismes sous-jacents à la progression de la LMC ne sont pas bien compris. Par conséquent, la découverte de gènes qui coopèrent avec l'oncogène BCR-ABL1, et qui pourraient expliquer la progression de la LMC vers des phases avancées, est nécessaire pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques de la LMC. Nous proposons d'établir un modèle cellulaire humain permettant l'identification de gènes capables de coopérer avec l'oncogène BCR-ABL1 pour une transformation tumorale complète. Ce système repose sur l'expression de *BCR-ABL1* et l'inactivation d'autres gènes en particulier à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9. L'identification des gènes coopérant avec BCR-ABL1 permettra la création de modèles cellulaires pour faciliter la sélection de médicaments capables de traiter la LMC dans les phases finales.

Dans un second temps, une étude approfondie du gène *TP53* a été menée. Ce gène étant muté dans plus de 50% des cancers, il est important de déterminer les conséquences de son inactivation dans des fibroblastes humains non tumoraux. La technologie CRISPR-Cas9 a été utilisée afin d'inactiver ce gène en particulier. Puis les cellules exprimant la forme sauvage ou la forme inactivée de p53 ont subi un traitement à la nutline-3a. Cette molécule empêche l'interaction du facteur de transcription p53 avec son inhibiteur MDM2. Des analyses transcriptomiques ont alors permis d'identifier d'une part les cibles aspécifiques de la nutline-3a et d'autre part les gènes cibles de p53 dans cette lignée de fibroblaste.

Mots clés : LMC, BCR-ABL1, modèle cellulaire humain, transformation tumorale, CRISPR-Cas9, p53

Chronic myeloid leukemia (CML) was the first human cancer to be consistently associated with a chromosomal abnormality: the Philadelphia chromosome. The resulting BCR-ABL1 fusion gene encodes a tyrosine kinase with deregulated activity. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) inactivating the BCR-ABL protein represent the most successful targeted therapy for CML in chronic phase. However, advanced CML does not respond well to TKIs treatment. The mechanisms underlying the progression of CML are not well understood. Therefore, the discovery of genes that cooperate with the BCR-ABL1 oncogene, which could explain the progression of CML to advanced phases, is required for the identification of novel therapeutic targets of CML. We propose to establish a human cellular model system that allows the identification of genes that are able to cooperate with the oncogene BCR-ABL1 for full tumoral transformation. This system relies on the expression of BCR-ABL1 and the generation of gene knock-out by using the CRISPR-Cas9 technology. Identification of genes cooperating with BCR-ABL1 will permit the creation of cellular model systems for identifying drugs that are able to treat CML in final phases.

Secondly, we performed a detailed study of TP53 function. This gene is mutated in more than 50% of all cancer types. It is therefore crucial to understand the impact of its inactivation in human fibroblast cells. The CRISPR/Cas9 system was used to inactivate this gene. Wild-type and TP53 knock-out cells subsequently underwent nutlin-3a treatment. This molecule blocks the interaction between p53 and its regulator: MDM2. Transcriptomic analyses were performed to further study p53 regulated genes, and also to discover other potential nutlin-3a targets.

Keywords : CML, BCR-ABL1, human cellular model, tumoral transformation, CRISPR-Cas9, p53

Table des matières

Liste des figures	7
Liste des abréviations	11
Avant-propos	13
Introduction	15
Chapitre 1	15
I. Transformation des cellules humaines via des éléments génétiques définis.....	15
A. Cellules tumorales : causes et conséquences	15
B. Cellules tumorales : transformation contrôlée en laboratoire	16
II. La leucémie myéloïde chronique : LMC.....	18
A. Généralités	18
B. La transformation médiée par <i>BCR-ABL</i>	21
C. La lutte contre la LMC : les inhibiteurs de tyrosine kinase	30
D. Les mécanismes impliqués dans l'évolution de la LMC	33
E. Les modèles existants pour l'étude de la LMC.....	35
III. Le système CRISPR-Cas9	39
A. Un système d'édition du génome.....	39
B. Le système CRISPR-Cas9 pour la modélisation d'altérations oncogéniques.....	41
C. Le système CRISPR-Cas9 en masse : les banques	45
IV. Construction d'un modèle cellulaire pour l'étude de la LMC.....	49
Chapitre 2	53
I. « Tumor Protein 53 » : <i>TP53</i>	53
II. Structure de p53	54
A. La famille p53	54
B. Les protéines codées par <i>TP53</i>	55
III. Régulation de p53.....	57
A. Activation de p53.....	57
B. Maintenir p53 sous contrôle.....	59
IV. Les gènes cibles de p53	61
A. L'arrêt du cycle cellulaire	62
B. La réparation de l'ADN	63
C. L'apoptose.....	64
D. La rétroaction	65
V. p53 et cancers	65
A. Mutation du gène <i>TP53</i> : inactivation vs gain de fonction	65
B. p53 : une cible à inactiver	67
VI. Augmenter l'expression de p53 dans des cellules en culture : la nutline-3a.....	68
Matériels et méthodes	71

I.	Matériels.....	71
A.	Souche bactérienne	71
B.	Les lignées cellulaires	71
C.	Les milieux et conditions de culture	71
D.	Les plasmides.....	72
E.	Les anticorps	73
II.	Méthodes	74
A.	Production des bactéries électro-compétentes	74
B.	Transformation des bactéries	74
C.	Préparation de l'ADN plasmidique.....	74
D.	Clonage des CRISPR	74
E.	Transfection des cellules humaines.....	75
F.	Infection des cellules.....	76
G.	Extraction des protéines	76
H.	Dosage des protéines.....	77
I.	Western Blot	77
J.	Extraction des ARN totaux.....	78
K.	RT-qPCR.....	79
L.	Croissance en agar mou (soft agar assay)	80
	Résultats.....	81
I.	Mise en place du ciblage des gènes par la technique CRISPR-Cas9	81
A.	Création de la lignée BJ-5ta exprimant la Cas9.....	81
B.	Validation de l'efficacité du système CRISPR-Cas9.....	82
II.	Absence de <i>BCR-ABL1</i>	83
	Chapitre 1.....	85
	Modélisation de la Leucémie Myéloïde Chronique	85
I.	Intégration de la séquence codante de l'oncogène <i>BCR-ABL1</i>	85
A.	Amplification du transcrite BCR-ABL1	86
B.	Détection de la protéine par western blot.....	89
C.	Vérification du statut tumoral des cellules.....	91
D.	Vérification de la fonctionnalité de la protéine BCR-ABL1	92
II.	Validation de la construction en plusieurs étapes de ce modèle	93
III.	Réalisation du KO p53	95
A.	Détection du KO par RT-PCR	96
B.	Validation du KO par séquençage	97
C.	Détection de la protéine tronquée par western blot.....	98
D.	Validation par RT-qPCR des effets du KO de p53	100
E.	Déléter <i>TP53</i> est-il suffisant pour transformer les cellules ?.....	102
IV.	Clonage d'un nouveau vecteur BCR-ABL1	103
	Chapitre 2.....	107
	KO du gène <i>TP53</i> dans des cellules BJ-5ta exprimant la Cas9.....	107
I.	Caractérisation des cellules KO p53	107

A.	Analyse de la transcription des gènes cibles de p53 entre la lignée <i>TP53^{WT}</i> et <i>TP53^{KO}</i>	108
B.	Analyse de l'expression des protéine p53, p21 et MDM2 entre la lignée <i>TP53^{WT}</i> et <i>TP53^{KO}</i>	113
II.	Séquençage des ARN totaux pour les cellules <i>TP53^{WT}</i> et <i>TP53^{KO}</i> +/- nutline-3a	114
A.	Comparaison des lignées <i>TP53^{KO}</i> et <i>TP53^{KO}</i> traitées à la nutline-3a	114
B.	Comparaison des lignées <i>TP53^{WT}</i> et <i>TP53^{WT}</i> nut	115
III.	Le cas particulier de <i>CXCL8</i>	117
A.	La transcription de <i>CXCL8</i> en réponse à la nutline-3a	118
B.	La transcription de <i>CXCL8</i> en réponse à $\text{IL-1}\beta$	121
C.	La transcription en réponse à la nutline-3a ou/et $\text{IL-1}\beta$	124
D.	Le promoteur <i>CXCL8</i>	126
	Discussion - Perspectives	129
	Chapitre 1	132
	Chapitre 2	139
	Bibliographie	143

Liste des figures

FIGURE 1 : LES CARACTERISTIQUES DES CELLULES CANCEREUSES	16
FIGURE 2 : TRANSLOCATION DU CHROMOSOME 9 ET DU CHROMOSOME 22 T(9;22) : FORMATION DU CHROMOSOME PHILADELPHIE	18
FIGURE 3 : MODELE REPRESENTANT LA PROGRESSION DE LA LMC ENTRE LA PHASE CHRONIQUE ET LA CRISE BLASTIQUE	20
FIGURE 4 : LES DIFFERENTS TRANSCRITS DE FUSION PRINCIPALEMENT OBTENUS POUR BCR-ABL1	22
FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PROTEINE DE FUSION BCR-ABL1 DE 210kDA ET DE SES DIFFERENTS DOMAINES	23
FIGURE 6 : LES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR LA PROTEINE BCR-ABL1	24
FIGURE 7 : LA VOIE RAS/RAF/MEK/ERK (D'APRES KIM AND BAR-SAGI, 2004).....	25
FIGURE 8 : MECANISME D'ACTIVATION DE LA VOIE PI3K PAR BCR-ABL1	26
FIGURE 9 : SUBSTRATS PHOSPHORYLES PAR AKT SUITE A SA PROPRE ACTIVATION PAR PI3K	27
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ACTIVATION DISTINCTE DES VOIES JAK2 ET STAT5 PAR BCR-ABL1	29
FIGURE 11 : MECANISME D'ACTION DE L'IMATINIB POUR INHIBER LA FONCTION DE BCR-ABL1	31
FIGURE 12 : REPRESENTATION ET POSITIONNEMENT DES MUTATIONS PERTURBANT LES TRAITEMENTS PAR LES ITKS.....	33
FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CLIVAGE D'UNE SEQUENCE D'ADN RECONNUE PAR LE SYSTEME CRISPR-Cas9	40
FIGURE 14 : REPRESENTATIONS SCHEMATIQUE DES VOIES DE REPARATION PAR NHEJ OU RH D'UNE CASSURE DOUBLE-BRIN DANS L'ADN SUITE A L'ACTION DU SYSTEME CRISPR-Cas9	41
FIGURE 15 : L'EXPRESSION DE DEUX ARN GUIDES ET DE LA Cas9 PERMET DE DELETER UN FRAGMENT D'UN GENE	43
FIGURE 16 : INVERSION CHROMOSOMIQUE IMPLIQUANT LES GENES 1 ET 2 SUITE A L'ACTION DE LA PROTEINE Cas9 ET DE DEUX ARN GUIDES CIBLANT CES GENES EN QUESTION	44
FIGURE 17 : SI LES ARN GUIDES CIBLANT DES CHROMOSOMES DIFFERENTS, ALORS LE SYSTEME CRISPR-Cas9 PEUT GENERER UNE TRANSLOCATION CHROMOSOMIQUE.....	45
FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SYSTEME SAM PERMETTANT LA SUREXPRESSION DES GENES.....	48
FIGURE 19 : NOMBRE D'ARTICLES PUBLIES DANS PUBMED SUR P53 DEPUIS LES ANNEES 70.....	53
FIGURE 20 : ARBRE GENEALOGIQUE SIMPLIFIE REPRESENTANT LA PRESENCE DES MEMBRES DE LA FAMILLE P53 AU COURS DU TEMPS	54
FIGURE 21 : STRUCTURE DES PROTEINES DE LA FAMILLE P53	55
FIGURE 22 : LES DIFFERENTES ISOFORMES PROTEIQUES DE P53 CODEES PAR LE GENE HUMAIN TP53	56
FIGURE 23 : CARTOGRAPHIE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA PROTEINE P53 HUMAINE.....	57
FIGURE 24 : REPRESENTATION D'UN MODELE DE L'ACTIVATION DE P53 SUITE A UN STRESS CELLULAIRE	59
FIGURE 25 : P53 EST CAPABLE D'ACTIVER DIRECTEMENT DES GENES CIBLES IMPLIQUES DANS DIVERS PROCESSUS CELLULAIRES ..	62
FIGURE 26 : POSITIONNEMENT DES MUTATIONS LES PLUS FREQUEMMENT OBSERVEES POUR P53 DANS LES CANCERS	66
FIGURE 27 : CARTE DU PLASMIDE pCas9I_BLASTR.....	81
FIGURE 28 : WESTERN BLOT AYANT PERMIS LA DETECTION DE LA PROTEINE Cas9 DANS LES CELLULES BJ-5TA INFECTEES PAR LE pCas9I_BLASTR ET AVEC OU SANS INDUCTION A LA DOXYCYCLINE.....	82
FIGURE 29 : ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DE LA PROPORTION DE CELLULES FLUORESCENTES GFP PARMIS UNE POPULATION DONT LE GENE CODANT POUR LA GFP EST CIBLE PAR LE SYSTEME CRISPR-Cas9	83
FIGURE 30 : FISH REALISEE SUR LES CELLULES BJ_Cas9I_BLASTR AFIN DE REVELER LA PRESENCE DES GENES BCR ET ABL1 .	84
FIGURE 31 : CARTE DU PLASMIDE p252_BCRABL1	85
FIGURE 32 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA POSITION DES AMORCES DE PCR PERMETTANT DE VERIFIER LA PRESENCE DU TRANSCRIT BCR-ABL1 DANS LES CELLULES INFECTEES.....	86

FIGURE 33 : ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE (1%) DES PCR REALISEES SUR LES ADNc DES CELLULES BJ_Cas9I_BLAStR FLUORESCENTES SUITE A L'INFECTION PAR LE VIRUS p252_BCRABL1	87
FIGURE 34 : WESTERN BLOT POUR LA SELECTION DES CELLULES AYANT UNE TRADUCTION EN PROTEINE DU TRANSCRIT BCR-ABL1	89
FIGURE 35 : WESTERN BLOT CONTRE LES PROTEINES BCR ET ABL1 AFIN DE VALIDER LE FAIT QUE LA BANDE OBSERVEE EST LIE A L'EXPRESSION DE L'ONCOGENE BCR-ABL1	90
FIGURE 36 : PHOTOS DES CELLULES CULTIVEES EN AGAR MOU (x4)	91
FIGURE 37 : WESTERN BLOT REVELANT LES PROTEINES CRKL ET STAT5 SOUS LEUR ETAT NON PHOSPHORYLE OU PHOSPHORYLE	92
FIGURE 38 : NOMBRE MOYEN DE COLONIES FORMEES POUR CHACUNE DES LIGNEES DONT LA CROISSANCE A ETE TESTEE EN AGAR MOU	94
FIGURE 39 : PHOTOS DES CELLULES ISSUES DU CLONE 2 (BJ_Cas9I_BLAStR) CULTIVEES EN AGAR MOU (x4)	94
FIGURE 40 : ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE (1%) DES PCR REALISEES SUR LES ADNc ISSUS DES CELLULES DONT LE STATUT DU GENE TP53 EST A DETERMINER	96
FIGURE 41 : RESULTATS DU SEQUENÇAGE DES ADNc CORRESPONDANT A TP53 ET AMPLIFIES PAR PCR	97
FIGURE 42 : MISE EN EVIDENCE PAR WESTERN BLOT DES FORMES DE LA PROTEINE P53 DANS LES DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES MODIFIEES	99
FIGURE 43 : MISE EN EVIDENCE PAR WESTERN BLOT DES FORMES DE LA PROTEINE P53 DANS LES DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES MODIFIEES LES LIGNEES « CLONE 1 » ET « CLONE 1_BCRABL1 » POSSEDENT LA FORME SAUVAGE DU GENE TP53 ET EXPRIMENT DONC LA FORME SAUVAGE DE LA PROTEINE P53. LES LIGNEES « CLONE 1_BCRABL1_p53- » POSSEDENT LE GENE TP53 DELETE DE L'EXON 4 ET EXPRIMENT UNE FORME TRONQUEE DE LA PROTEINE P53 (Δ P53).	100
FIGURE 44 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION BASALE DES GENES CDKN1A, BBC3 ET MDM2 DANS LES CELLULES AYANT LA FORME SAUVAGE OU TRONQUEE DE TP53	101
FIGURE 45 : PHOTOS DES CELLULES ISSUES DU CLONE 3 (BJ_Cas9I_BLAStR) CULTIVEES EN AGAR MOU (x4)	102
FIGURE 46 : CARTE DU PLASMIDE p197_HYGRO_3xFLAG_BCRABL1	103
FIGURE 47 : DETECTION DE LA PROTEINE BCR-ABL1 PAR WESTERN BLOT ET PAR UN ANTICORPS DIRIGE CONTRE LE 3xFLAG	104
FIGURE 48 : DETECTION DE LA PROTEINE BCR-ABL1 PAR WESTERN BLOT, PAR DES ANTICORPS DIRIGES CONTRE BCR ET CONTRE ABL1	105
FIGURE 49 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION BASALE DES GENES CDKN1A, BBC3, MDM2 ET TP53 LUI-MEME DANS LES CELLULES AYANT LA FORME WT OU KO DE TP53	107
FIGURE 50 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION DES GENES TP53, CDKN1A, BBC3 ET MDM2 DANS LES CELLULES TP53 ^{WT} TRAITEES OU NON A 8 μ M DE NUTLINE-3A PENDANT 24H	108
FIGURE 51 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION DES GENES TP53, CDKN1A, BBC3 ET MDM2 ENTRE LES CELLULES TP53 ^{WT} ET LES CELLULES TP53 ^{KO} TRAITEES OU NON A 8 μ M DE NUTLINE-3A PENDANT 24H	109
FIGURE 52 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION DES GENES TP53, CDKN1A, BBC3 ET MDM2 DANS LES CELLULES TP53 ^{WT} TRAITEES A 8 μ M DE NUTLINE-3A SUR DES TEMPS VARIABLES (ENTRE 0 ET 24 HEURES)	110
FIGURE 53 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION DES GENES TP53, CDKN1A, BBC3 ET MDM2 DANS LES CELLULES TP53 ^{WT} TRAITEES A 8 μ M DE NUTLINE-3A SUR DES TEMPS VARIABLES (ENTRE 0 ET 2 HEURES)	111
FIGURE 54 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION DES GENES E2F1, CCNA2, CCNB1 ET CCNB2 DANS LES CELLULES TP53 ^{WT} TRAITEES A 8 μ M DE NUTLINE-3A SUR DES TEMPS VARIABLES (ENTRE 0 ET 24 HEURES)	112
FIGURE 55 : DETECTION PAR WESTERN BLOT DES PROTEINES p53, p21 ET MDM2 DANS LES CELLULES TP53 ^{WT} ET TP53 ^{KO} SUITE A UN TRAITEMENT A LA NUTLINE-3A SUR DES TEMPS VARIABLES (ENTRE 0 ET 6 HEURES)	113
FIGURE 56 : IDENTIFICATION PAR UN DIAGRAMME DE VENN DE 50 GENES QUI REPRESENTENT DE POTENTIELLES NOUVELLES CIBLES DE p53	116
FIGURE 57 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION DE SEPT GENES AFIN DE DETERMINER S'ILS SONT DES CIBLES DE p53 ...	117

FIGURE 58 : SUIVI DE LA TRANSCRIPTION BASALE DES GENES CXCL8, CDKN1A, BBC3 ET MDM2 DANS LES LIGNEES TP53 ^{WT} ET TP53 ^{KO} LA LIGNEE UTILISEE COMME REFERENCE EST LA LIGNEE TP53 ^{WT}	118
FIGURE 59 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION DU GENE CXCL8 DANS LES CELLULES TP53 ^{KO} TRAITÉES A 8μM DE NUTLINE-3A SUR DES TEMPS VARIABLES (0 A 24 HEURES)	119
FIGURE 60 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION DU GENE CXCL8 DANS LES CELLULES TP53 ^{WT} TRAITÉES A 8μM DE NUTLINE-3A SUR DES TEMPS VARIABLES (0 A 24 HEURES)	120
FIGURE 61 : SUIVI PAR RT-QPCR DE LA TRANSCRIPTION DE CXCL8 DANS LES CELLULES TP53 ^{WT} ET TP53 ^{KO} APRES UN TRAITEMENT DE 24 HEURES A 0,5 NG/ML D'IL-1B	121
FIGURE 62 : SUIVI DE LA TRANSCRIPTION DES GENES CDKN1A, BBC3 ET MDM2 SUITE AU TRAITEMENT DES CELLULES TP53 ^{WT} ET TP53 ^{KO} A IL-1B.....	122
FIGURE 63 : SUIVI DE LA TRANSCRIPTION DES GENES CDKN1A, BBC3 ET MDM2 SUITE AU TRAITEMENT DES CELLULES TP53 ^{WT} ET TP53 ^{KO} A IL-1B.....	123
FIGURE 64 : SUIVI DE LA TRANSCRIPTION DES GENES CXCL8, CDKN1A, BBC3 ET MDM2 SUITE AU TRAITEMENT DES CELLULES TP53 ^{WT} ET TP53 ^{KO} A LA NUTLINE-3A OU/ET A IL-1B.....	124
FIGURE 65 : SUIVI DE LA TRANSCRIPTION DES GENES CDKN1A, BBC3 ET MDM2 SUITE AU TRAITEMENT DES CELLULES TP53 ^{WT} ET TP53 ^{KO} A LA NUTLINE-3A OU/ET A IL-1B	126

Liste des abréviations

ABL1 : Abelson 1
ADNc : ADN complémentaire
ARNi : ARN interférence
ARNm : ARN messenger
BBC3 : BCL2 Binding Component 3
BCR : breakpoint cluster region
BJ : cellules BJ-5ta
blastR : gène de résistance à la blasticidine
Cas9 : CRISPR-associated 9
Cas9i : séquence codante de la protéine Cas9 sous contrôle d'un promoteur inductible
CC : Coiled-coil
CDK : kinase cycline dépendante
CDKN1A : inhibiteur de kinase cycline dépendante 1A
CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CRKL : CRK-oncogene-like
C-term : C-terminal
CXCL8 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 8
DBD : Domaine de liaison à l'ADN
GeCKO : Genome-scale CRISPR Knock-Out
GFP : protéine fluorescente verte
GRB2 : growth factor receptor-bound protein 2
HPV : papillomavirus humain
hTERT : sous-unité catalytique de la télomérase humaine
i(17q) : isochromosome 17 qui a dupliqué son bras long (q)
Il-8 : interleukine 8
Indels : insertions / délétions
ITKs : inhibiteur de tyrosine kinase
JAK : Janus kinase
KI : Knock-in
KO : Knock-out
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
MDM2 : Murine Double Minute 2
MPTs : modification post-traductionnelle
NHEJ : non-homologous end-joining
NLS : signal de localisation nucléaire
N-term : N-terminal
nut : traitement à la nutline-3a
OD : domaine d'oligomérisation
P : phosphorylation ; A : acétylation ; Ub : ubiquitination ; M : méthylation
p53 RE : p53 response element
PAM : Protospacer adjacent motif

PCR : Polymerase Chain Reaction
Ph : chromosome de Philadelphie
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PP2A : protéine phosphatase 2A
PR : domaine riche en proline
PUMA : P53-Upregulated Modulator Of Apoptosis
qPCR : PCR quantitative
RAS-G12V : gène RAS portant une mutation G12V
RB1 : gène du rétinoblastome
RH : Recombinaison Homologue
RIN : RNA Integrity Number
RNA-seq : séquençage des ARN
RT-PCR : Reverse transcriptase PCR
RT-qPCR : Reverse transcriptase quantitative PCR
SAM : sterile alpha motif (contexte p53)
SAM : Synergistic Activation Mediators (contexte CRISPR-Cas9)
SCID : severe combined immunodeficiency
Ser / Thr : sérine / thréonine
sgARN : ARN single guide
SH : src homology
STAT : signal transducer and activator of transcription
SV40 : Virus simien 40
t(9 ;22) : translocation entre les chromosomes 9 et 22
TA : domaine de transactivation
TK : Tyrosine kinase
TP53 : Tumor protein 53
TP53^{KO} : KO du gène TP53
TP53^{WT} : gène TP53 sauvage

Avant-propos

Contrairement aux cellules normales, les cellules tumorales acquièrent et cumulent différentes altérations génétiques. Ces mutations sont souvent à la base du développement du cancer, de sa progression ou encore l'absence de réponse à un traitement. Ainsi, l'intérêt des systèmes cellulaires modèles repose sur leur capacité à contenir les aberrations génétiques observées dans les tumeurs primaires ainsi que leurs conséquences sur les différentes voies de signalisation dans la cellule.

Des lignées cancéreuses issues de patients sont souvent utilisées comme modèles expérimentaux établis de cancers. Pendant de nombreuses années, ces lignées cellulaires ont notamment été utilisées comme outils pour la découverte de drogues à utiliser comme traitement au cancer en question (Sharma et al. 2010). Et bien que certaines propriétés liées aux cellules d'origine soient conservées par ces lignées cellulaires et que la pertinence de ces modèles soit établie, il existe des différences importantes par rapport aux tumeurs *in vivo* dont elles sont issues. Ces changements génétiques, épigénétiques ou d'expressions d'ARN et/ou de protéines s'expliquent par une sélection et une évolution *in vitro* des cellules. Outre cette constatation, il existe surtout une hétérogénéité génétique importante au sein d'une population de patients atteints par un cancer. Quoiqu'il en soit il s'agit là d'un système modèle très répandu pour l'étude des processus biologiques impliqués dans le développement des cancers (Staveren et al. 2009).

La création de cellules tumorales humaines modèles, en ciblant des éléments génétiques définis, est également une méthode permettant l'étude des mécanismes primaires impliqués dans le processus de cancérisation (Hahn et al. 1999). Cette méthode permet notamment de suivre à chacune des étapes de la transformation, les changements provoqués sur différentes voies de signalisation. Les outils mis au point ces dernières années tendent à faciliter la création et l'utilisation de ces modèles. Leur performance repose sur une utilisation simple tout en diminuant les biais liés à l'expérimentation. Par l'utilisation de ces méthodes et de leurs contrôles, les interprétations qui peuvent être faites à partir des systèmes construits sont d'autant plus solides. Avec ces modèles, les événements se produisant de façon précoce dans la voie de cancérisation peuvent être étudiées plus particulièrement. En effet, lorsqu'ils sont dépistés, les cancers sont déjà formés. C'est donc l'ensemble des mutations qui en sont responsables qui sont présentes dans les cellules cancéreuses. Avoir un modèle qui permette d'étudier à chaque nouvelle mutation les conséquences qui en découlent induit une nouvelle compréhension du

processus de cancérisation et un nouveau point de vue quant aux marqueurs à cibler, dans le cas d'un dépistage, ou concernant les stratégies thérapeutiques à adopter.

Introduction

Chapitre 1

I. Transformation des cellules humaines via des éléments génétiques définis

A. Cellules tumorales : causes et conséquences

Il est clair que la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses peut découler d'une accumulation de mutations dans leur génome. Ces altérations génétiques permettent aux cellules de dépasser les systèmes de contrôle qui adaptent leur survie et leur prolifération aux besoins d'un organe ou tissu donné. Il est estimé que pour qu'une transformation tumorale soit complète il faut entre deux et six mutations qui interviennent à la fois pour inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation d'oncogènes (Kandoth et al. 2014). Ces mutations sont qualifiées de conductrices. Elles peuvent être accompagnés par des mutations passagères n'étant pas capables de transformer une cellule mais contribuant à l'expansion clonale. Les cellules vont alors acquérir un ensemble de caractéristiques communes qui définissent le phénotype tumoral transmissibles aux cellules filles : une immortalité et une prolifération anarchique entre autres. En 2000, Hanahan et Weinberg ont défini six caractéristiques communes et essentielles pour décrire les cellules cancéreuses : l'auto-suffisance en facteurs de croissance, la perte du contrôle du cycle cellulaire, la résistance à l'apoptose, un potentiel répliatif illimité (immortalisation), l'angiogenèse tumorale et l'invasion tissulaire/métastases (figure 1)(Hanahan et Weinberg 2000).

Les cellules tumorales *in vitro*, en culture cellulaire, ont la capacité de se multiplier sans nécessité d'un support pour s'ancrer. *In vivo*, les cellules cancéreuses vont former des tumeurs, envahir les tissus sains, induire l'angiogenèse et générer des métastases.

Plus récemment, de nouvelles caractéristiques des cellules cancéreuses ont été mises en évidence. La capacité de modifier ou de reprogrammer le métabolisme cellulaire afin de soutenir la prolifération néoplasique et le fait d'échapper à une destruction par le système immunitaire (figure 1)(Hanahan et Weinberg 2011). De plus le processus de cancérisation s'auto-alimente puisque les cellules cancéreuses présentent une forte instabilité génétique responsable à la fois de la progression du cancer mais également de l'absence de réponse à un traitement.

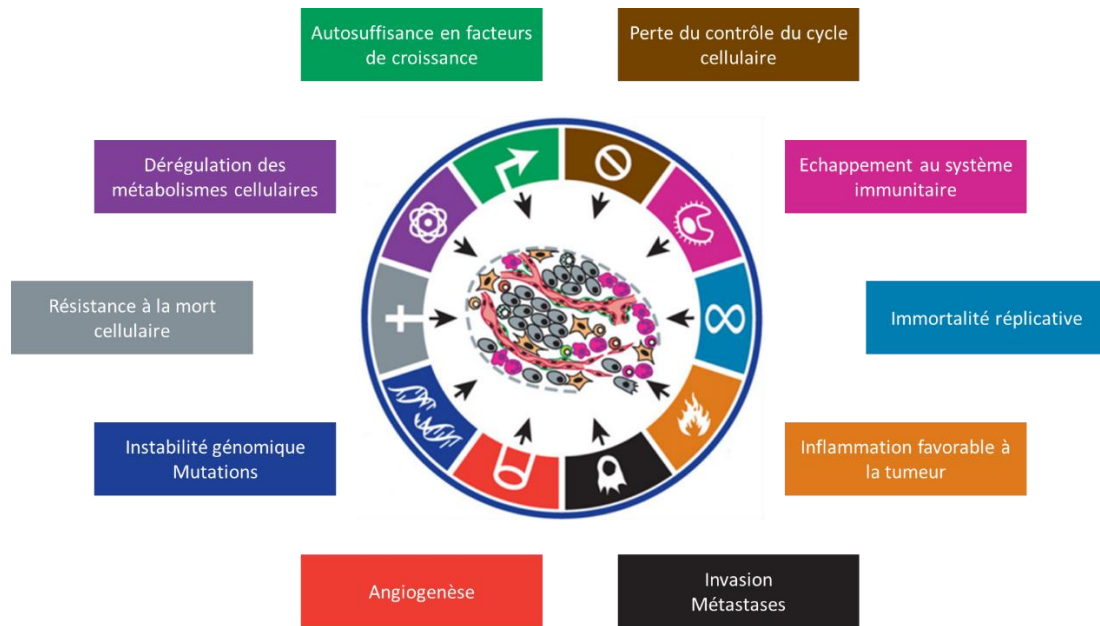


Figure 1: Les caractéristiques des cellules cancéreuses
D'après Hanahan et Weinberg, 2011

Une tumeur peut ainsi contenir de nombreuses mutations. La plupart de ces mutations sont considérées passagères, par opposition aux mutations conductrices, car elles ne participent pas au processus oncogénique en lui-même mais sont en fait une conséquence de la transformation des cellules (Kandoth et al. 2014; Vogelstein et al. 2013). Dans ces conditions il est difficile d'identifier quel gène en particulier peut être impliqué dans l'aggravation de la maladie ou dans sa capacité, innée ou acquise, à résister à un traitement. D'autant plus compliqué qu'il ressort désormais qu'il n'y a pas seulement des mutations qui sont impliquées dans la tumorigénèse, mais aussi des altérations épigénétiques (Beggs et al. 2013).

B. Cellules tumorales : transformation contrôlée en laboratoire

Des études ont montré que la co-expression d'oncogènes dans des cellules de rongeurs permet la conversion de cellules saines en cellules tumorales (Land et al. 1983; Ruddle 1983). En revanche en appliquant la même expérience à des cellules humaines, ceci n'avait pas permis la transformation des cellules (O'Brien et al. 1986; Stevenson et Volsky 1986). La différence biologique majeure entre les cellules de rongeurs et les cellules humaines utilisées concernait les télomères (Hahn et al. 1999). En effet, les cellules de rongeurs montrent une longueur des télomères supérieure à celle des cellules humaines. Il a alors été montré qu'une expression ectopique de la sous-unité catalytique de la télomérase (*hTERT*) combinée à l'expression d'onco-

protéines issues du SV40 et de l'oncogène *RAS*, induit un phénotype tumoral chez des cellules humaines qui étaient saines (Hahn et al. 1999). Les observations faites sur des cellules issues de tumeurs humaines tendent à supposer qu'une activité de la télomérase contribue au processus de tumorigénération (Shay et Bacchetti 1997).

Plusieurs expériences de transformation ont été menées. Dans un modèle en particulier, les gènes *RBI*, *TP53* et *PP2A* ont été inactivés par des éléments génétiques définis, conjointement à l'activation constitutive de *RAS*. Ces changements sont suffisants pour une multiplication incontrôlée des cellules. Pour rendre ces cellules immortelles, il a suffi d'introduire la séquence codante *hTERT* qui protège les télomères du raccourcissement naturel. Le processus de transformation est alors total et les cellules sont tumorales. Plus exactement ces cellules transformées expriment la protéine Large T du SV40 qui cible et inactive les protéines Rb et p53, les produits des gènes suppresseurs de tumeur *RBI* et *TP53*. Elles expriment également la protéine small T du SV40 qui lie et inhibe la protéine phosphatase 2A (PP2A), l'oncogène *RAS* et *hTERT* (Hahn et al. 2002). Il semble donc qu'inactiver (p53, Rb et PP2A), changer l'expression (*hTERT*) ou muter (*RAS*) ces cinq éléments dans une cellule humaine suffisent à installer un phénotype tumoral. Avec son modèle, Hahn et al., rapportent également que l'absence d'un seul de ces éléments, empêche le phénotype tumoral de s'installer. D'autres éléments exprimés conjointement ont également permis une transformation totale de cellules humaines. Dans ce cas les cellules exprimaient les protéines E6 et E7 du papillomavirus (HPV16), *hTERT*, *RAS* et la protéine small T du SV40 (Hahn et al. 2002). A l'instar de la protéine large T du SV40, les protéines E6 et E7 vont respectivement cibler et inactiver les protéines p53 et Rb.

Cette démarche de transformation des cellules primaires humaines en cellules tumorales est déjà maîtrisée au laboratoire (Durrieu-Gaillard et al. 2017). Les cellules IMR90 ont été transformées par cinq étapes distinctes. Les cellules ont été infectées par des rétrovirus pour permettre l'expression des protéines E6 et E7 du papillomavirus (HPV16), mais aussi l'antigène small T du SV40. Ces cellules, toujours par la voie des rétrovirus, surexpriment *RAS-G12V* et *hTERT*. Ces modifications permettent l'obtention d'un modèle de transformation tumoral exploitable à différentes étapes de la transformation et dont les éléments génétiques sont connus. Dans ce cas, le processus de transformation s'appuie sur des éléments génétiques qui sont fréquemment perturbés dans les cancers.

Il est aussi possible de construire des modèles de transformation en s'appuyant sur les mêmes outils afin d'obtenir un modèle plus fidèle d'un cancer en particulier. Par exemple, dans le cas de la leucémie myéloïde chronique, une mutation en particulier se produit et est responsable de

la mise en place du cancer. Il s'agit de l'oncogène *BCR-ABL1*. La voie virale permet d'intégrer la séquence codante de cet oncogène dans des cellules saines et de suivre les changements qui auront lieu dans la cellule.

II. La leucémie myéloïde chronique : LMC

La leucémie est une maladie du sang qui se caractérise par une augmentation importante du nombre de globules blancs. Dans le cas d'une leucémie myéloïde, la moelle osseuse produit des leucocytes de façon excessive. Ces globules blancs sont dits anormaux car ils sont immatures au moment de leur passage dans la circulation sanguine. Finalement le terme chronique indique que la maladie évolue lentement dans les premières années de la maladie. La LMC représente 15% à 20% des leucémies de l'adulte (Kang et al. 2016).

A. Généralités

1. Origine de la LMC

L'apparition de la maladie est liée, dans 95% des cas, à une anomalie génétique : la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 ($t(9;22)$) dans une cellule souche hématopoïétique (figure 2). Le chromosome 22 ainsi obtenu sera plus court et est appelé chromosome de Philadelphie (Ph), du fait de la ville dans laquelle il a été mis à jour (Nowell et Hungerford 1960).

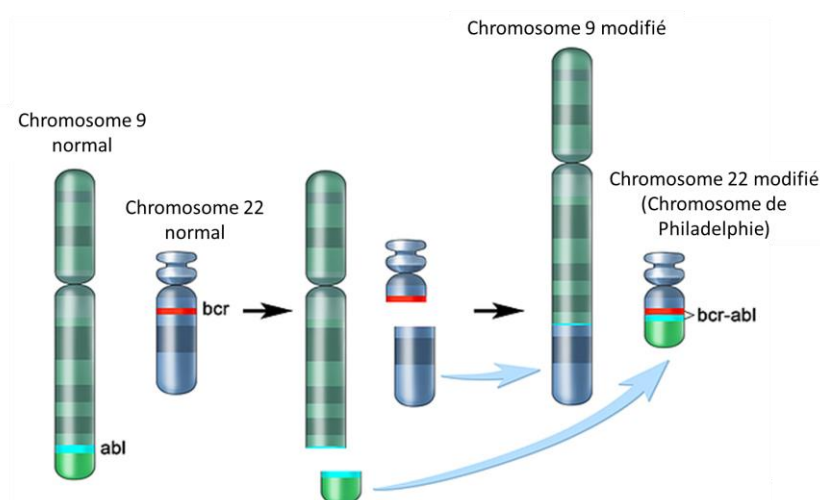


Figure 2 : Translocation du chromosome 9 et du chromosome 22 $t(9;22)$: formation du chromosome Philadelphie

Le chromosome de Ph a été la première aberration chromosomique à être associée à un cancer humain et a été identifié pour la première fois en 1960 chez un patient atteint de la LMC. Cette translocation réciproque induit l'assemblage du proto-oncogène *Abelson (ABL1)* du bras long du chromosome 9 avec le gène *Breackpoint Cluster Region (BCR)* du bras long du chromosome 22. Cette translocation t(9 ;22)(q34 ;q11) forme l'oncogène de fusion *BCR-ABL1* qui code pour la tyrosine kinase constitutivement active BCR-ABL1 (Shtivelman et al. 1985). Cette protéine n'est présente que dans les cellules leucémiques et joue un rôle essentiel dans la mise en place et l'aggravation de la leucémie. La preuve que l'expression de *BCR-ABL1* est nécessaire et suffisant pour induire la LMC a été apporté par un modèle murin (Daley et al. 2002).

2. Les signes cliniques

La LMC évolue en 3 phases cliniques distinctes et consécutives. La première est la phase chronique. La maladie évolue alors lentement, 4 à 5 ans en absence d'un traitement, et il y a peu de symptômes. C'est souvent à ce stade que la maladie est détectée, après un examen cytogénétique permettant le dépistage du chromosome de Ph dans 95% des cas. Puis suit la phase d'accélération, durant laquelle il y a augmentation du nombre de globules blancs immatures dans le sang (figure 3). Il y a également une augmentation de la charge BCR-ABL1 et l'apparition de nouvelles anomalies chromosomiques. Il y a plus de symptômes bien qu'ils soient non spécifiques. Si un traitement n'est pas mis en œuvre, la maladie va alors rapidement évoluer vers la phase blastique ou aigüe. La maladie est alors très grave et est rapidement mortelle. Durant cette phase, la différenciation hématopoïétique est bloquée à un stade précoce et il y a alors plus de 30% de cellules immatures, appelés blastes, circulant dans le sang (Clarke et Holyoake 2017; Ma et al. 2015).

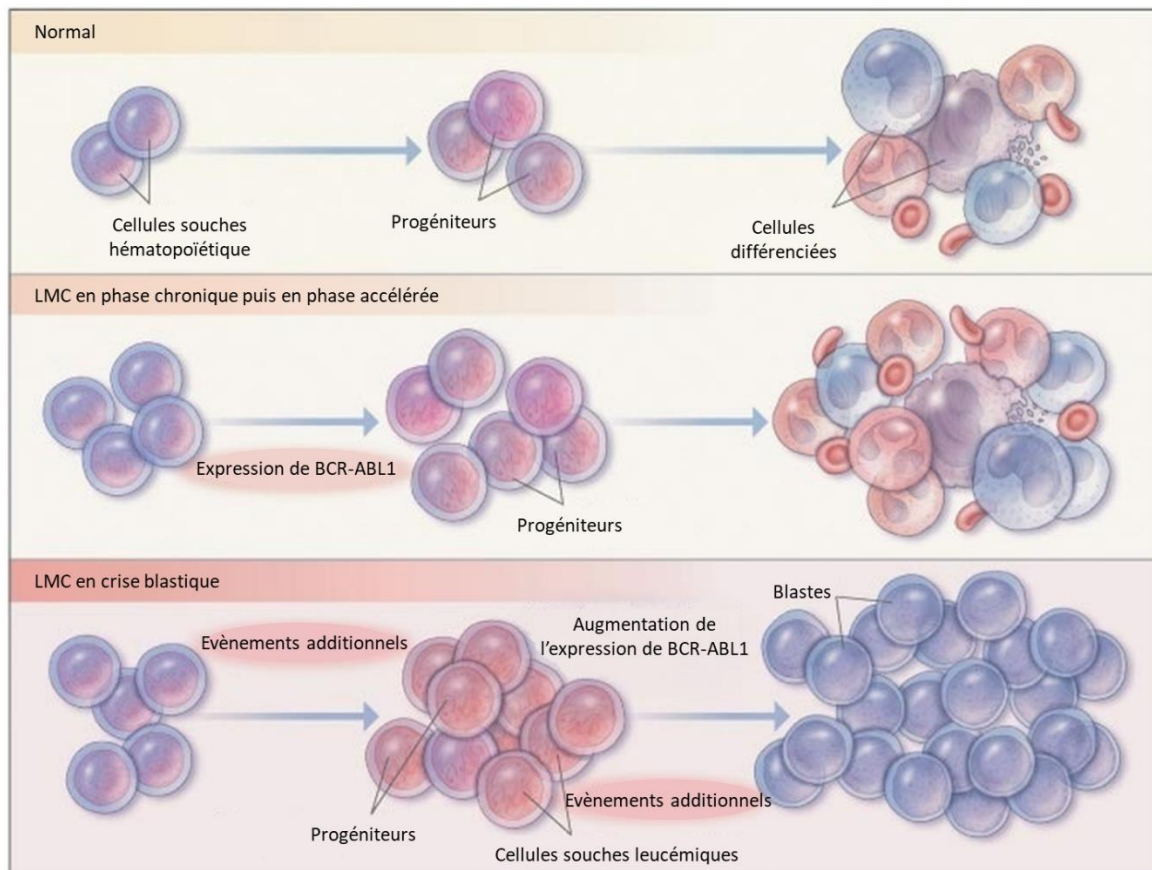


Figure 3 : Modèle représentant la progression de la LMC entre la phase chronique et la crise blastique (d'après Jamieson *et al.*, 2004)

Par rapport à un individu non atteint de LMC, chez un patient en phase chronique de LMC il y a expression de BCR-ABL1. Durant cette phase et surtout en phase accélérée, il y a augmentation du nombre de globules blancs dans le sang. Finalement en crise blastique, il y a de nombreuses cellules immatures (blastes) dans la circulation sanguine.

La LMC est parmi les cancers les plus étudiés. L'anomalie génétique qui la caractérise en fait un modèle d'étude particulièrement intéressant pour comprendre les voies de transduction du signal qui participent à la transformation des cellules hématopoïétiques.

La LMC est la première maladie pour laquelle une thérapie ciblée a été mise au point avec le développement des inhibiteurs de tyrosine kinase dans les années 90, comme l'imatinib. Ces médicaments, décrits ultérieurement dans ce manuscrit, agissent en empêchant l'enzyme anormale de fonctionner. A ce jour ce traitement reste le plus fréquemment utilisé et le plus efficace pour la première phase de la maladie.

B. La transformation médiée par *BCR-ABL*

1. *BCR-ABL1*

L'oncoprotéine BCR-ABL1 possède une activité tyrosine kinase dérégulée et la présence de cette protéine est caractéristique de la LMC. Différentes fusions formant l'oncogène *BCR-ABL1* permettent de générer différentes isoformes de protéine BCR-ABL1 : p210, p190 ou p230 (figure 4) qui ont en commun une activité tyrosine kinase, portée par *ABL1*, accrue (Melo 1996). Le gène *ABL1* est rompu entre les exons 1 et 2. Le gène *BCR* peut être rompu à différents niveaux (figure 4A), notamment de la région M-BCR (majeur-BCR), soit entre les exons 12 et 16. Les fusions les plus fréquentes sont nommées e13a2 ou e14a2 (figure 4C), elles correspondent à la fusion entre les exons 13 ou 14 du gène *BCR* et l'exon 2 du gène *ABL1*. Ces produits de fusion codent pour une protéine chimérique BCR-ABL1 de 210 kDa. C'est la forme caractéristique de la LMC.

La rupture dans le gène *BCR* peut aussi se produire entre les exons 1 et 2, soit dans la région mineure de cassure (m-BCR) (figure 4A). La fusion se produit alors entre l'exon 1 de *BCR* et l'exon 2 d'*ABL1* : e1a2 et code pour une protéine de 190 kDa (figure 4C) qui est observé dans la leucémie aiguë lymphoïde à chromosome de Ph (Fainstein et al. 1987).

Une dernière isoforme BCR-ABL1 de 230 kDa est le produit de la fusion entre l'exon 19 de *BCR* (région μ -BCR) et l'exon 2 d'*ABL1* : e19a2 est considéré comme un marqueur pour le diagnostic des LMC à neutrophiles (figure 4)(Pane et al. 1996).

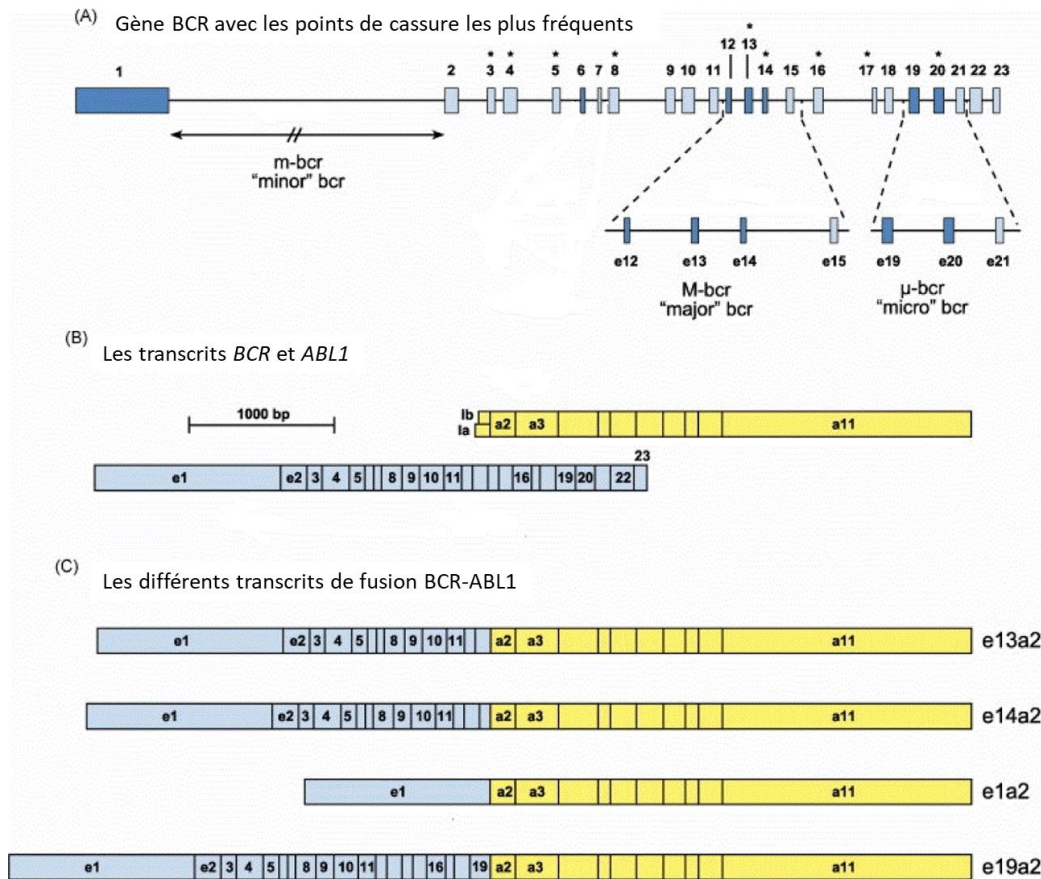


Figure 4 : Les différents transcrits de fusion principalement obtenus pour *BCR-ABL1* (d'après Kumar *et al.*, 2014)

A. Représentation des différents points de cassures identifiés dans le gène *BCR*.

B. ARNm issus de la transcription des gènes *BCR* et *ABL1*.

C. Les ARNm de *BCR-ABL1* issus des différentes fusions possibles entre les gènes *BCR* et *ABL1*.

Dans la LMC, la protéine BCR-ABL1 de 210 kDa conserve les trois domaines d'homologie src (SH1, SH2 et SH3), qui régulent l'activité tyrosine kinase (TK) d'ABL1 et la partie C-terminale (C-term) : le signal de localisation nucléaire (NLS) et les domaines de liaison à l'ADN et à l'actine (figure 5). Les domaines conservés de BCR sont le domaine N-terminal Coiled-coil (N-term CC), qui contient le domaine d'oligomérisation indispensable pour l'auto-activation par phosphorylation de l'activité kinase d'ABL1. Le domaine sérine / thréonine (Ser / Thr) kinase, contient un résidu tyrosine essentiel : Y177 qui se lie avec GRB2 et permet l'activation de la voie RAS. Et le domaine RHO / GEF (Kang *et al.* 2016).

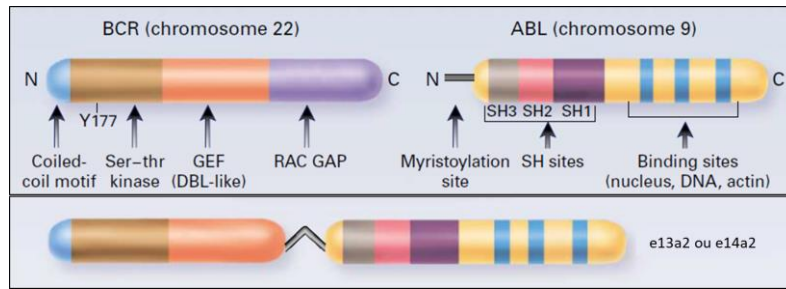


Figure 5 : Représentation schématique de la protéine de fusion BCR-ABL1 de 210kDa et de ses différents domaines (d'après Faderl et al. 1999)

L'activité TK est assurée par le domaine SH1 d'ABL1 qui contient le site de liaison à l'ATP (Kang et al. 2016).

2. Les voies de signalisation activées par BCR-ABL1

Alors que la protéine ABL1 navigue entre le noyau et le cytoplasme, l'oncoprotéine BCR-ABL1 perd cette capacité et est principalement retenue dans le cytoplasme (Wetzler et al. 1993). Elle interagit alors avec de nombreux substrats cellulaires impliqués dans des voies oncogéniques, lui permettant notamment l'activation des voies de prolifération ou de survie (Danisz et Blasiak 2013). Parmi les protéines activées par BCR-ABL1, il y a des protéines du cytosquelette (paxilline ou taline), des kinases (PI3K), des protéines adaptatrices (GRB2 ou CRKL), des facteurs de transcription (STAT5) ou des phosphatases (figure 6).

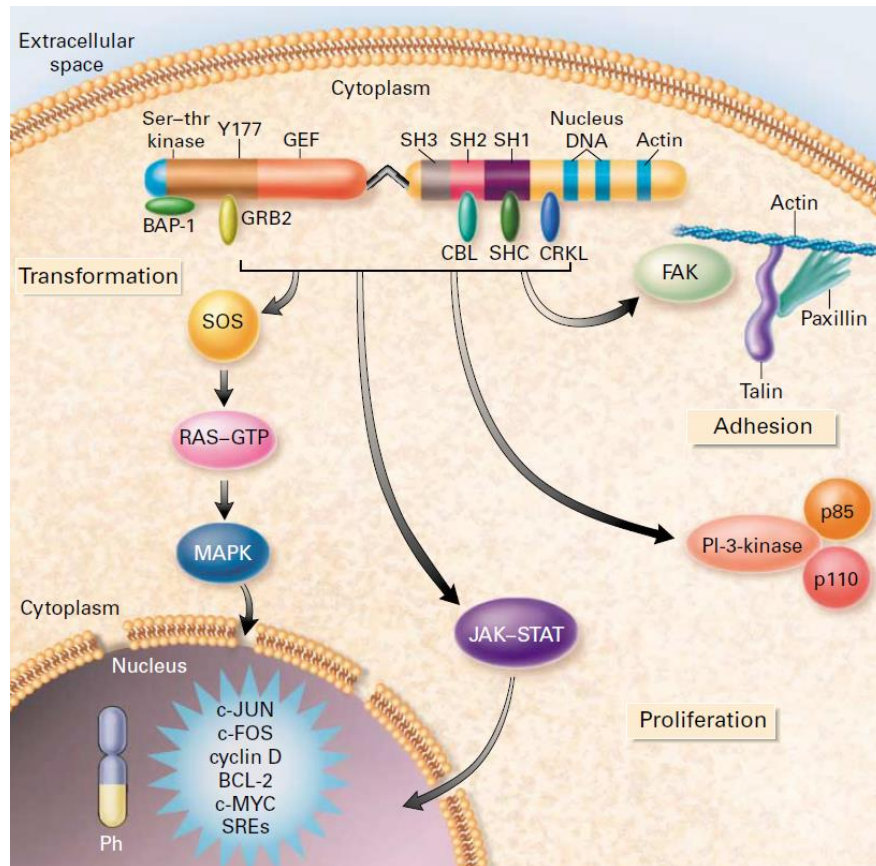


Figure 6 : Les voies de signalisation activées par la protéine BCR-ABL1 (Faderl et al. 1999)

a. La voie RAS/RAF/MEK/ERK

La phosphorylation de la tyrosine 177 (Y177) de BCR est essentielle pour l'oncogénicité de BCR-ABL1. Elle permet le recrutement de la protéine « growth factor receptor-bound protein 2 » (GRB2) en se liant à son domaine SH2 (Pendergast et al. 1993). Cette interaction BCR-ABL1-GRB2 est requise pour l'activation constitutive de la voie de signalisation RAS via le facteur d'échange de guanine « Son Of Sevenless » (SOS) et « GRB2-associated binding protein 2 » (GAB2). RAS sous sa forme active : RAS-GTP peut alors activer les MAPK qui jouent un rôle majeur dans la transduction du signal (figure 7).

La liaison du domaine SH3 de la protéine « CRK-oncogene-like » CRKL à BCR-ABL1 phosphorylé permet également une activation de la protéine RAS (Senechal et al. 1996). Il semble d'ailleurs que ces deux voies contribuent indépendamment à la transformation des cellules. Lorsque le site de liaison à GRB2 ou CRKL est disrupté, la capacité transformante des cellules est partiellement diminuée. Elle est d'autant plus réduite quand les deux sites sont mutés simultanément.

De manière générale, une dérégulation de la signalisation RAS est fortement impliquée dans la cancérisation. Des mutations activatrices de la protéine RAS sont observées dans plus de 30% des cancers (Fernández-Medarde et Santos 2011). Dans la LMC, cette voie de signalisation est activée par plusieurs protéines intermédiaires et semble indispensable pour la transformation des cellules.

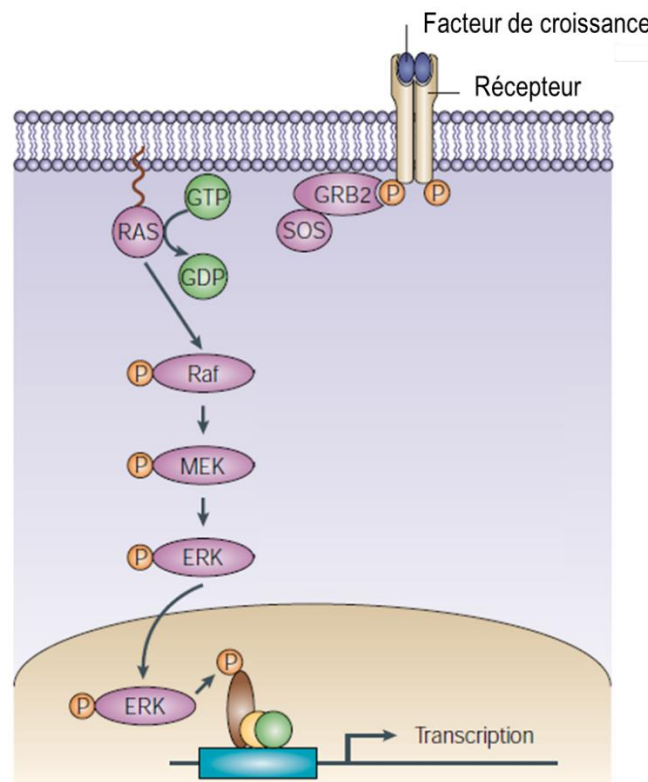


Figure 7 : : la voie RAS/RAF/MEK/ERK (d'après Kim et Bar-Sagi, 2004)

RAS-GTP va se fixer à la kinase RAF et l'activer par phosphorylation (figure 7). RAF va alors activer sa cible : les kinases « Mitogen-Activated Protein (MAP) Extracellular signal-Regulated Kinase » MEK1/2 qui pourront à leur tour activer les kinases « Extracellular Regulated Kinase » ERK1/2 par une double phosphorylation. Ces dernières peuvent alors se relocaliser dans le noyau et activer différents facteurs de transcription : c-MYC, c-JUN, c-FOS, etc. Cette voie RAS/RAF/MEK/ERK favorise ainsi la survie et la prolifération en permettant la progression du cycle cellulaire.

b. La voie PI3K/AKT

La voie de signalisation « phosphoinositide 3-kinase » (PI3K) est dérégulée dans un grand nombre de cancers humains, la LMC incluse. Ceci en fait une cible à privilégier lors du développement de traitement (Vivanco et Sawyers 2002).

Les enzymes PI3K sont des lipides kinases regroupées en trois classes qui diffèrent par leur structure, leurs substrats et leurs mécanismes de régulation (Fruman, Meyers, and Cantley 1998). Les protéines de la classe I_A de PI3K sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique. Il y a trois gènes qui codent pour la sous-unité catalytique (p110 α , p110 β , et p110 δ) et trois gènes qui codent pour la sous-unité régulatrice (p85 α , p85 β et p55 γ). Les PI3K de classe I_A sont les plus impliqués dans les cancers humains et les plus étudiés dans la LMC, ce sont donc leur seul mécanisme qui est abordé ici.

L'activation de PI3K par BCR-ABL1 est une voie essentielle à la transformation tumorale. Elle peut se faire par plusieurs voies et comme pour RAS, PI3K est constitutivement active dans les cellules LMC. L'activation qui implique l'interaction directe de p85, sous-unité régulatrice de PI3K, avec BCR-ABL1 existe (Skorski et al. 1997), mais n'est pas indispensable (Jain et al. 1996). L'activation de PI3K est plutôt un mécanisme indirect médiée par l'association de BCR-ABL1 à d'autres protéines phosphorylées : notamment les protéines adaptatrices CRKL et GRB2 (figure 8).

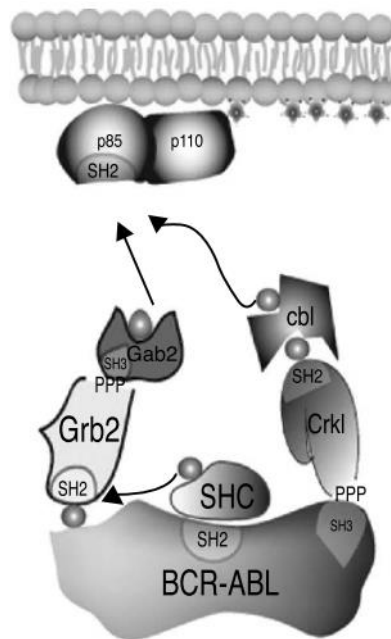


Figure 8 : Mécanisme d'activation de la voie PI3K par BCR-ABL1
(Kharas and Fruman 2005)

Ces dernières sont également impliquées dans l'activation de RAS, comme décrit précédemment.

L'interaction avec BCR-ABL1 permet la phosphorylation de la protéines CRKL. La protéine CBL aura alors la possibilité de s'y ancrer et d'être à son tour activée par phosphorylation, induisant alors l'activation de PI3K par fixation à la sous-unité régulatrice. L'activation de PI3K par BCR-ABL1 médiée par la protéines GRB2 est également une voie importante (Sattler et al. 2002). En se liant à la Y177 de BCR-ABL1, GRB2 va activer GAB2 qui pourra à son tour activer PI3K.

PI3K actif aura la capacité d'aller activer AKT, qui semble être la cible première de PI3K dans la signalisation médiée par BCR-ABL1. AKT active a de nombreux substrats impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la croissance et la survie des cellules, ce qui en fait l'effecteur de PI3K le plus associé à la transformation des cellules (figure 9). AKT semble effectivement impliqué dans la transformation leucémique puisque son inactivation diminue le phénotype tumoral *in vitro* et le développement de la leucémie *in vivo* (Skorski et al. 1997).

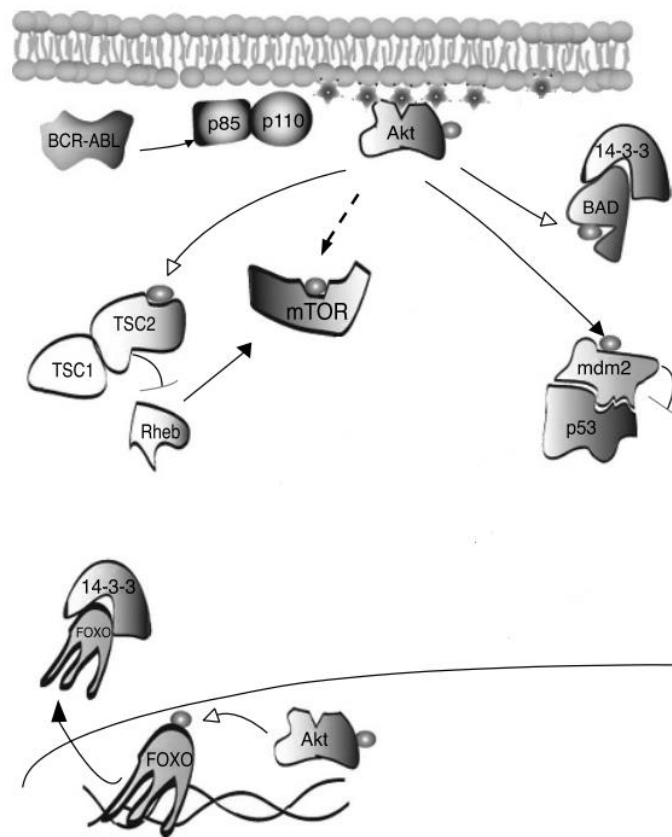


Figure 9 : Substrats phosphorylés par AKT suite à sa propre activation par PI3K (d'après Kharas et Fruman, 2005)

Parmi les substrats d'AKT, il y a le facteur de transcription FOXO. Or sa phosphorylation par AKT conduit à la sous-expression des gènes *p27^{KIP}* et *BIM*, respectivement impliquées dans l'inhibition du cycle cellulaire et l'apoptose (Burgering et Kops 2002; Tran et al. 2003). AKT est également capable d'inactiver par phosphorylation BAD, une protéine pro-apoptotique (Salomoni et al. 2000; Vanhaesebroeck et al. 2001). Ou d'activer la protéine régulatrice MDM2, conduisant à l'inactivation de p53, également impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Autre cible importante activée directement et indirectement par PI3K/AKT, c'est la sérine/thréonine kinase « mammalian target of rapamycin » (mTOR)(Hay 2004; Richardson et al. 2004). L'activation de mTOR conduit à la progression du cycle cellulaire.

La voie PI3K/AKT, par différents mécanismes et différentes cibles, favorise ainsi la prolifération et la survie des cellules hématopoïétiques exprimant BCR-ABL1.

c. La voie JAK/STAT

Les facteurs de transcription « signal transducer and activator of transcription » (STAT) 1 et 5 sont des éléments importants de la signalisation BCR-ABL1 (Ilaria et Van Etten 1996). Dans les cellules normales, la localisation nucléaire des facteurs STAT est régulée par des « Janus kinases » (JAKs), elles-mêmes régulées par des récepteurs aux cytokines. Dans les cellules LMC, les facteurs STAT, notamment STAT5, sont activés indépendamment du facteur JAK2 par association directe entre leur domaines SH2 avec la protéines BCR-ABL1 (Carlesso et al. 1996; Ilaria et Van Etten 1996; Klejman et al. 2002; Xie et al. 2001). La kinase BCR-ABL1 active tout de même JAK2, qui pourra activer différentes cibles impliquées dans l'oncogenèse (figure 10)(Xie et al. 2001, 2002).

Par l'activation de la voie JAK/STAT, les cellules exprimant BCR-ABL1 favorisent leur survie et leur prolifération.

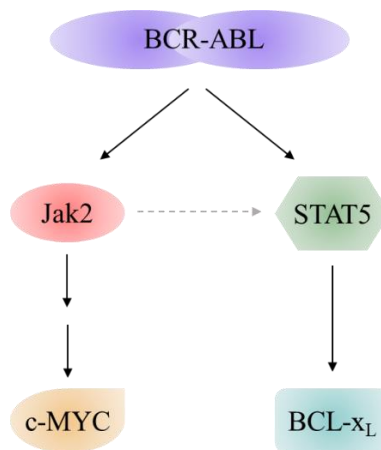


Figure 10 : Représentation schématique de l'activation distincte des voies JAK2 et STAT5 par BCR-ABL1 (d'après Xie et al., 2002)

L'activation de STAT5, par exemple, protège les cellules de la mort programmée en induisant l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-XL (figure 10)(Socolovsky et al. 1999; Horita et al. 2000; Gesbert et al. 2000). Ce mécanisme est d'ailleurs redondant avec l'inactivation de la protéine pro-apoptotique BAD par AKT. L'activation de JAK2 par BCR-ABL1 conduit également à l'activation de l'oncogène MYC (Xie et al. 2002; Samanta et al. 2006).

d. Les voies impliquées dans l'instabilité génomique

L'instabilité génomique est une caractéristique de la LMC, notamment dans les phases avancées de la maladie. Lorsqu'une lésion est détectée dans une cellule saine, il y a arrêt du cycle cellulaire et les systèmes de réparation sont activés. Des études ont montré que ces différents systèmes de réparation sont perturbés par la présence de BCR-ABL1, permettant la survie et la prolifération de cellules LMC portant des anomalies génétiques.

Ainsi, dans des cellules hématopoïétiques de souris ou des CD34+ de patient atteints de LMC, une diminution de la sous unité catalytique du complexe « DNA-dependent protein kinase » (DNA-PK) dépendante de l'expression de BCR-ABL1 a été mise en évidence (Deutsch et al. 2001). Le complexe DNA-PK est un système majeur de réparation des cassures double-brin d'ADN par la voie de re-ligation directe « non-homologous end-joining » (NHEJ) et de la recombinaison V(d)J dans les cellules de mammifères. La sous-expression de DNA-PK entraîne alors un défaut de réparation de l'ADN.

L'expression de la protéine BCR-ABL1 est aussi associée à une diminution de l'expression de la protéine « Breast Cancer Associated Protein 1 » BRCA1 dans des modèles expérimentaux et des cellules LMC de patients (Deutsch et al. 2003). Or cette protéine est impliquée dans le

maintien de la stabilité génétique. En empêchant l'expression de BRCA1, BCR-ABL1 inhibe la réparation de l'ADN suite à une cassure double-brin.

Dierov et al. ont aussi montré que suite à un stress génotoxique, la protéine BCR-ABL1 passe rapidement du cytoplasme au noyau. BCR-ABL1 perturbe alors la transduction du signal dépendant de la protéine ATR en s'y associant (Dierov et al. 2004). ATR (« ataxia-telangiectasia Mutated and rad 3-related »), une sérine-thréonine kinase appartenant à la famille des PI3K-like protéines kinases, est impliquée dans l'activation des points de contrôle enclenchés lors d'un dommage à l'ADN. BCR-ABL1 joue là un rôle direct dans l'augmentation des dommages à l'ADN en modifiant la réponse cellulaire à ces anomalies.

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) jouent également un rôle dans l'intégrité du génome puisqu'ils peuvent induire des dommages à l'ADN. Or une production accrue de ces ROS a été directement associée à l'activité de BCR-ABL1 (Sattler et al. 2000). Ceci suggère que les ROS peuvent être impliqués dans la progression de la LMC via l'induction de changements génétiques.

Aussi, le fait que la protéine BCR-ABL1 soit capable de phosphoryler et d'interagir avec la protéine « xeroderma pigmentosum group B » (XPB) suppose une altération de la réparation de l'ADN (Takeda et al. 1999). Ceci associé à une résistance à l'apoptose permet aux cellules leucémiques de cumuler des réparations imprécises au cours du temps là où les cellules normales vont rapidement mourir habituellement. Ce qui aboutit finalement à la crise blastique de la maladie (Deininger et al. 2000).

Finalement, la prolifération excessive et le renouvellement cellulaire élevé, associé à une apoptose et une réparation allégée, représentent évidemment des facteurs favorisant l'installation de lésions génétiques supplémentaires qui conduisent aux phases avancées de la LMC.

C. La lutte contre la LMC : les inhibiteurs de tyrosine kinase

Le fait que l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL1 soit clairement associée à l'origine de la LMC a conduit au développement de traitements pour inhiber cette activité. Depuis 2001, les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) sont utilisés comme traitement de première intention afin de lutter contre le développement de la LMC. En bloquant l'activité de BCR-ABL1, les ITKs contrôlent la croissance et la prolifération des cellules leucémiques. Les patients atteints de LMC ont ainsi été les premiers à bénéficier d'une thérapie anti-cancéreuse ciblée (Druker et al. 2001b; Kantarjian et Talpaz 2001).

Ces traitement ITKs sont efficaces essentiellement en phase chronique de la maladie et permettent de maintenir les patients dans cette phase. La majorité d'entre eux auront alors une rémission durable de la maladie et un risque très faible d'évolution vers les phases avancées. Les ITKs ont ainsi nettement amélioré la survie globale des patients atteints de LMC.

1. *ITK de première génération : l'imatinib*

Les cellules leucémiques ont une capacité de survie et de prolifération accrue mais ceci peut être réduit en inhibant seulement l'oncoprotéine BCR-ABL1. L'imatinib (STI571, imatinib mesylate, Gleevec ou Glivec®, Novartis) a été la première molécule développée capable de cibler directement l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL1 et testée pour traiter la LMC. Compte tenu des l'efficacité et de la bonne tolérance du traitement, cet ITK est très rapidement devenu le traitement standard de première intention pour les patients en phase chronique de LMC (Melo et al. 2003; Druker et al. 2001).

Le taux de réponse au traitement par l'imatinib lors de la phase chronique de la maladie est élevé, en revanche elle n'est que de courte durée dans les phases avancées (Druker et al. 2001; Ottmann et al. 2002; Sawyers et al. 2002; Talpaz et al. 2002).

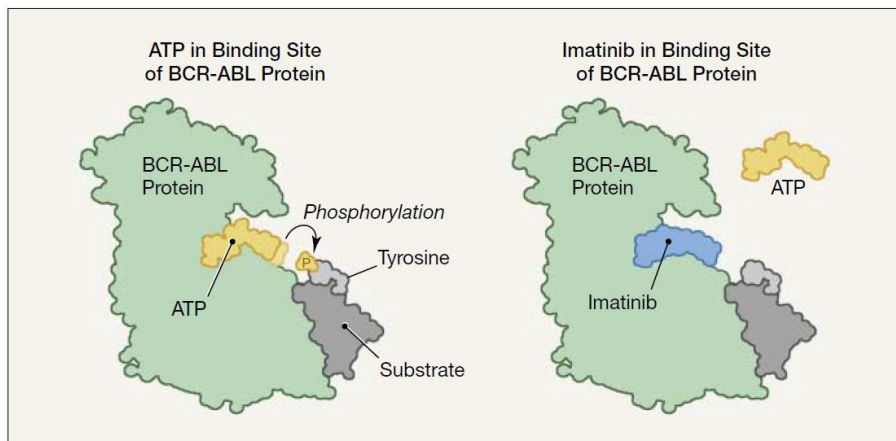


Figure 11 : Mécanisme d'action de l'imatinib pour inhiber la fonction de BCR-ABL1 (Friedrich 2003)

L'imatinib entre en compétition avec l'ATP pour se lier au site d'autophosphorylation de BCR-ABL1 (figure 11) et maintient la protéine en conformation inactive, ce qui bloque les voies de signalisations en aval (Schindler et al. 2000).

Malgré l'efficacité de l'imatinib, des patients sont ou deviennent résistants au traitement et voient leur maladie évoluer vers les phases avancées. Pour environ 30% des patients en phase

chronique de la maladie, une mutation dans le domaine kinase de BCR-ABL1 est responsable de cette résistance. Cette proportion monte à 52% de patients en phase accéléré et 75% des patients en crise blastique (Soverini et al. 2006). Ces mutations altèrent la liaison de l'imatinib à BCR-ABL1, sans altérer la liaison de l'ATP ou l'activité kinase de la protéine (Corbin et al. 2002). D'autres mécanismes, dépendants ou indépendants de BCR-ABL1, peuvent également entraîner une résistance au traitement. C'est le cas d'une surexpression de la protéine BCR-ABL1 par exemple (Donato et al. 2003; Gorre et al. 2010).

2. ITK de seconde génération : nilotinib – dasatinib - bosutinib

L'évolution vers les phases avancées de la LMC ont conduit au développement de nouveaux inhibiteurs de kinases capable de surmonter la résistance à l'imatinib.

- Le nilotinib (AMN107, Tassigna®, Novartis) a été développé en modifiant la structure de l'imatinib. Cette molécule se lie à BCR-ABL1, au site de liaison à l'ATP, avec une plus grande affinité que l'imatinib (Weisberg et al. 2005; Weisberg et al. 2006).
- Le dasatinib (BMS-354825, Sprycel®, Bristol-Myers Squibb), possède une structure chimique différente mais entre également en compétition avec l'ATP. Cette molécule peut se lier aux formes active et inactives de BCR-ABL1 avec une affinité encore supérieure par rapport au nilotinib (Tokarski et al. 2006).
- Le bosutinib (SKI-606, Pfizer) se lie aux conformation inactives et intermédiaire de BCR-ABL1 pour inhiber efficacement son activité (Puttini et al. 2006; Konig et al. 2008).

Ces ITK de seconde génération sont plus efficaces pour éviter une évolution de la LMC vers une crise blastique que l'imatinib. Ils sont également moins sensibles aux mutations qui peuvent se produire dans BCR-ABL1 (figure 12) (Soverini et al. 2015). Il y a néanmoins une mutation particulière qui reste un obstacle à l'efficacité de ces traitements, la T315I.

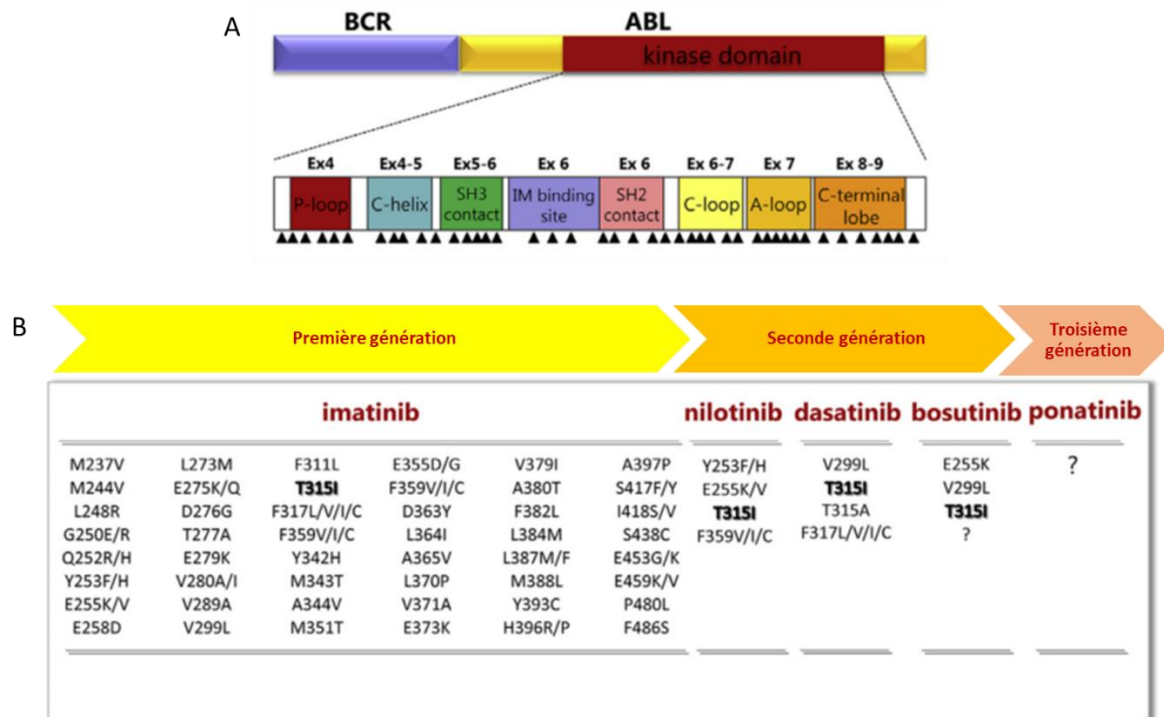


Figure 12 : Représentation et positionnement des mutations perturbant les traitements par les ITKs (d'après Soverini et al., 2015)

- A. Représentation du positionnement des mutations principalement responsables des résistances aux traitements : dans le domaine kinase de BCR-ABL1.
 B. Détails des mutations responsables des résistances aux différents ITKs.

3. ITK de troisième génération : ponatinib

Compte tenu de l'échec de la lutte contre BCR-ABL1 portant la mutation T315I par les ITKs de première et de seconde génération, une troisième génération d'ITK a été mise au point. Le ponatinib (AP24534, laboratoire ARIAD) a montré son efficacité lors de la résistance aux autres traitements, y compris contre la mutation T315I (O'Hare et al. 2009). Dans ce cas, le ponatinib inactive BCR-ABL1 en induisant un changement de conformation.

Ainsi, le choix du traitement à mettre en place lorsqu'un patient présente une résistance au traitement de première intention qu'est l'imatinib, dépend fortement des mutations portées par BCR-ABL1.

D. Les mécanismes impliqués dans l'évolution de la LMC

Les mécanismes responsables de l'évolution de la LMC de la phase chronique vers les phases avancées de la maladie sont encore mal connus. Néanmoins, certaines altérations génétiques ont été identifiées comme pouvant être impliquées dans cet avancement pathologique comme

l'altération de proto-oncogènes pour générer des oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (Beck et al. 2000). De plus, hormis la présence du chromosome de Ph, le caryotype est normal pour les cellules LMC en phase chronique. C'est lors de l'évolution vers les phases accélérées et blastiques que des aberrations chromosomiques apparaissent (Beck et al. 2000). Comme vu précédemment, de nombreux défaut de fonctionnalité des systèmes de réparation de l'ADN peuvent être assimilés à ces aberrations génétiques. Des anomalies de nombre de chromosomes sont ainsi associées à 80% des transitions de la phase chronique à la phase aiguë (Rowley et Testa 1982). Il est commun d'observer un gain du chromosome 8 ou 19, du chromosome de philadelphie lui-même ou encore la présence d'un chromosome i(17q).

1. La place de p53 dans la LMC

Le chromosome i(17q) correspond à un isochromosome 17 qui a dupliqué son bras long (q) suite à la perte de son bras court (p). Ce chromosome est observé chez près de 20% des patients qui se trouvent en phase aiguë de la LMC. Or le gène suppresseur de tumeur *TP53* est localisé sur le bras court du chromosome 17. De plus, des altérations de p53, protéine codée par le gène *TP53*, sont retrouvées chez 20 à 30 % des patient qui sont en crise blastique de LMC (H. Ahuja et al. 1989; Kelman et al. 1989). C'est d'ailleurs cette protéine pour laquelle il y a le plus fréquemment des anomalies observées lors des phases avancées de la LMC (H. Ahuja et al. 1989; Feinstein et al. 1991). Il peut s'agir de mutations ponctuelles du gène *TP53*, de délétion du chromosome 17p ou d'autres réarrangements.

L'implication de p53 dans la progression de la LMC en crise blastique a été mise en évidence par un modèle de souris exprimant BCR-ABL1 mais KO pour *TP53* (Skorski et al. 1996; Honda et Hirai 2001; Honda et al. 2000). En effet, pour ces souris, la transition de la LMC vers la crise blastique se fait plus rapidement que chez des souris exprimant la forme sauvage de p53.

L'implication générale de p53 dans le développement des cancers est un cas particulièrement intéressant. Le gène *TP53* est en effet muté dans plus de 50% des cancers et sa fonction est altérée dans de nombreux autres (Brooks et Gu 2006; Soussi et Wiman 2007). L'étude de ce gène individuel fera donc également l'objet d'une partie de cette thèse et sera décrite ultérieurement dans le manuscrit.

2. D'autres mutations impliquées dans l'évolution la LMC

Dans 80 % des cas, l'évolution de la LMC de la phase chronique vers la phase blastique est associée à des anomalies chromosomiques (Rowley et Testa 1982). Les anomalies les plus fréquentes sont des gains de chromosomes 8, 19 ou du chromosome de Ph (Melo et Barnes 2007). Ainsi que la perte du chromosome ou partie du chromosome 17 (i(17q)) comme décrit dans la partie ci-dessus.

Lors de la duplication des chromosomes il y a duplication de l'ensemble des gènes qu'ils portent. Ce gain d'une copie des gènes semble impliqué dans la pathogénicité de la LMC. La duplication du chromosome 8 par exemple, permet l'expression d'une copie supplémentaire de l'oncogène *MYC*. Ce gène est justement amplifié et sur-exprimé dans certains cas de LMC en crise blastique et parfois associé à une trisomie du chromosome 8 (Blick et al. 1987).

Des études ont aussi été menées sur des gènes suppresseurs de tumeur en particulier. Ainsi les gènes *CDKN2A* et *RBI*, respectivement localisés sur les chromosomes 9 et 13, ont été identifiés comme étant altérés chez des patients en crise blastique (Ahuja et al. 1991; Beck et al. 2000; Sill et al. 1995; Towatari et al. 1991; Williams et Sherr 2008). Dans le cas de ces deux gènes, ce sont rarement des altérations chromosomiques qui sont mis en évidence mais plutôt des altérations des gènes eux-mêmes (Johansson et al. 2002).

De manière générale, la délétion de ces gènes suppresseurs de tumeur, comme l'expression accrue d'oncogènes, sont utilisés comme marqueur de l'évolution de la maladie mais ne sont pas nécessairement considérés comme étant les agents responsables de son aggravation. Il existe une grande variété de lésions génétiques rapportées comme étant impliquées dans la transition vers la crise blastique. Ce sont donc probablement de multiples lésions qui coopèrent afin d'induire le phénotype blastique de la LMC (Deininger et al. 2000).

E. Les modèles existants pour l'étude de la LMC

Différents systèmes expérimentaux ont été développés afin d'étudier la physiopathologie de la LMC. Chacun possède des avantages et des inconvénients mais aucun ne représente un modèle, *in vitro* ou *in vivo*, idéal qui permettrait de couvrir tous les aspects de la LMC humaine.

1. Les lignées cellulaires

Les lignées de fibroblastes étant facile à manipuler, elles ont été largement utilisées pour la recherche sur la LMC. De plus leur transformation peut être suivie par un test de croissance en

agar-mou, c'est-à-dire en absence d'ancrage (Todaro et Green 1964). Cependant, selon la lignée dans laquelle BCR-ABL1 est intégrée, différentes conséquences sont observées. Ainsi, l'expression de BCR-ABL1 est suffisante pour transformer les fibroblastes RAT-1 (Lugo et Witte 1989) mais pas les fibroblastes de souris NIH 3T3 (Daley et al. 1987). Des expériences ont également montré des différences entre les fibroblastes et les cellules hématopoïétiques, notamment lors de l'utilisation de mutants de BCR-ABL1. Ainsi, la protéine BCR-ABL1 sans domaine SH2 permet toujours la transformation de cellules 32D hématopoïétiques (Ilaria et Van Etten 1995) mais pas celle des fibroblastes RAT-1 (Afar et al. 1994). Les interactions de BCR-ABL1 avec d'autres protéines sont aussi différentes chez les cellules hématopoïétiques et les fibroblastes. C'est le cas pour CRKL qui est impliqué dans l'activation de RAS et la transformation dans les fibroblastes (Senechal et al. 1996) mais pas dans les cellules hématopoïétiques (Heaney et al. 1997).

Parmi les cellules hématopoïétiques utilisées comme modèle d'étude de la LMC, la plus connues est la lignée K562. Le principal inconvénient de ces lignées hématopoïétiques est qu'elles sont issues de patients en crise blastique de la LMC et possèdent donc des anomalies génétiques en plus de l'oncogène *BCR-ABL1*. Ce qui en fait un modèle peu intéressant pour la compréhension de la LMC en phase chronique et de son avancement vers les phases accélérée et blastique (Deininger et al. 2000). De plus ces cellules subissent un grand nombre de divisions cellulaire et acquièrent toujours de nouvelles altérations génétiques au cours du temps (Clarke et Holyoake 2017). Actuellement il n'existe pas de lignée cellulaire issue de la phase chronique de la maladie et les tentatives d'immortalisation de ce type de cellules issues de patients a échoué (Deininger et al. 2000).

Une approche intéressante consiste à étudier des cellules souches embryonnaires transduites pour exprimer *BCR-ABL1*. Ce modèle reproduit un signe clinique de la maladie dans un modèle murin (OP9) qui est l'expansion de la lignée myéloïde (Era et Witte 2000).

Finalement, l'utilisation de lignées cellulaires pour étudier la LMC a incontestablement contribué à la compréhension de la maladie. Nombre de protéines qui interagissent avec BCR-ABL1 ont été identifiées dans des lignées cellulaires qui exprime cette protéine de fusion. Mais bien que ces lignées cellulaires représentent un puissant outil d'étude de la LMC, les résultats doivent être confirmés par l'étude de cellules primaires issues de patients ou plus généralement dans des modèles humains.

L'étude de cellules primaires issues de patients LMC et leur comparaison à des cellules issues de donneurs sains, permet une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de la LMC, notamment en phase chronique. Cela permet aussi l'acquisition de nouvelles données concernant les différences entre les propriétés cellulaires des cellules saines ou de LMC (Garin et al. 2000).

2. Les modèles animaux

Un modèle animal permet d'étudier la physiopathologie de la leucémie sur un organisme complexe ainsi que le développement et l'évaluation de nouveaux traitements. L'animal essentiellement utilisé pour l'étude *in vivo* de la LMC est la souris. Ces modèles murins ont été établis par transgénèse ou par transduction de cellules souches murines par un rétrovirus portant la séquence codante de l'oncogène de fusion *BCR-ABL1*.

Lors de la transgénèse médiée par *BCR-ABL1*, la protéine de fusion BCR-ABL1 sera produite et exprimée tout au long de la vie de la souris. Bien que des promoteurs différents aient été utilisés pour diriger l'expression de BCR-ABL1 dans les tissus souhaités, ceci pose des problèmes de mortalité rapide des animaux. Ce qui ne permet pas une étude à long terme des cellules exprimant BCR-ABL1, notamment l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de la crise blastique. Il y a aussi des soucis quant à la toxicité de la protéine qui peut expliquer l'importante létalité embryonnaire observée pour ces animaux (Ma et al. 2015; Heisterkamp et al. 1991). La stratégie employée pour palier à cette dernière difficulté est l'emploi d'un promoteur inductible pour contrôler l'expression de l'oncogène *BCR-ABL1* (Huettner et al. 2000; Koschmieder et al. 2005; Huettner et al. 2003).

Des approches de transduction de la moelle osseuse des souris ont été développées en utilisant des rétrovirus codant pour BCR-ABL1 afin de modéliser la LMC (Daley et al. 1990; Kelliher et al. 1990). Ces souris montraient effectivement un syndrome myéloprolifératif semblable à la LMC et associé à l'expression de BCR-ABL1. Néanmoins, certaines des souris ayant reçu les cellules transduites pour exprimer BCR-ABL1 ont également développé d'autres maladies ou ont développé la LMC mais à des latences différentes.

Puis des modifications ont permis d'améliorer les systèmes modèles en améliorant la construction des transgènes, la production des rétrovirus ou les conditions de l'infection (Pear et al. 1998; Zhang et Ren 1998; Li et al. 1999). Permettant l'obtention de modèles murins présentant une maladie de type LMC semblable à la LMC humaine. Ces systèmes constituent des outils importants pour comprendre les mécanismes de la LMC, la progression de la maladie

et la résistance aux traitements (Wolff et Ilaria 2001). Cependant, le titre viral utilisé pour l'infection reste une source de variabilité dans la reproductibilité des modèles et le choix du promoteur pour l'expression de *BCR-ABL1* induit une expression à latence variable (Sontakke et al. 2016).

Les modèles de transduction/transplantation s'avèrent plus efficaces que les souris transgéniques car l'approche est plus simple et rapide à mettre en place. Ils permettent des études fonctionnelles de l'implication de BCR-ABL1 dans l'induction de la LMC et l'étude des différentes voies de signalisations activées dans cette oncogenèse. Ces systèmes facilitent également l'analyse fonctionnelle de gènes en particulier et impliqués dans les voies de signalisations activées lors de la mise en place et de l'évolution de la LMC (Ma et al. 2015).

En transplantant des cellules leucémiques d'un patient en phase blastique de LMC dans des souris SCID « severe combined immunodeficiency », Sawyers et al. ont observé une croissance de myoblastes leucémiques reproductible dans les tissus hématopoïétiques de ces souris immunodéficientes (Sawyers et al. 1992). Puis Sirard et al. ont montré que des souris SCID irradiées pouvaient être transplantées avec des cellules normales (Ph-) et des cellules leucémiques (Ph+) provenant de patients en phase chronique ou blastique de LMC. Les cellules de patients en crise blastiques envahissent plus rapidement et à un haut niveau la moelle osseuse des animaux SCID par rapport aux cellules de patients en phase chronique (Sirard et al. 1996).

3. Un nouveau modèle d'étude de la LMC

Autant les modèles cellulaires que les modèles animaux ont permis une meilleure compréhension de la LMC. Il reste cependant plusieurs biais liés à leur utilisation. Les modèles animaux notamment nécessitent forcément une transposition à l'Homme. Quant aux lignées cellulaires issues de patients, elles ne tiennent pas compte de la grande variabilité génétique qui existe entre chaque individu lors de l'évolution de la maladie. L'utilisation de cellules primaires issues de patients passent également outre la variabilité génétique ou épigénétique propre à l'individu et qui fait qu'un modèle unique ne peut s'appliquer dans ce cas.

Dans le modèle que nous proposons de construire, nous partons certes d'une lignée cellulaire, mais non pas de patient, mais saine. Il n'y a donc pas d'anomalie génétique liée à la LMC qui peut interférer dans l'interprétation des observations. En intégrant l'oncogène *BCR-ABL1* dans le génome de ces cellules, il sera possible de suivre l'évolution de la LMC depuis sa phase chronique jusqu'à ses phases avancées. Une transposition des résultats aux cellules issues de

patients à différentes phases de la maladie sera toujours indispensable. Mais établir un modèle de transformation cellulaire défini permet de suivre au cours du temps et de la transformation, quels sont les changements majeurs qui s'appliquent et de cibler directement chez les individus malades ces changements.

III. Le système CRISPR-Cas9

A. Un système d'édition du génome

En 2012, deux articles ont montré comment les composants de base du système immunitaire adaptatif des procaryotes, peuvent être utilisés pour cliver spécifiquement, *in vitro*, un fragment d'ADN (Jinek et al. 2012; Gasiunas et al. 2012). Ce système clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR-associated 9 (Cas9), système CRISPR-Cas9, consiste en un complexe ARN-protéine.

Quelques mois plus tard, l'efficacité de ce nouvel outil a été démontrée dans des cellules de mammifères avec l'obtention de différents types de modifications génétiques par transfection d'un vecteur exprimant la Cas9 et un ARN guide (sgARN) (Cong et al. 2013; Mali et al. 2013; Jinek et al. 2013). Le sgARN cible une séquence de 20 nucléotides dans le génome et va y conduire l'endonucléase Cas9 afin qu'elle puisse induire spécifiquement une coupure double-brin (figure 13). La séquence ciblée par le sgARN doit être suivie d'une séquence PAM c'est-à-dire une séquence NGG. Dans le cas de la Cas9 du *Streptococcus pyogenes*, la présence de cette séquence PAM est indispensable pour l'action de la Cas9 qui va induire la coupure double brin 3 ou 4 nucléotides en 5' de la PAM (figure 13).

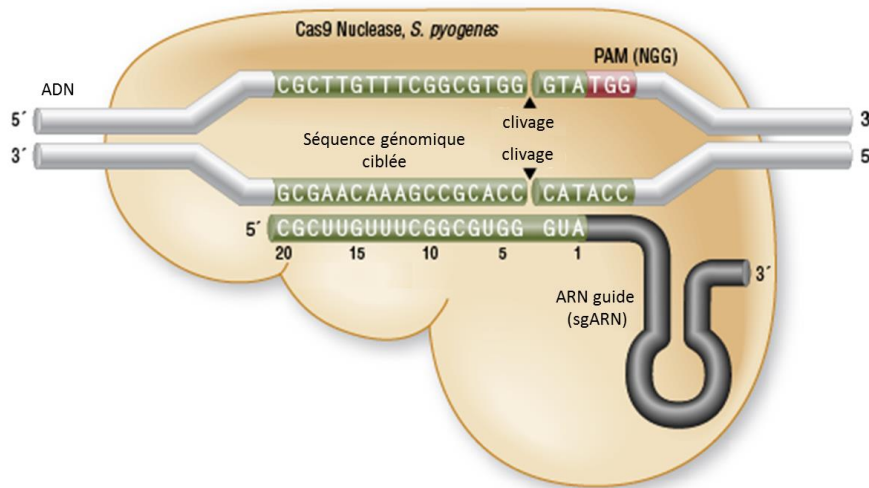


Figure 13 : Représentation schématique du clivage d'une séquence d'ADN reconnue par le système CRISPR-Cas9 (d'après NEB)

Deux mécanismes de réparation de l'ADN peuvent alors se déclencher (figure 14). Premièrement, la réparation par NHEJ va assembler les extrémités franches de l'ADN. C'est la méthode utilisée pour l'inactivation d'un gène puisqu'elle génère des insertions ou délétions (indels) de quelques nucléotides qui peuvent perturber la séquence codante du gène. La seconde voie de réparation est la recombinaison homologue (RH). Elle implique qu'un ADN donneur soit utilisé comme matrice pour une réparation, permettant de restaurer la séquence initiale de l'ADN. Il est possible d'utiliser la RH pour introduire des mutations spécifiques en apportant soi-même une matrice de recombinaison homologue choisie. Ainsi il est possible de générer une mutation ponctuelle en particulier, de remplacer un gène par un autre ou même d'insérer la séquence codante d'un gène entier (Patrick et al. 2014).

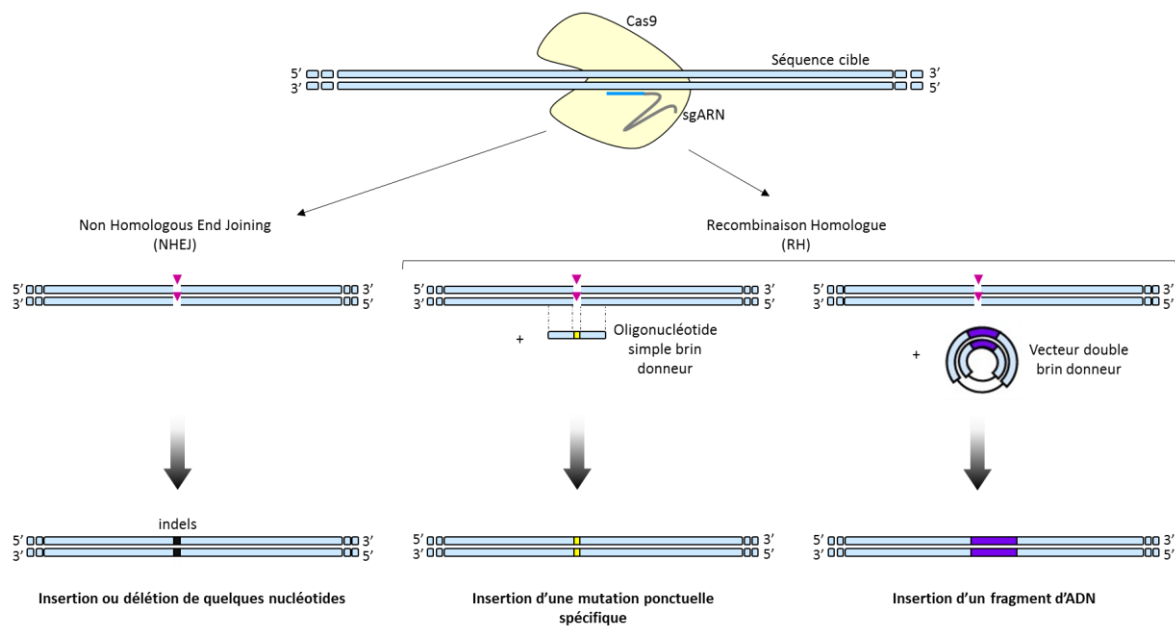


Figure 14 : Représentations schématique des voies de réparation par NHEJ ou RH d'une cassure double-brin dans l'ADN suite à l'action du système CRISPR-Cas9

Ce système simple et efficace a ouvert la voie à une nouvelle ère dans l'édition du génome. En effet, cette technologie peut être utilisée pour cibler, modifier, réguler ou marquer des loci génomiques dans de nombreuses cellules ou organismes.

B. Le système CRISPR-Cas9 pour la modélisation d'altérations oncogéniques

Le processus de transformation d'une cellule normale en cellule tumorale nécessite l'accumulation de plusieurs mutations. Il en résulte des inactivations de gènes suppresseurs de tumeur et l'activation d'oncogènes qui définissent le phénotype tumoral. Par la suite, les cellules tumorales, du fait de leur grande instabilité génétique, vont accumuler toujours plus de mutations qui vont permettre la progression du cancer (Hanahan et Weinberg 2011). Le système CRISPR-Cas9 est efficace et accessible, il peut être utilisé pour produire un modèle de cancer en se basant sur les mutations les plus fréquemment identifiées dans les tumeurs humaines. Dans le cas de certains cancers, une mutation en particulier qui le caractérise peut aussi être facilement reproduite. L'utilisation de ce système pour modifier le génome des cellules permet une imitation plus fidèle des altérations naturellement présentes dans les cellules. Ceci permet alors une caractérisation fonctionnelle des mutations individuelles en utilisant des modèles expérimentaux *in vitro* ou *in vivo*. En effet, comme vu précédemment, la plupart des outils

utilisés jusqu'à présent pour créer des modèles de maladies reposait sur un système viral pour lequel il y a insertion du génome des virus dans le génome des cellules ciblées.

1. L'inactivation d'un gène par NHEJ : Knock-Out

L'application la plus simple de la technologie CRISPR-Cas9 est l'inactivation de gènes. La cellule en réparant par NHEJ va induire des indels qui vont provoquer un décalage du cadre de lecture (figure 14). Ainsi il est possible d'étudier un gène en particulier pour en comprendre le rôle. Appliquer cette démarche à un gène suppresseur de tumeur permet d'étudier son rôle dans le processus de cancérisation. Dans leur étude, Malina et al., ont réalisé une disruption du gène *Trp53* dans des cellules MEFs en utilisant le système CRISPR-Cas9 porté par un vecteur lentiviral et qui cible l'exon 7 de ce gène. Pour enrichir leur population cellulaire en cellules qui sont KO pour le gène *Trp53*, un traitement à la nutline-3a à 10µM pendant 24h a été appliqué sur les cellules, 72 heures après l'infection (Malina et al. 2013). La nutline-3a est un inhibiteur spécifique de l'interaction p53-MDM2 qui provoque, selon la dose utilisée, un arrêt du cycle cellulaire chez les cellules exprimant la protéine p53 sous sa forme sauvage (Vassilev 2005).

Si un vecteur permet l'expression de plusieurs sgARN, alors il permettra d'inactiver simultanément plusieurs gènes dans la cellule qui l'exprime. Cette expérience a été réalisée avec succès dans des cellules MEFs pour inactiver les gènes *Trp53*, *PTEN* et *VHL*, qui sont trois gènes suppresseurs de tumeur (Albers et al. 2015).

2. L'introduction d'une mutation par RH : Knock-In (KI)

Outre l'inactivation des gènes, cet outil peut être mis en œuvre pour une édition plus précise du génome. Pour étudier une mutation ponctuelle observée dans un oncogène par exemple. Dans ce cas, CRISPR-Cas9 est utilisé conjointement à un ADN donneur qui va apporter la mutation d'intérêt flanquée de part et d'autre de séquences homologues au locus ciblée et qui sert de matrice pour une RH (figure 14). Cette stratégie a été utilisée pour l'étude de la mutation Y537S du gène *ESR1* (« Estrogen Receptor 1 ») dans la lignée cellulaire luminale du cancer du sein : MCF7. Cette mutation est l'une des plus fréquemment observées dans le cas des cellules tumorales pour lesquelles il y a absence de réponse au traitement par les anti-œstrogènes. Dans leur étude, les auteurs ont utilisé un plasmide contenant une séquence d'homologie de 1,8 kb, et englobant la mutation d'intérêt, pour matrice ADN à la RH (Harrod et al. 2017). Une alternative pratique à l'utilisation d'une matrice ADN double brin pour générer une mutation

ponctuelle, est l'utilisation d'un oligonucléotide simple brin. C'est la stratégie qui a été utilisée pour l'étude du gène *XPO1* qui code pour la protéine exportine 1 (Negggers et al. 2015). Les auteurs souhaitaient obtenir une lignée cellulaire homozygote pour la mutation C528S du gène *XPO1* afin que les cellules deviennent résistantes au selinexor, anticancéreux qui inhibe l'exportine 1. L'oligonucléotide choisi comme matrice de réparation de l'ADN est de 135 bases. Toutefois, malgré le fort potentiel de la méthode utilisant la RH pour modifier l'ADN, elle reste peu efficace ou même inefficace selon les lignées cellulaires utilisées.

3. D'autres modifications possibles

Alors que l'utilisation d'un sgARN unique permet d'inactiver le gène qu'il cible, l'utilisation de deux sgARN simultanément peut générer des altérations structurelles plus conséquentes dans le génome suite à la réparation de l'ADN. Cette stratégie a été mise en œuvre pour modéliser des réarrangements fréquemment observés dans les cellules tumorales humaines et qui induisent l'expression de protéines de fusions ayant des propriétés oncogéniques.

Si les deux sgARN ciblent le même chromosome, il est possible de générer une délétion d'un locus en particulier (figure 15) ou l'inversion du fragment visé (figure 16) (Kataoka et al. 2016).

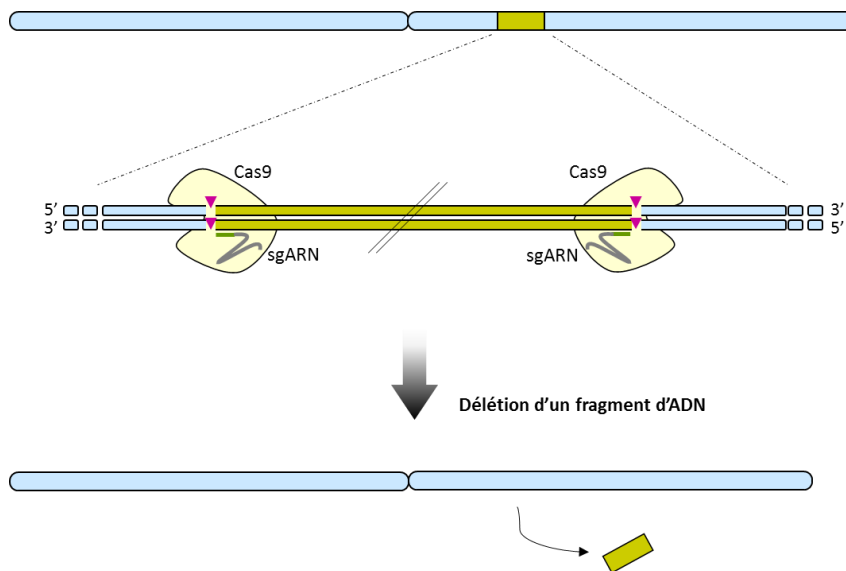


Figure 15 : L'expression de deux ARN guides et de la Cas9 permet de déléter un fragment d'un gène

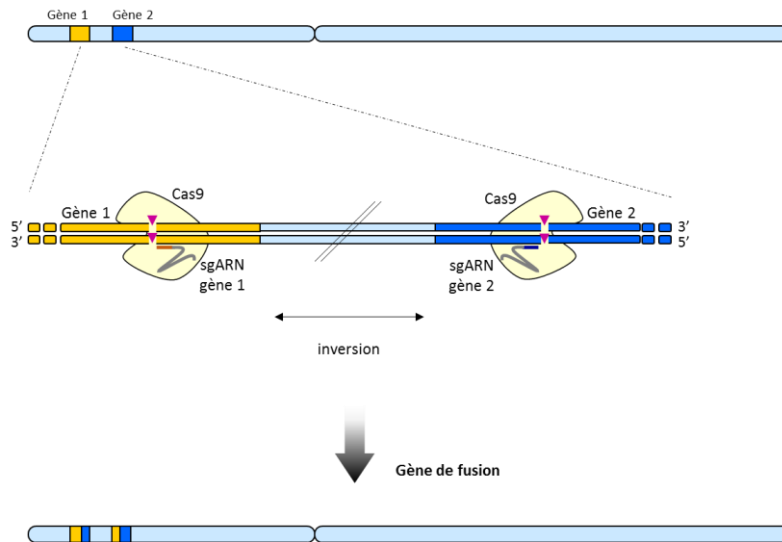


Figure 16 : Inversion chromosomique impliquant les gènes 1 et 2 suite à l'action de la protéine Cas9 et de deux ARN guides ciblant ces gènes en question

Dans leur étude, Choi et Meyerson ont généré par CRISPR-Cas9 deux inversions intrachromosomales impliquées dans le cancer du poumon : *EML4-ALK* et *KIF5B-RET* (Choi et Meyerson 2014). *EML4-ALK* est le produit d'une inversion paracentrique (figure 16) qui se fait dans le bras court du chromosome 2. *KIF5B-RET* résulte d'une inversion péricentrique entre les deux bras du chromosome 10. Pour générer ces inversions en particulier, les auteurs ont transfecté des cellules HEK 293T avec un plasmide permettant l'expression des sgARNs ciblant la séquence d'intérêt et l'expression de la protéine Cas9. Dans les deux cas les sites de coupures par les sgARN étaient espacés de plusieurs milliers de bases (> 11Mb).

Cette stratégie s'appuie sur le NHEJ pour réparer les cassures double brin générées et les auteurs ont constaté une haute fréquence de fusion directe et exacte, c'est-à-dire sans indels au point de fusion.

Si les deux sgARN ciblent deux chromosomes différents, cela peut aussi générer une translocation chromosomique (figure 17).

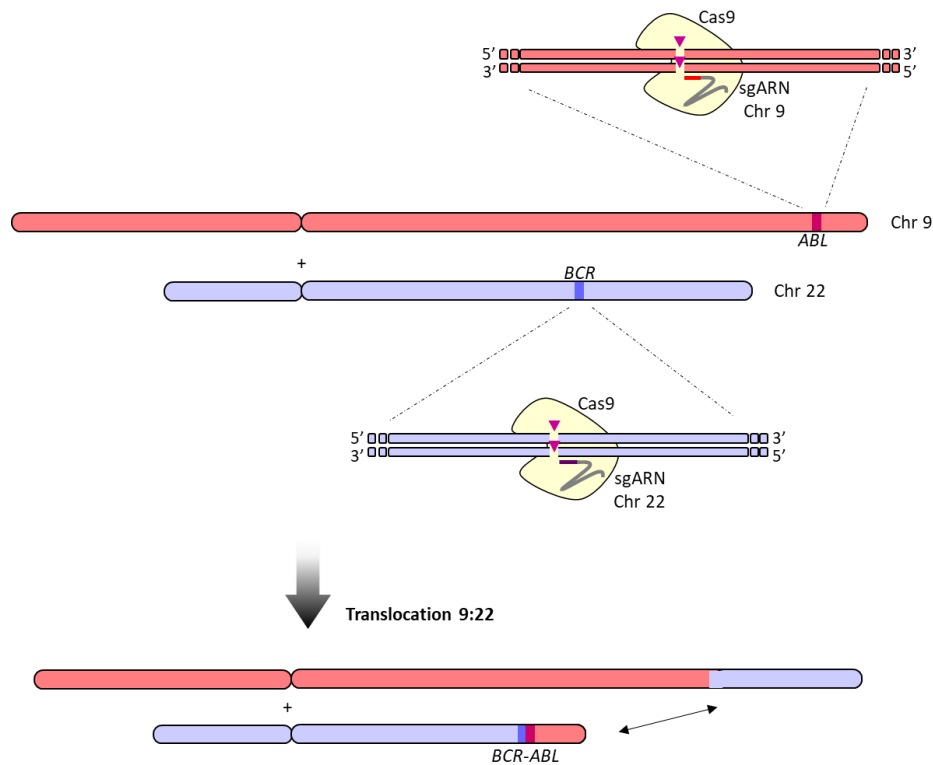


Figure 17 : Si les ARN guides ciblent des chromosomes différents, alors le système CRISPR-Cas9 peut générer une translocation chromosomique

Cette stratégie a été employée pour induire une translocation entre les chromosomes 5 et 6 dans des cellules HEK293T (Choi et Meyerson 2014). Cette translocation permet la formation de l'oncogène de fusion *CD74-ROS1* impliqué dans le cancer du poumon. Un autre groupe a utilisé cette approche pour générer une translocation entre les chromosomes 8 et 21, d'abord dans des cellules HEK 293A, afin de modéliser le gène de fusion *RUNX1-ETO*. Puis ont vérifié avec succès que cette stratégie pouvait être appliquée à des cellules souches hématopoïétiques humaines CD34+ isolées de sang de cordon ombilical (Torres et al. 2014).

Deux sgARN ciblant les gènes *BCR* et *ABL1* à des points définis, pourront donc être envisagés pour modéliser la translocation entre les chromosomes 9 et 22, responsable de la fusion entre *BCR* et *ABL1* et impliqué dans le développement de la leucémie myéloïde chronique.

C. Le système CRISPR-Cas9 en masse : les banques

Les cellules cancéreuses, de par leur instabilité génétique, acquièrent toujours de nouvelles aberrations génétiques. Ces mutations sont caractéristiques de la progression tumorale et confèrent aux cellules cancéreuses la capacité à échapper aux traitements. Pour modéliser cette instabilité génétique, la technologie CRISPR-Cas9 est utilisée sous forme de banques. La

spécificité de la Cas9 à cibler un gène est liée à son sgARN, qui est une courte séquence. Il est donc facile de générer une librairie de séquences guides afin d'explorer à grande échelle les fonctions des gènes (Shalem et al. 2014).

1. Crible génétique s'appuyant sur une perte de fonction

La banque « Genome-scale CRISPR Knock-Out » (GeCKO) permet de générer des KO des gènes, elle permet donc l'identification de gènes impliqués dans un mécanisme mais lorsque ceux-ci sont inactifs. Pour constituer cette banque, les auteurs se sont basés sur des vecteurs lentiviraux qui permettent simultanément l'expression de la protéine Cas9, du sgARN et du gène de sélection : la résistance à la puromycine. La voie lentivirale est choisie car elle permet de contrôler le nombre de copies transgéniques. De plus, les virus intégrés sont maintenus de façon stable dans le génome de ces cellules au cours de la réplication. Pour leurs expériences, c'est un total de 18 080 gènes du génome humain qui seront ciblés par cette banque, à raison de 3 ou 4 sgARN différents par gènes, soit 64 751 sgARN uniques (Shalem et al. 2014).

Dans leur étude, Shalem et al., cherchent d'abord à identifier les gènes essentiels à la viabilité cellulaire dans le cancer et les cellules souches pluripotentes en utilisant un crible négatif. Les auteurs ont alors suivi une perte de représentativité des sgARN au cours du temps dans des populations cellulaires. Ainsi la lignée cellulaire A375 de mélanome humain et les cellules souches humaines HUES62 sont transduites avec la banque de sgARN GeCKO. 14 jours après la transduction, une analyse par séquençage haut débit permet de suivre la perte d'expression de certains sgARN. Après analyse, cette perte de diversité des sgARN dans les cellules survivantes, montre que la plupart d'entre eux ciblent des gènes essentiels. L'utilisation de la banque GeCKO pour identifier des gènes essentiels à la survie cellulaire est donc possible via un crible négatif. Ceci permet de révéler des gènes à cibler dans le cas d'une lutte contre le cancer.

Mais cette banque leur a aussi permis d'identifier des gènes impliqués dans la résistance à un traitement anti-cancéreux en particulier. La sélection effectuée est alors positive. La lignée A375 de mélanome humain, qui possède une forme mutante de la protéine kinase BRAF, a été utilisée pour identifier les gènes impliqués dans la résistance au traitement vémurafénib. Le vémurafénib est un traitement qui inhibe la protéine kinase BRAF mutante (Shalem et al. 2014). Le traitement au vémurafénib provoque un arrêt de croissance des cellules A375. Après transduction de la banque GeCKO dans ces cellules et leur traitement à cette drogue, la

population cellulaire sera enrichie en cellules devenue résistantes au traitement après leur modification par le système CRISPR-Cas9. A nouveau, après 14 jours de traitement, une comparaison de la représentativité des sgARN exprimés par les cellules non traitées ou traitées, montre une distribution différente des sgARN. De plus cette analyse montre que pour certains gènes, ce sont plusieurs sgARN qui les ciblent qui sont sur-représentés (par exemple NF1, MED12, NF2, CUL3, TADA2B et TADA1). Ceci suggère que ces gènes en particulier contribuent effectivement au phénomène de résistance au traitement vémurafénib.

L'approche CRISPR-Cas9 a permis aux auteurs de mettre à jour des gènes qui étaient déjà identifiés comme candidats pour le phénomène de résistance suite à l'utilisation de shARN, mais aussi de nouveaux. De nouvelles hypothèses peuvent donc être formulées pour expliquer le mécanisme de résistance au traitement. De plus il semble qu'il y ai une meilleure efficacité des sgARN pour interrompre l'expression d'un gène en comparaison à l'utilisation de l'ARN interférence (ARNi). En effet, l'ARNi va réduire l'expression protéique en ciblant l'ARN et empêcher sa traduction. Cette méthode permet seulement le ciblage des ARN, de façon incomplète. Les sgARN en revanche induisent une réelle perte de fonction en ciblant directement le génome. Ce qui permet d'ailleurs de cibler plus de fonctions que les séquences codantes seules. Un sgARN va ainsi pouvoir cibler un promoteur, un site d'épissage, ect et permettre des études plus précises des gènes et de leur régulation (Shalem et al. 2014).

2. Crible génétique s'appuyant sur un gain de fonction

Une approche complémentaire a ensuite été publiée par le même groupe mais en identifiant cette fois les gènes impliqués dans la résistance au traitement suite à une surexpression (Konermann et al. 2015). Dans ce cas, la protéine Cas9 ne possède pas son activité catalytique (dCas9) mais agit comme facteur de transcription pour activer l'expression du gène ciblée par l'ARN guide. En effets, la dCas9 est fusionnées avec un domaine activateur de transcription : VP64. Cette dCas9-VP64 va cibler la région promotrice des gènes pour moduler leur expression. Pour accroitre encore l'activation de la transcription des gènes ciblés, les sgARN ont été modifiés par ajout d'un aptamère qui lie la protéine d'enveloppe de bactériophage MS2 dimérisée. Cette protéine MS2 est elle-même fusionnée avec les domaines activateurs p65 et HSF1. La présence simultanée de ces trois domaines d'activation, VP64, p65 et HSF1, permet une activation robuste de la transcription (figure 18).

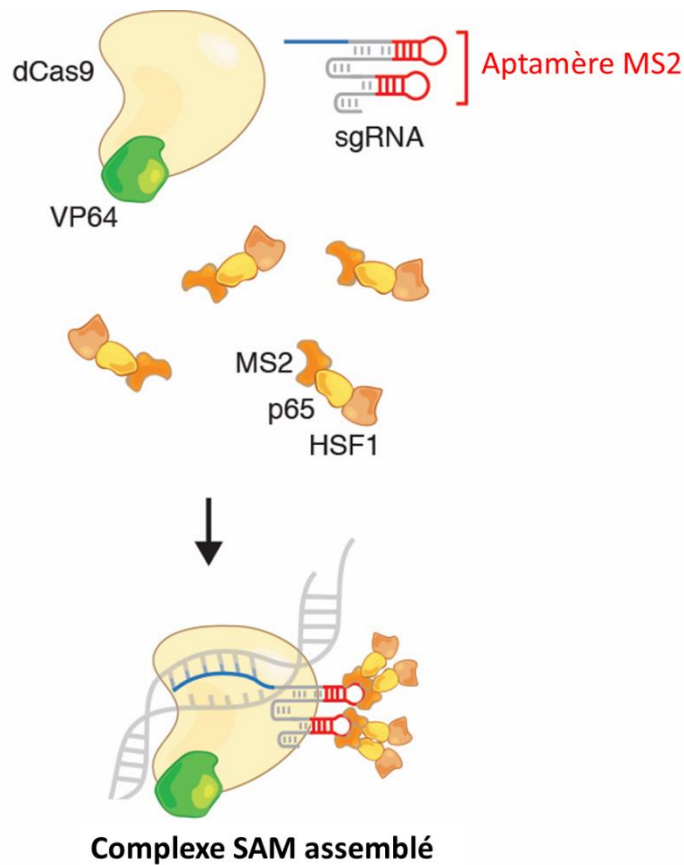


Figure 18 : Représentation schématique du système SAM permettant la surexpression des gènes (Konermann et al. 2015)

Ce système « Synergistic Activation Mediators » (SAM) est un complexe protéique conçu pour activer la transcription des gènes endogènes. La banque SAM se compose de 70 290 guides qui ciblent 23 430 séquences codantes et ses différentes isoformes. Soit 3 sgARN par isoformes qui vont reconnaître un site distant de moins de 200pb en amont du site d'initiation de la transcription (Konermann et al. 2015).

Tout comme pour la banque d'inactivation GeCKO, la banque SAM a été utilisée sur des cellules A375 de mélanome qui ont ensuite subi un traitement par l'anti-cancéreux vémurafénib. Après 14 jours de traitement, la distribution des sgARN a été comparé entre les cellules n'ayant pas subi le traitement et les cellules traitées. Cette analyse a montré des différences de représentativité des guides. Pour certains gènes, plusieurs sgARN qui le cible ont été enrichis dans la population de cellules traitées indiquant leur probable implication dans le phénomène d'absence de réponse au traitement (Konermann et al. 2015).

Dans leurs stratégies de perte et de gain de fonction, les analyses par séquençage des groupes de sgARN enrichis suite à un traitement à la vémurafénib ont permis une identification fiable

de gènes qui sont potentiellement impliqués dans la résistance au traitement. Pour argumenter l'implication de ces gènes dans ce phénomène de résistance, les auteurs ont sélectionné les gènes pour lesquels au moins trois sgARN distincts étaient significativement enrichis en présence de vémurafénib. Pour valider les résultats ils ont réalisé des pertes ou gains de fonction de façon individuelle sur les dix gènes les plus significativement représentés dans chacun des deux cribles. Ces expériences ont confirmé que la réactivation de la voie ERK semble être impliquée dans la mise en place de la résistance contre le vémurafénib (Koner mann et al. 2015). Ainsi, en appliquant la technologie CRISPR-Cas9 pour des analyses à haute résolution des éléments fonctionnels de l'ADN, une meilleure compréhension de la régulation de l'expression génique au cours de la mise en place et de la progression du cancer est désormais simple et peu coûteuse.

IV. Construction d'un modèle cellulaire pour l'étude de la LMC

Comme décrit précédemment, les systèmes viraux peuvent être utilisés pour construire un modèle cellulaire humain de la LMC. Les éléments génétiques impliqués dans la mise en place du cancer sont en partie identifiés et la construction d'un modèle cellulaire par cette voie est maîtrisée (Durrieu-Gaillard et al. 2017). Néanmoins les nouvelles technologies mises à jour ces dernières années permettent d'envisager une nouvelle démarche pour la construction des modèles de maladies. La technologie CRISPR-Cas9 en particulier semble être une bonne stratégie à développer dans le laboratoire. L'utilisation de cet outil permet de générer les mutations désirées de façon plus physiologique puisqu'elle évite l'utilisation de virus dont le génome s'intègre à celui des cellules ciblées.

Les cellules qui ont été choisies pour la construction de ce modèle de la maladie sont les cellules BJ-5ta. Ce sont des fibroblastes humains diploïdes immortalisés avec *hTERT* mais qui ne possèdent à priori pas d'autres mutations dans leur génome. Ces cellules sont présentes au laboratoire et ont été caractérisées quant à l'expression des gènes que je souhaite suivre durant la construction du modèle. Le choix de ces cellules repose sur leur immortalité et la facilité de leur entretien en culture cellulaire. Je suppose donc que le succès de leur transformation en cellules cancéreuses reposera sur les éléments génétiques que j'aurai choisis de perturber. Elles ont été validées comme ne pouvant pas former de colonies en soft agar, ce qui est une preuve de leur caractère non tumoral. La première étape de la transformation de ces cellules sera l'expression de l'oncogène *BCR-ABL1*. Ce gène de fusion est obtenu par la translocation 9;22. Forcer cette translocation à se produire dans les BJ-5ta en utilisant des sgARN adéquats est une

stratégie envisagée (figure 17). Néanmoins, les cellules BJ-5ta se transfectent difficilement et la probabilité d'obtenir une translocation stable dans ces cellules est limitée. Une autre stratégie est mise en place : l'intégration de la séquence codante de l'oncogène *BCR-ABL1* dans le génome des cellules par la voie lentivirale. Un vecteur lentiviral portant cette séquence codante et les virus qu'il a permis de produire étaient disponible. Pour faire rapidement et facilement la preuve de faisabilité de ce modèle c'est donc cette seconde stratégie qui est employée concernant l'expression *BCR-ABL1*.

Les étapes suivantes consisteront à induire un KO du gène *TP53* puis un KO du gène *RBI* par la technique CRISPR-Cas9. Les cellules ainsi obtenues exprimeront l'oncogène impliqué dans le développement de la maladie, *BCR-ABL1*, auront deux gènes suppresseurs de tumeur inactivés, *TP53* et *RBI* et seront immortalisées avec *hTERT*. Je suppose qu'avec ces changements génétiques et compte tenu des modèles préalablement construits (Durrieu-Gaillard et al. 2017; Hahn et al. 2002), les cellules seront totalement transformées et auront développé un phénotype tumoral. Effectivement, pour rappel, l'oncoprotéine BCR-ABL1 régule les activités de RAS et PP2A. Les modifications appliquées à ces deux éléments dans le système de Durrieu-Gaillard et al. seront ainsi compensées par l'expression de BCR-ABL1. Mais ce ne sont pas ces cellules qui seront intéressantes. C'est plutôt celles qui seront partiellement transformées c'est à dire exprimeront l'oncogène *BCR-ABL1*, *hTERT* et auront un KO dans le gène *TP53* ou *RBI*, mais pas les deux. Ces cellules pourront alors être utilisées pour réaliser un crible génétique afin d'identifier des gènes, qui lorsqu'ils sont inactivés, sont impliqués dans la transformation totale des cellules. Mon hypothèse est que ces gènes alors identifiés jouent un rôle dans la coopération oncogénique avec *BCR-ABL1* et sont impliqués dans l'évolution de la LMC. Comme contrôle de ce crible génétique, les gènes *TP53* ou *RBI* seront attendus dans la liste des gènes identifiés. Ce crible sera possible par l'utilisation de la banque de lentivirus GeCKOv2. Cette banque est composée de 123 411 sgARN qui ciblent 19 050 gènes, soit 6 sgARN par gènes, et de deux fois 1000 sgARN contrôles qui ne ciblent rien dans le génome (<https://www.addgene.org/pooled-library/zhang-human-gecko-v2/>). Tout comme (Shalem et al. 2014; Konermann et al. 2015), ce sont les gènes pour lesquels il y aura une sur-représentation des sgARNs qui seront identifiés comme pouvant être impliqués dans l'évolution de la LMC. Et ces derniers seront recherchés chez les patients à différentes phases de la LMC afin de confirmer leur implication dans l'évolution de la maladie.

Ce qui est intéressant avec le système CRISPR-Cas9 et leur utilisation pour la modélisation des maladies, c'est que ce qui est vrai pour l'une, le sera aussi pour les autres. Cette technique va permettre une meilleure compréhension des maladies à différentes étapes de leur

développement. Cela va aussi permettre d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques à long terme.

Chapitre 2

I. « Tumor Protein 53 » : *TP53*

Le gène *TP53* et la protéine p53 qui lui correspond, sont probablement le gène et la protéine les plus étudiés avec plus de 90 000 entrées dans PubMed.

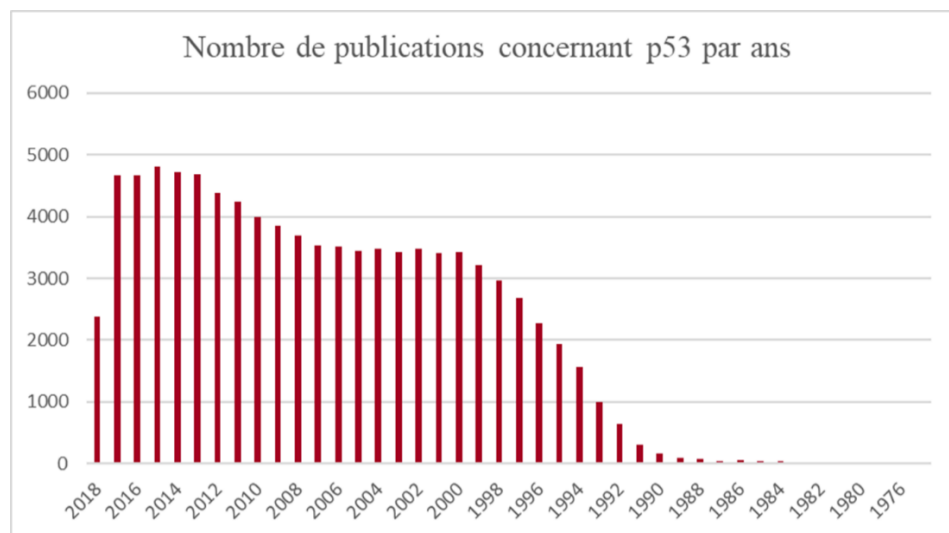


Figure 19 : Nombre d'articles publiés dans PubMed sur p53 depuis les années 70

Décrit pour la première fois en 1979 par six groupes de chercheurs indépendants, *TP53* est d'abord considéré comme étant un oncogène surexprimé dans les cancers avant d'acquies le titre du plus important gène suppresseur de tumeur et même de « gardien du génome » (pour revue : Lane 1992). Ce changement de statut intervient suite à la preuve apportée que p53 est inactivé directement par mutation du gène *TP53* dans près de la moitié des cancers et inactivé de façon indirecte dans beaucoup d'autres. Ainsi, depuis 1989, le nombre de recherches menées sur *TP53* et la quantité de publications le concernant ont largement augmenté (figure 19) (Vogelstein et al. 2000; Levine et Oren 2009). Il est aussi évident à présent que p53 a conservé ses caractéristiques structurelles et fonctionnelles dans de nombreuses espèces au cours de l'évolution.

p53 est maintenant connu comme étant un facteur de transcription activé suite à un stress cellulaire : un dommage à l'ADN, l'activation d'un oncogène ou encore l'hypoxie. La protéine va alors se tétramériser avant de se fixer à l'ADN et activer la transcription de ses gènes cibles. Ceux-ci sont impliqués dans différentes voies pour le maintien de la cellule : l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la senescence ou encore l'apoptose.

II. Structure de p53

A. La famille p53

La protéine p53 possède deux homologues : p63 et p73 (Kaghad et al. 1997; Yang et al. 1998). Ces protéines p53, p63 et p73 possèdent une forte homologie de séquence et de structure. Un ancêtre commun aux trois membres de la famille p53 a été identifié chez l'anémone de mer comme étant impliqué dans le maintien de l'intégrité du génome des cellules de la lignée germinale. Puis cet ancêtre commun a été identifié chez presque tous les invertébrés (Belyi et al. 2010). C'est chez les poissons cartilagineux qu'il y a eu duplication du gène, conduisant à l'expression de p53 et de p63/p73. Les versions des gènes codants les protéines p53, p63 et p73 sont retrouvées à partir des vertébrés (poissons osseux et mammifères). Cette famille de gène a ainsi conservé ses propriétés structurales et fonctionnelles durant l'évolution (figure 20) (Belyi et al. 2010; Yang et al. 2002).

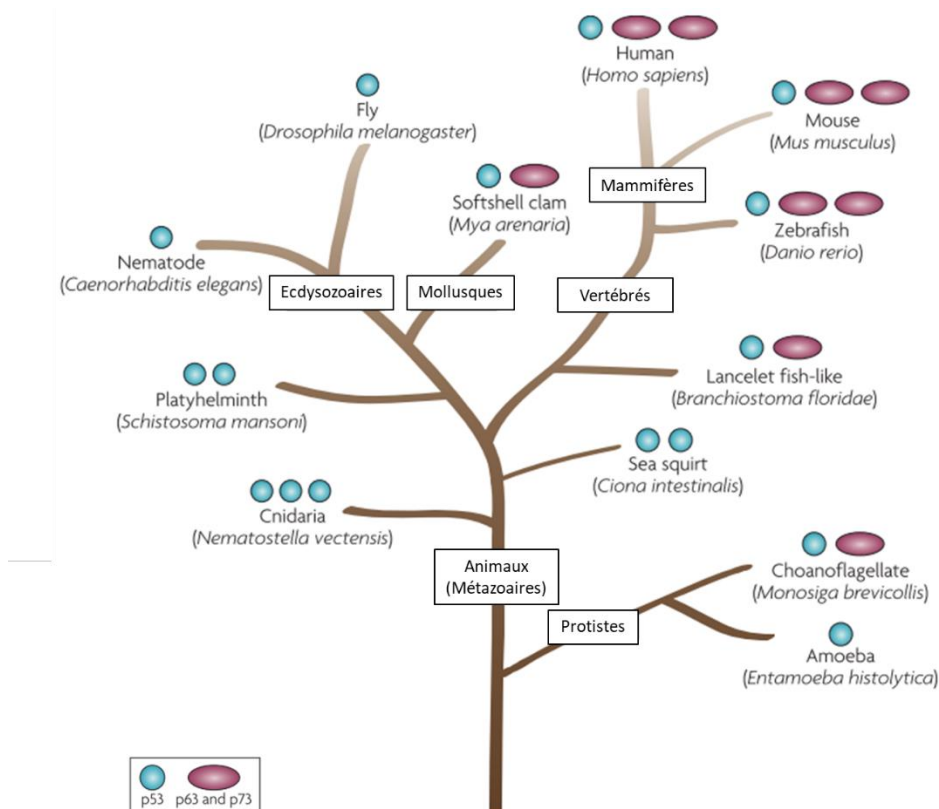


Figure 20 : Arbre généalogique simplifié représentant la présence des membres de la famille p53 au cours du temps (d'après Lu et al. 2009)

Chez l'Homme donc, les trois membres de la famille p53 sont présents. Tous ces membres possèdent quatre domaines très conservés : un domaine de transactivation (TA) en N-terminal,

un domaine riche en prolines (PR), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine d'oligomérisation (OD) en C-terminal de la protéine (figure 21). Les protéines p63 et p73 contiennent également un domaine d'interaction protéine-protéine « sterile alpha motif » (SAM) en C-terminal (figure 21)(Dötsch et al. 2010).

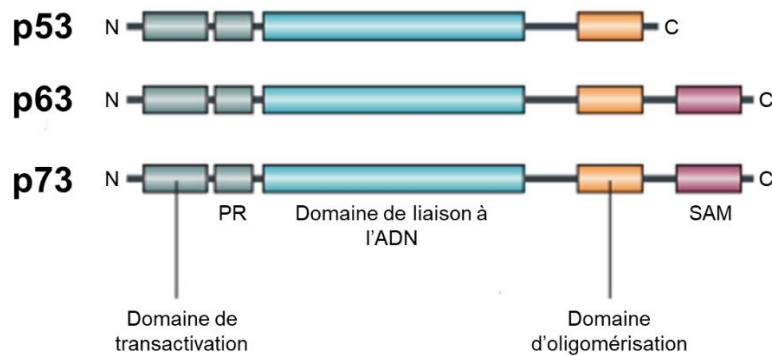


Figure 21 : Structure des protéines de la famille p53
(d'après Lu et al. 2009)

Les protéines p53, p63 et p73 possèdent un domaine de transactivation, un domaine riche en prolines (PR), un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'oligomérisation. Les protéines p63 et p73 possèdent en plus un domaine « sterile alpha motif » (SAM).

Du fait de leur homologie, p53, p63 et p73 peuvent se lier et activer la transcription de la plupart des cibles de p53, provoquant un arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Mais p63 et p73 possèdent également des rôles qui leur sont propres notamment dans le contrôle du développement et de la différenciation.

B. Les protéines codées par TP53

Le gène *TP53* est positionné sur le chromosome 17p13 chez l'Homme (Baker et al. 1989). La transcription de ce gène est sous le contrôle de trois promoteurs : deux promoteurs alternatifs sur l'exon 1, P1 et P1' et un promoteur interne, P2, situé dans l'intron 4 (figure 22A). L'épissage alternatif de l'ARN pré-messagers, l'usage d'un promoteur alternatif et une initiation de la traduction variable permet de générer neuf isoformes de la protéine p53 (Bourdon et al. 2005). La plus connue et la plus longue, aussi considérée comme étant la forme sauvage, est composée de 393 acides-aminés pour une migration à un poids moléculaire de 53kDa. Elle est aussi appelée p53 α . Elle contient le domaine de transactivation en N-terminal, divisé en deux sous domaines TA1 et TA2 et comprenant le domaine riche en proline (PR), le domaine de liaison à

l'ADN suivi d'un signal de localisation nucléaire (NLS), puis du domaine C-terminal contenant le domaine d'oligomérisation (OD) (figure 22B).

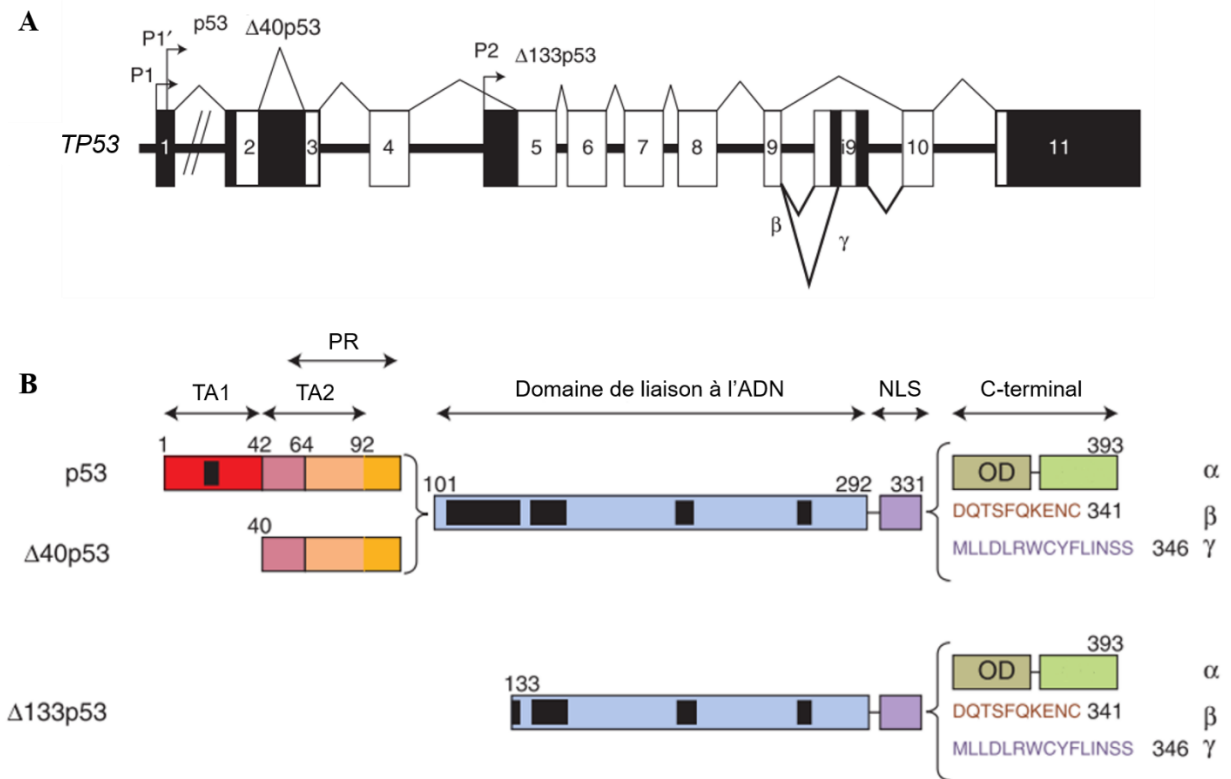


Figure 22 : Les différentes isoformes protéiques de p53 codées par le gène humain TP53 (d'après Khoury et Bourdon, 2010)

A. Représentation du gène TP53 humain. Les promoteurs P1, P1' et P2 sont indiqués par des flèches. Les exons sont représentés par des cases blanches (codants) ou noires (non codant) et les différents épissages possibles sont également indiqués avec l'isoforme concernée.

B. Schéma des isoformes protéiques de p53. La forme longue p53α possède les domaines de transactivation TA1 et TA2, de domaine riche en prolines (PR), le domaine de liaison à l'ADN suivi du signal de localisation nucléaire (NLS) et finalement le domaine d'oligomérisation (OD) en C-terminal de la protéine. Les différentes isoformes obtenues par épissage sont indiquées comme p53, Δ40p53 ou Δ133p53 suivies des symboles α, β et γ.

L'intron 9 de l'ARNm de p53 peut être épissé des trois différentes façons, induisant l'expression de protéines p53 avec des domaines C-terminal différents : p53α, p53β et p53γ. L'intron 2 subit également un épissage alternatif, conduisant à l'expression d'une protéine tronquée des 40 premiers acides-aminés : Δ40p53α et avec toujours les isoformes β et γ due aux différents épissages subit par l'exon 9. Le promoteur alternatif P2, conduit à l'expression d'une protéine p53 tronquée à l'extrémité N-terminal, avec une traduction initiée à partir du codon 133 : Δ133p53α, β et γ. Les différents épissages de l'ARNm de p53 sont représentés dans la figure 22A et les formes protéines correspondantes dans la figure 22B.

III. Régulation de p53

A. Activation de p53

Les voies de signalisation déclenchées par p53 sont normalement inactives et ne sont pas nécessaires au bon fonctionnement d'une cellule. C'est seulement lorsque la cellule sera stressée ou endommagée que p53 sera rapidement stabilisée et activée via des mécanismes de régulation post-traductionnelle avec comme objectif le maintien de l'intégrité du génome de cette cellule. Pour cela, la protéine p53 agit en tant que facteur de transcription qui régule de nombreux processus cellulaires par l'intermédiaire de ses gènes cibles, notamment l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose si nécessaire.

La forme active de p53 est un tétramère qui va se lier à une séquence consensus sur ses gènes cibles (Kern et al. 1991; Bargonetti et al. 1991; Stenger et al. 1992). Cette séquence comporte deux motifs palindromiques séparé par 0 à 13 pb : 5' - RRRCWWGYYY (N) RRRCWWGYYY - 3' avec R = A ou G, W = A ou T, Y = C ou T et N = 0 à 13 nucléotides. Cette séquence est appelée « p53 response element » (p53 RE) (El-Deiry et al. 1992).

Des modifications post-traductionnelles (MPTs) sont donc impliquées dans la régulation de l'activité de p53. Or, p53 étant hautement régulé, il existe de nombreuses et diverses MPTs de cette protéine (figure 23). La protéine p53 peut ainsi être phosphorylée, acétylée, ubiquitinée, ect, et il semble que ces modifications affectent le repliement de la protéine pour réguler son activité.

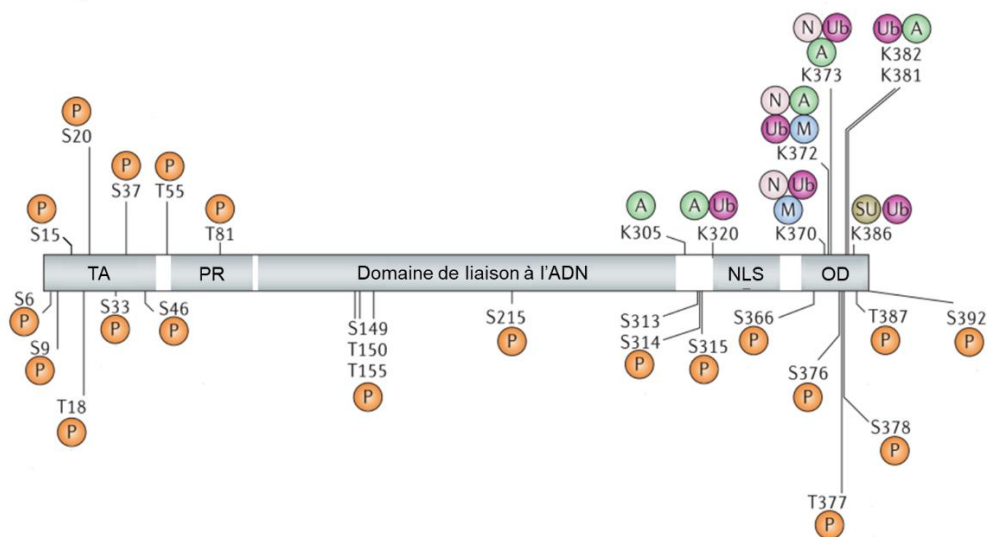


Figure 23 : Cartographie des modifications post-traductionnelles de la protéine p53 humaine (d'après Toledo et Wahl, 2006)

Les résidus sont indiqués ainsi que leur position dans la protéine. Ces modifications peuvent être des phosphorylations (P) indiquées en orange, une acétylation (A) indiquées en vert, une ubiquitination (Ub) indiquées en violet, une méthylation (M) en bleu, une sumoylation (SU) en kaki ou une neddylation (N) en rose.

A noter également que selon les MPTs, p53 va pouvoir activer différentes cibles (Meek et Anderson 2009). L'acétylation de la lysine K320, par exemple, est favorable à l'activation des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, là où l'acétylation de la lysine K373 est favorable à l'apoptose (Knights et al. 2006).

Globalement, des modifications en C-terminal de p53, permettent d'améliorer sa liaison à l'ADN (Vogelstein et al. 2000). Ainsi, l'acétylation de la lysine K320 permet à p53 de réguler l'expression de p21 en se liant au promoteur du gène *CDKN1A* (Knights et al. 2006). De même, l'ubiquitination de la lysine K320 de p53 est également favorable à l'activation de p21, poussant les cellules vers un arrêt du cycle cellulaire plutôt que vers l'apoptose (Le Cam et al. 2006). En revanche, l'acétylation de la lysine K373 permet de renforcer l'interaction avec les promoteurs pour lesquels p53 n'a qu'une faible affinité de liaison. C'est le cas pour les gènes pro-apoptotiques, notamment *BAX*.

Quelques MPTs du domaine de liaison à l'ADN sont également rapportées. L'acétylation de la lysine K120 par exemple, est cruciale pour induire l'apoptose via l'activation des gènes *BAX* et *BBC3* mais n'a pas d'incidence sur le cycle cellulaire (Tang et al. 2006; Sykes et al. 2006).

Finalement, les phosphorylations en N-terminal affectent plutôt l'affinité de MDM2 pour p53 et donc diminuent la dégradation de la protéine (Vogelstein et al. 2000). C'est notamment le cas pour les sérines S15 et S20 qui sont localisées dans le domaine de liaison à MDM2. Leur phosphorylation permet de dissocier MDM2 de p53 et de stabiliser la protéine (Shieh *et al.*, 1997). Une phosphorylation supplémentaire sur la thréonine T18 modifie la conformation de p53 pour également empêcher l'interaction avec MDM2 (Schon et al. 2002; Craig et al. 1999). Cette régulation de p53 par MDM2 sera décrite dans un paragraphe suivant.

Quoiqu'il en soit, ces phosphorylations de sérine et thréonines en N-terminal, dans le domaine de transactivation, permettent de réduire l'affinité de p53 pour MDM2 tout en favorisant les interactions avec des coactivateurs transcriptionnels comme p300/CBP. Ces coactivateurs ont eux-mêmes un rôle dans l'action de p53. Ainsi l'acétylation médiée par p300 sur l'extrémité C-terminale stabilise et active p53 (Toledo et Wahl 2006)(figure 24).

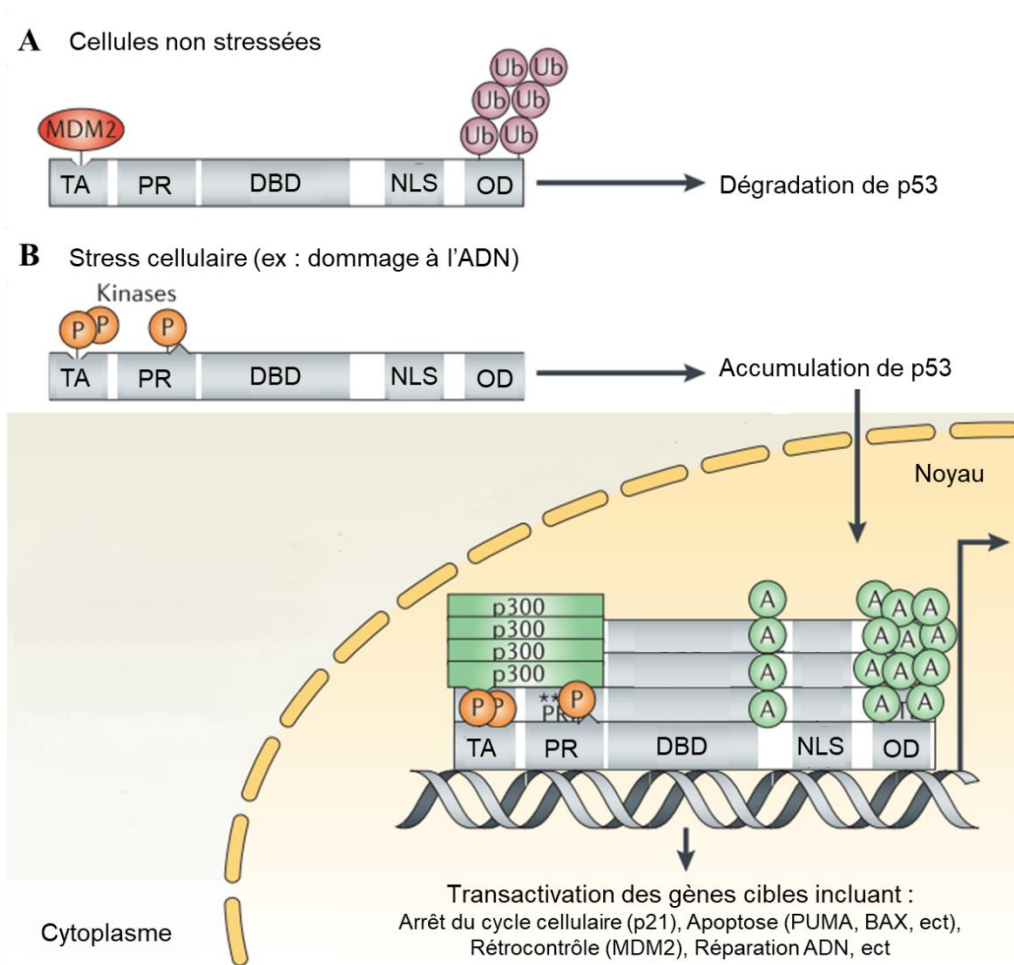


Figure 24 : Représentation d'un modèle de l'activation de p53 suite à un stress cellulaire (d'après Toledo et Wahl, 2006)

- A. Dans les cellules non stressées, p53 est maintenu inactif par l'action de MDM2. Sa fixation au domaine de transactivation de p53 empêche la liaison de p53 avec ses coactivateurs (tels que p300). Et son activité ubiquitine-ligase induit la poly-ubiquitination de la partie C-terminale de p53, favorisant sa dégradation par le protéasome.
- B. Lors d'un stress cellulaire, il y a stabilisation et activation de p53. La phosphorylation des S15, S20 et T18 de p53, réduisent son affinité pour MDM2. Il y a alors accumulation de p53 dans la cellule et formation des tétramères dans le noyau. Les phosphorylations dans le domaine de transactivation de p53 favorisent l'interaction avec son partenaire p300. L'acétylation de la partie C-terminale de p53 par p300 stabilise d'autant plus p53 et augmente sa liaison à l'ADN et plus particulièrement à ses gènes cibles. Il y aura alors activation de la transcription de ces gènes en question.

B. Maintenir p53 sous contrôle

Etant un puissant inhibiteur du cycle cellulaire et un inducteur d'apoptose, la fonction de p53 doit être contrôlée afin de maintenir une croissance normale des cellules. Plusieurs mécanismes le permettent : la régulation de la transcription et de la traduction, la stabilité et la localisation de la protéine et l'activité. Cette dernière a été décrite ci-dessus.

1. Régulation de la transcription/traduction

Une régulation de la transcription de *TP53* a été mise en évidence. Ainsi les facteurs de transcription NF- κ B, c-MYC et NOXA5 semblent impliqués dans ce contrôle (Webster et Perkins 1999; Raman et al. 2000; Wu et Lozanos 1994; Reisman et al. 1993; Roy et al. 1994). Cependant, l'absence de corrélation entre le niveau de protéine p53 dans les cellules, en comparaison avec les taux d'ARNm correspondants, tendent à mettre en évidence une régulation de la traduction (Fu et al. 1996). Cette régulation de la traduction semble liée à la présence d'éléments de type Alu dans la partie 3'UTR de l'ARNm de p53.

Mais c'est principalement au niveau protéique que la régulation de l'activité de p53 s'effectue. En effet, lorsqu'un stress génotoxique est appliqué à des cellules en culture, il y a une accumulation de p53 dans ces cellules sans augmentation de la transcription du gène ou d'amélioration de la stabilité des ARNm. C'est donc la demi-vie de la protéine qui est allongée. Dans ce cas c'est plutôt la régulation par MDM2, expliquée ultérieurement, qui est impliquée.

2. Régulation de la localisation subcellulaire

Pour exercer son activité de facteur de transcription, la protéine p53 doit avoir une localisation nucléaire. Or, lorsqu'elle n'est pas activée, la protéine est surtout localisée dans le cytoplasme. Déjà, la partie C-terminale de p53 possède des signaux de localisation nucléaire qui permettent de conduire la protéine du cytoplasme vers le noyau. Mais cette localisation nucléaire de p53 dépend également de sa capacité à interagir avec les microtubules. Il semble en effet que le transport de p53 vers de noyau se fasse le long des microtubules via la protéine motrice dynéine (Giannakakou et al. 2000).

La régulation de l'activité p53 passe également par son exportation du noyau vers le cytoplasme via des séquences d'exportation nucléaires situées dans le domaine d'oligomérisation (Stommel et al. 1999). Mais ce processus d'exportation nucléaire peut également être dépendant d'autres protéines régulatrices interagissant avec p53, tels que MDM2 (Freedman et al. 1999). Dans ce cas c'est MDM2 qui porte les signaux d'exportation nucléaire et les applique à p53 en s'y liant. Cette exportation vers le cytoplasme est également nécessaire pour la dégradation de la protéine p53 (Lain et al. 1999; Freedman et Levine 1998; Roth et al. 1998).

3. Régulation de la stabilité de p53 : Le rôle essentiel de MDM2

MDM2 (« Murine Double Minute 2 ») est une onco-protéine qui joue un rôle central dans le processus de régulation de l'activité de p53 puisqu'elle induit la dégradation de cette dernière

en cas d'absence de stress cellulaire. Il s'agit d'une E3 ubiquitine ligase qui va poly-ubiquitiner p53, comme une étiquette pour la dégradation par le protéasome (Haupt et al. 1997; Kubbutat et al. 1997).

L'importance de l'interaction entre p53 et MDM2 a été clairement mise en évidence par l'utilisation d'un modèle murin. Ainsi, la perte de l'expression de MDM2 chez les souris provoque une forte létalité embryonnaire alors que la perte d'expression conjointe de p53 et de MDM2 permet de passer outre ce phénotype et permet aux souris un développement normal (Jones et al. 1995).

La protéine MDM2 va interagir avec le domaine N-terminal de p53, son domaine transactivateur (Chen et al. 1996). Plus précisément la séquence minimale de liaison de MDM2 à p53 correspond aux résidus 18 à 26 de cette dernière. Le site hydrophobe ainsi formé par les résidus 19 à 26 de p53 vont se fixer à la poche hydrophobe formée en N-terminal de MDM2 (Kussie et al. 1996; Schon et al. 2002). Cette liaison inhibe l'activité de facteur de transcription de p53 en empêchant son interaction avec ses co-activateurs transcriptionnels tel que p300. Puis la poly-ubiquitination de la partie C-terminale de p53 par MDM2 favorise la dégradation de la protéine par le protéasome (figure 24A).

La transcription de *MDM2* est elle-même induite par la protéine p53 et dans une cellule non stressée, la quantité de p53 nécessaire pour la transactivation de *MDM2* est très faible (Barak et al. 1993; Zauberman et al. 1995). C'est donc une boucle de rétroaction autorégulatrice qui est décrite ici avec p53 qui régule positivement l'expression de MDM2 et MDM2, au contraire, régule négativement l'activité de p53.

IV. Les gènes cibles de p53

Tant qu'une cellule n'est pas soumise à un stress, la protéine p53 est régulée par dégradation. Cette régulation permet à la cellule de progresser dans son cycle et de se diviser. C'est lors d'un stress cellulaire que cette inhibition sera levée et que p53 va pouvoir s'accumuler, s'activer et alors induire la transcription de ses gènes cibles.

Un grand nombre de gènes ont été identifiés comme étant des cibles de p53 et lui confèrent la fonction de suppresseur de tumeurs. Ces gènes sont impliqués dans différentes réponses cellulaires : l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose, le métabolisme, l'autophagie, la traduction et les mécanismes de rétroaction (figure 25).

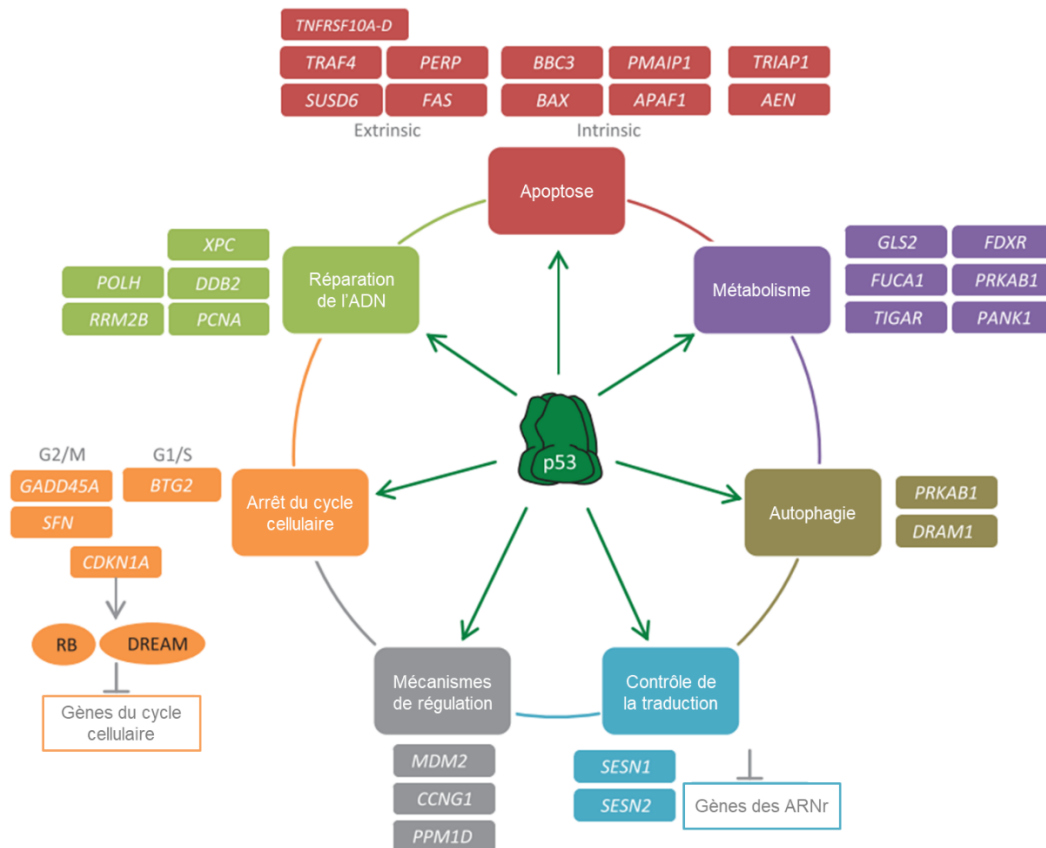


Figure 25 : p53 est capable d'activer directement des gènes cibles impliqués dans divers processus cellulaires (d'après Fischer, 2017)

Toutes ces voies cellulaires activées par p53 ne sont pas décrites par la suite. Seules les plus connues et décrites dans la littérature le seront.

A. L'arrêt du cycle cellulaire

La protéine p53 utilise les points de contrôle du cycle cellulaire pour induire des arrêts en G1/S et G2/M. Le gène *CDKN1A* (« cyclin-dependent kinase inhibitor 1A », qui code la protéine p21, a été l'un des premiers gènes identifiés comme cible de p53 et a un rôle majeur dans ces points de contrôle du cycle cellulaire (Abbas et Dutta 2009; Agarwal et al. 1995; Bunz et al. 1998). p21 interagit avec les complexes cyclines/kinases cyclines dépendantes (CDK) pour les inactiver (Harper et al. 1993). Les complexes cycline D/CDK4 ou 6, cycline A/CDK2 et cycline E/CDK2 ainsi inhibés, p21 conduit à la stabilisation et à l'activation de Rb et du complexe DREAM. Rb, comme p21, est requis pour l'arrêt du cycle cellulaire puisqu'il séquestre la protéine E2F, impliqué dans l'entrée en phase S. La stabilisation du complexe DREAM régule

les gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire et dont les fonctions s'étendent de la phase G1 à la fin de la mitose : *CDK1*, *CDC25*, *CCNA*, *CCNB*, ect. La voie DREAM est ainsi impliqué dans les points de contrôle G1/S et G2/M (Engeland 2017).

Globalement, cette protéine p21 est suffisante pour conduire à l'arrêt du cycle cellulaire. Toutefois, l'activation transcriptionnelle de *CDKN1A* peut être dépendante et indépendante de p53.

Les gènes *GADD45* et *SFN* qui codent respectivement pour les protéines GADD45 et 14-3-3 sont également des cibles de p53 qui permettent de stopper le cycle cellulaire.

B. La réparation de l'ADN

p53 étant activé en réponse à un dommage à l'ADN, il est naturel que plusieurs de ses gènes cibles activés soient impliqués dans la réparation et le maintien de l'ADN. C'est d'ailleurs un rôle majeur de cette protéine puisqu'une réparation erronée de l'ADN peut entraîner une accumulation de mutations ou d'aberrations chromosomiques et provoquer le développement d'un cancer.

Ainsi, suite à un dommage à l'ADN induit par des UV par exemple, p53 va pouvoir activer les gènes *XPC* (« xeroderma pigmentosum group C ») et *DDB2* (p48) qui codent pour des protéines permettant la réparation par excision de nucléotides (Adimoolam et Ford 2002; Hwang et al. 1999).

D'autres gènes dont l'expression est régulée par p53, et impliqués dans des mécanismes de réparation de l'ADN, sont les gènes *RRM2B* et *POLH* (Tanaka et al. 2000; Liu et Chen 2006). La protéine p53R2 codée par *RRM2B* correspond à une petite sous-unité d'une ribonucléase réductase régulée par p53 et qui fournit les dNTP au site endommagé dans l'ADN au moment de la réparation. La polymérase η , codée par le gène *POLH*, participe à la réparation de l'ADN via sa capacité de synthèse translésionnelle.

La protéine PCNA, impliquée dans la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire joue également un rôle dans la réparation de l'ADN. En fait, certaines protéines engagées dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation ont des actions qui s'entrecroisent. GADD45 est également l'une de ces protéines puisqu'elle se fixe à PCNA et favorise alors la réparation conjointement à une inhibition de la réplication (Smith et al. 1994).

Ainsi, lors d'un dommage à l'ADN, p53 va d'abord permettre un arrêt du cycle cellulaire afin que la réparation de l'ADN puisse être effectuée par la machinerie de réparation adéquate. Et finalement si cette réparation échoue, p53 va conduire la cellule à la mort par apoptose.

C. L'apoptose

Le rôle de p53 étant de prévenir le développement de cancer, son activité pro-apoptotique est primordiale en tant que gène suppresseur de tumeur. Cette apoptose, à la fois intrinsèque et extrinsèque, est induite par des gènes cibles de p53.

L'apoptose intrinsèque est menée par des gènes de la famille BCL-2. Les membres de cette famille de gène peuvent être pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques et contrôlent le relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme. Plusieurs membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 ont leur transcription activée par p53 : *BBC3* (PUMA), *BAX*, *PMAIP1* (NOXA) (Nakano et Vousden 2001; Oda et al. 2000). Suite au relargage du cytochrome c par action ces protéines, il va se lier à la protéine APAF1, codée par le gène *APAF1*, lui-même activé par p53 (Robles et al. 2001).

Le gène *AEN*, autre cible pro-apoptotique de p53, code pour une exonucléase active contre l'ADN double brin pour former un ADN simple brin. Elle amplifie le signal de dommage à l'ADN et donc induit de par elle-même l'apoptose (Kawase et al. 2008).

L'activation de l'apoptose extrinsèque est surtout sous contrôle de la famille des récepteurs du « tumor necrosis factor » TNF-R et l'activation de la cascade des caspases-8 et 3. Dans ce cas, p53 va activer les gènes codant des protéines transmembranaires, qui sont des TNF-R : *FAS* ou *TNFRSF10A-D* (aussi *DR5*). L'induction de l'expression de *FAS* se produit, notamment, en réponse à une irradiation γ . p53 semble également impliqué dans l'augmentation de ce récepteur à la surface des cellules. Lorsque le récepteur FAS est activé suite à sa liaison avec son ligand FASL, il y a activation de la cascade des caspase et induction de l'apoptose.

Le gène *TNFRSF10A-D*, qui code pour le récepteur TRAIL-R1, est induit par p53 en réponse à un dommage de l'ADN et induit également la mort cellulaire par l'intermédiaire des caspases-8 (Haupt et al. 2003).

D'autres gènes cibles identifiés de p53 et impliqués dans l'apoptose extrinsèque sont les gènes : *PERP*, *TRAF4* ou *SUSD6* (Fischer 2017).

D. La rétroaction

p53 est un puissant activateur de transcription en réponse à un stress cellulaire. Parmi les nombreux gènes cibles activés par p53, certains sont responsables de sa propre régulation. C'est le cas de *MDM2*, le plus connu et qui a été décrit précédemment.

Le gène *CCNG1*, qui est aussi une cible de p53, code pour la cycline G1 et contribue également à la boucle de régulation médiée par p53. En effet, la cycline G1 active MDM2 par déphosphorylation par l'intermédiaire de PP2A (Okamoto et al. 2002).

Le gène cible de p53 *PPM1D* code pour une phosphatase qui va déphosphoryler p53 au niveau de la S15 et inactiver sa fonction protéique. C'est donc un régulateur négatif des voies de réponse au stress dans la cellule par inhibition de l'activité facteur de transcription de p53 (Lu et al. 2005).

Toutes ces voies dans lesquelles p53 est impliqué montrent bien son rôle primordial en tant que gène suppresseur de tumeur.

Il semble en tous cas que la fonction de p53 soit seulement celle d'un activateur de transcription et que les régulations négatives mises en évidence soient indirectement liées à p53 et requièrent souvent l'action d'une protéine intermédiaire telle que p21 (Fischer 2017).

Dans le cadre de ma thèse j'ai plus particulièrement suivi l'activité de p53 au travers de ses gènes cibles : *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* qui codent respectivement pour les protéines p21, PUMA et MDM2.

V. p53 et cancers

L'inactivation de *TP53* altère les voies de signalisations normalement induites par ce gène et est essentielle au développement de nombreux cancers. *TP53* est inactivé directement par mutation dans plus de 50% des cancers et indirectement inactif dans de nombreux autres. De plus, il y a maintenant des preuves que certaines mutations de *TP53* changent l'activité de la protéine et lui confèrent des propriétés oncogéniques.

A. Mutation du gène *TP53* : inactivation vs gain de fonction

La majorité des mutations de *TP53* associées aux cancers sont des mutations faux-sens. Soit la substitution d'une seule paire de base mais qui induit un changement au moment de la

traduction par une substitution d'un acide-aminé. La plupart de ces mutations sont situées dans la région codant pour le domaine de liaison à l'ADN et provoque une perte de fonction de la protéine (figure 26)(Olivier et al. 2010). Il y a d'ailleurs six acides-aminés du DBD en particulier qui constituent des points chauds et présentent une fréquence de mutation plus élevée que les autres résidus (figure 26)(Freed-Pastor et Prives 2012).

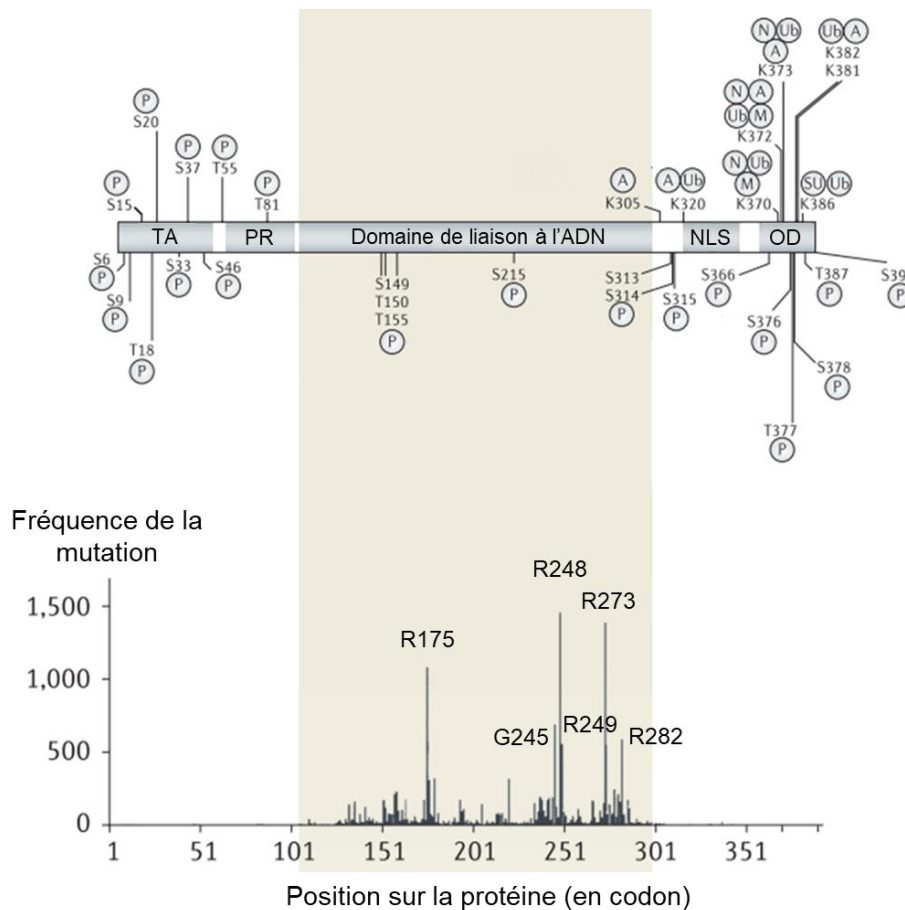


Figure 26 : Positionnement des mutations les plus fréquemment observées pour p53 dans les cancers (d'après Toledo et Wahl, 2006)

Cette carte de la protéine p53 humaine indique la position des résidus qui sont modifiés dans les cancers humains, sur la base d'un total de 15 911 tumeurs

Les mutations ponctuelles ne résultent pas en une protéine tronquée ou complètement absente. Au contraire cela génère l'accumulation des protéine p53 mutantes, de taille complète et avec une demi-vie prolongée (Strano et al. 2007). Des études structurales ont permis de classifier les mutants p53 en deux grandes catégories : les mutants ayant une incapacité à se lier à l'ADN et les mutants ayant une altération fonctionnelle importante. De plus, ces formes mutantes de p53 peuvent exercer un effet dominant négatif sur la forme sauvage de la protéine et abolir sa fonction normale de suppresseur de tumeur.

Il existe également des arguments clairs au fait que des formes mutantes de p53 puissent exercer une activité oncogénique liée à un gain de fonction suite à l'acquisition de la mutation (Freed-Pastor et Prives 2012). Les activités gain de fonction de p53 sont liées à deux mécanismes : l'interaction du mutant p53 avec de nouveaux partenaires protéiques ou bien la régulation de nouveaux gènes cibles et plus particulièrement des oncogènes. Ainsi la forme mutante de p53 peut interagir, séquestrer ou inactiver des protéines impliquées dans les processus anti-tumoraux : arrêt de croissance ou apoptose entre autres. La p53 mutée et facteur de transcription de nouveaux gènes cibles peut, pour sa part, contribuer au développement de résistances aux traitements anti-cancéreux ou l'instabilité génétique caractéristique des cellules cancéreuses, ou encore favoriser les métastases. Et finalement, c'est surtout en interagissant avec un partenaire protéique qui soit un facteur de transcription (exemple de NF-Y), que p53 mutée induit la transcription d'un nouveau panel de gènes (Strano et al. 2007). Parmi les gènes dont la transcription est accrue par la présence d'une forme mutante de p53 : *MYC*, *CXCL1*, *PCNA*, *CDK1*, *CDC25C*, *CCNA*, *CCNB*, *EGR1*, *NFKB2*, *BCL-xL* ect. Tous ces gènes sont impliqués dans la prolifération des cellules tumorales, dans la résistance à la mort cellulaire, dans la chimiorésistance, favorisant les métastases ou plus généralement dans le métabolisme cellulaire (Freed-Pastor et Prives 2012).

B. p53 : une cible à inactiver

Outre les mutations de *TP53* lui-même, l'inactivation de la protéine peut aussi être le fait d'une inactivation indirecte. Plusieurs mécanismes d'inactivation indirecte de p53 ont été identifiés. Concernant le principal régulateur de p53 d'abord : MDM2. Il a été mis en évidence dans certains cancers, une amplification du gène *MDM2* et donc la surexpression de la protéine correspondante. Cette dernière était responsable de l'inactivation de p53. Cette amplification de MDM2 est constaté dans 7% des cancers et ceci sans mutation conjointe du gène *TP53* (Momand et al. 1998).

Dans les cancers du col de l'utérus c'est un autre mécanisme qui a été révélé. Dans ce cas, c'est une protéine virale qui est responsable de l'inactivation de la protéine p53. Ainsi l'oncogène *E6* du papillomavirus de type 16 ou 18 permet l'expression de la protéine E6 qui va se lier à p53 et stimuler sa dégradation (Scheffner et al. 1990).

Une mauvaise localisation de p53 dans la cellule peut aussi être responsable de son inactivité. Dans ce cas, p53 est confinée dans le cytoplasme et ne peut appliquer son rôle de facteur de transcription dans le noyau (Vogelstein et al. 2000).

La conservation de *TP53* à travers l'évolution montre bien l'importance de son rôle dans le système cellulaire et pour le maintien de l'intégrité du génome, quel que soit l'espèce. Comme cela a été décrit précédemment, ce gène *TP53* semble impliqué dans l'évolution de la leucémie myéloïde chronique. C'est la première raison pour laquelle ce gène sera ciblé lors de la construction du modèle cellulaire. Cependant, l'étude de la perte de fonction de ce seul gène constitue également un vaste sujet. C'est pourquoi quelques analyses le concernant seront décrites dans la suite de ce manuscrit.

VI. Augmenter l'expression de p53 dans des cellules en culture : la nutline-3a

De par son statut de gardien du génome, p53 constitue une cible de choix pour lutter contre le développement et la progression des cellules cancéreuses. Plusieurs stratégies et plusieurs molécules ont été mises au point pour cela. Cependant toutes ne seront pas abordées. Je vais ici seulement discuter de la molécule utilisée lors des expériences réalisées pour l'étude de p53.

Cette molécule en question permet d'augmenter la présence de la protéine p53. Pour cela c'est le processus de régulation de la protéine par dégradation qui est inhibé. Ainsi, inhiber le contact entre la protéine MDM2 et p53 permet d'augmenter la quantité de p53 dans les cellules. L'utilisation de ce type de molécule n'est possible que dans le cas des cancers pour lesquels il y a une surexpression de *MDM2* sans atteinte de *TP53*.

La nutline-3a est donc une petite molécule antagoniste de MDM2 qui permet d'activer par stabilisation p53 sans nécessité d'un stress génotoxique (Vassilev et al. 2004; Vassilev 2005). p53 alors actif va pouvoir activer la transcription de ses gènes cibles. Plus exactement, la nutline-3a se lie à la protéine MDM2 au site d'interaction avec p53 et inhibe l'activité d'ubiquitination de MDM2 sur p53.

Différentes études ont été menées afin de déterminer les effets d'un traitement de cellules, cancéreuses ou non, par la nutline-3a. Elles ont notamment révélé que les effets du traitement dépendent de la présence de p53 fonctionnel dans les cellules. Ainsi, les cellules n'ayant pas de p53 fonctionnel sont insensibles au traitement, renforçant l'idée que p53 est la seule cible pertinente de la nutline-3a (Efeyan et al. 2007).

Plus tard, il a été révélé que la mort cellulaire provoquée par le traitement de cellules p53 fonctionnel est liée à l'induction de *BBC3* (protéine PUMA) par p53. Et que l'absence de ce gène *BBC3* conférait une protection aux cellules contre l'apoptose médiée par la nutline-3a via p53 (Valente et al. 2016).

En se basant sur ces données et celles de Malina et al. 2013 ou Guernet et al. 2016, j'ai réalisé un traitement à la nutline-3a pour sélectionner les cellules pour lesquelles une disruption de *TP53* par le système CRISPR-Cas9 était souhaité. En traitant les cellules avec la dose adéquat de nutline-3a, seules les cellules ayant un *TP53* inactivé survivent et sont ainsi amplifiées.

Un traitement à la nutline-3a à la dose appropriée sera ensuite appliqué sur des lignées cellulaires non transformées, exprimant la forme sauvage fonctionnelle de p53 (*TP53^{WT}*) ou la forme disruptée (*TP53^{KO}*), afin de vérifier dans un premier temps la spécificité de la drogue envers sa cible. Puis des analyses par séquençage des ARN totaux permettra d'identifier de nouveaux gènes cibles de p53.

Matériels et méthodes

I. Matériels

A. Souche bactérienne

1. X11-Blue

Souche de bactérie E.coli de génotype *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIq Z_M15 Tn10* (Tetr)]. Ces bactéries résistantes à la tétracycline sont utilisées pour amplifier des plasmides.

B. Les lignées cellulaires

1. BJ-5ta (ATCC® CRL-4001™)

Lignée de fibroblastes humains diploïdes issus de prépuce d'un nouveau-né. Ces cellules ont été immortalisées avec le gène *hTERT* (sous-unité catalytique de la télomérase humaine) porté par le vecteur pGRN145, qui leur confère également la résistance à l'hygromycine.

2. HeLa (ATCC® CCL-2™)

Cellules épithéliales humaines issues d'un adénocarcinome du col de l'utérus.

3. K562 (ATCC® CCL-243™)

Lignée cellulaire humaine dérivée d'une patiente en phase blastique de la LMC.

C. Les milieux et conditions de culture

1. Culture des bactéries

Les bactéries vont se multiplier en milieu LB : L-Broth (10g de NaCl, 10g de tryptone, 5g d'extrait de levure dans 1 litre d'eau). Leur culture se fait à 37°C, soit en milieu liquide sous agitation (180 rpm) soit en milieu solide en ajoutant 1% d'agar. Ce milieu peut être complété avec un antibiotique. Les antibiotiques utilisés sont l'ampicilline (200µg/ml) ou la tétracycline (10µg/ml).

2. Culture des cellules BJ-5ta

400ml de Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1X (DMEM) (Gibco n°41966052) complété avec 100ml de milieu 199 (Sigma® Aldrich M4530), 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen # 10270) et 100 unités/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine

(Invitrogen # 15140122). Les cellules sont cultivées sur boîte (100x20 mm BD Falcon®) à 37°C, en atmosphère humide enrichie en CO₂ (5%).

3. Culture des cellules HeLa

500ml de milieu DMEM 1X complété avec 10% de SVF, 100 unités/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine. Les cellules sont cultivées sur boîte (100x20 mm BD Falcon®) à 37°C, en atmosphère humide enrichie en CO₂ (5%).

4. Culture des cellules K562

500ml de milieu RPMI 1640 (Gibco n°21875034) complété avec 10% de SVF, 100unités/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine. Les cellules sont cultivées en flasque à 37°C, en atmosphère humide enrichie en CO₂ (5%).

D. Les plasmides

1. Les plasmides du système CRISPR-Cas9

- CRISPR-CAS MLM3636 (Addgene plasmid # 43860) : Plasmide qui contient le promoteur U6 et la séquence du gRNA scaffold. Entre ces deux éléments se trouve deux sites de restriction de l'enzyme BsmBI qui permet le clonage des ARN guides.
- pCW-Cas9 (Addgene plasmid # 50661) : Vecteur lentiviral contient la séquence codante de la protéine Cas9 dont l'expression est sous contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline. Cette séquence codante de la protéine Cas9 est suivie d'une étiquette 3xFLAG qui permet sa détection par western blot. Le vecteur lentiviral apportera également la résistance à la blasticidine.
- pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (Addgene plasmid # 48139) : Plasmide qui contient à la fois la séquence codante de la protéine Cas9 taguée par un 3xFLAG, suivie d'une séquence 2A-puroR, et les éléments nécessaires à l'expression d'un ARN guides. Ce plasmide permet donc d'apporter à la cellule la protéine Cas9 et l'ARN guide qui servent à cibler une séquence dans le génome et la résistance à la puromycine pour sélectionner les cellules exprimant l'ensemble de ce système.

2. Les plasmides utilisés pour les clonages

- pUC18 : Vecteur qui contient une origine de réplication bactérienne, le gène de résistance à l'ampicilline et le gène LacZ permettant un crible blanc/bleu (<http://www.addgene.org/vector-database/4490/>)

E. Les anticorps

Les différents anticorps utilisés étaient dilués soit dans une solution de TBST 5% de lait écrémé dans le cas d'une détection d'une forme classique de protéine, soit dans une solution de TBST 5% de BSA dans le cas d'identification de l'état de phosphorylation d'une protéine.

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés lors des expériences de western blot

	Cible	Espèce d'origine	Fournisseur	Dilution
Anticorps primaire	p53 (DO-1)	Souris	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
	p21 (SX118)	Souris	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
	p21 (F-5)	Souris	Santa Cruz Biotechnology	1/500
	PUMA α/β (G-3)	Souris	Santa Cruz Biotechnology	1/500
	MDM2 (SMP14)	Souris	Santa Cruz Biotechnology	1/500
	ABL1 (8E9)	Souris	BD Pharmingen	1/1000
	BCR (B-12)	Souris	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
	Il-8 (B-2)	Souris	Santa Cruz Biotechnology	1/500
	Il-8 (GTX115959)	Lapin	GeneTex	1/500
	β -actine (ACTBD11B7)	Souris	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
FLAG [®] M2	Souris	Stratagene	1/1000	
Anticorps secondaire	Anticorps anti-souris (A5906)	Mouton	Sigma [®] life science	1/10 000
	Anticorps anti-lapin (A6154)	Chèvre		

II. Méthodes

A. Production des bactéries électro-compétentes

Pour que les bactéries puissent être transformées, il faut qu'elles soient compétentes à l'électroporation. Pour cela, les bactéries X11-Blue sont mises en pré-culture à 37°C dans 10ml de LB + tétracycline et sous agitation pendant 1 nuit. Cette pré-culture permet d'inoculer une culture d'1L de LB + tétracycline, placée à 37°C sous agitation jusqu'à la phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} entre 0.6 et 0.8). La culture bactérienne est alors refroidie rapidement dans la glace puis centrifugée à 4000 rpm pendant 15 min à 4°C. Les bactéries sont alors lavées trois fois, en re-suspendant le culot dans de l'eau stérile glacée et par centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min à 4°C. Enfin le culot bactérien est repris dans du glycérol 10% et aliquoté en volumes de 50µl, refroidis rapidement dans de l'azote liquide et stocké à -80°C.

B. Transformation des bactéries

Un aliquot de 50µl de bactéries compétentes est transformé avec quelques nano-grammes d'ADN par un choc électrique de 1800V pendant 1,5 millisecondes (MicroPulser™ Biorad). Les bactéries sont reprises et incubées dans 200µl de LB, 30 minutes à 37°C et sous agitation. Elles sont ensuite mises en culture et sélectionnées sur une gélose LB complétementé en antibiotique d'intérêt (culture à 37°C sur la nuit).

C. Préparation de l'ADN plasmidique

Des colonies qui auront croît sur la gélose LB de sélection sont récupérées et mises individuellement dans 3ml de culture liquide de LB contenant l'antibiotique de sélection (une nuit à 37°C sous agitation). Puis l'extraction de l'ADN plasmidique est faite par la méthode de la lyse alcaline en utilisant un kit (Gene JET plasmid kit - Thermo Scientific # K0502). La concentration des plasmides extraits est déterminée par dosage via un spectrophotomètre (DeNovix®) à partir d'1µl d'échantillon.

D. Clonage des CRISPR

1. Design des ARN guides

Pour le design des ARN guides, il faut choisir une séquence à cibler et respecter certaines règles. La séquence qui est reconnue par l'ARN guide est de 20 nucléotides et est impérativement

suivie d'une séquence PAM : NGG. Cette séquence est nécessaire à la reconnaissance et la coupure par la Cas9. De plus, le premier nucléotide reconnu doit être un G ou un A. Si ce n'est pas possible, alors il faut choisir une séquence de 20 nucléotides mais ajouter un nucléotide supplémentaire qui sera un G et sera situé en première position. Ceci permet la transcription de l'ARNguide qui est sous contrôle d'un promoteur U6.

Voici le modèle à suivre pour le design des oligonucléotides permettant le clonage des ARN guides :

5' – CACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN – 3' (top oligonucléotide)

3' – CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAA – 5' (bottom oligonucléotide)

En utilisant le logiciel en accès libre CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) et en soumettant une large séquence à cibler (un exon par exemple), un certain nombre d'ARNguides seront proposés. Pour chacun d'entre eux, un score d'efficacité est prédit et les possibles cibles aspécifiques indiquées ainsi que leur position dans le génome : nom du gène, exon, intron, ect. D'autres logiciels en libre accès sont utilisés pour le choix des ARN guides : CHOPCHOP ([https:// chopchop.rc.fas.harvard.edu/](https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/)) ou CRISPR design (<http:// crispr.mit.edu/>).

2. Clonage des ARNguides

La réaction de clonage se fait via des étapes de digestion et ligation. La première étape consiste à aligner et phosphoryler les oligonucléotides top et bottom. 1µl de chacun des oligonucléotides à 100µM sont mélangés à 1X de tampon T4 ligase (NEB), 0,5µl de T4 PNK (NEB) et de l'eau q.s.p 10µl. Les réactions se font durant 30 minutes à 37°C suivi de 5 minutes à 95°C. La température diminue ensuite jusqu'à 25°C à raison de 5°C par minute. Les oligonucléotides alignés et phosphorylés sont alors dilués au 1/100^{ème}.

La réaction de ligation contient 100 ng de vecteur PX459, 1µl d'oligonucléotides dilués au 1/100^{ème}, 1X de tampon T4 ligase, 0,5µl d'enzyme BbsI, 1µl de T4 ligase et de l'eau q.s.p 20µl. l'incubation et la ligation se déroulent selon le programme : 5 min à 37°C suivi de 5 min à 23°C et en renouvelant ces deux étapes à raison de 20 cycles.

Finalement 2µl de la réaction sont utilisées pour transformer des bactéries compétentes.

E. Transfection des cellules humaines

La réaction de transfection des cellules se fait en puits de plaque 24 puits et en utilisant la lipofection, plus exactement la Lipofectamine® LTX et le PlusTM Reagent. Les cellules sont

transfectées à une confluence de 80%. Un premier mélange est préparé et contient l'OptiMEM et la lipofectamine® LTX. En parallèle un second mélange contenant l'OptiMEM, l'ADN d'intérêt et le Plus™ Reagent est préparé. Chacun de ces mélanges est vortexé puis la solution d'ADN est ajoutée sur la solution de lipofectamine. Ce dernier mélange est alors incubé 5 minutes à température ambiante avant d'être ajouté au milieu de culture cellulaire.

F. Infection des cellules

L'infection des cellules se fait à partir d'une suspension virale de titre connu (nombre de particules virales dans la suspension) sur une population cellulaire à 50-80% de confluence. La culture cellulaire, quel que soit son volume, est infectée avec une quantité adéquate de suspension virale. 24 à 48 heures après l'infection, l'antibiotique permettant la sélection des cellules ayant intégré la séquence souhaitée via le virus, est ajouté au milieu de culture.

G. Extraction des protéines

1. Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales est faite par un tampon RIPA (25mM TrisHCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) dans lequel 1X d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases est ajouté (Halt™ protease and phosphatase inhibitor cocktail 100X – ThermoFisher Scientific # 78442).

Le milieu de culture des cellules adhérentes est enlevé délicatement puis les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid en prenant bien soin de l'éliminer au maximum. Le tampon RIPA froid est ajouté sur les cellules. La boîte est gardée sur la glace pendant 5 minutes. Des mouvements circulaires permettent une répartition uniforme du tampon sur les cellules. A l'aide d'un grattoir, les cellules sont rassemblées sur le bord de la boîte de culture, le lysat cellulaire est alors collecté et transféré dans un tube d'1.5ml. Les échantillons sont centrifugés à 14000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant, qui contient les protéines des compartiments cytoplasmiques et nucléaires des cellules, est collecté dans un nouveau tube et stocké à -80°C.

2. Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires

Les cellules humaines qui auront été cultivées comme décrit ci-dessus sont trypsinées pour être décollées de leur support (pour les cellules adhérentes) et centrifugées à 1000 rpm 5 minutes.

Le culot cellulaire est lavé 2 fois avec du PBS froid. A partir de cette étape, toutes les suivantes sont réalisées dans la glace.

Le volume du culot de cellules récupéré est estimé afin de déterminer les volumes des solutions à ajouter. Ce culot sera alors repris dans 2 volumes de solution S100 + NP40 0.05% (1.5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 20 mM TrisHCl pH 7.9, 3 mM DTT, 0.5 mM PMSF et 0.05% NP40) et centrifugé 15 minutes à 5000 rpm à 4 °C. Le surnageant contient les protéines cytoplasmiques. Il est récupéré et sera stocké à -80°C. Le culot de noyaux est alors lavé avec 2 volumes de solution S100 (sans NP40) et centrifugée 15 minutes à 5000 rpm. Le surnageant est éliminé et les noyaux sont repris dans 1 volume de tampon B hypotonique (20% glycérol, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 20 mM TrisHCl pH 7.9, 3 mM DTT et 0.5 mM PMSF) auquel on ajoute 1/3 du volume total de solution C hypertonic (20% glycérol, 1.5 mM MgCl₂, 1.2 M KCl, 20 mM TrisHCl pH 7.9, 3 mM DTT et 0.5 mM PMSF). Le tout est homogénéisé sur roue à 4°C pendant 30 minutes avant d'être centrifugé à 13000 rpm à 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant sera récupéré, il contient les protéines nucléaires et sera stocké à -80°C.

H. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode colorimétrique de Bradford en utilisant le « Biorad Protein assay » (Biorad #5000001). La concentration des protéines est déterminée par mesure de l'absorbance à 595 nm, en utilisant une gamme établie avec de la BSA (albumine de sérum bovin) à une concentration connue.

I. Western Blot

1. *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide*

Une quantité définie de protéines à analyser est mélangée à un tampon de charge dénaturant Laemmli 1X final (Laemmli buffer 5X : 10% SDS, 50% glycérol, 25% β-Mercaptoéthanol, 300mM TrisHCl pH 6.8, 0.04% bleu de bromophénol) et chauffée 5 minutes à 95°C. Le tout est chargé sur un gel de d'acrylamide composé de deux parties. Un gel de concentration (4% acrylamide/bisacrylamide (29/1 – 40%), 0.125 M TrisHCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.1% TEMED) et d'un gel de résolution (X% acrylamide/bisacrylamide (29/1 – 40%), 0.375 mM TrisHCl pH8.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.1% TEMED) qui permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Le pourcentage en acrylamide dépend de la taille de la

protéine à mettre en évidence. La migration des protéines se fait à 100 volts dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris, 200 mM glycine, 0.1% SDS, pH8.3) pendant 3 heures.

2. Transfert des protéines sur membrane

Après leur migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Ce transfert se fait en conditions immergées (Biorad Trans-Blot cell) dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 200 mM glycine, pH 8.3) contenant 20% de méthanol en cas de transfert des petites protéines (taille < 100 kDa) à 30 volts sur la nuit à 4°C. Le transfert est contrôlé par une coloration au rouge ponceau (0.1% de rouge ponceau dans 5% d'acide acétique).

3. Immunodétection de la protéine d'intérêt

La membrane est lavée avec du TBS-T (10 mM TrisHCl pH 8, 150 mM NaCl et 0.05% Tween20) jusqu'à élimination de la coloration au rouge ponceau. Les sites aspécifiques sont ensuite bloqués avec une solution de TBS-T contenant 5% de lait écrémé (ou de BSA) pendant 30 min à température ambiante. La membrane saturée est alors hybridée avec l'anticorps ciblant la protéine d'intérêt, appelé anticorps primaire, pendant la nuit à 4°C. Cet anticorps est dilué en fonction de son efficacité (de 500 fois à 1000 fois, cf tableau 1) dans une solution de TBS-T 5% de lait (ou de BSA). Le lendemain, la membrane est lavée deux fois 7 minutes avec la solution de TBS-T puis hybridée avec l'anticorps secondaire (dilué 10000 fois dans une solution de TBS-T 5% lait) couplé à la peroxydase, pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est lavée 3 fois 5 minutes avec du TBS-T puis 1 fois avec du PBS puis séchée. La détection du signal sur la membrane se fait alors par traitement ECL (Biorad Clarity™ Western ECL Substrate # 1705061) de 10 minutes à température ambiante suivi d'une exposition sur film Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare).

J. Extraction des ARN totaux

1. L'extraction des ARN

Les cellules humaines qui auront été cultivées comme décrit ci-dessus sont trypsinées pour être décollées de leur support (pour les cellules adhérentes) et centrifugées à 1000 rpm 5 minutes. Le culot cellulaire est lavé 2 fois avec du PBS froid. A partir de cette étape, toutes les suivantes sont réalisées dans la glace.

Dans un tube de 1.5ml, le culot de cellules est repris dans 1 ml de TRIzol (TRIzol® Reagent Invitrogen), 25 µl de glycogène (20mg/ml) et 200µl de chloroforme. L'ensemble est mélangé vigoureusement 15 secondes et incubé 15 minutes dans la glace avant d'être centrifugé 10 minutes à 10000 g à 4°C. La phase aqueuse est récupérée et mélangée à 1 volume de TRIzol et 1/10^{ème} du volume total de chloroforme. Après avoir mélangé 15 secondes et incubé 10 minutes dans la glace, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 10000g à 4°C. La phase aqueuse est à nouveau récupérée et mélangée avec 1 volume de chloroforme. Le mélange est incubé 5 minutes dans la glace et centrifugé 5 minutes à 10000g à 4°C. La phase aqueuse est récupérée et mélangée à 1 volume d'isopropanol. Ce mélange est incubé 10 minutes à température ambiante puis à -20°C pendant 1 nuit. Les échantillons sont centrifugés à 13000g à 4°C pendant 30 minutes puis rincés à l'éthanol 70%. Après une dernière centrifugation de 5 minutes à 7500g, le culot est séché et resuspendu dans 52µl d'eau stérile et traité à la DNase (kit TURBO DNaseTM – Ambion® RNA by Life TechnologieTM). Pour cela, 6µl de tampon DNase 10X et 2 µl de DNase sont ajoutés aux extraits. L'enzyme va agir pendant 25 minutes à 37°C avant d'être inactivée en ajoutant 6.6µl d'agent d'inactivation qui agit 2 minutes à température ambiante. Enfin une centrifugation de 5 minutes à 10000g à 4°C permet de récupérer le surnageant qui contient les ARN totaux. Ils sont conservés à -80°C.

2. Contrôle qualité des ARN

Les ARN extraits sont dosés au spectrophotomètre (DeNovix®) afin de déterminer leur concentration puis leur qualité est vérifiée sur une puce Agilent® suivant les recommandations du fabricant. Cette méthode permet de connaître le RIN (RNA Integrity Number – entre 0 et 10) des ARN extraits. Les ARN ayant un RIN entre 8 et 10 peuvent être utilisés pour une RT-qPCR. Pour le séquençage des ARN, seuls les ARN ayant une qualité proche ou égale à 10 peuvent être utilisés.

K. RT-qPCR

1. Retro-transcription des ARN (RT)

Les ADN complémentaires (ADNc) sont synthétisés à partir de 2µg d'ARN de qualité suffisante (RIN > 8). Pour cela, ils sont mélangés avec 10µl de Random Primer (15ng/µl) et de l'eau qsp 20µl. Les ARN sont alors incubés 5 minutes à 65°C puis 5 minutes à 4°C. 8µl de tampon 5X maxima (Thermo Scientific), 2µl de dNTP (10mM), 1µl de RiboLok (Thermo Scientific), 1µl de RT Maxima (Thermo Scientific) et 8µl d'eau sont ajoutés à la réaction. Cette

réaction va se dérouler selon le programme : 10 minutes à 25°C puis 1 heure à 50°C et enfin 15 minutes à 70°C. Les ADNc sont stockés à 20ng/μl à -20°C.

2. PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative se fait en utilisant un couple d'amorces qui va amplifier spécifiquement la séquence du transcrit à étudier. Cette amplification aura une taille comprise entre 70 et 100 pb. Pour la réaction de RT, 4ng d'ADNc sont mélangés à 5μl de mix Takyon™ – No Rox SYBR® MasterMix blue dTTP (Eurogentec) et à 3μl du couple d'amorce (1600 nM) dans un volume final de 10μl. Le programme de la réaction commence par 30 secondes à 105°C puis 3 minutes à 95°C suivi de 40 cycles de 30 secondes à 95°C + 30 secondes à 60°C. Puis une étape durant laquelle la température évolue de 65°C à 95°C à raison de 0,5°C toute les 5 secondes et enfin 1 minute à 22°C. Les résultats sont analysés avec le logiciel Biorad CFX Maestro.

L. Croissance en agar mou (soft agar assay)

Dans une plaque 6 puits, 3.5 ml de bottom agar sont déposés au fond de chacun des puits. Après polymérisation, sont ajoutés sur cette gélose 2 ml qui sont composés d'1 ml de bottom agar et d'1 ml de milieu de culture contenant 50 000 cellules à étudier. Lorsque la gélose est suffisamment reposée, du milieu de culture est ajouté par-dessus afin d'éviter leur assèchement. Après 3 semaines à 37°C, 5% CO₂, les colonies sont comptées après coloration au cristal violet. Composition du bottom agar pour les cellules BJ-5ta : 10.70g de milieu DMEM en poudre (2X)(gibco® by life Technology™) + 2.96g de NaHCO₃ + 200 ml de milieu 199 (Sigma Aldrich M4530) + 300 ml d'eau. Le pH est ajusté jusqu'à 7 avec de l'HCl et l'ensemble de la solution est filtrée par un filtre de 0.2μm. Au moment de couler les géloses, sont ajouté 2 % d'agar (Invitrogen # 3091-023), 10% de SVF, 100 unités/ml de pénicilline et 100μg/ml de streptomycine.

Au moment de la coloration au cristal violet, le milieu de culture liquide est éliminé et remplacé par la solution de cristal violet. Celle-ci est composée de poudre de cristal violet et de PBS et est laissé sur les cellules environs 3 heures. Avant la lecture des plaques, la solution de coloration est éliminée.

Résultats

I. Mise en place du ciblage des gènes par la technique CRISPR-Cas9

A. Création de la lignée BJ-5ta exprimant la Cas9

Les cellules BJ-5ta sont difficiles à transfecter et plus la taille du plasmide à faire entrer dans les cellules est grand, moins les cellules se transfectent facilement. Pour pallier à ces difficultés et faciliter l'établissement du modèle cellulaire, la séquence codante de la protéine Cas9, sous contrôle d'un promoteur inducible à la doxycycline, est directement intégrée dans le génome des cellules suite à une infection lentivirale. Le plasmide utilisé pour la production de ces virus est présenté ci-dessous (figure 27).

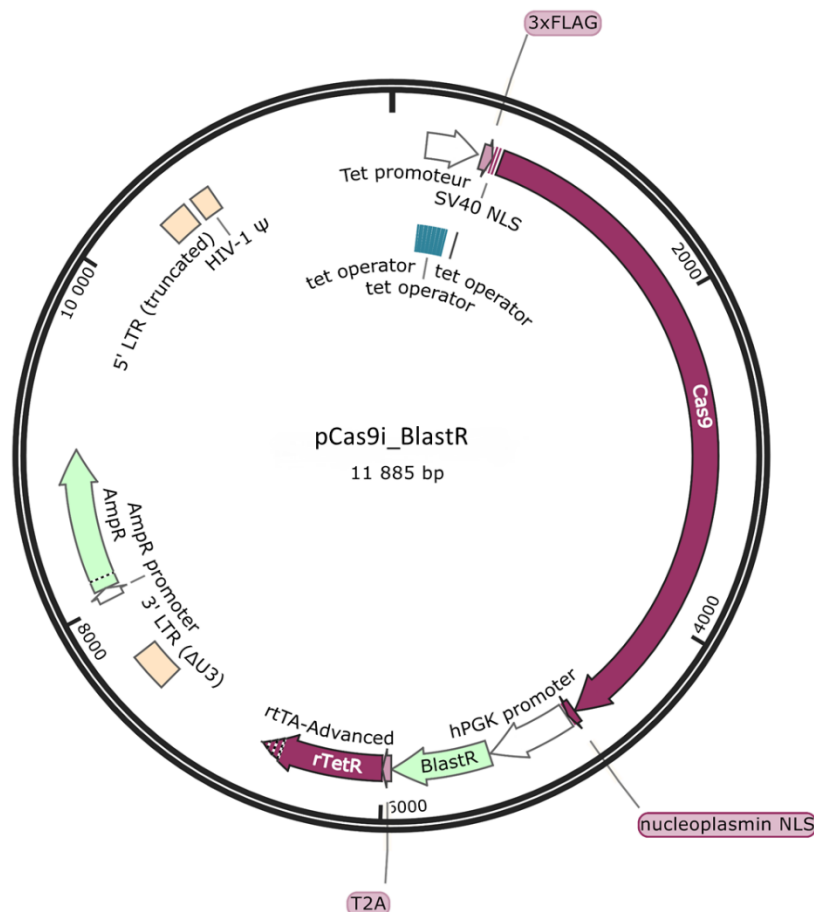


Figure 27 : Carte du plasmide pCas9i_BlastR

Ce plasmide porte la séquence codante de la Cas9 sous contrôle du promoteur inducible Tet (inductible en présence de doxycycline). Une séquence 3xFLAG en amont de la séquence de la Cas9 permet la production d'une protéine taguée. Ce plasmide porte également le gène de résistance à la Blastidicine (BlastR).

Les cellules ont été infectées à une MOI de 0,5 et celles qui ont intégré le virus sont sélectionnées par ajout de blasticidine à 10 μ g/ml au milieu de culture.

Après expansion, les protéines totales ont été extraites d'une partie de ces cellules, traitées ou non à la doxycycline. La protéine Cas9 étant taguée par un 3xFLAG, un anticorps anti-FLAG a permis de révéler sa présence sur western blot (figure 28). En absence d'induction, une faible expression de Cas9 est observée et cette expression est augmentée par la doxycycline ajoutée au milieu de culture. Plusieurs doses de doxycycline ont été utilisées afin d'induire l'expression de la Cas9 : 1 μ g /ml, 2 μ g/ml ou 5 μ g/ml.

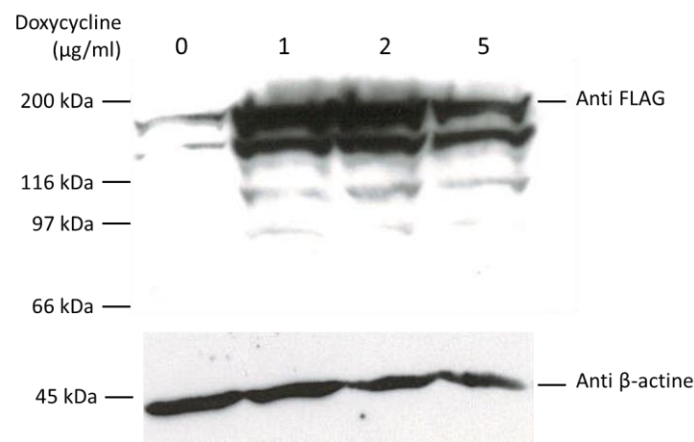


Figure 28 : Western Blot ayant permis la détection de la protéine Cas9 dans les cellules BJ-5ta infectées par le *pCas9i_BlastR* et avec ou sans induction à la doxycycline
Les extraits déposés sont des extraits totaux issus de cellules résistantes à la blasticidine non traitées à la doxycycline (0 μ g/ml) ou bien avec 1, 2 ou 5 μ g/ml de doxycycline.

Ces cellules qui expriment la protéine Cas9 sont nommées BJ_Cas9i_BlastR. Elles sont résistantes à l'hygromycine via l'intégration d'*hTERT* et à la blasticidine via l'intégration de *Cas9*.

Ainsi, lors de la construction du modèle et de l'utilisation du système CRISPR-Cas9, seuls les ARN guides seront à transférer dans les cellules.

B. Validation de l'efficacité du système CRISPR-Cas9

Bien que les cellules expriment la Cas9, il est nécessaire de vérifier que cette protéine est fonctionnelle dans le cadre du système CRISPR-Cas9. Pour cela, une partie des cellules BJ_Cas9i_BlastR est infectée par un lentivirus qui va intégrer la séquence codante de la GFP. La MOI utilisée pour l'infection est de 0,3 et les cellules seront sélectionnées sur plusieurs

semaines par le G418. Une observation au microscope à fluorescence permet de constater la bonne expression de la GFP dans les cellules BJ_Cas9i_BlastR_GFP.

Ces cellules fluorescentes vont alors subir une nouvelle infection permettant l'intégration d'un ARN guide dirigé contre la GFP : BJ_Cas9i_BlastR_GFP_SgARN-GFP. La MOI utilisée pour l'infection est de 4 et les cellules ne peuvent cette fois pas être triées. Ces cellules sont également induites à la doxycycline afin d'activer l'expression de la Cas9 et ainsi avoir l'ensemble des éléments du système CRISPR-Cas exprimés dans les cellules.

Après dix jours en culture, la population de cellules est passée au cytomètre en flux afin de déterminer s'il y a effectivement extinction de la GFP et en quelle proportion (figure 29).

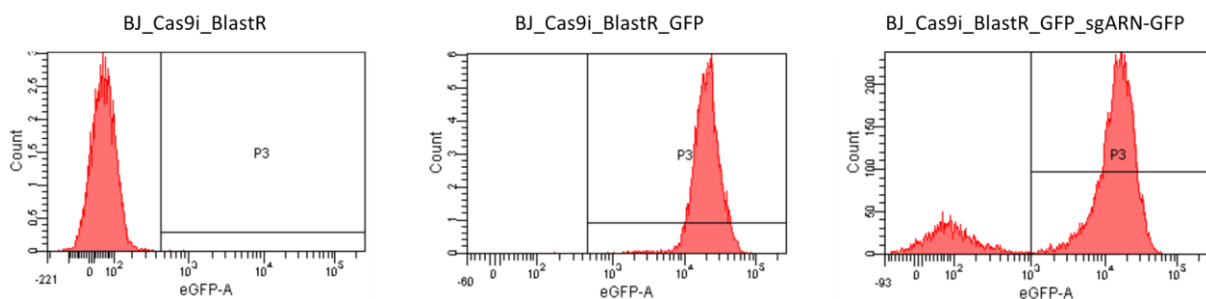


Figure 29 : Analyse par cytométrie en flux de la proportion de cellules fluorescentes GFP parmi une population dont le gène codant pour la GFP est ciblé par le système CRISPR-Cas9

Les cellules BJ_Cas9i_BlastR sont le contrôle négatif de fluorescence puisqu'elles ne possèdent pas le gène codant la GFP. Les cellules BJ_Cas9i_BlastR_GFP sont le contrôle positif de fluorescence puisqu'elles expriment un gène codant la GFP. Dans la population de cellules BJ_Cas9i_BlastR_GFP_sgARN-GFP, certaines cellules expriment l'ensemble du système CRISPR-Cas9 ciblant le gène de la GFP.

Le passage des cellules au cytomètre montre effectivement une perte de fluorescence pour les cellules exprimant l'ARN guide dirigé contre le gène de la GFP. Il y a donc eu disruption de ce gène par le système CRISPR-Cas9. Ces résultats montrent que le système CRISPR-Cas9 est bien fonctionnel dans ces cellules et capable d'induire une cassure double-brin. Ce système peut donc être utilisé ultérieurement pour réaliser des disruptions de gènes.

II. Absence de *BCR-ABL1*

L'objectif d'une partie de ma thèse est de faire exprimer l'oncoprotéine de fusion BCR-ABL1 aux cellules fibroblastiques BJ_Cas9i_BlastR. Il est donc important de vérifier au préalable l'absence de cet oncogène *BCR-ABL1* dans le génome des cellules. Mais aussi de vérifier le

nombre de copies des gènes *BCR* et *ABL1* ainsi que le nombre de chromosomes total dans les noyaux de ces cellules BJ_Cas9i_BlastR.

Pour vérifier simultanément tous ces points de contrôle, c'est la technique de « Fluorescence in situ hybridization » (FISH) qui a été abordée. Cette méthode a permis de marquer par une fluorescence verte le gène *BCR* sur le chromosome 22 et par une fluorescence rouge le gène *ABL1* sur le chromosome 9.

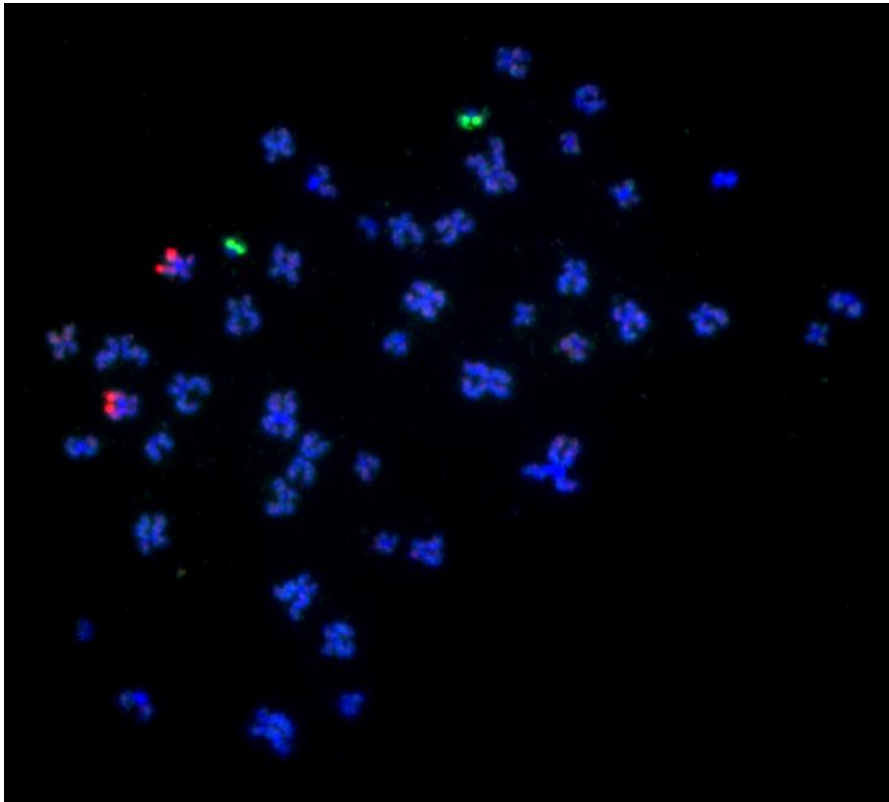


Figure 30 : FISH réalisée sur les cellules BJ_Cas9i_BlastR afin de révéler la présence des gènes *BCR* et *ABL1*
Le gène *BCR* est mis en évidence par des sondes émettant une fluorescence verte et le gène *ABL1* par des sondes émettant une fluorescence rouge. La présence de l'oncogène de fusion *BCR-ABL1* conduirait à la colocalisation des sondes ciblant *BCR* et *ABL1* et à l'émission d'une fluorescence jaune.

La FISH réalisée sur les noyaux des cellules BJ_Cas9i_BlastR a révélé la présence de deux copies des gènes *BCR* et *ABL1* situées respectivement chacune sur un chromosome 22 et 9 (chromosomes métaphasiques)(figure 30). Cette expérience n'a pas mis en évidence la présence de l'oncogène de fusion *BCR-ABL1* (qui ressortirai par une fluorescence jaune). Et finalement le nombre de chromosomes dans les noyaux des cellules BJ_Cas9i_BlastR est de 46, soit 23 paires de chromosomes c'est-à-dire le nombre attendu pour ces cellules humaines.

L'absence du gène de fusion *BCR-ABL1* nous permet d'utiliser ces cellules pour la construction du modèle cellulaire de la LMC.

Chapitre 1

Modélisation de la Leucémie Myéloïde Chronique

I. Intégration de la séquence codante de l'oncogène *BCR-ABL1*

Les cellules BJ_Cas9i_BlastR (résumées par « clone » dans les figures du manuscrit) ont été infectées avec le virus permettant l'intégration la séquence codante de *BCR-ABL1*. Le plasmide p252_BcrAbl1, qui a permis la production de ces virus, a été validé par séquençage afin de vérifier l'absence de mutation dans la séquence d'intérêt et est présenté schématiquement ci-dessous (figure 31).

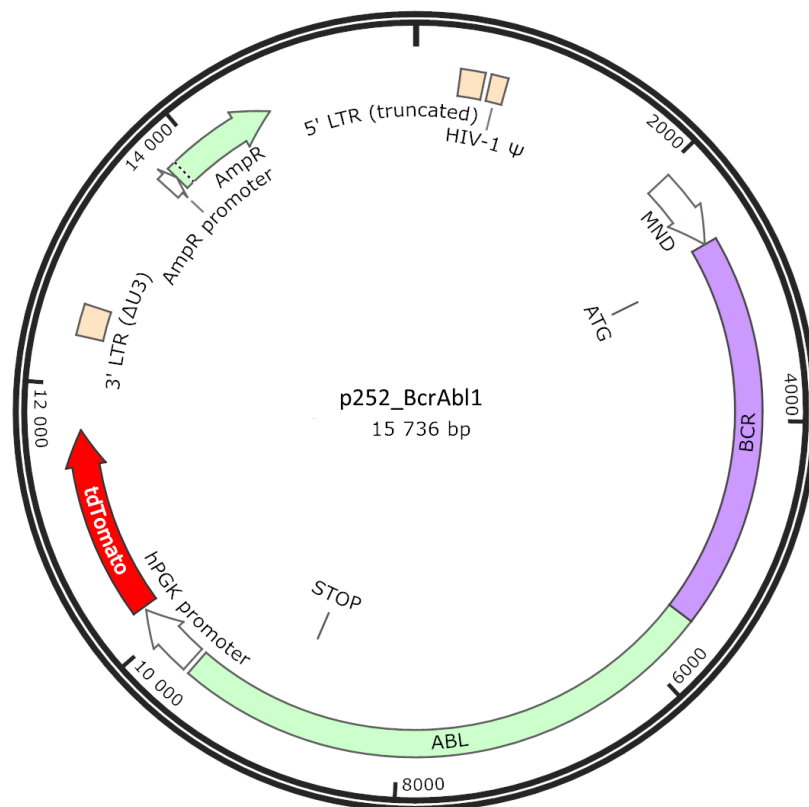


Figure 31 : Carte du plasmide p252_BcrAbl1

L'oncogène de fusion BCR-ABL1 est sous contrôle du promoteur MND. Les exons d'initiation (ATG) et de fin (STOP) de la traduction sont indiqués. La sélection des cellules est possible par le gène de fluorescence tdTomato.

Compte tenu de la taille du virus et de la taille de l'insert, les cellules ont été infectées à une MOI importante afin d'accroître le nombre de cellules qui l'auront intégré, soit une MOI de 10. Pour avoir suffisamment de recul sur la construction du modèle, l'infection a été réalisée trois

fois sur trois populations de cellules BJ_Cas9i_BlastR. Les cellules ayant intégré l'oncogène ont été sélectionnées au cytomètre en fonction de leur capacité à émettre de la fluorescence Tomato. Lors de ce tri, les cellules fluorescentes ont directement été clonées en plaque 96 puits et mises en culture à 37°C durant trois à quatre semaines afin d'obtenir une population clonale qui puisse être expansée pour analyse.

A. Amplification du transcrit BCR-ABL1

La première analyse qui a été menée consistait à valider l'intégration de la séquence codante de *BCR-ABL1* dans le génome des cellules. Pour valider ceci, mais aussi la capacité de cet oncogène à être transcrit, cette analyse a été menée sur les ARN messagers. Après extraction des ARNs totaux par Trizol, comme décrit dans le matériel et méthode, suivie d'une rétrotranscription en ADN complémentaire par des oligo-dT, des amplifications des séquences d'intérêt par PCR ont été réalisées. Ces amplifications ont été réalisées avec une amorce sens dans la séquence de *BCR* et la seconde amorce antisens dans la séquence d'*ABL1* afin d'amplifier des fragments correspondant à BCR majeur, à ABL majeur et à BCR-ABL1 complet (figure 32).

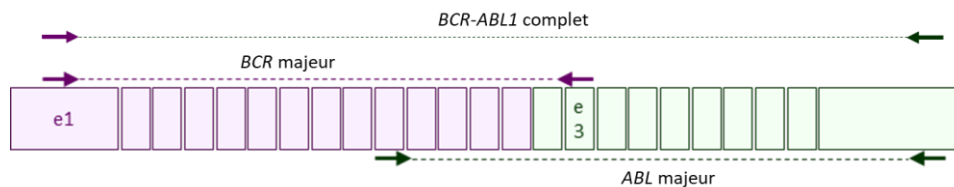


Figure 32 : Représentation schématique de la position des amorces de PCR permettant de vérifier la présence du transcrit *BCR-ABL1* dans les cellules infectées

Les amorces sens sont situées dans *BCR* (violet) et les amorces antisens dans *ABL1* (vert). Trois amplifications sont réalisées afin d'amplifier un fragment contenant surtout la séquence correspondant à *BCR* (BCR majeur), la séquence d'*ABL1* (ABL majeur) ou le transcrit *BCR-ABL1* au complet (BCR-ABL1 complet)

Ceci permet d'amplifier seulement les séquences d'intérêt et non les *BCR* et *ABL1* endogènes. Pour chacune de ses PCR, la lignée K562 a été utilisée comme lignée de référence puisqu'elle exprime l'oncogène *BCR-ABL1* de façon constitutive. Le plasmide p252_BcrAb11 qui apporte la séquence codante de *BCR-ABL1*, et qui a permis la production des virus est également utilisé comme contrôle positif de la réaction de PCR.

Les PCR correspondant aux amplifications BCR majeur, ABL majeur et BCR-ABL1 complet ont été réalisées sur trois clones fluorescents lors du passage en cytométrie en flux et chacun issu

d'une infection différente (pour rappel, trois infections par le virus p252_BcrAb11 ont été réalisées).

Les résultats sont présentés dans la figure 33.

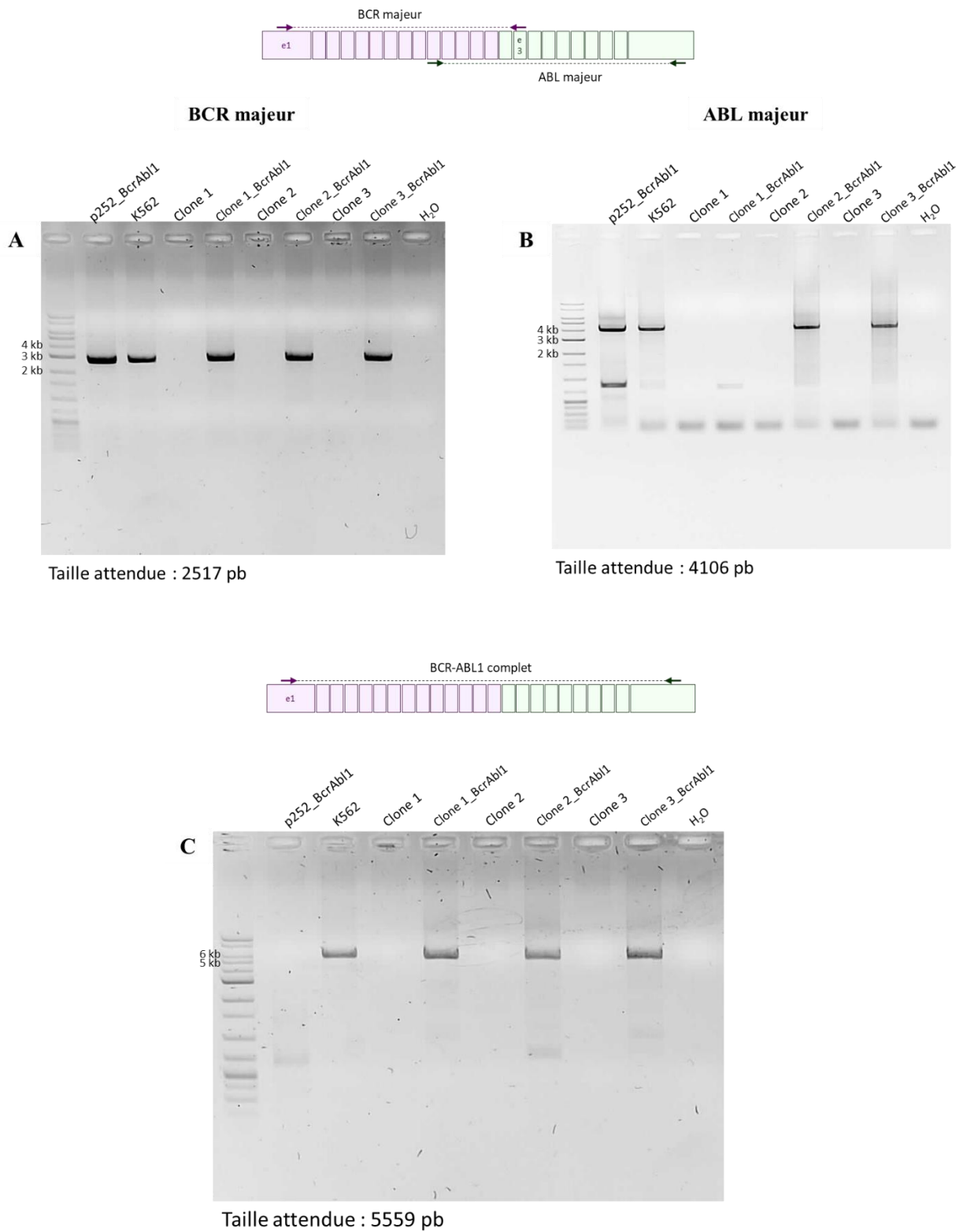


Figure 33 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des PCR réalisées sur les ADNc des cellules BJ_Cas9i_BlastR fluorescentes suite à l'infection par le virus p252_BcrAb11

Les puits « p252_BcrAbl1 » et « K562 » correspondent aux contrôles positifs de la réaction de PCR. Le puits « H₂O » correspond au contrôle négatif de la réaction de PCR et permet de vérifier l'absence de contamination lors de la réaction. Les puits « Clone n° » correspondent aux cellules non infectées par le virus p252_BcrAbl1. Et les puits « Clone n°_BcrAbl1 » correspondent aux cellules infectées par le virus p252_BcrAbl1 et qui sont fluorescente.

A. Amplification du fragment correspondant à BCR majeur. B. Amplification du fragment correspondant à *ABL1* majeur.
C. Amplification du transcrit *BCR-ABL1* complet

Concernant l'amplification correspondant au fragment BCR majeur, une amplification de la taille attendue est constatée pour les contrôles positifs : K562 et p252_BcrAbl1. Une amplification de taille identique est obtenue dans chacun de clones testés et pour lesquels une expression de *BCR-ABL1* est effectivement attendue. En revanche il n'y a pas d'amplification obtenue pour les clones correspondants aux contrôles non infectés par le virus ni pour l'amplification sans matrice (H₂O).

Les résultats de l'amplification du fragment ABL majeur sont similaires. Seule l'amplification attendue pour le clone1_BcrAbl1 est manquante. Cependant cette amplification avait été obtenue lors de précédentes réactions de PCR consistant à tester ce clone seul. Malgré plusieurs tentatives pour obtenir une figure complète, il manquait soit l'amplification pour le contrôle p252_BcrAbl1, soit pour ce clone. Puis la réaction suivante apporte finalement la réponse à ce défaut d'amplification.

En effet, la réaction de PCR devant mettre en évidence une amplification complète du transcrit *BCR-ABL1* montre effectivement que chacun des trois clones devant exprimer l'oncogène permettent une réaction PCR positive. La taille de cet amplifia correspond d'ailleurs à celui obtenu pour le transcrit *BCR-ABL1* dans les cellules K562. Cette fois, c'est les contrôle p252_BcrAbl1 qui n'a pas permis d'amplification. La réaction PCR a été reproduite sur le vecteur linéarisé, avec en contrôle positif les ADNc issus des cellules K562, et la réaction s'est révélée positive. Une fois de plus les contrôles négatifs pour la présence de *BCR-ABL1* ne montrent pas d'amplification.

Les réactions de PCR ont été purifiées et envoyé au séquençage pour valider qu'il s'agit effectivement du transcrit attendu. Ce qui fut le cas et sans détection de mutation.

Les trois clones ici présentés ont donc intégré la séquence codante du gène *BCR-ABL1* et peuvent transcrire cet oncogène dans sa totalité. Ce sont maintenant des cellules appelées BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1 (résumées par clone_BcrAbl1 dans les figures du manuscrit). Il fallait ensuite valider la présence de la protéine.

B. Détection de la protéine par western blot

Pour déterminer si l'ARNm est traduit en protéine BCR-ABL1 dans les cellules BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1, ce sont des extraits totaux obtenus par RIPA qui ont été déposés sur des gels de polyacrylamide.

Deux anticorps sont ensuite utilisés pour révéler la présence de la protéine d'intérêt : un anticorps dirigé contre la protéine ABL1 et un anticorps dirigé contre la protéine BCR. Ceci doit permettre de mettre en évidence les protéines endogènes BCR et ABL1 ainsi que la protéine de fusion BCR-ABL1.

Une fois de plus ce sont des extraits protéiques issus des cellules K562 qui sont utilisés comme contrôle positif de la présence de l'oncoprotéine.

La figure 34 montre les résultats obtenus lors de la sélection par western blot (anticorps anti-ABL1) des clones ayant un transcrite complet de *BCR-ABL1*.

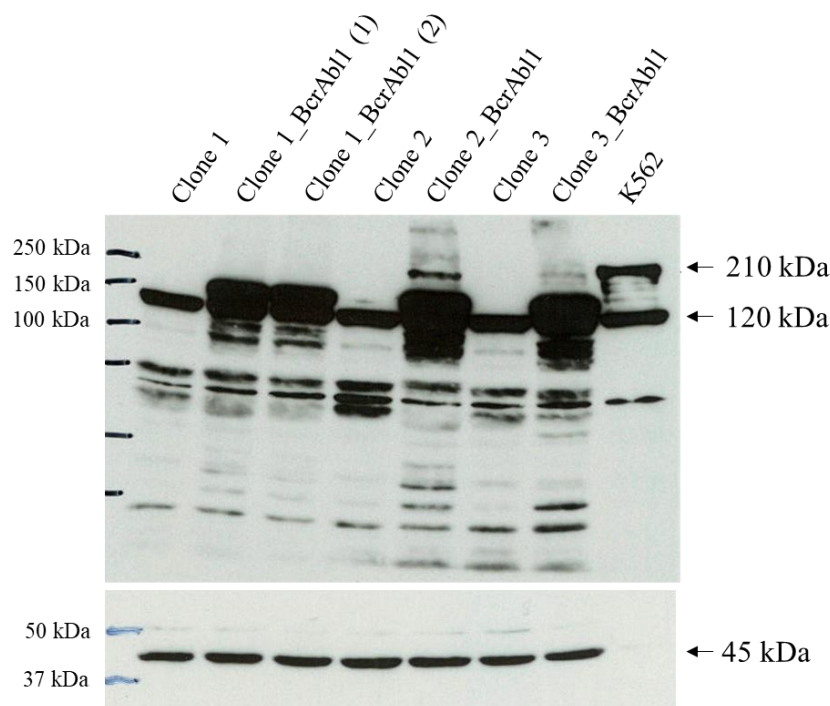


Figure 34 : Western Blot pour la sélection des cellules ayant une traduction en protéine du transcrite *BCR-ABL1*

Le puits « K562 » sert de contrôle positif pour la détection de la protéine de fusion BCR-ABL1. Les puits « clone n° » correspondent aux cellules non infectées par le virus p252_BcrAbl1. Les puits « clone n°_BcrAbl1 » correspondent aux cellules infectées par le virus p252_BcrAbl1 et ayant un transcrite complet de *BCR-ABL1* détectée par RT-PCR. La protéine ABL1 fait 120 kDa, la protéine de fusion BCR-ABL1 a une taille de 210 kDa et la β -actine qui sert de contrôle de charge du gel a une taille de 45 kDa.

Plusieurs observations sont faites. La détection d'une protéine de 120 kDa, correspondant à la protéine ABL1 est mise en évidence dans tous les extraits déposés sur le western blot. Pour le

contrôle positif ensuite, la présence d'une bande à la taille attendue (210 kDa) et correspondant à BCR-ABL1 est visible. Dans les cellules n'exprimant pas BCR-ABL1, cette bande n'est pas visible. En revanche, dans les cellules infectées qui expriment le transcrit *BCR-ABL1* complet, une bande de la taille attendue mais de très faible intensité est visible dans certains clones : clones 2 et 3_BcrAbl1. Surtout, une seconde bande est visible uniquement dans les cellules exprimant le transcrit *BCR-ABL1* mais ne correspond pas à la taille attendue. Par rapport au contrôle positif K562, la taille de cette protéine mise en évidence par le western blot est réduite. Afin de vérifier si la présence de cette bande détectée est liée à l'intégration de la séquence codante de *BCR-ABL1*, de nouveaux western blots ont été réalisés en utilisant les anticorps dirigés contre les protéines BCR et ABL1. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 35.

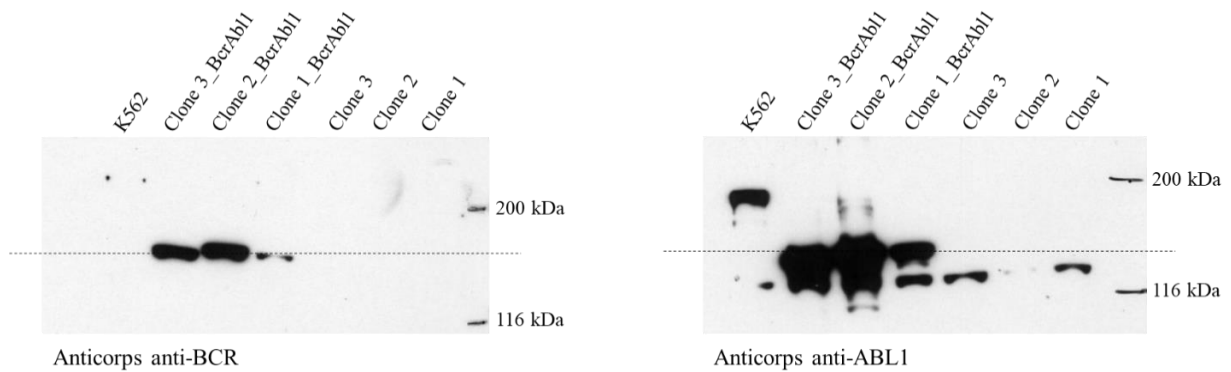


Figure 35 : Western blot contre les protéines BCR et ABL1 afin de valider le fait que la bande observée est liée à l'expression de l'oncogène BCR-ABL1

La bande en question est révélée uniquement dans les cellules ayant intégré la séquence codante de la protéine BCR-ABL1 et est de forte intensité. De plus elle est révélée par les anticorps dirigés contre BCR et contre ABL1. La présence de cette protéine est donc effectivement liée à l'expression de la séquence codante de *BCR-ABL1* intégrée par voie lentivirale. Sa taille est effectivement inférieure à celle de 210 kDa attendue pour la protéine de fusion BCR-ABL1 (révélée dans l'extrait issu des cellules K562). La forme totale de la protéine qui était visible pour les clones 2 et 3_BcrAbl1 est ici très faible.

Il est maintenant important de déterminer si la protéine produite, tronquée ou pas, est fonctionnelle et si son expression est suffisante pour induire un phénotype tumoral à ces lignées cellulaires.

C. Vérification du statut tumoral des cellules

L'objectif étant de construire un modèle de transformation tumoral contrôlé, il est nécessaire de vérifier à chacune des étapes de la transformation si les cellules ont acquis ou non un phénotype tumoral. A ce moment de la construction du modèle, il s'agit de vérifier si l'expression de *BCR-ABL1* est suffisante pour induire ce phénotype tumoral. Pour cela, les cellules sont mises en culture dans un milieu semi-solide, comme décrit dans le matériels et méthodes. Seules les cellules ayant un phénotype tumoral auront la capacité à croître dans ce milieu semi solide (aussi appelé agar mou) et formeront alors des colonies.

Un contrôle positif correspondant à une lignée cellulaire transformée par des éléments génétiques définis et ayant un phénotype tumoral, disponible au laboratoire est utilisée comme contrôle positif de l'expérience. Puis les clones exprimant ou non BCR-ABL1 sont testés (figure 36).

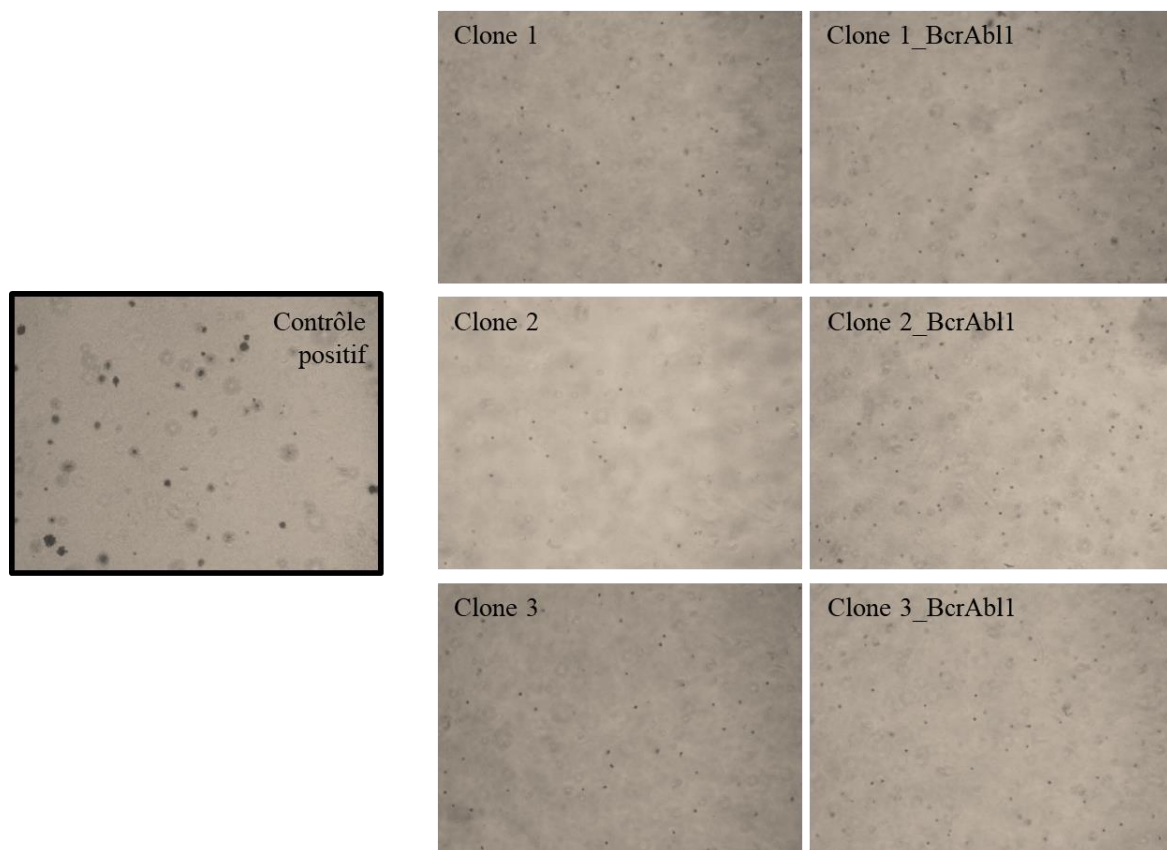


Figure 36 : Photos des cellules cultivées en agar mou (x4)
Dans chacune des conditions, 50 000 cellules ont été placées en culture durant trois semaines à 37°C.

Comme attendu, les cellules de la lignée contrôle positif montre une capacité à se diviser sans ancrage et forme des colonies en agar mou. Les clones 1, 2 et 3 n'exprimant pas *BCR-ABL1*

(BJ_Cas9i_BlastR) n'ont pas cette capacité de division sans ancrage propre aux cellules tumorales. Ce qui correspond au résultat attendu pour ces cellules. Et les cellules BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1 (clones 1, 2 et 3_BcrAbl1) ne montrent pas non plus de phénotype de transformation totale puisqu'aucune colonie n'est visible dans l'agar.

L'utilisation de trois lignées indépendantes (clones 1, 2 et 3 exprimant ou non *BCR-ABL1*) constitue un triplicat biologique nécessaire à la validation du modèle. Et pour chacune de ces lignées, un triplicat technique a également été appliqué afin de valider les résultats de l'expérience de culture en agar mou.

Pour ces cellules fibroblastiques, l'expression de l'oncogène de fusion *BCR-ABL1* n'est pas suffisant pour induire une transformation complète des cellules.

D. Vérification de la fonctionnalité de la protéine BCR-ABL1

Afin de vérifier la fonctionnalité de la protéine, deux cibles de BCR-ABL1 ont été suivies par western blot. C'est plus particulièrement l'état de phosphorylation de ces deux protéines qui était à identifier. Les deux cibles suivies étaient donc CRKL/p-CRKL et STAT5/p-STAT5. Des anticorps différents permettaient de reconnaître soit la forme normale de la protéine, soit sa forme phosphorylée (p-) (figure 37).

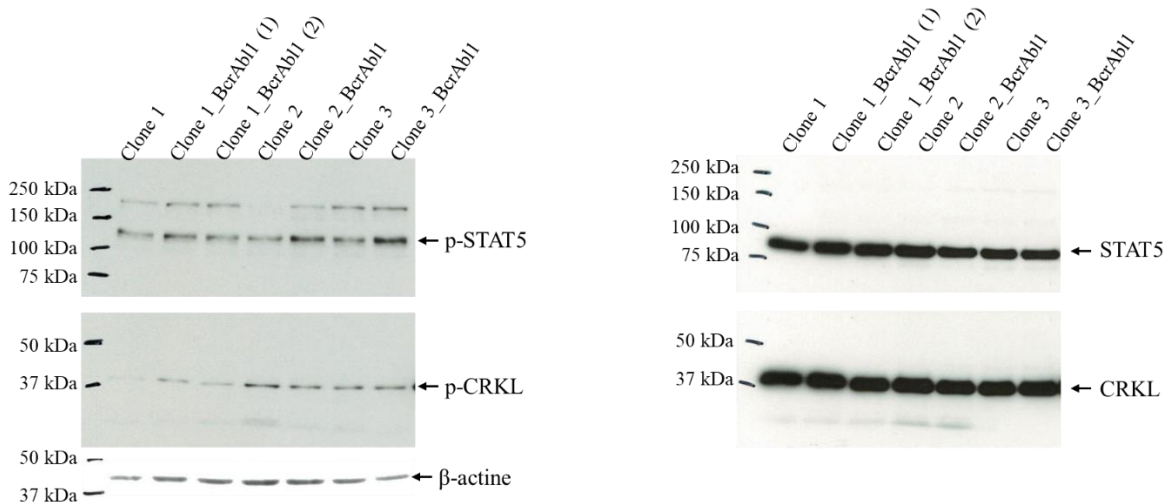


Figure 37 : Western blot révélant les protéines CRKL et STAT5 sous leur état non phosphorylé ou phosphorylé

Après avoir réalisé ce western blot, aucune conclusion ne pouvait être tirée de cette manipulation. Concernant les formes non phosphorylées de ces deux protéines, STAT5 et CRKL, une quantité équivalente de chacune d'entre-elles était mise en évidence par le western

blot. Et concernant p-STAT5 et p-CRKL, là encore, une quantité équivalente de ces protéines phosphorylées a été détectée par western blot. Pour p-STAT5 cependant, il semble que les détections obtenues soient plus intenses dans les clones exprimant *BCR-ABL1* par rapport à leurs lignées de référence. Cependant cette variation d'intensité des bandes en western blot est faible et nécessite d'être affirmée par quantification.

D'autres expériences utilisant des quantités de protéines plus faibles, pour détecter des éventuelles différences dans la phosphorylation de STAT5 et de CRKL, n'ont pas permis d'obtenir des résultats conclusifs pour autant.

Une nouvelle expérience a été menée pour observer l'état de phosphorylation globale des protéines issues des cellules. L'anticorps utilisé reconnaissant les tyrosines phosphorylées quel que soit la protéine. Là encore, peu ou pas de différence n'était observable entre les cellules exprimant ou non l'oncogène *BCR-ABL1*.

II. Validation de la construction en plusieurs étapes de ce modèle

Afin de valider l'exploitation future de ce modèle, de nouvelles infections ont été réalisées sur les cellules BJ_Cas9i_BlastR et les cellules BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1 afin de leur permettre l'expression des gènes *E6* et/ou *E7* du papillomavirus 16 humain. Cette étape intervient avant de produire les lignées cellulaires disruptées pour p53 et Rb par CRISPR-Cas9 et pour constater rapidement la faisabilité du modèle à construire. En effets, les protéine *E6* et *E7* ciblent respectivement l'expression ou l'activité des protéines p53 et Rb ce qui implique leur inactivation.

Suite à ces infections, plusieurs lignées établies ont été comparées. Les caractéristiques suivantes étaient attendues pour ces lignées :

- **BJ_Cas9i_BlastR** : lignée de référence
- **BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1** : lignée preuve que BCR-ABL1 n'est pas suffisant à la transformation des cellules
- **BJ_Cas9i_BlastR_E6E7** : lignée preuve que BCR-ABL1 est nécessaire à la transformation des cellules
- **BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1_E6** : lignée intermédiaire de transformation
- **BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1_E7** : lignée intermédiaire de transformation
- **BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1_E6E7** : lignée transformée

L'expérience qui a principalement menée sur ces différentes lignées consistait à vérifier le comportement des cellules en agar mou. La figure 38 récapitule les résultats obtenus pour chacune des lignées testées et la figure 39 montre les résultats visuels obtenus pour la lignée n°2 (« clone 2 ») mais des résultats similaires ont été obtenus pour les autres clones 1 et 3 (figure 38).

A nouveau, l'utilisation de trois lignées cellulaires indépendantes (Clones 1, 2 et 3 exprimant ou non *BCR-ABL1*) correspond au triplicat biologique. Un triplicat technique a également été appliqué à chacune de ces lignées.

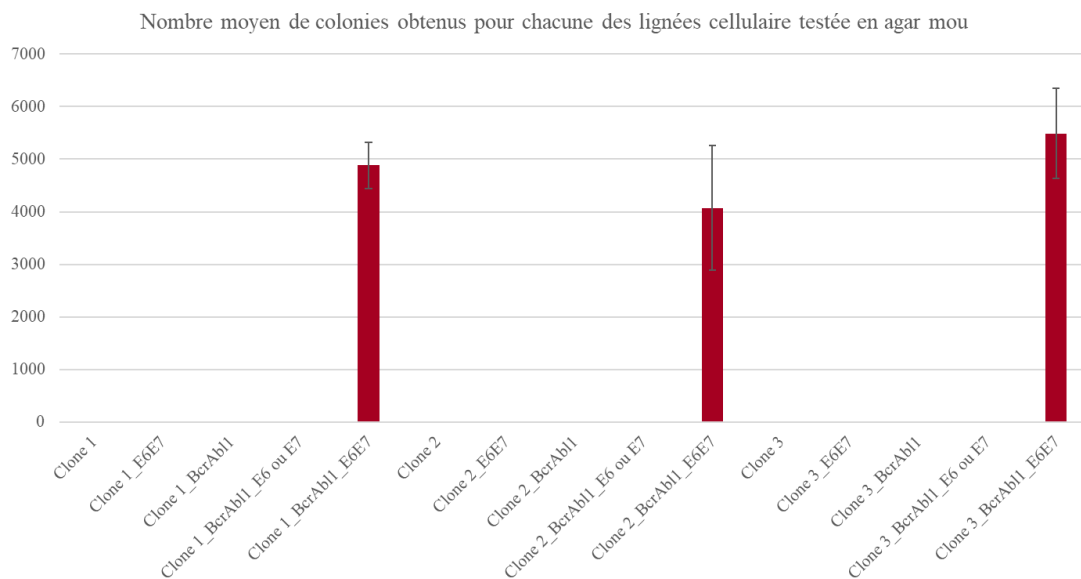


Figure 38 : Nombre moyen de colonies formées pour chacune des lignées dont la croissance a été testée en agar mou
 Dans chacune des conditions, 50 000 cellules ont été placées en culture durant trois semaines à 37°C

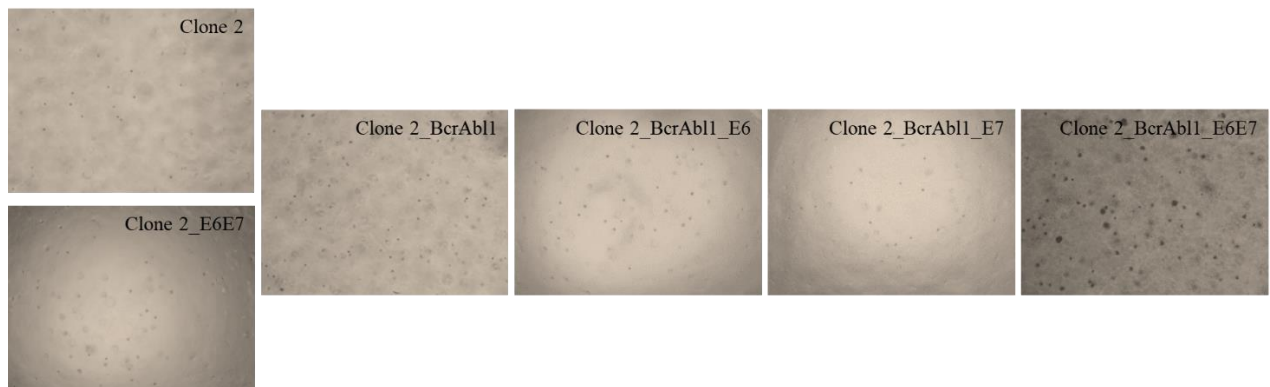


Figure 39 : Photos des cellules issues du clone 2 (BJ_Cas9i_BlastR) cultivées en agar mou (x4)
 Dans chacune des conditions, 50 000 cellules ont été placées en culture durant trois semaines à 37°C.

Les résultats de la croissance des cellules en agar mou montrent une nouvelle fois l'absence de division des cellules BJ_Cas9i_BlastR (clone 2) ou des cellules exprimant seulement BCR-ABL1 (BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1 = clone 2_BcrAbl1). Les cellules exprimant seulement E6 et E7 (BJ_Cas9i_BlastR_E6E7 = clone 2_E6E7) n'ont pas acquis la capacité à se diviser en absence d'ancrage. Tout comme les cellules intermédiaires exprimant à la fois BCR-ABL1 et E6 ou E7 (BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1_E6 ou E7 = clone 2_BcrAbl1_E6 ou E7). En revanche les cellules qui expriment simultanément BCR-ABL1, E6 et E7 (BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1_E6E7 = clone 2_BcrAbl1_E6E7) forment des colonies. Ce qui indique que ces cellules ont la capacité de se diviser sans nécessité d'ancrage à un support. C'est un phénotype caractéristique des cellules transformées/tumorales.

Ces résultats montrent bien la possibilité de créer un modèle de transformation dépendant de BCR-ABL1 et nécessitant plusieurs étapes dans la transformation. Dans la suite du projet c'est la technologie CRISPR-Cas9 qui sera utilisée pour disrupter directement et spécifiquement les gènes *TP53* et *RBI* afin de se placer dans les conditions qui se rapprochent au maximum de la physiologie du cancer. Effectivement les protéines E6 et E7, bien qu'elles inhibent les protéine p53 et Rb, ne sont pas spécifiques de ces cibles. Elles peuvent cibler d'autres voies de signalisation dans la cellule. De plus, cibler le produit du gène peut s'avérer moins efficace que de cibler directement le gène lui-même. Et finalement dans le cas de la LMC, ce sont bien des inactivations des gènes *TP53* et *RBI* qui ont été rapportés et non pas l'expression des protéines E6 et E7.

III. Réalisation du KO p53

Suite à l'intégration de l'oncogène *BCR-ABL1* dans les cellules BJ_Cas9i_BlastR et à la preuve de faisabilité du modèle, c'est la disruption du gène *TP53* qui a été accomplie. Celle-ci doit remplacer l'expression de l'oncogène *E6* afin de contrôler au mieux la transformation tumorale via des manipulations génétiques précises.

Pour réaliser le KO de ce gène, c'est la technologie de CRISPR-Cas9 qui a été appliquée. Plus exactement, deux ARN guides ciblant *TP53*, respectivement au début et à la fin de l'exon 4, ont été apportés aux cellules. Les coupures à ces points du génome peuvent générer une délétion d'un fragment de l'exon 4 situé entre ces deux ARN guides.

Avant leur transfection, les cellules BJ_Cas9i_BlastR et BJ_Cas9i_BlastR_BcrAb11 ont été traitées à la doxycycline afin d'induire la production de la protéine Cas9. Puis un plasmide portant simultanément les deux ARN guides a été apporté par la lipofectamine LTX. Les cellules qui sont KO pour le gène *TP53* ont ensuite été sélectionnées à la nutline-3a.

Pour rappel, la nutline-3a inhibe l'interaction entre les protéines MDM2 et p53, stabilisant ainsi p53 et favorisant l'activation de ses gènes cibles. Un traitement à une dose adéquate de nutline-3a permet alors l'arrêt du cycle cellulaire des cellules ou même leur mort par apoptose. Seules les cellules ayant un défaut du gène *TP53* pourront croître dans des conditions de culture impliquant la nutline-3a (Malina et al. 2013; Guernet et al. 2016).

A. Détection du KO par RT-PCR

La vérification de la délétion a été directement réalisée sur des ADNc par PCR. Si la délétion avait effectivement lieu, il devait y avoir conservation du cadre de lecture : perte de 192 pb soit 64 acides aminés.

Dans la figure 40 suivante seuls les résultats obtenus pour les cellules issues du clone 1 sont présentées. Des résultats similaires ont été obtenus pour les cellules issues des clones 2 et 3.

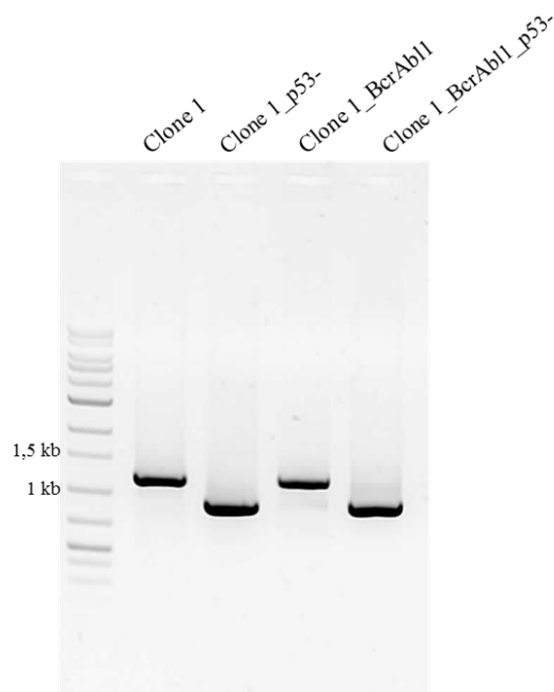


Figure 40 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des PCR réalisées sur les ADNc issus des cellules dont le statut du gène *TP53* est à déterminer

Le puits « clone1 » correspond à la lignée de référence (BJ_Cas9i_BlastR) qui n'exprime ni l'oncogène *BCR-ALI* et n'a pas été transfectée avec les ARN guides ciblant *TP53*. Le puits « clone 1_p53- » est la lignée de référence dont le gène *TP53* a été

ciblé par le système CRISPR-Cas9. Le puits « clone 1_BcrAbl1 » n'a pas été ciblé sur *TP53* par le système CRISPR-Cas9. Le puits « clone 1_BcrAbl1_p53- » exprime BCR-ABL1 et a son gène *TP53* qui a été ciblé par le système CRISPR-Cas9.

L'amplification par PCR du fragment d'ADNc de *TP53*, de part et d'autre du site de coupure, permet de mettre en évidence une délétion d'un fragment de ce gène dans les cellules ayant reçu les deux ARN guides. De plus il n'y a pas d'amplification correspondant à la forme sauvage du gène qui est détecté dans ces cellules, laissant supposer une forme homozygote de la délétion (figure 41B). Il y a donc une forte efficacité de la double coupure et d'élimination du fragment suite à l'utilisation de la technologie CRISPR-Cas9.

Cette amplification étant réalisée sur les ADNc, l'information est double : il y a eu coupure et élimination du fragment situé entre les deux points de coupure. Mais aussi l'ARNm qui est transcrit à partir du gène raccourci n'est pas éliminé. Si le cadre de lecture est effectivement conservé suite à la réparation, alors la protéine tronquée sera visible par western blot. Mais avant cela, les fragment mis en évidence ici ont été purifié pour être séquencés.

B. Validation du KO par séquençage

Les fragments de PCR purifiés ont été séquencés par la méthode de Sanger. Voici les séquences obtenues :

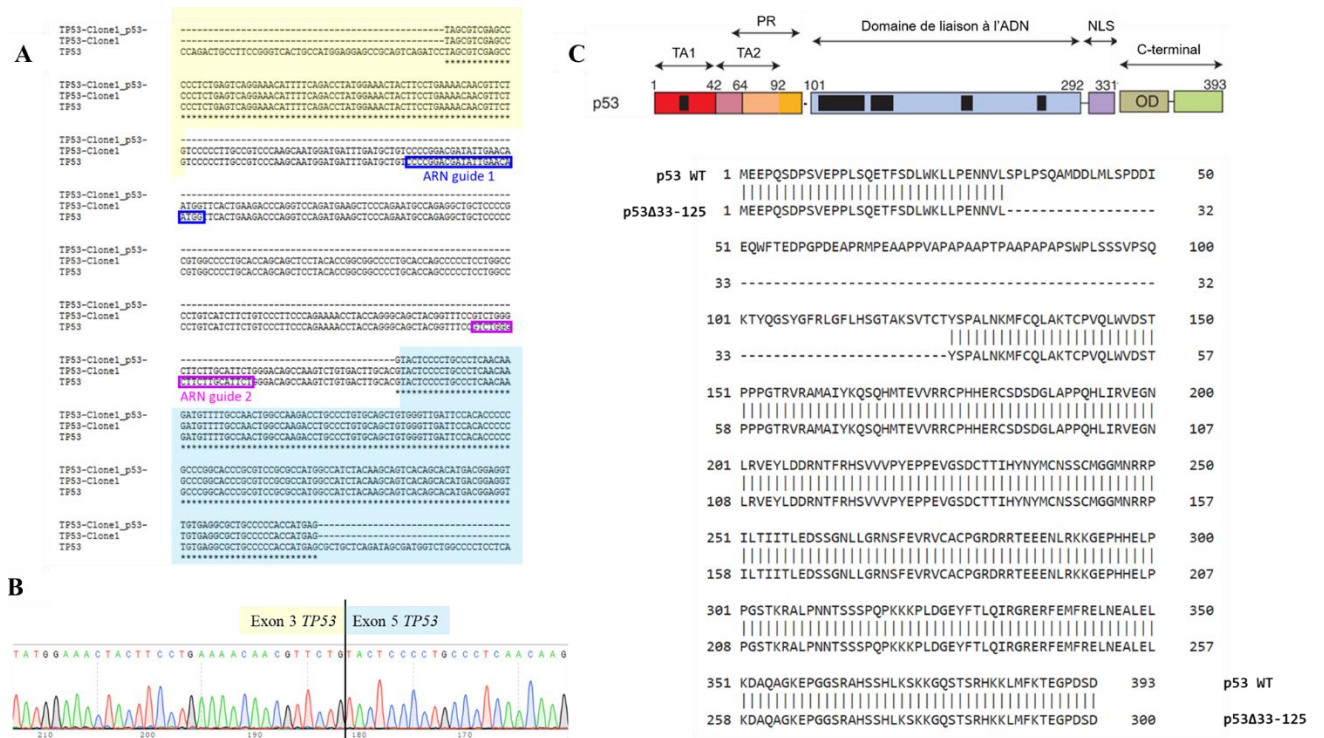


Figure 41 : Résultats du séquençage des ADNc correspondant à *TP53* et amplifiés par PCR

- A. Alignement des séquences correspondant à la forme sauvage de *TP53* de référence disponible dans PubMed (mettre le numéro de la séquence) (*TP53*), à la séquence de *TP53* sauvage dans les cellules utilisées (*TP53*-Clone 1) et à la séquence de *TP53* dans les cellules ciblées par le système CRISPR-Cas9 (*TP53*-Clone 1_p53-). Les positions des ARN guides utilisés pour la réalisation du KO sont indiqués en bleu (ARN guide 1) et en violet (ARN guide 2).
- B. Chromatogramme correspondant à la séquence *TP53*-Clone1_p53- qui permet de valider une seule et unique séquence dans le produit PCR. Révélant une forme homozygote de la délétion.
- C. Structure de la protéine p53 sauvage suivi de l'alignement des séquences en acides aminés des formes sauvages de p53 (p53 WT : p53 converti depuis la séquence nucléotidique *TP53*-Clone 1) et de la forme délétée de p53 (p53 Δ 33-125 converti depuis la séquence nucléotidique *TP53*-Clone 1_p53-)

Ces résultats sont similaires pour tous les clones ayant une délétion pour *TP53*.

Les données du séquençage de l'ARNm ont montré une délétion supérieure à celle attendue (figure 41A), de 279 nucléotides exactement au lieu des 192 prévus, ainsi que le maintien du cadre de lecture pour la traduction. La séquence convertie en acides aminés indique que la traduction conduit à une forme tronquée de 93 acides-amino (de la position 33 à la position 125) de la protéine p53 (p53 Δ 33-125) (figure 41C). Finalement c'est l'intégralité de l'exon 4 de *TP53* qui a été éliminé suite à l'action du système CRISPR-Cas9 et de la réparation par NHEJ et ceci dans les deux allèles du gène (figure 41B). La figure 41C permet par ailleurs de positionner la délétion sur la protéine. Et ce sont donc les domaines de transactivation (TA) et une partie du domaine de liaison à l'ADN qui sont manquants à la protéine tronquée.

C. Détection de la protéine tronquée par western blot

La délétion d'un fragment du gène *TP53* par la technique CRISPR-Cas9 est validée. Les effets de ce KO sur la protéine p53 ont également été validés par western blot sur des extraits totaux (figure 42).

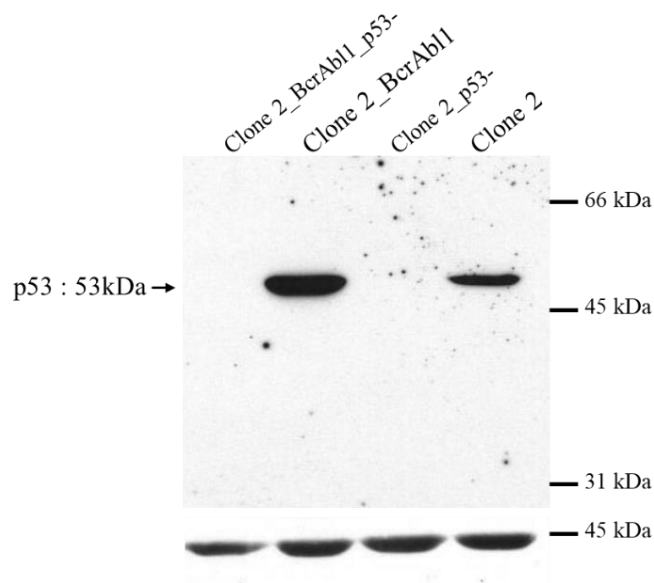


Figure 42 : Mise en évidence par western blot des formes de la protéine p53 dans les différentes lignées cellulaires modifiées. Le puits correspondant aux protéines issues du « Clone 2 » (soit BJ_Cas9i_BlastR) sert de contrôle pour la détection de la forme sauvage de la protéine p53. Le gène *TP53* de cette lignée n'a pas été ciblé par le système CRISPR-Cas9. Le puits « Clone 2_p53- » (soit BJ_Cas9i_BlastR_p53-) correspond aux cellules de référence dans lesquelles le système CRISPR-Cas9 a permis la délétion de l'exon 4 du gène *TP53*. Le gène *TP53* des cellules « Clone 2_BcrAb11 » (soit BJ_Cas9i_BlastR_BcrAb11) n'a pas été ciblé par le système CRISPR-Cas9 et correspond à la forme sauvage. Le gène *TP53* des cellules « Clone2_BcrAb11_p53- » a été ciblé par le système CRISPR-Cas9 afin de déléter l'exon 4. Ce western blot a été réalisé à partir de 40 µg d'extraits totaux et la normalisation est faite par la β -actine.

Ainsi, la révélation du western blot montre effectivement une bande à 53 kDa qui correspond à la protéine p53 dans les extraits issus des cellules qui possèdent la version sauvage du gène (Clone 2 et Clone 2_BcrAb11). A noter que la quantité de protéine p53 est plus importante dans les cellules qui expriment l'oncogène *BCR-ABL1*.

En revanche, dans cette figure 42, aucune protéine p53 n'est détectable dans les extraits correspondant aux cellules pour lesquelles il y a eu délétion de l'exon 4 du gène *TP53*. Cette absence de signal est manipulation dépendante. En effet, lors de la vérification des clones, la forme tronquée de la protéine était visible sur le western blot (figure 43).

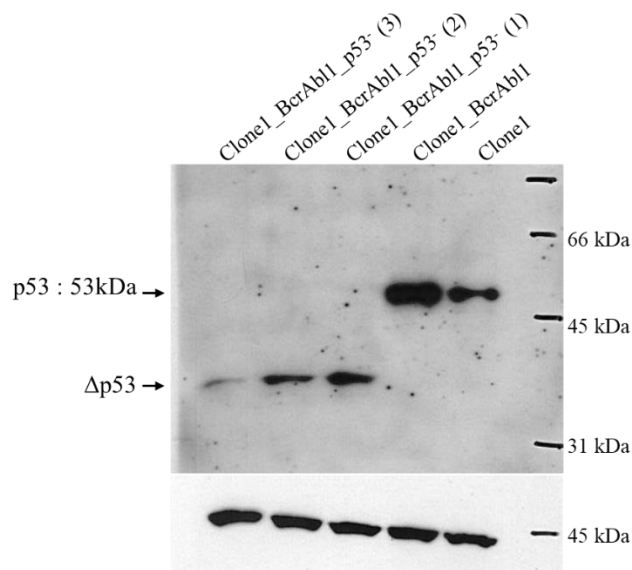


Figure 43 : Mise en évidence par western blot des formes de la protéine p53 dans les différentes lignées cellulaires modifiées. Les lignées « Clone 1 » et « Clone 1_BcrAb11 » possèdent la forme sauvage du gène *TP53* et expriment donc la forme sauvage de la protéine p53. Les lignées « Clone 1_BcrAb11_p53- » possèdent le gène *TP53* délété de l'exon 4 et expriment une forme tronquée de la protéine p53 (Δ p53). Ce western blot a été réalisé à partir de 40 μ g d'extraits totaux et la normalisation est faite par la β -actine.

Dans la figure 43, la forme sauvage de la protéine est détectée dans les extraits totaux issus des cellules ayant la forme sauvage du gène (Clone 1 et Clone 1_BcrAb11). Avec une nouvelle fois l'observation d'une surexpression de p53 dans les cellules exprimant *BCR-ABL1* par rapport aux cellules n'exprimant pas cet oncogène. Puis dans les extraits protéiques totaux issus des cellules ayant une délétion de l'exon 4 de *TP53*, c'est une forme tronquée de la protéine (Δ p53) qui est détectable. Des résultats similaires ont été observés pour chacun des clones 1, 2 ou 3 mais de façon aléatoire concernant la forme tronquée de la protéine. C'est-à-dire que Δ p53, d'un western blot à un autre pouvait être détectée ou absente.

Quoiqu'il en soit la troncature du gène *TP53* code pour une forme tronquée de la protéine p53. Il est nécessaire de vérifier si cette protéine tronquée est fonctionnelle.

D. Validation par RT-qPCR des effets du KO de p53

L'élimination d'un fragment de gène et de protéine p53 a été mis en évidence. Il faut maintenant valider que la protéine n'est plus capable d'assumer son rôle de facteur de transcription. Pour cela les ARN totaux des cellules ont été extraits, rétro-transcrits puis la transcription de certains gènes cibles de p53 ont été analysés par qPCR.

Ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles de p53, *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* a été suivi et comparée entre les lignées exprimant la forme sauvage de p53 et la forme tronquée $\Delta p53$ (figure 44).

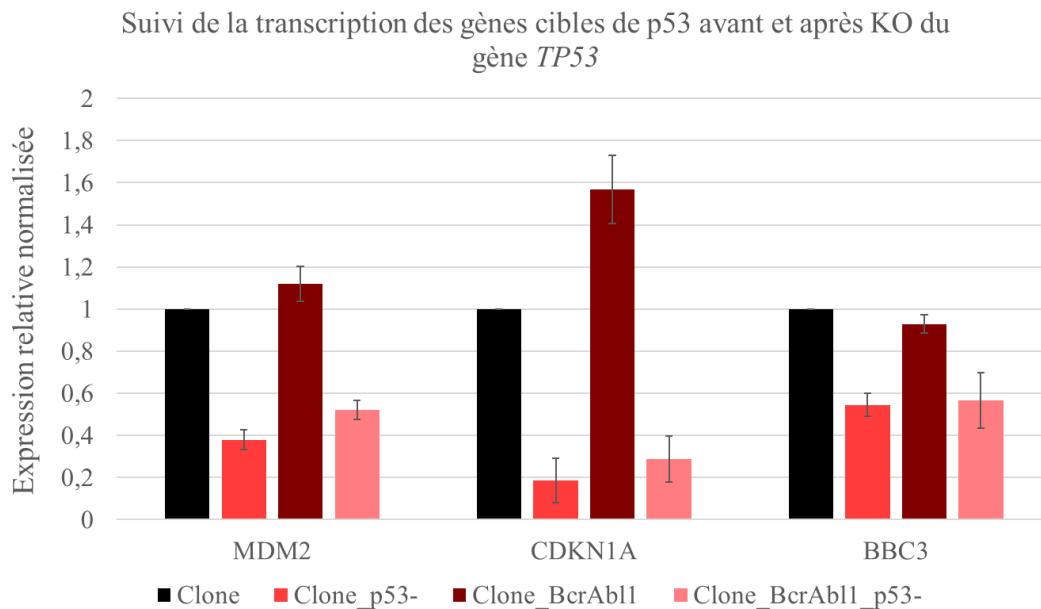


Figure 44 : Suivi par RT-qPCR de la transcription basale des gènes *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* dans les cellules ayant la forme sauvage ou tronquée de *TP53*

Les lignées « Clone » et « Clone_BcrAbl1 » correspondent aux lignées exprimant la forme sauvage du gène *TP53*, avec les lignées « Clone » comme lignée de référence à celles qui en sont issues. Les lignées « Clone_p53- » et « Clone_BcrAbl1_p53- » expriment la forme tronquée du gène *TP53*.

Les résultats présentés correspondent à la moyenne des expressions obtenues des triplicats biologiques (lignées issues des clones 1, 2 et 3) et triplicats techniques.

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée « Clone » et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*.

Les données de RT-qPCR montrent une expression similaire des transcrits *MDM2*, *CDKN1A* et *BBC3* dans le cas de cellules exprimant la forme sauvage du gène *TP53*, bien que la transcription de *CDKN1A* soit augmentée d'environ 1,5 fois dans les lignées exprimant BCR-ABL1. Dans les cellules ayant la délétion de l'exon 4 de *TP53*, la transcription des gènes *HDM2*, *CDKN1A* et *BBC3* est réduite de moitié au minimum.

Ces données de RT-qPCR valident donc la perte de son rôle d'activateur de transcription de la protéine p53 suite à la délétion de l'exon 4 du gène *TP53*. Le gène *TP53* est éteint dans les lignées ayant été ciblées par le système CRISPR-cas9.

E. Déléter *TP53* est-il suffisant pour transformer les cellules ?

Suite à l'extinction du gène *TP53*, les cellules ont une nouvelle fois été cultivées en agar mou afin de vérifier si le KO de ce gène cumulé avec l'expression de *BCR-ABL1* était suffisant pour transformer totalement les cellules (figure 45).

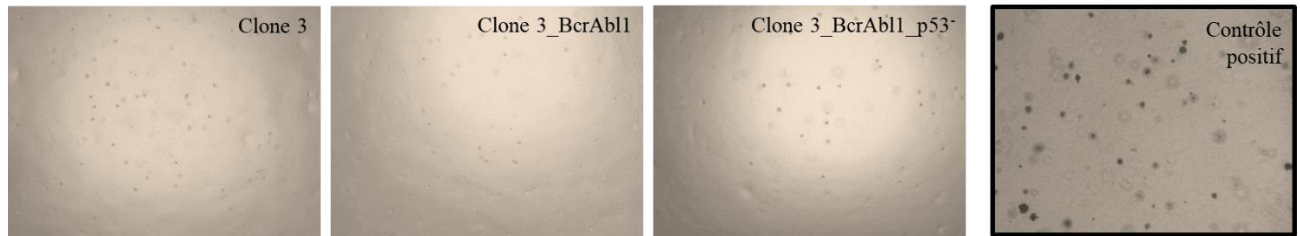


Figure 45 : Photos des cellules issues du clone 3 (BJ_Cas9i_BlastR) cultivées en agar mou (x4)
Dans chacune des conditions, 50 000 cellules ont été placées en culture durant trois semaines à 37°C.

La culture des cellules en agar mou n'a pas permis la formation de colonies et ce quel que soit les cellules mises en culture : BJ_Cas9i_BlastR (ici Clone 3), BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1 (ici Clone 3_BcrAbl1) ou encore BJ_Cas9i_BlastR_BcrAbl1_p53- (ici Clone 3_BcrAbl1_p53-).

Les cellules BJ_Cas9i_BlastR_p53- (Clone 3_p53-) ont également été testées comme contrôle et ne formaient pas de colonies elles non plus. Ce résultat n'est pas présenté.

Les cellules n'ayant pas de phénotype tumoral, leur transformation n'est pas complète. La délétion d'un nouveau gène a alors été envisagé afin d'obtenir des cellules totalement transformées : la disruption du gène *RBI*.

Cependant, afin de surveiller le comportement des cellules en culture, de nouvelles expériences de croissance en agar mou ont été réalisées le temps d'obtenir les lignées KO pour le gène *RBI* par la technologie CRISPR-Cas9. Or ces expériences ont montré progressivement la formation de colonies et à tous les stades de transformation des lignées cellulaires.

Et finalement après quelques semaines de culture supplémentaires, environs 10 semaines, toutes les lignées formaient des colonies en agar mou.

Il n'était ainsi plus possible de suivre la transformation des cellules en accord avec les différentes étapes de la construction du modèle. En effets, même les cellules simplement BJ_Cas9i_BlastR avaient acquis la capacité à se diviser sans nécessité d'un ancrage, ce qui correspond au phénotype tumoral.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la dérive de ces cellules et seront abordées dans la partie discussion du manuscrit.

Quoiqu'il en soit les différentes lignées cellulaires avaient été congelées à des temps très précoces après validation de chacune d'elles. Elles ont été décongelées pour constater si toutes les cellules, y compris celles qui n'avaient pas été maintenues en culture, avaient acquis ce phénotype tumoral. Ce qui fut effectivement le cas.

Il fallait donc prévoir la construction du modèle en se basant sur une nouvelle lignée cellulaire de départ. Les BJ-5ta étant maintenant considérées comme potentiellement instables au cours du temps.

IV. Clonage d'un nouveau vecteur BCR-ABL1

La construction du modèle devant être repensée, un nouveau vecteur permettant la production des virus pour l'intégration de la séquence codante de *BCR-ABL1* a été réalisé. La carte de ce vecteur est présentée dans la figure 46 ci-dessous.

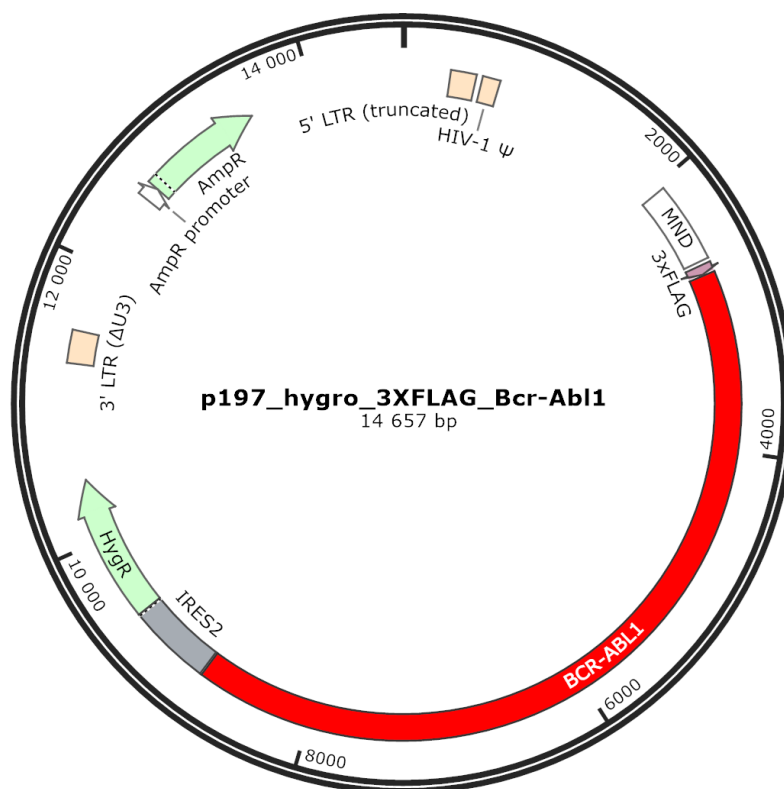


Figure 46 : Carte du plasmide p197_hygro_3xFLAG_BcrAbl1

Les gènes *BCR-ABL1* et de sélection à l'hygromycine sont sous contrôle du promoteur MND. La séquence 3xFLAG en amont de la séquence codante de *BCR-ABL1* permet la production d'une protéine flaguée.

Cette fois la séquence codante de *BCR-ABL1* et le gène de sélection à l'hygromycine seront sous contrôle d'un seul et même promoteur. Le gène de sélection ne correspondra donc plus à

une fluorescence mais à une résistance à un antibiotique. Autre modification, l'ajout d'une séquence 3xFLAG en amont de la séquence codante de *BCR-ABL1*. Ceci permettra la production d'une protéine 3xFLAG et devrait faciliter sa détection par western blot. Ce plasmide est appelé p197_hygro_3xFLAG_BcrAbl1.

Suite au clonage et à la validation de ce vecteur par séquençage, sa capacité à permettre l'expression de *BCR-ABL1* ainsi que du gène de résistance à l'hygromycine a été contrôlé dans des cellules HeLa.

Une transfection transitoire a été réalisée pour ce vecteur (figure 47) puis pour le vecteur p252_BcrAbl1 (figure 48).

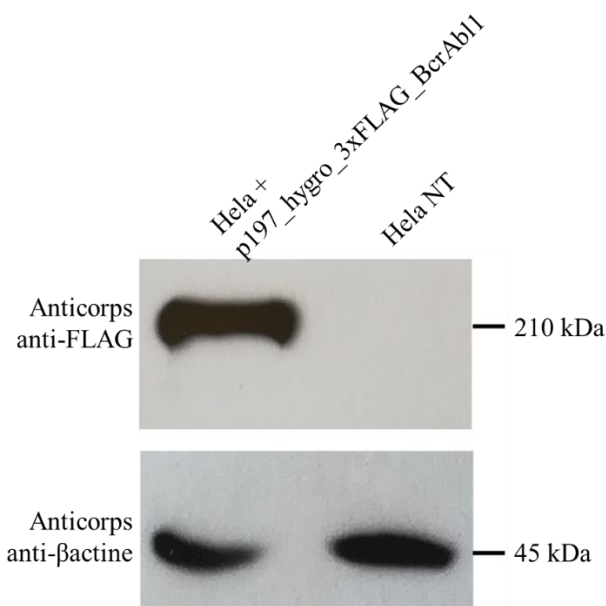


Figure 47 : Détection de la protéine BCR-ABL1 par western blot et par un anticorps dirigé contre le 3xFLAG
Les cellules HeLa non transfectées (Hela NT) servent de contrôle à l'expérience. Dans ces cellules il n'y a pas d'expression du vecteur p197_hygro_3xFLAG_Bcr-Abl1, la protéine BCR-ABL1 ne peut donc pas être détectée contrairement aux cellules dans lesquelles ce vecteur est apporté par transfection transitoire.
La β -actine permet de valider la quantité de protéines utilisée pour cette expérience.

La révélation du western blot suite à l'hybridation d'un anticorps dirigé contre le 3xFLAG permet de mettre en évidence une protéine de la taille attendue dans les cellules qui ont reçu le plasmide p197_hygro_3xFLAG_BcrAbl1, soit 210 kDa environs. Cette bande observée à 210 kDa étant la seule visible sur le gel, il est certain qu'il s'agit de la protéine BCR-ABL1.

Autre constatation liée à la transfection des cellules HeLa avec ce plasmide, c'est que suite à l'ajout de l'hygromycine dans le milieu de culture, des cellules ont survécu à la sélection contrairement aux cellules non transfectées elles aussi traitées avec la même dose d'hygromycine sur la même durée.

Un nouveau western blot a ensuite été réalisé mais en utilisant des anticorps dirigés contre BCR et contre ABL1 (figure 48). Un extraits protéique issu de cellules K562 a été déposé comme contrôle de la présence de la protéine BCR-ABL1. Un extrait des cellules Hela transfectées avec le plasmide p252_BcrAbl1 a également été ajouté. Le p252_BcrAbl1 ayant servi de base pour le clonage de la séquence codante de *BCR-ABL1* dans le p197, il était important de valider que la protéine produite est de taille similaire. De plus ce contrôle permettra d'interpréter les tailles observées pour la protéine BCR-ABL1 dans les cellules BJ-5ta.

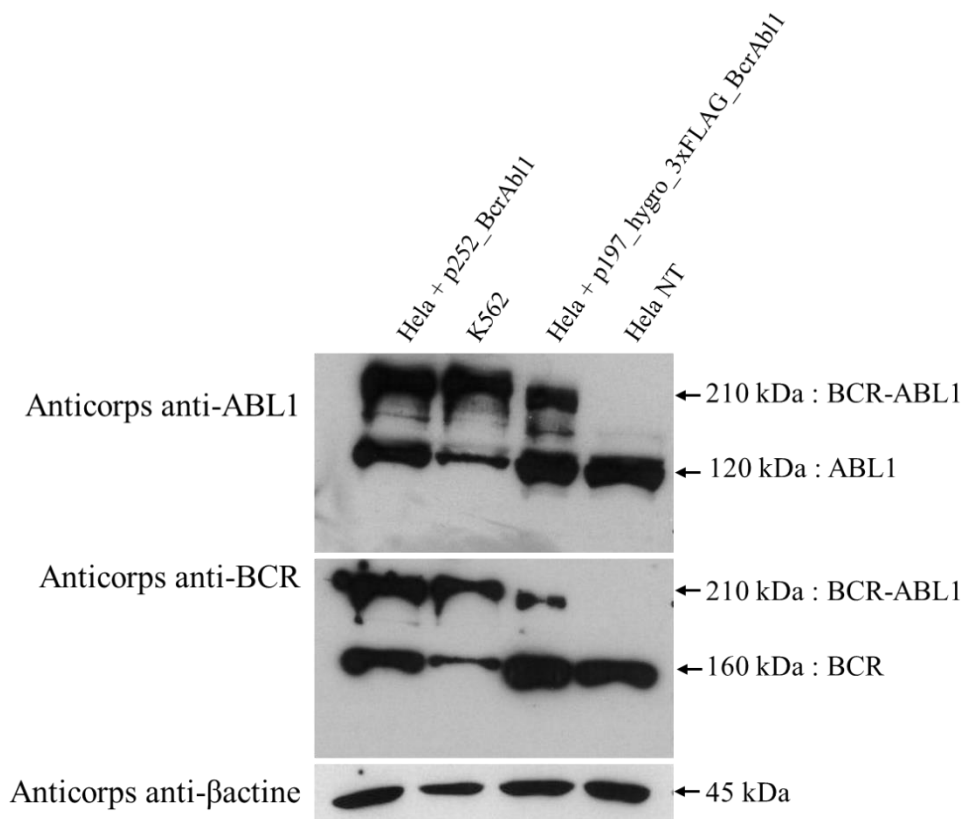


Figure 48 : Détection de la protéine BCR-ABL1 par western blot, par des anticorps dirigés contre BCR et contre ABL1
 L'extrait protéique issu des cellules Hela non transfectées (Hela NT) permet de valider l'absence de l'oncoprotéine BCR-ABL1 dans ces cellules. Les protéines extraites des cellules K562 sont utilisées comme contrôle de la présence de la protéine de fusion BCR-ABL1. Les protéines issues des cellules Hela transfectées avec le plasmide p252_Bcr-Abl1 ou p197_hygro_3xFLAG_Bcr-Abl1 permettent de valider l'expression de BCR-ABL1 à partir de ces plasmides en question. La détection de la β -actine permet de valider la quantité de protéines chargées pour réaliser cette expérience.

La révélation du western blot permet de mettre en évidence la présence d'une protéine correspondant à la taille attendue dans chacun des extraits pour lesquels BCR-ABL1 est souhaité. Dans les cellules Hela transfectées à la fois avec le p252_BcrAbl1 et avec le p197_hygro_3xFLAG_BcrAbl1 une bande correspondant à la protéine totale BCR-ABL1 dans

les extraits de cellules K562 est mise à jour. C'est donc que la protéine est bien produite à partir de ces deux plasmides. Cette protéine est révélée à la fois avec l'anticorps dirigé contre BCR et contre ABL1. De plus, l'absence de détection de cette protéine dans l'extrait protéique issu des cellules non transfectées (Hela NT) valide l'identité de BCR-ABL1.

Cela permet de confirmer l'utilisation de ce plasmide pour la production de lentivirus. Ces virus seront utilisés pour infecter des cellules et intégrer la séquence codante de *BCR-ABL1* dans leur génome. Les cellules en question qui seront utilisées pour la reconstruction du modèle de transformation seront les fibroblastes humains IMR90.

Chapitre 2

KO du gène *TP53* dans des cellules BJ-5ta exprimant la Cas9.

Était déjà disponible au laboratoire une lignée cellulaire clonale totalement KO pour le gène *TP53*. Ces cellules sont des BJ-5ta qui avaient été obtenues par l'utilisation du système CRISPR-Cas9 puis par isolement d'un clone d'intérêt. Ce clone délété pour p53 est nommé *TP53*^{KO} (par opposition aux cellules *TP53*^{WT} d'origine) et montre par séquençage une délétion de 4 nucléotides pour les deux allèles du gène. L'absence de détection de la protéine p53 par western blot a validé le KO. Enfin, des analyses par RT-qPCR ont permis de valider que l'absence de la protéine p53 avait un effet négatif sur la transcription de ses gènes cible au sein de ces cellules (figure 49).

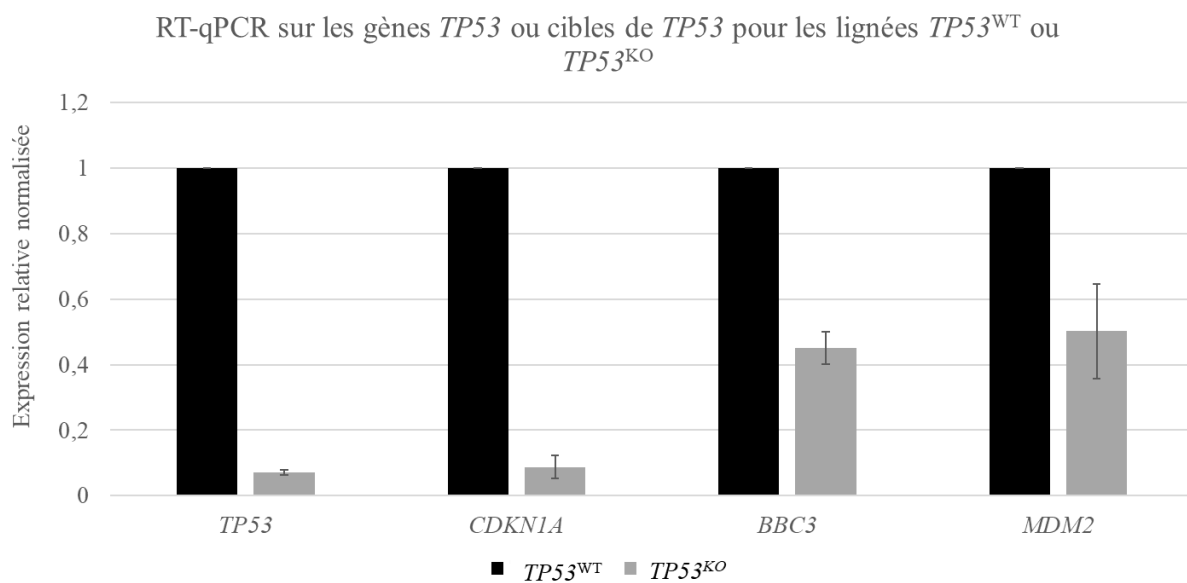


Figure 49 : Suivi par RT-qPCR de la transcription basale des gènes *CDKN1A*, *BBC3*, *MDM2* et *TP53* lui-même dans les cellules ayant la forme WT ou KO de *TP53*

La lignée *TP53*^{WT} est utilisée comme référence pour cette comparaison. L'expression des gènes étudiés est donc considérée comme étant de 1 pour cette lignée.

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée *TP53*^{WT} et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*.

I. Caractérisation des cellules KO p53

L'expression de p53 ainsi que certaines de ses cibles a été analysée pour les cellules ayant un p53 sauvage et pour leurs dérivées p53 KO. Pour ces analyses, les cellules auront subi, ou non,

des traitements à 8µM de nutline-3a sur des temps différents. Le taux des transcrits est analysée par RT-qPCR pour les gènes *TP53*, *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2*. Et l'expression protéique est réalisée sur les produits de ces gènes, soit p53, p21 et MDM2.

A. Analyse de la transcription des gènes cibles de p53 entre la lignée *TP53^{WT}* et *TP53^{KO}*

1. Après un traitement de 24 heures à 8µM de nutline-3a

La transcription des gènes cibles de p53 a été suivi par RT-qPCR sur les gènes *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* dans les lignées *TP53^{WT}* et *TP53^{KO}* sans traitement ou avec un traitement de 24 heures à 8µM de nutline-3a. La transcription du gène *TP53* lui-même a également été suivie.

La figure 50 présente les résultats obtenus pour les gènes cités et permet de comparer la transcription entre la lignée *TP53^{WT}* et la lignée *TP53^{WT}* traitée 24h à 8µM de nutline-3a (*TP53^{WT} nut*).

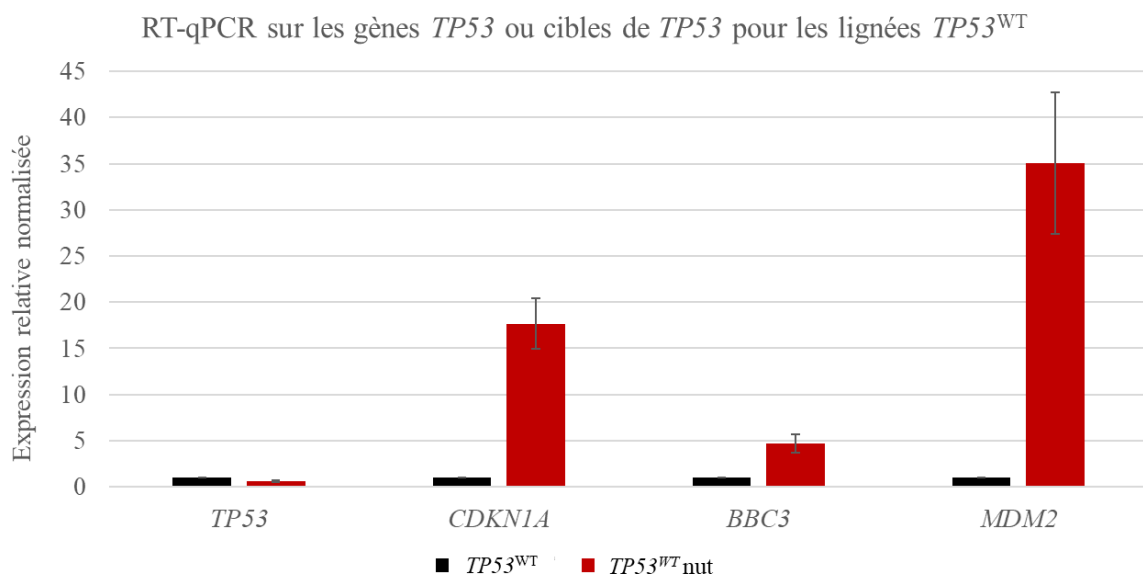


Figure 50 : Suivi par RT-qPCR de la transcription des gènes *TP53*, *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* dans les cellules *TP53^{WT}* traitées ou non à 8µM de nutline-3a pendant 24h

La lignée *TP53^{WT}* est utilisée comme référence pour cette comparaison. L'expression des gènes étudiés est donc considérée comme étant de 1 pour cette lignée.

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée *TP53^{WT}* et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*.

La figure 51 présente les résultats obtenus pour les mêmes gènes et permet de comparer la transcription entre la lignée *TP53^{WT}* et la lignée *TP53^{KO}* ainsi que la lignée *TP53^{KO}* traitée 24h à 8µM de nutline-3a (*TP53^{KO} nut*).

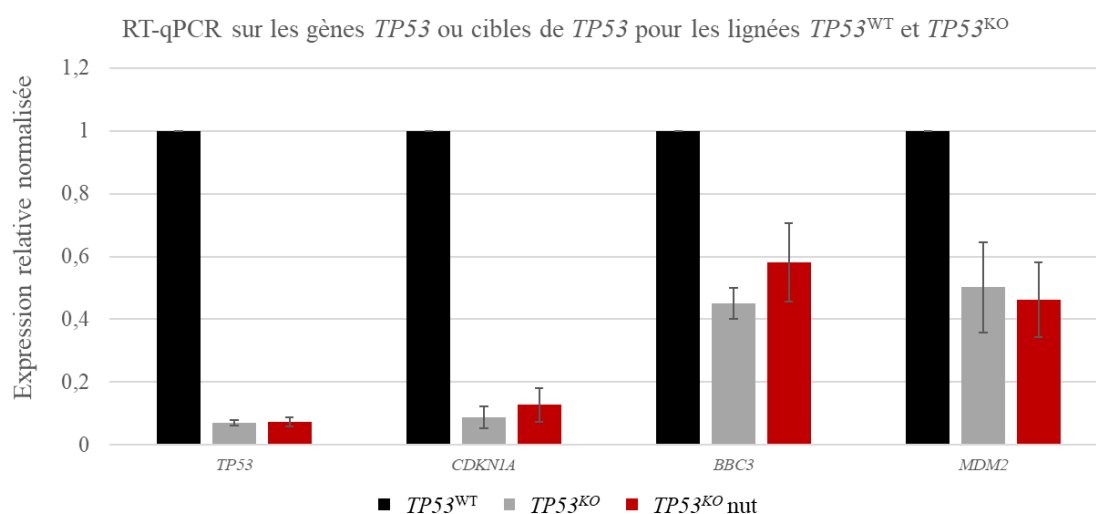


Figure 51 : Suivi par RT-qPCR de la transcription des gènes *TP53*, *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* entre les cellules *TP53^{WT}* et les cellules *TP53^{KO}* traitées ou non à $8\mu\text{M}$ de nutline-3a pendant 24h. La lignée *TP53^{WT}* sert de lignée de référence pour l'analyse de la transcription des gènes dans les lignées *TP53^{KO}* et *TP53^{KO} mut* et a donc une expression considérée comme étant de 1. Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée *TP53^{WT}* et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*.

En comparant les deux figures ci-dessus, il est clair que l'ajout de nutline-3a dans le milieu de culture des cellules exprimant la protéine p53 WT active la transcription des cibles de cette protéine, jusqu'à 35 fois pour le gène *MDM2*. Pour *TP53*, il n'y a pas d'activation de la transcription. L'activation de p53 par la nutline-3a ne se fait pas au niveau transcriptionnel mais protéique.

En revanche, l'ajout de cette même molécule au milieu de culture des cellules p53 KO ne montre aucun effet sur la transcription des gènes cibles de p53 ou sur *TP53* lui-même. Ces résultats de RT-qPCR montrent donc qu'un traitement à la nutline-3a n'a plus d'effet sur l'activation de la transcription des gènes cible de p53. En effet, la protéine p53 n'étant plus active, son activation par la nutline-3a est sans conséquences sur les gènes étudiés.

2. Identification du temps nécessaire pour l'activation de la transcription par p53

De nouvelles expériences de RT-qPCR ont été conduites afin de déterminer le temps nécessaire à p53 pour activer la transcription de ses cibles directes. En ciblant par RT-qPCR spécifiquement *CDKN1A*, *MDM2* et *BBC3* qui sont trois cibles directes connues de p53 et codant respectivement pour p21, impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, *MDM2*, impliquée

dans la régulation de p53 et PUMA, impliquée dans l'apoptose. Les mesures par RT-qPCR ont été menées à des temps différents de traitement à la nutline-3a. Il est ainsi possible de déterminer le temps nécessaire à p53 pour activer la transcription de ses cibles après sa propre activation par la nutline-3a (figure 52).

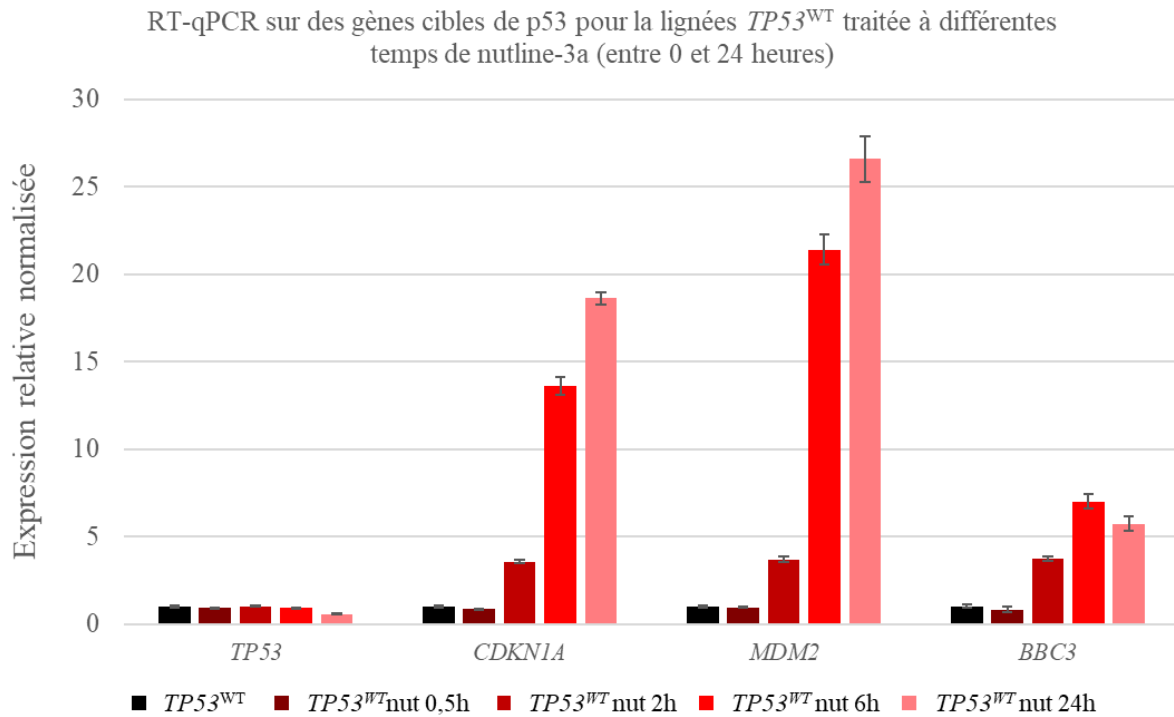


Figure 52 : Suivi par RT-qPCR de la transcription des gènes $TP53$, $CDKN1A$, $BBC3$ et $MDM2$ dans les cellules $TP53^{WT}$ traitées à $8\mu M$ de nutline-3a sur des temps variables (entre 0 et 24 heures). Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée $TP53^{WT}$ et deux gènes de référence $SDHA$ et $RPL29$.

L'activation de la transcription pour les gènes cibles de p53 est visible entre 30 minutes et 2 heures après ajout de la nutline-3a au milieu de culture des cellules.

Une nouvelle RT-qPCR entre ces deux temps est réalisée afin d'affiner les observations (figure 53).

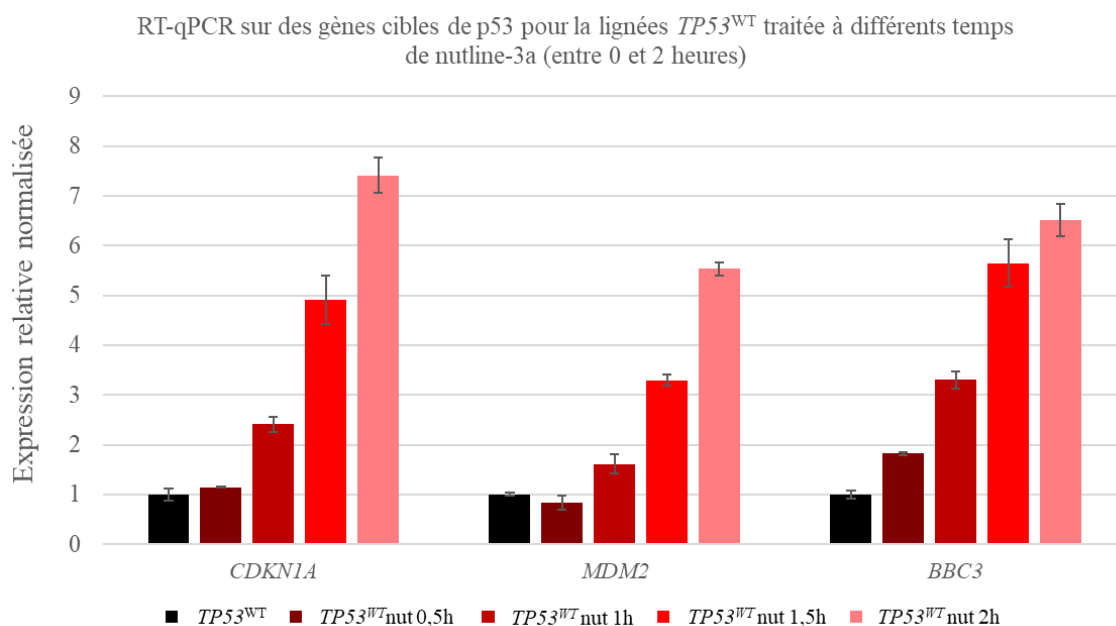


Figure 53 : Suivi par RT-qPCR de la transcription des gènes $TP53$, *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* dans les cellules $TP53^{WT}$ traitées à $8\mu M$ de nutline-3a sur des temps variables (entre 0 et 2 heures)
Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée $TP53^{WT}$ et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*.

Ces résultats montrent qu'une activation de la transcription des gènes cibles de p53 est visible entre 30 minutes (0,5h) et 1 heure 30 (1,5h) de traitement à la nutline-3a selon les cibles. C'est donc cette référence de temps d'1 heure 30 minutes qui sera utilisé pour considérer un gène comme étant une cible directe de p53 ou non.

La même expérimentation a été menée sur des gènes dont la transcription est inhibée suite à l'activation de p53. Dans cette situation, l'hypothèse est que l'inhibition est indirecte et que c'est une voie de signalisation activée par p53 qui va être impliquée dans la baisse de la transcription de ces gènes et non p53 lui-même (Engeland 2017; Fischer 2017). Il faut donc s'attendre à un temps supérieur à 1 heure 30 minutes avant de constater une baisse de la transcription de ces gènes en question. Les gènes ainsi étudiés sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire : *E2F1*, *CCNA*, *CCNB1* et *CCNB2* (figure 54).

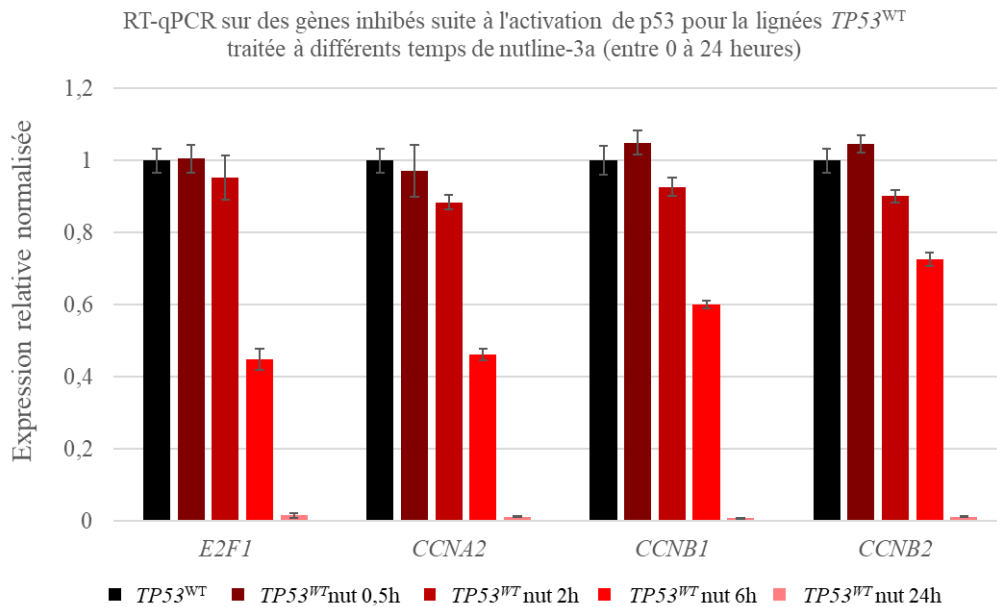


Figure 54 : Suivi par RT-qPCR de la transcription des gènes *E2F1*, *CCNA2*, *CCNB1* et *CCNB2* dans les cellules $TP53^{WT}$ traitées à $8\mu M$ de nutline-3a sur des temps variables (entre 0 et 24 heures)
Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée $TP53^{WT}$ et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*.

Contrairement à l'activation de la transcription étudiée ci-dessus, l'inhibition de la transcription de ces gènes nécessite un temps plus long pour se mettre en place. L'effet inhibiteur est visible environs 6 heures après l'activation de p53 par la nutline-3a.

Avec ces données, un gène sera considéré comme cible directe de p53 si l'activation de sa transcription intervient environs 1 heure 30 après l'activation de cette protéine par la nutline-3a. Et considéré cible indirecte si sa transcription diminue 6 heures ou plus après l'activation de p53 par la nutline-3a.

B. Analyse de l'expression des protéine p53, p21 et MDM2 entre la lignée *TP53^{WT}* et *TP53^{KO}*

Suite aux analyses menées par RT-qPCR, des analyses par western blot ont été réalisées sur les cellules *TP53^{WT}* et *TP53^{KO}* traitées ou non à 8µM de nutline-3a à différents temps, afin de confirmer au niveau protéique les observations obtenues en transcription (figure 55).

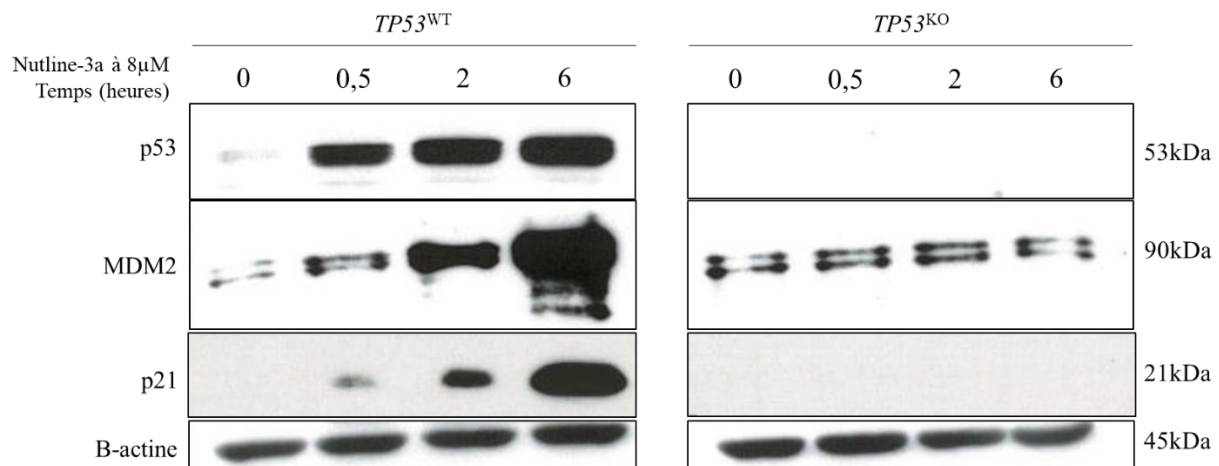


Figure 55 : Détection par western blot des protéines p53, p21 et MDM2 dans les cellules *TP53^{WT}* et *TP53^{KO}* suite à un traitement à la nutline-3a sur des temps variables (entre 0 et 6 heures)

La détection de la β -actine permet de valider la quantité de protéines chargées pour réaliser cette expérience.

Effectivement, les cellules *TP53^{WT}* qui ont subi un traitement à la nutline-3a montrent bien une augmentation de la quantité de protéines p53 ou codées par des gènes cibles de p53 au cours du temps.

L'activation de p53 par la nutline-3a est visible par la quantité de protéine détectée et ceci dès 30 minutes de traitement. La quantité de protéine p53 détectée semble augmenter au cours du temps avec une quantité de protéine détectée après 6 heures de traitement supérieur à la quantité de protéine détectée après 30 minutes de traitement.

Cette activation est aussi visible sur les protéines p21 et MDM2. Ainsi la quantité de protéine MDM2 ou p21 augmente en même temps que l'activation de p53 avec un effet du traitement visible dès 30 minutes là encore.

Concernant les cellules *TP53^{KO}*, là aussi, deux observations. La première c'est l'absence de détection pour la protéine p53 et ceci même après une inhibition de MDM2 par la nutline-3a. La seconde c'est l'absence d'activité de p53 visible par la non augmentation de ses cibles. MDM2 montre une expression constante au cours du temps et p21 n'est pas détecté. Ces

observations sont en accord avec les résultats obtenus en RT-qPCR et permettent de valider le KO p53 en transcription et en traduction.

II. Séquençage des ARN totaux pour les cellules $TP53^{WT}$ et $TP53^{KO}$ +/- nutline-3a

La nutline-3a est une molécule utilisée pour altérer l'interaction de p53 avec son inhibiteur MDM2. Pour cela, cette drogue entre en compétition avec p53 pour se lier à MDM2 (Vassilev, Vu, Graves, et al. 2004). Pour analyser si un traitement à la nutline-3a altère l'expression des gènes dans des cellules KO p53, un séquençage des ARN totaux a été réalisé. Les cellules $TP53^{WT}$ et $TP53^{KO}$ ont donc subi un traitement de 24h à 8 μ M de nutline-3a puis les ARN totaux ont été extraits et leur qualité analysée avant d'être envoyés à séquencer.

Les résultats obtenus apportent alors 2 types de réponses. La première concerne la spécificité de la nutline-3a à cibler le complexe MDM2-p53 dans les cellules BJ-5ta. En effet, si cette molécule est capable de cibler d'autres voies de signalisation dans la cellule, ceci pourra être identifié par le séquençage des ARN issus des cellules $TP53^{KO}$. La seconde concerne la mise à jour de nouvelles cibles de p53. Augmenter l'activité de la protéine p53, c'est augmenter la transcription de ses cibles, donc la quantité d'ARN apparaîtra comme augmentée au séquençage. C'est la lignée $TP53^{WT}$ qui apportera cette réponse.

A. Comparaison des lignées $TP53^{KO}$ et $TP53^{KO}$ traitées à la nutline-3a

Concernant la spécificité de la nutline-3a, les analyses ont été effectuées en se basant sur un $\log_2(\text{fold-change})$ de 2 c'est-à-dire une augmentation de la transcription de 4 fois par rapport à la lignée de référence, ici $TP53^{KO}$, et sur un p-value $\leq 0,05$. En comparant les résultats obtenus pour la lignée $TP53^{KO}$ et $TP53^{KO}$ traitée à la nutline-3a à 8 μ M pendant 24h, aucun gène ne voit sa transcription diminuer entre les deux conditions. Et seul un gène voit sa transcription

augmenter suite au traitement pas la nutline-3a. Il s'agit du gène *CXCL8* qui code pour l'interleukine 8 (IL8).

Il semble donc que la nutline-3a soit très spécifique de sa cible : MDM2. Mais surtout ces résultats nous assurent que ceux obtenus concernant les ARN issus des cellules *TP53^{WT}* (+/- traitement à la nutline-3a), seront dus à l'activation spécifique de p53.

Le cas de *CXCL8* sera abordé ultérieurement.

B. Comparaison des lignées *TP53^{WT}* et *TP53^{WT} nut*

Comme pour la comparaison effectuée précédemment pour les cellules *TP53^{KO}*, les analyses ont été effectuées en se basant sur un $\log_2(\text{fold-change})$ de 2 c'est-à-dire une augmentation de la transcription de 4 fois par rapport à la lignée de référence, ici *TP53^{WT}*, et sur un p-value $\leq 0,05$. En comparant les résultats obtenus pour la lignée *TP53^{WT}* et *TP53^{WT}* traitée à la nutline-3a à $8\mu\text{M}$ pendant 24h, 351 gènes montrent un taux d'ARNm que diminué et 175 gènes qui connaissent une augmentation de la quantité d'ARNm.

Une analyse en ligne par le logiciel « STRING DB : Functional protein association network » (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins DataBase*) indique que les gènes dont la transcription est régulée à la baisse sont très majoritairement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Concernant les gènes ayant leur transcription activée, ils semblent surtout impliqués dans les processus d'apoptose, des mécanismes de rétrocontrôle ou de traduction/maturation des protéines.

Il n'est pas clairement identifié dans la littérature que p53 puisse être un inhibiteur direct de la transcription (Engeland 2017; Fischer 2017). L'hypothèse d'une inhibition indirecte est privilégiée pour expliquer la diminution de transcription observée pour les 351 gènes et pourrait être le résultat de la régulation du cycle cellulaire.

L'objectif étant d'identifier de nouvelles cibles directes de p53, seule la liste des 175 gènes qui voient leur transcription augmenter a été comparée à différentes listes de gènes dont la transcription semble également dépendante de p53. Dans son article, Martin Fischer (Fischer 2017) regroupe 16 études cherchant à identifier des cibles de p53 par des méthodes d'analyses différentes. Il livre ainsi un tableau regroupant les 3661 gènes identifiés comme étant des cibles de p53 et régulées par une activation ou une inhibition de la transcription. Les gènes en question sont impliqués dans plusieurs types de réponses cellulaires : l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'autophagie, la traduction des ARNm ou les mécanismes de rétroaction.

Cette liste de 3661 gènes a été utilisée comme référence pour déterminer si de nouveaux transcrits étaient ressortis lors du séquençage des ARN issues des cellules $TP53^{WT}$ traitées à la nutline-3a ($TP53^{WT}$ nut). Pour rappel ces ARN en question ont leur transcription augmentée suite à l'activation de p53 spécifiquement et ceci est confirmé par le contrôle effectué à partir des cellules $TP53^{KO}$. En utilisant un diagramme de Venn, qui compare les deux listes et identifie les doublons, il s'avère que 125 sont présents dans les deux listes et 50 gènes n'ont pas été identifiés précédemment (figure 56).

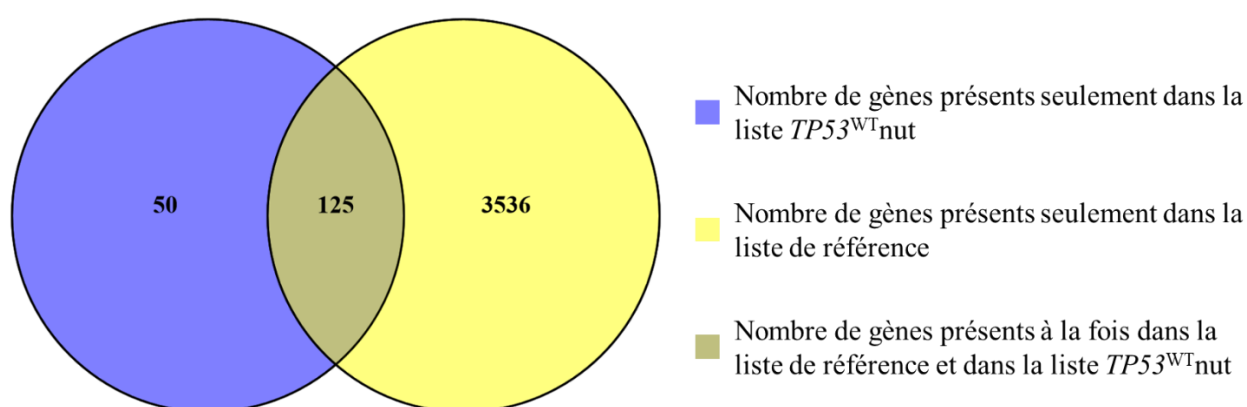


Figure 56 : Identification par un diagramme de Venn de 50 gènes qui représentent de potentielles nouvelles cibles de p53. 50 des 175 gènes identifiés sont uniques à cette étude. Les 125 autres gènes avaient déjà été répertoriés dans la liste des 3661 potentiels gènes cibles de p53

Pour cette liste de 50 gènes identifiée, il fallait déterminer s'il s'agit effectivement de nouvelles cibles directes de p53 ou bien de gènes dont la transcription est activée par une autre voie de signalisation.

Parmi les 50 gènes identifiés, 11 ont été sélectionnés pour une étude approfondie : *PAPPA*, *TREM2*, *TNFRSF14*, *PPL*, *HMOX1*, *SERPINE2*, *YPEL4*, *ADAMTS13*, *PCDHGC5*, *CYP3A7*-*CYP3A51P* et *CXCL8*. Ces gènes ont été sélectionnés selon plusieurs critères : ils ont été cités comme étant de potentielles cibles de p53 dans la littérature scientifique (*TNFRSF14*, *HMOX1* ou *SERPINE2*) ; ils sont identifiés comme étant impliqué dans certains cancer (*PAPPA* ou *PPL*) ; ils sont impliqués dans des maladies tels que la maladie d'Alzheimer (*TREM2*) ou dans la maladie de Willebrand (*ADAMTS13*) ; ils sont impliqués dans la connexion entre les neurones (*PCDHGC5*) ; ou dans d'autres voies cellulaires. Le gène *CXCL8* pour sa part, est étudié de par les résultats obtenus précédemment dans les cellules $TP53^{KO}$. Pour certain de ces gènes, les

amorces utilisées pour les qPCR n'ont pu être validées. Elles ne peuvent donc pas être utilisées pour les expérimentations : *TREM2*, *YPELA* et *ADAMTS13*.

Pour les autres voici les résultats obtenus :

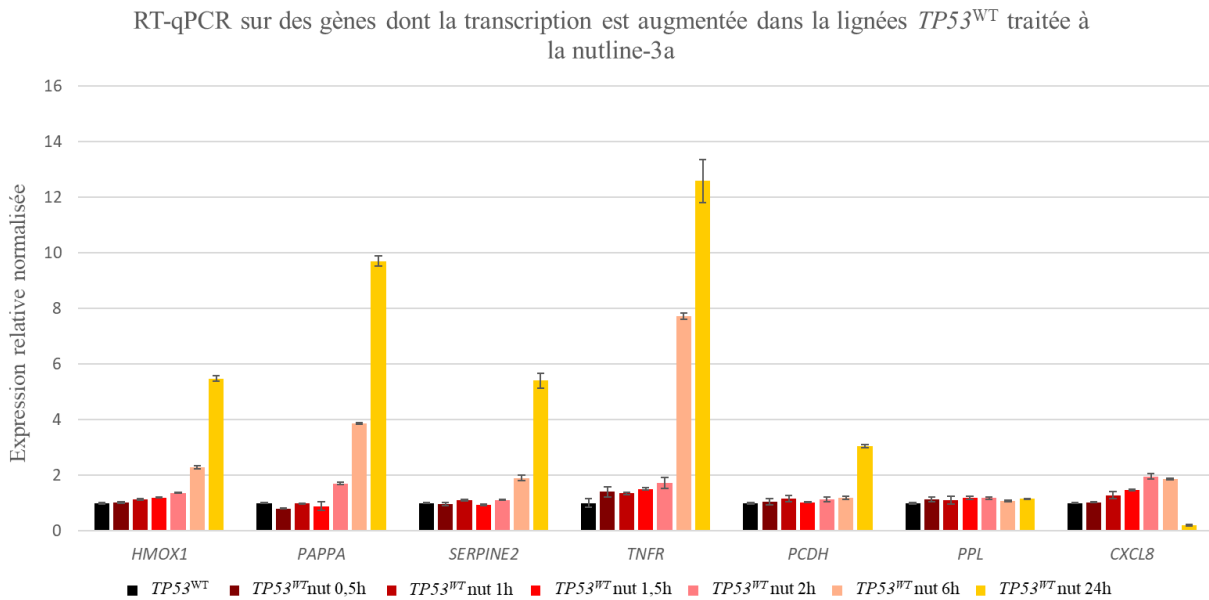


Figure 57 : Suivi par RT-qPCR de la quantité de transcrit de sept gènes afin de déterminer s'ils sont des cibles directes ou indirectes de *p53*

Suivi de la transcription après un traitement à 8µM de nutline-3a à différents temps (entre 0 et 24 heures).

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée *TP53^{WT}* et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*.

Pour tous ces gènes, l'activation de la transcription semble augmentée après 6 heures ou plus. Ils ne semblent donc pas être des cibles directes de *p53*. Pour le gène *PPL*, il ne semble même pas y avoir d'activation.

Concernant *CXCL8*, les effets observés suite à un traitement de 24 heures à la nutline-3a des cellules *TP53^{WT}*, ils sont opposés à ceux observés dans les cellules *TP53^{KO}* traitées à la même dose de nutline-3a et sur la même durée. En effets, c'est une augmentation de la transcription de ce gène qui a été mise en évidence dans ce cas-là par le séquençage des ARN. Son cas est développé ci-après.

III. Le cas particulier de *CXCL8*

Dans un premier temps, j'ai simplement comparé la transcription basale de certains gènes entre les cellules *TP53^{WT}* et *TP53^{KO}* en utilisant comme lignée de référence la lignée *TP53^{WT}*.

Les gènes suivis sont les gènes cibles de p53 : *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* comme déjà décrit précédemment auquel s'ajoute le gène étudié par la suite : *CXCL8*.

La transcription de ces gènes est suivie par RT-qPCR et permet d'avoir une idée de l'expression basale de chacun d'entre eux (figure 58). Ainsi les trois gènes cibles de p53 sont toujours sous exprimés dans la lignée *TP53^{KO}*, comme rapporté précédemment au moment de la description de cette lignée. Et la transcription basale du gène *CXCL8* semble similaire entre les deux lignées cellulaires.

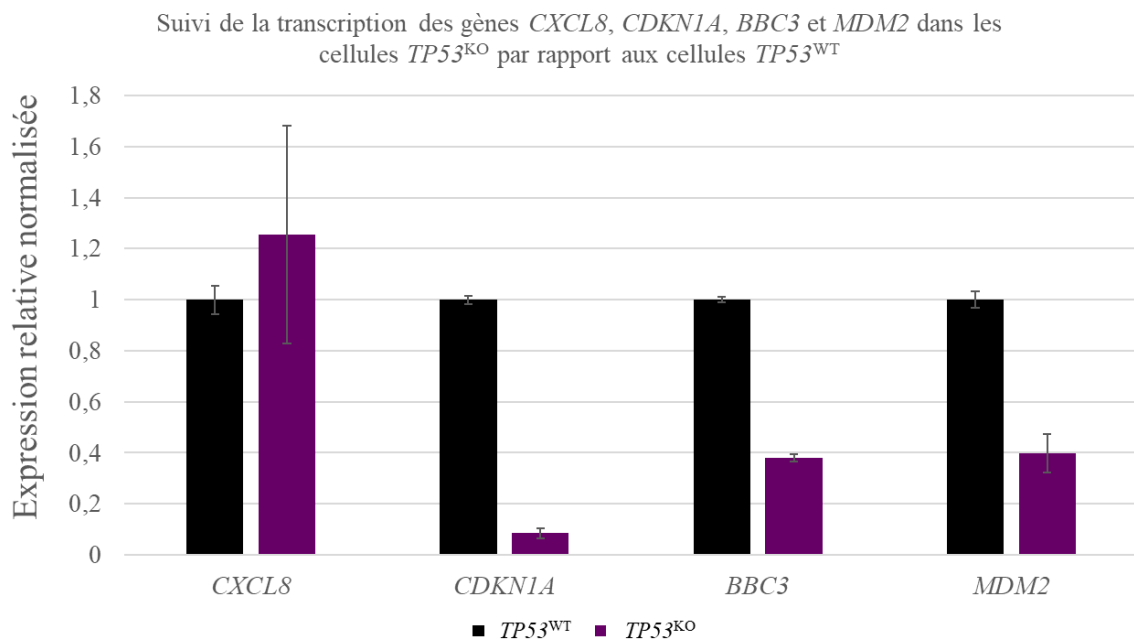


Figure 58 : Suivi de la transcription basale des gènes *CXCL8*, *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* dans les lignées *TP53^{WT}* et *TP53^{KO}*. La lignée utilisée comme référence est la lignée *TP53^{WT}*. Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée *TP53^{WT}* et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*.

Par la suite la transcription de ces gènes sera analysée sur les cellules qui auront été traitées à la nutline-3a ou par une protéine activatrice de *CXCL8* : Il-1 β .

A. La transcription de *CXCL8* en réponse à la nutline-3a

Suite aux résultats obtenus lors du séquençage des ARN totaux, d'autres expériences ont été menées pour tenter d'identifier à quel moment, après le traitement à la nutline-3a, l'activation

de la transcription de *CXCL8* se déclenche dans les cellules *TP53*^{KO}. Ces cellules *TP53*^{KO} ont ainsi été traitées à 8μM de nutline-3a sur des temps différents : 1h, 2h, 6h ou 24h (figure 59).

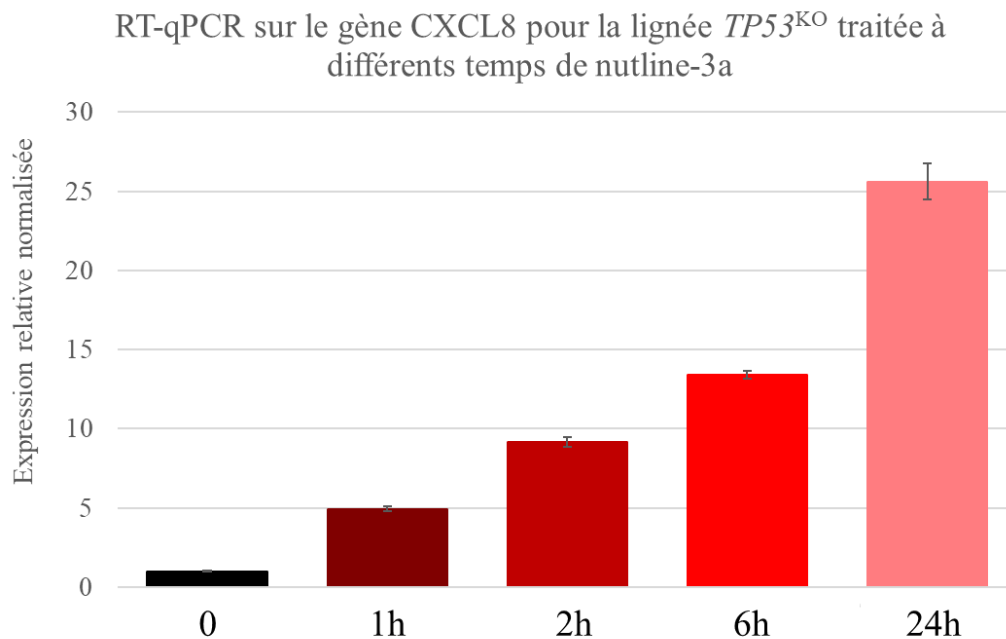


Figure 59 : Suivi par RT-qPCR de la transcription du gène *CXCL8* dans les cellules *TP53*^{KO} traitées à 8μM de nutline-3a sur des temps variables (0 à 24 heures)

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée *TP53*^{WT} et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*

Il semble, au vu des résultats obtenus par RT-qPCR, que l'activation de la transcription de *CXCL8* soit très rapide lors d'un traitement des cellules *TP53*^{KO} par de la nutline-3a. En effet, 1 heure après le traitement des cellules, il y a déjà une augmentation de la transcription de 5

fois par rapport aux cellules non traitées. Puis le taux de transcription de *CXCL8*, sous l'action de la nutline-3a, augmente au cours du temps.

Ce qui est intéressant c'est que la cinétique de l'expression de *CXCL8*, dans la lignée *TP53*^{WT} qui subit un traitement à la nutline-3a, aboutisse à une répression importante après 24 heures de traitement (figure 60).

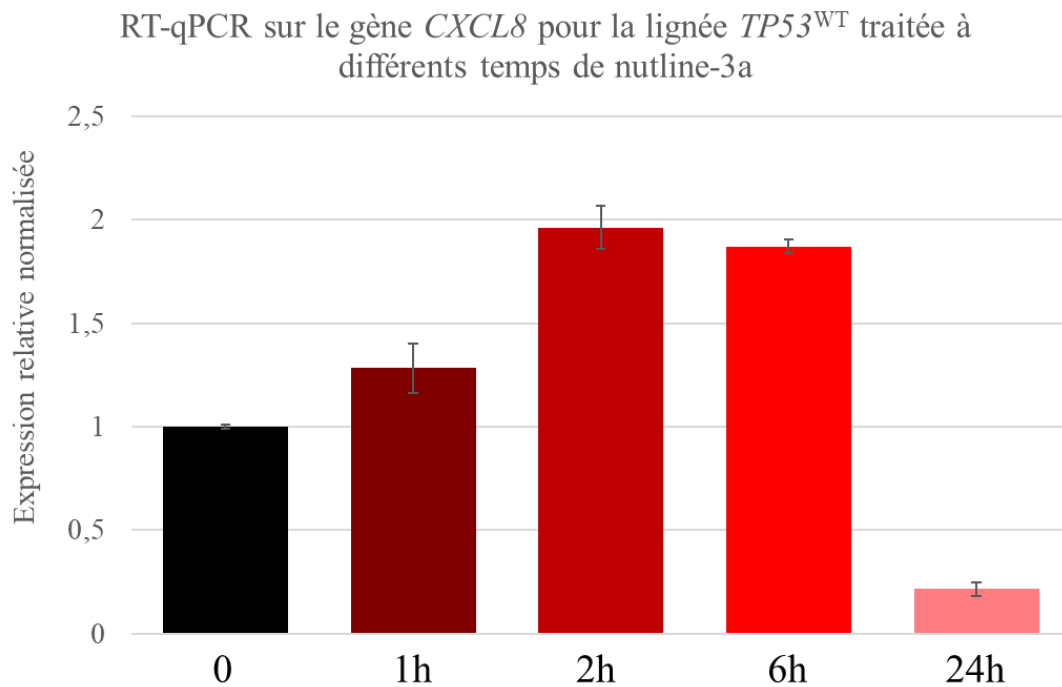


Figure 60 : Suivi par RT-qPCR de la transcription du gène *CXCL8* dans les cellules *TP53*^{WT} traitées à 8 μ M de nutline-3a sur des temps variables (0 à 24 heures)

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée *TP53*^{WT} et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*

Après une légère augmentation de la transcription (≤ 2) lors des temps de traitement courts (jusqu'à 6 heures), il y a une forte diminution de la transcription de *CXCL8* suite à un traitement de 24 heures de ces cellules à la nutline-3a. En revanche, contrairement au cas des cellules *TP53*^{KO}, les effets du traitement à la nutline-3a ne sont pas immédiats sur le transcrit de ce gène.

C'est seulement au point de mesure 24 heures après traitement que la baisse est réellement visible.

B. La transcription de *CXCL8* en réponse à $\text{Il-1}\beta$

1. Suivi de la transcription de *CXCL8*

Il a été publié que le taux d' Il-8 augmente en réponse à l'ajout d' $\text{Il-1}\beta$ dans le milieu de culture des cellules (Rasmussen et al. 2008; De Larco et al. 2003). Cette réponse est d'ailleurs visible par le taux de transcription mais aussi par la quantité de protéines présente dans les milieux de culture.

Les cellules BJ-5ta exprimant p53 sauvage ($TP53^{\text{WT}}$) ou la forme mutée de p53 ($TP53^{\text{KO}}$) ont donc été cultivées avec une quantité définie d' $\text{Il-1}\beta$ (0,5 ng/ml) pendant 24 heures afin d'observer la réponse transcriptionnelle de *CXCL8* à l'ajout de son activateur (figure 61).

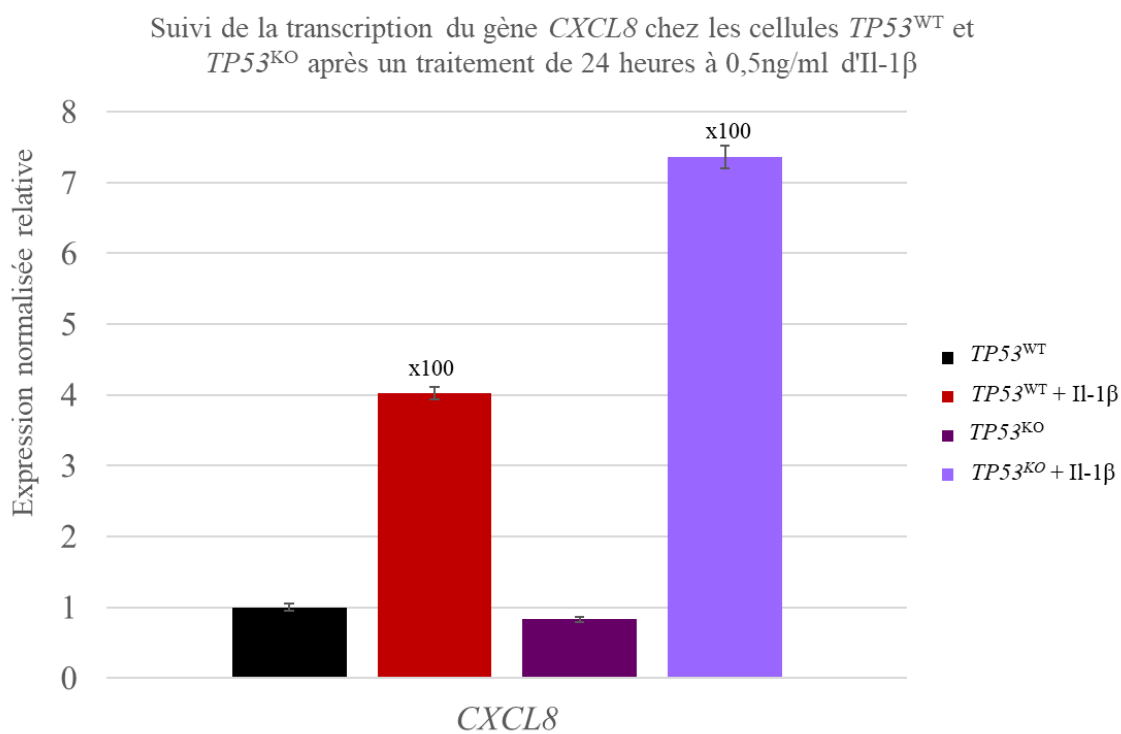


Figure 61 : Suivi par RT-qPCR de la transcription de *CXCL8* dans les cellules $TP53^{\text{WT}}$ et $TP53^{\text{KO}}$ après un traitement de 24 heures à 0,5 ng/ml d' $\text{Il-1}\beta$

La lignée utilisée comme référence est la lignée $TP53^{\text{WT}}$ dont le niveau d'expression est considéré comme étant de 1. Pour faciliter la représentation des résultats, les taux de transcription de *CXCL8* dans les lignées $TP53^{\text{WT}}$ et $TP53^{\text{KO}}$ traitées à l' $\text{Il-1}\beta$ ont été divisés par 100.

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée $TP53^{\text{WT}}$ et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*

Suite à un traitement des cellules avec 0,5 ng/ml d'Il-1 β durant 24 heures, le taux de transcription de *CXCL8* augmente de près de 400 fois dans les cellules *TP53*^{WT} et de quasiment 730 fois dans les cellules *TP53*^{KO} par rapport aux cellules *TP53*^{WT} non traitées. Il y a donc une très forte activation de la transcription de *CXCL8* suite à l'action d'Il-1 β . Cette activation de la transcription est plus importante dans les cellules qui ne sont plus capable de produire la protéine p53.

2. Suivi de la transcription des gènes cibles de p53 : *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2*

La transcription des gènes *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* a également été suivie suite au traitement des cellules à Il-1 β afin d'effectuer la comparaison avec les résultats obtenus par un traitement à la nultine-3a.

Deux représentations de ces résultats sont analysées. La première (figure 62) utilise la lignée non traitée pour référence à la lignée traitée. Plus exactement la lignée *TP53*^{WT} traitée à Il-1 β est comparée à sa lignée non traitée de référence *TP53*^{WT}. De même la lignée *TP53*^{KO} traitée à Il-1 β est comparée à sa lignée de référence *TP53*^{KO}.

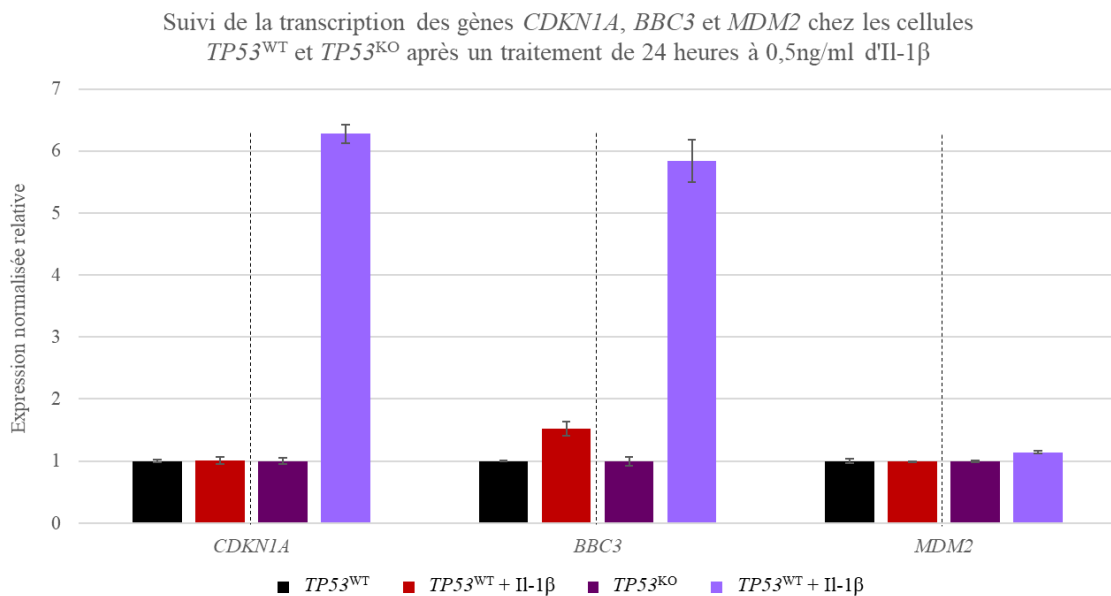


Figure 62 : Suivi de la transcription des gènes *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* suite au traitement des cellules *TP53*^{WT} et *TP53*^{KO} à Il-1 β

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée *TP53*^{WT} et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*

Dans ce cas, il n'y a pas d'activation de la transcription visible pour ces trois gènes cibles de p53 dans la lignée $TP53^{WT}$ suite au traitement à $Il-1\beta$. En revanche une activation de la transcription de 6 fois est visible pour les gènes $CDKN1A$ et $BBC3$ dans la lignée $TP53^{KO}$ traitée à $Il-1\beta$ par rapport à la lignée $TP53^{KO}$ non traitée.

La seconde représentation des résultats compare toutes les lignées ($TP53^{WT}$ et $TP53^{KO}$), traitées ou non à une seule lignée de référence : $TP53^{WT}$ (figure 63).

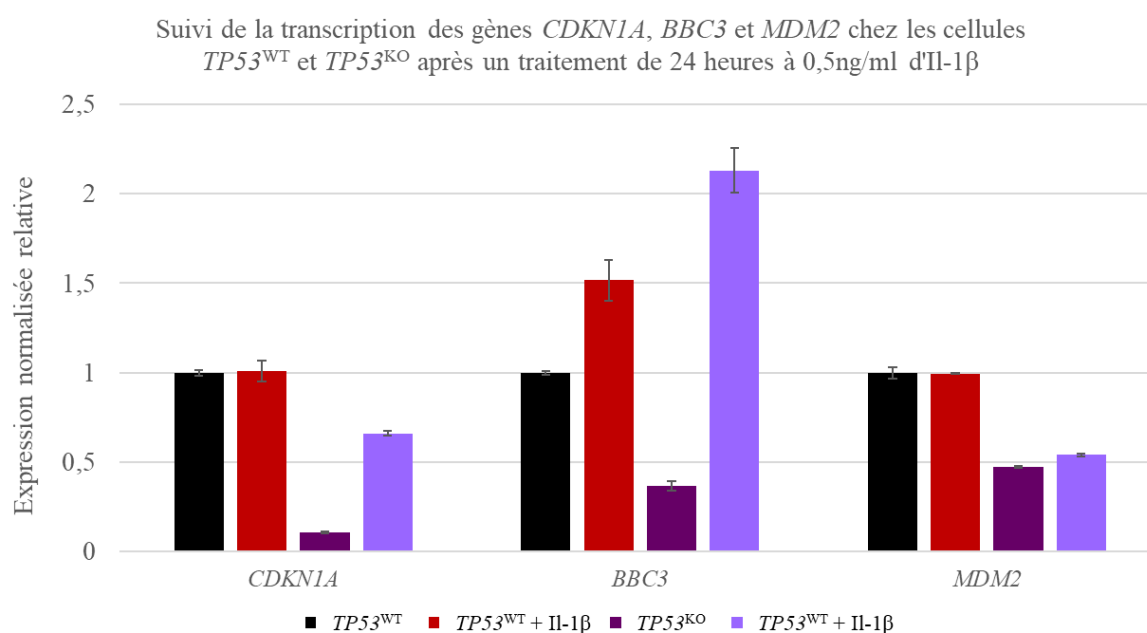


Figure 63 : Suivi de la transcription des gènes $CDKN1A$, $BBC3$ et $MDM2$ suite au traitement des cellules $TP53^{WT}$ et $TP53^{KO}$ à $Il-1\beta$
Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée $TP53^{WT}$ et deux gènes de référence $SDHA$ et $RPL29$

Dans ce cas il n'y a pas de changement pour les lignées $TP53^{WT}$ et $TP53^{WT} + Il-1\beta$. Mais pour les lignées $TP53^{KO}$ et $TP53^{KO} + Il-1\beta$, cela permet de constater que l'activation de la transcription des gènes $CDKN1A$ et $BBC3$, bien qu'augmentée suite au traitement des cellules, reste proche de celle de base observée pour la lignée $TP53^{WT}$.

La transcription de $BBC3$ montre une augmentation de 2 fois dans la lignée $TP53^{KO} + Il-1\beta$, ce qui reste une activation assez faible compte tenu des résultats observés précédemment lors du traitement de la lignée $TP53^{WT}$ à la nutline-3a.

Par la suite, ces mêmes cellules sont traitées à la nutline-3a à 8 μ M ou l'Il-1 β à 0,5 ng/ml ou avec l'Il-1 β et la nutline-3a afin de déterminer s'il ces deux agents empruntent la même voie pour activer la transcription de *CXCL8*.

C. La transcription en réponse à la nutline-3a ou/et Il-1 β

Les cellules *TP53*^{WT} et *TP53*^{KO} ont été traitées soit à la nutline-3a à 8 μ M pendant 6 heures, soit à 0,5 ng/ml d'Il-1 β pendant 6 heures, soit simultanément avec la nutline-3a à 8 μ M et l'Il-1 β à 0,5 ng/ml durant 6 heures.

Les résultats de RT-qPCR obtenus pour les gènes *CXCL8*, *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* sont présentés dans la figure 64.

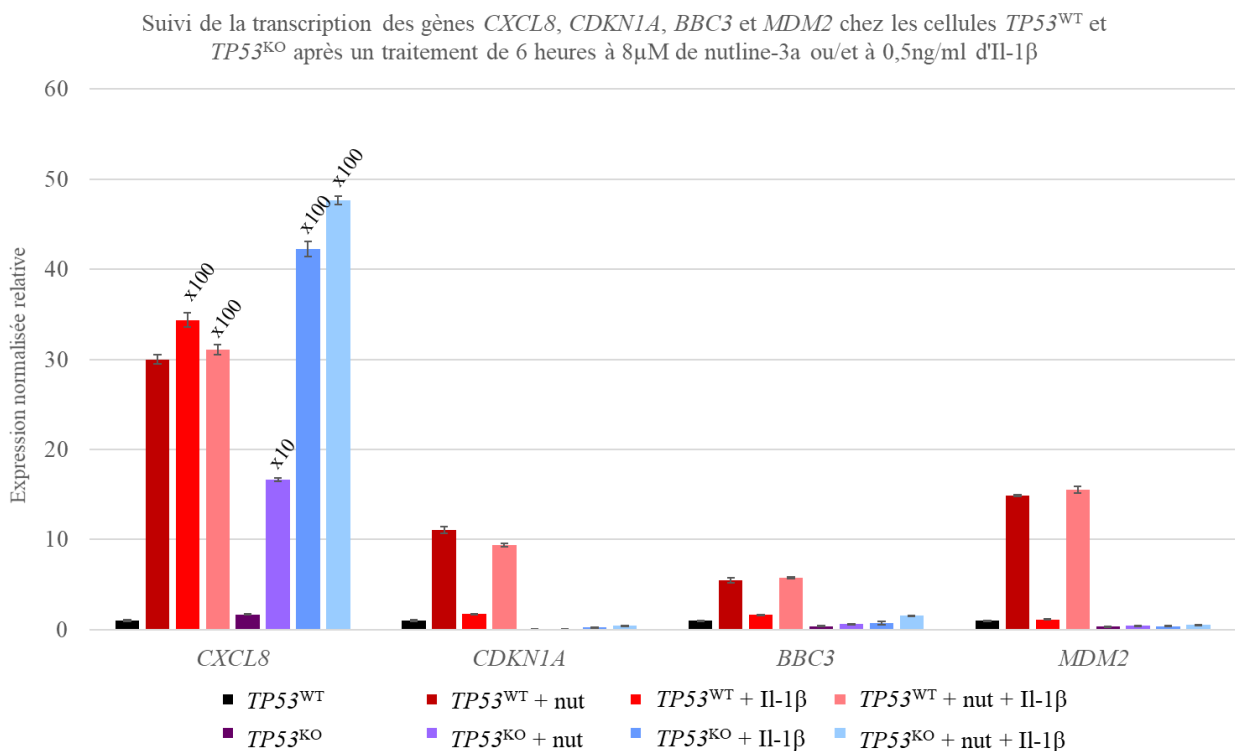


Figure 64 : Suivi de la transcription des gènes *CXCL8*, *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* suite au traitement des cellules *TP53*^{WT} et *TP53*^{KO} à la nutline-3a ou/et à Il-1 β

La lignée utilisée comme référence pour la comparaison des taux de transcription des différents gènes et dans les différentes conditions est la lignée *TP53*^{WT}.

Pour faciliter la représentation des résultats, les taux de transcriptions de *CXCL8* dans les lignées *TP53*^{WT} et *TP53*^{KO} ont pu être divisé par 10 ou par 100.

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée *TP53*^{WT} et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*

Dans cette représentation des résultats, chacune des conditions est comparée à la lignée de référence non traitée *TP53*^{WT}.

Concernant la transcription du gène *CXCL8* dans les cellules *TP53*^{WT} : suite au traitement par la nutline-3a durant 6 heures, la transcription est augmentée de 30 fois par rapport à la lignée *TP53*^{WT} non traitée. Cette activation n'avait pas été observée précédemment (figure 60). Ces mesures n'ayant été faite que sur un extrait, elles nécessitent d'être réalisées à nouveau pour être confirmées. Les cellules traitées avec 0,5 ng/ml d'Il-1 β durant 6 heures montrent une activation de la transcription de *CXCL8* augmentée de 3400 fois environ. Et les cellules traitées à la fois avec la nutline-3a et l'Il-1 β , montrent une augmentation de la transcription d'environ 3100 fois. Soit une activation de la transcription de *CXCL8* similaire entre les deux conditions de traitement à Il-1 β ou nutline-3a et Il-1 β .

Dans les cellules *TP53*^{KO} le taux de transcription basale de *CXCL8* est similaire à la lignée *TP53*^{WT} : soit respectivement 1 et 1,6. Pour les autres lignées *TP53*^{KO}, la transcription de *CXCL8* suite au traitement de 6 heures par la nutline-3a est augmentée d'environ 160 fois par rapport à la lignée *TP53*^{WT} non traitée. Pour ces cellules mais traitées 6 heures à l'Il-1 β , la transcription de *CXCL8* est augmentée de 4200 fois et de 4700 fois environ pour les cellules traitées à la nutline-3a et à Il-1 β et comparé à la lignée *TP53*^{WT}. Là encore, il y a un taux de transcription similaire entre les cellules traitées à Il-1 β avec et sans combinaison avec la nutline-3a.

Il semble donc que la combinaison des traitements à Il-1 β et la nutline-3a n'induit pas une transcription plus importante que l'Il-1 β seule.

Concernant la transcription des gènes *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2*, une augmentation de la transcription n'est visible que dans les conditions de traitement des cellules *TP53*^{WT} avec de la nutline-3a (figure 65). Une transcription équivalente entre les conditions de traitement à la nutline-3a seule et le traitement combiné de nutline-3a et Il-1 β suggère que la nutline-3a seule est responsable de cette activation. D'autant plus qu'il n'y a pas d'activation de la transcription visible pour ces gènes dans le cas d'un traitement des cellules à l'Il-1 β seule.

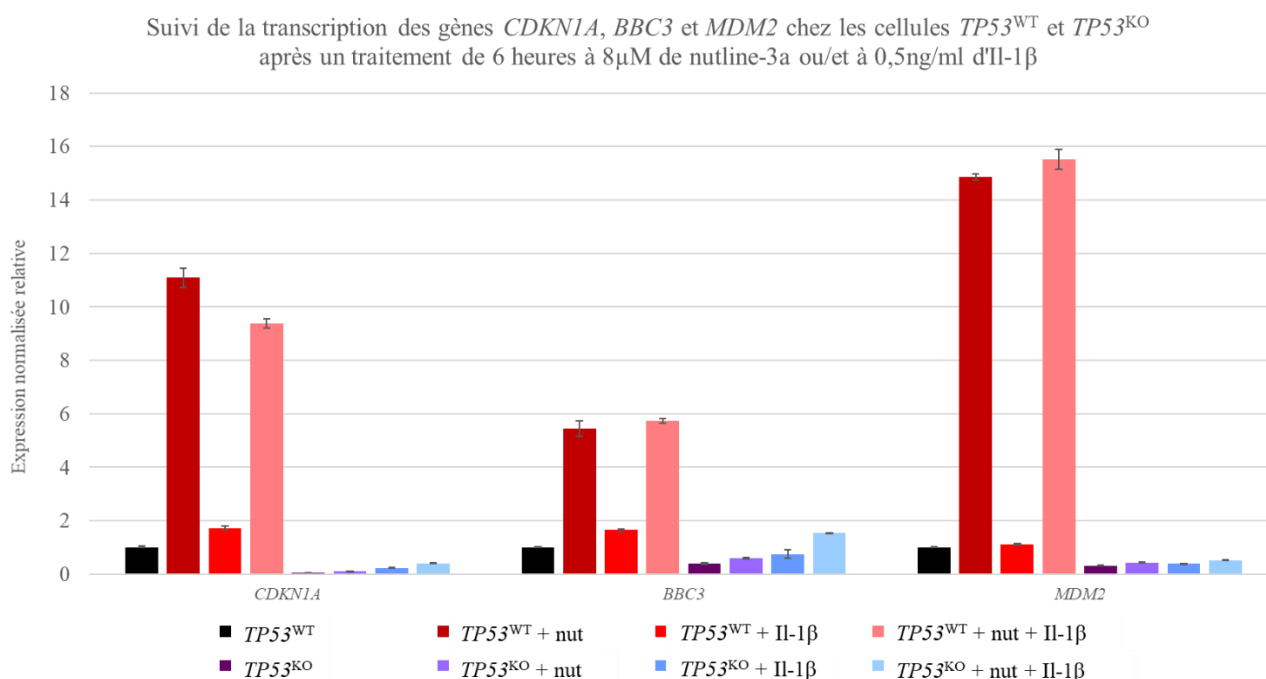


Figure 65 : Suivi de la transcription des gènes *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* suite au traitement des cellules *TP53^{WT}* et *TP53^{KO}* à la nutline-3a ou/et à Il-1β

La lignée utilisée comme référence pour la comparaison des taux de transcription des différents gènes et dans les différentes conditions est la lignée *TP53^{WT}*.

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport à la lignée *TP53^{WT}* et deux gènes de référence *SDHA* et *RPL29*

La transcription des gènes *CDKN1A*, *BBC3* et *MDM2* dans les cellules *TP53^{KO}* n'est réellement activée dans aucune des conditions de traitement par rapport aux cellules *TP53^{WT}*. La transcription de *MDM2* ne montre même aucune variation entre les différentes conditions de culture des cellules *TP53^{KO}* entre elles. En revanche les gènes *CDKN1A* et *BBC3* semblent avoir une transcription activée dans la condition des cellules *TP53^{KO}* traitées simultanément avec la nutline-3a et Il-1β par rapport aux cellules *TP53^{KO}* cultivées dans les conditions standard. Cependant cette activation, bien que visible par rapport à la lignée *TP53^{KO}*, reste insuffisante pour être équivalente à la transcription basale obtenue dans les cellules *TP53^{WT}*.

Des tentatives de western blot ont été menées pour mettre à jour la protéine Il-8 codée par *CXCL8*, mais sans succès.

D. Le promoteur *CXCL8*

Pour expliquer l'activation de la transcription de *CXCL8*, l'hypothèse d'un changement de méthylation s'effectuant sur le promoteur de ce gène suite aux différents traitements a été émise

(De Larco et al. 2003). Pour vérifier cela, l'ADN génomique des cellules *TP53*^{WT} et *TP53*^{KO} soumises aux différents traitements avec nutline-3a et/ou Il-1 β a été extrait. Après fixation des méthylation, une amplification de la séquence comprise entre les positions -1470 et +90 du site d'initiation de la transcription du gène *CXCL8* (De Larco et al. 2003) est effectuée afin d'amplifier le promoteur *CXCL8* par PCR. S'en suivra une purification et un pyroséquençage. Cependant, le traitement de l'ADN génomique par le kit EZ DNA Methylation-GoldTM (Zymo Research) afin de fixer les méthylation, n'a pas permis d'amplifier la séquence souhaitée. Une autre méthode de fixation des méthylation devra être appliquée aux ADN génomiques afin de mener les analyses souhaitées.

Discussion - Perspectives

L'établissement d'une lignée cellulaire qui puisse être considérée comme un modèle d'évolution de la LMC doit s'appuyer sur une base génétique et phénotypique déterminée. Les cellules utilisées pour obtenir ce modèle leucémique sont issues de la lignée fibroblastique BJ-5ta. Au cours du temps, différentes caractérisations ont été menées sur celles-ci par le laboratoire, donnant une idée des avantages et inconvénients liés à leur utilisation. Outre les conditions de culture ou le suivi de la transcription de gènes en particulier, les conditions optimales d'apport d'un plasmide d'expression ont également été déterminées.

Ainsi, différentes démarches ont été appliquées afin d'amener un plasmide dans ces cellules BJ-5ta. Il s'avère qu'elles sont difficilement transfectable. Et plus la taille du plasmide à apporter aux cellules est importante, moins la transfection est efficace. Or, initialement, le système CRISPR-Cas9 est apporté aux cellules par transfection d'un plasmide permettant l'expression complète de ce système : PX459 (pSpCas9(BB)-2A-Puro). Ceci s'est avéré efficace dans nombre de lignées cellulaires (Jafari et al. 2017; Walton et al. 2016; Sessions et al. 2016; Prior et al. 2016) contrairement aux tests préalablement menés au laboratoire sur les cellules BJ-5ta. Cette inefficacité est surtout liée à un taux de cellules transfectées très faible (environ 8% des cellules transfectées avec un vecteur d'expression de fluorescence montraient effectivement la fluorescence attendue). Le choix d'intégrer la séquence codante de la Cas9 semblait alors palier en partie à cette difficulté. En effet le plasmide PX459, qui exprime simultanément la Cas9 et l'ARN guide d'intérêt, a une taille > 9 Mpb. Le plasmide permettant l'expression seule du ou des ARN guides d'intérêt possède une taille < 5 Mpb. Différentes analyses menées au laboratoire au début de ma thèse ont effectivement conduit à adopter cette démarche.

Cependant, pour se soustraire à une expression constitutive de la Cas9, celle-ci a été placée sous contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline. Ceci évite deux problématiques. La première concerne l'expression de la Cas9 elle-même. Il a été mis en évidence par un laboratoire associé (ACTION - Université de Bordeaux - Inserm U1218) une perte d'expression de cette protéine au cours du temps lors d'une expression constitutive. En effet, la Cas9 n'ayant pas de rôle dans la cellule humaine lorsqu'elle est exprimée seule, la cellule n'a pas de raison de la produire en continu. La seconde concerne son rôle dans l'induction des cassures double-brin. Le fait que la protéine Cas9 puisse être active sans nécessité d'apport d'un ARN guide n'est pas rapporté dans la littérature. Cependant le génome humain code pour des petits ARN non codants. Il n'est donc pas exclu, bien que ceci n'est pas été mis en évidence, que la Cas9

s'associe avec un de ces petits ARN et l'utilise comme guide pour induire des cassures double-brin dans le génome. Une production par induction de la protéine Cas9 permet alors une action du système CRISPR-Cas9 à un instant de la vie de la cellule et simultanément à l'apport de l'ARN guide.

Lors de la vérification de l'induction de la Cas9 par la doxycycline, différentes doses ont été testées. Quel que soit la dose de doxycycline utilisée (5, 2 ou 1 $\mu\text{g/ml}$), il y a une forte activation et même une dégradation visible de la protéine (figure 28). La dose de 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline étant suffisante pour induire une forte expression de la Cas9, c'est celle-ci qui est utilisée pour les inductions. Autre constatation, c'est la présence de la protéine Cas9 même en absence d'induction. Il y a donc une fuite du promoteur dans les cellules BJ-5ta. Cette fuite n'a pas été constatée par le laboratoire ayant développé cette stratégie dans d'autres lignées cellulaires. Mon hypothèse est qu'une très faible quantité de doxycycline puisse être apportée par le sérum de veau fœtal ajouté au milieu de culture des cellules BJ-5ta. Des contrôles de production de la Cas9 suite à une induction par la doxycycline ont été menées tout au long de mon doctorat. Aucune perte d'expression n'a été constatée au cours du temps. La fuite du promoteur n'est donc pas suffisante pour que la cellule arrête toute transcription de ce gène.

Après la production de la Cas9, c'est le du système CRISPR-Cas9 dans son intégralité et dans ces cellules qui a été validé. L'utilisation de la GFP et d'un ARN guide dirigé contre la GFP montre l'efficacité de ce système (figure 29). Son application peut donc se faire pour cibler le génome des cellules BJ-5ta et construire le modèle souhaité.

D'autres observations ont été menées afin de mieux caractériser le phénotype de la lignée BJ-5ta. Ainsi, une culture des cellules BJ-5ta dans un milieu semi-solide a mis en évidence leur incapacité à se diviser sans ancrage à un support. Ce qui correspond à un phénotype de cellules non transformées.

L'absence d'aneuploïdie a également été contrôlée. Ceci constitue un argument positif supplémentaire à l'utilisation de ces cellules puisque les cellules de LMC en phase chronique ne sont pas aneuploïdes. Effectivement, l'objectif est de construire un modèle de transformation tumorale à partir de cellules saines et dites normales. De plus le système CRISPR-Cas9 sera plus efficace s'il y a deux copies de chromosomes à cibler plutôt que de multiples copies. En outre, l'aneuploïdie est une caractéristique des cellules cancéreuses (Douglas Hanahan and Weinberg 2011; Rajagopalan and Lengauer 2004). Il sera donc possible d'observer l'apparition de cette anomalie tumorale plus tard dans la construction du modèle afin de constater les

conséquences de la transformation des cellules. D'autant plus que cette anomalie du nombre de chromosome est caractéristique des cellules de LMC en phase avancée.

Finalement, l'absence de l'oncogène *BCR-ABL1* était primordiale pour le choix de cette lignée cellulaire (figure30).

Chapitre 1

L'objectif de ma thèse étant d'exploiter un modèle de cellule humaine représentatif de la LMC, deux stratégies ont été menées afin que les cellules BJ_Cas9i_BlastR expriment l'oncogène *BCR-ABL1*.

La plus physiologique consistait à induire la translocation entre les chromosomes 9 et 22. Pour cela, deux ARN guides ont été apportés aux cellules (figure 17). L'un cible l'intron 14 de *BCR* et le second cible l'intron 1 d'*ABL1*. De cette façon, une fusion entre l'intron 14 de *BCR* et l'intron 1 d'*ABL1* devait conduire à la production de la forme de 210 kDa de *BCR-ABL1* (e14a2) (figure 4). Bien que cette stratégie ait été appliquée à plusieurs reprises sur les cellules BJ_Cas9i_BlastR, aucune fusion entre les gènes *BCR* et *ABL1* n'a été mise en évidence après sélection des cellules. La capacité de ces ARN guides à induire une cassure double brin n'a cependant pas été vérifiée. Je ne peux donc assurer si l'absence de fusion entre ces deux chromosomes est liée à une réparation fidèle ou à une absence de coupure.

La seconde stratégie employée était donc l'intégration de la séquence codante de l'oncogène *BCR-ABL1* dans le génome des cellules par la voie des lentivirus. Cette démarche est bien maîtrisée au laboratoire et les lentivirus en question (p252_Bcr-Abl1) étaient disponibles dans le laboratoire partenaire (ACTION – Inserm U1218). Malgré la faible efficacité de l'infection (moins de 2% des cellules infectées exprimaient la fluorescence associée à l'expression de l'oncogène *BCR-ABL1*), des cellules exprimant une forme complète du transcrit *BCR-ABL1* ont été obtenues (figure 33). Le séquençage a permis de valider que la séquence intégrée ne portait pas de mutations et correspondait effectivement au transcrit dans sa totalité.

En revanche, lors de la détection de la protéine BCR-ABL1, des anomalies quant à sa masse moléculaire ont été mises en évidence (figure 34). Bien qu'une faible quantité de la protéine à 210 kDa soit révélée, c'est essentiellement une protéine de taille inférieure qui est détectée. Cette protéine est mise à jour à la fois par l'anticorps dirigé contre BCR et contre ABL1 et seulement dans les cellules exprimant le transcrit *BCR-ABL1* (figure 35). Il n'y a donc pas de doutes quant à affirmer que cette protéine est le produit de l'oncogène *BCR-ABL1* intégré au préalable dans le génome des cellules. L'énigme porte alors sur la taille de la protéine. Une transcription à partir d'un promoteur alternatif est une origine possible à cette protéine tronquée. Cependant différents couples d'amorces ciblant différentes séquences du transcrit *BCR-ABL1*, n'ont pas mis en évidence de transcription alternative. De plus, la transcription étant dirigée par un promoteur fort (promoteur MND) est un argument en faveur de son utilisation exclusive.

L'hypothèse porte alors sur une anomalie au moment de la traduction. Les résultats obtenus en figure 48 montrent que cette forme tronquée de la protéine n'est pas obtenue dans les cellules HeLa qui expriment la même séquence codante de *BCR-ABL1*. Il est donc fort probable que cette traduction tronquée trouve son origine dans la lignée BJ-5ta elle-même plutôt que dans une mutation de la séquence codante du gène. D'autant qu'aucune mutation n'a été mise en évidence suite au séquençage. D'autres expériences d'expression du gène de fusion *BCR-ABL1* doivent être menées dans d'autres lignées cellulaires afin de valider que la lignée BJ-5ta est effectivement responsable de cette anomalie.

Malgré la présence majoritaire de cette protéine raccourcie par rapport à la protéine de 210 kDa attendue, le choix a été fait de continuer la construction du modèle à partir de ces cellules. L'hypothèse d'un facteur limitant la traduction de la protéine BCR-ABL1 et exprimé par les fibroblastes BJ-5ta est émise. Dans ce cas, une perte de ce facteur est attendue lors de la transformation complète de ces cellules. Hypothèse qui nous incite alors à poursuivre l'établissement du modèle de la LMC dans cette lignée cellulaire.

Le phénotype non cancéreux des cellules, obtenu par la culture en agar mou, a confirmé le fait que l'expression de l'oncogène *BCR-ABL1* n'est pas suffisant pour induire la transformation des fibroblastes humains BJ-5ta. Pour rappel, bien que la forme tronquée de la protéine soit celle majoritairement détectée par western blot, une forme complète de 210 kDa est également révélée.

Cela confirme les observations rapportées dans la littérature affirmant que l'espèce d'origine de la lignée cellulaire dans laquelle cet oncogène est exprimé influe sur sa capacité à induire la tumorigénèse. En effet, dans les fibroblastes de rats et de souris, *BCR-ABL1* est nécessaire et suffisant pour transformer les cellules (Pendergast et al. 1993; Daley et al. 1990), en revanche dans les cellules humaines, ce n'est pas le cas. Ce résultat n'est pas surprenant quand on sait que le transcrits *BCR-ABL1* est détecté, à un faible niveau, dans les cellules du sang périphérique chez des individus sains (Biernaux et al. 1995; Bose et al. 1998; Song et al. 2011). Ceci apporte un argument supplémentaire à l'importance de la cellule dans laquelle la translocation va s'effectuer et l'importance du microenvironnement. Ici le choix a été fait d'utiliser des fibroblastes. Des études antérieures ont mis en évidence l'intérêt de ces lignées cellulaires bien que différentes des lignées hématopoïétiques. Or ces études en question utilisaient surtout des fibroblastes de souris ou de rat. L'utilisation de fibroblastes humains permettra de contourner des biais liés à l'espèce d'origine. La transformation cellulaire suite à

l'expression de *BCR-ABL1* dans les cellules d'origine animale constituant déjà un argument en soi.

Lors de l'analyse des conséquences de l'expression de *BCR-ABL1* sur la phosphorylation de certaines de ses protéines cibles, aucun résultat interprétable n'a été mis à jour. De nouvelles analyses devront être menées pour affirmer la fonctionnalité de la protéine dans ces cellules.

Concernant la suite de la construction du modèle, là encore deux stratégies ont été suivies. A nouveau celle faisant appelle à la technologie CRISPR-Cas9 et celle utilisant des lentivirus. Cette dernière stratégie a permis de montrer rapidement et facilement que la construction de ce modèle permet une transformation contrôlée des cellules grâce à des éléments génétiques définis et dépendamment de la présence de *BCR-ABL1*. Les figures 38 et 39 montrent effectivement que les cellules qui expriment à la fois la protéine de fusion BCR-ABL1, ainsi que les protéine E6 et E7 du papillomavirus présentent un phénotype tumoral. En revanche les lignées pour lesquelles un des éléments BCR-ABL1 ou E6 ou E7 est manquant, les cellules ne sont pas capables de se diviser en absence d'ancrage et ne sont donc pas transformées.

La preuve est alors apportée que, pour la LMC, il est possible de transformer de façon contrôlée les fibroblastes humains BJ-5ta à partir de l'expression de *BCR-ABL1*.

Ces lignées cellulaires qui expriment simultanément *BCR-ABL1* ainsi que *E6* et *E7*, peuvent être utilisées afin de clarifier si la transformation complète permet effectivement au cellules BJ-5ta de produire la protéine BCR-ABL1 sous sa forme totale de 210 kDa.

Afin de se rapprocher des conditions physiologiques de le LMC, le choix a été fait de construire également le modèle mais à partir de la technologie CRISPR-Cas9. N'ayant pas obtenu de lignée cellulaire dans laquelle la translocation entre les chromosomes 9 et 22 avait eu lieu via CRISPR-Cas9, c'est sur la lignée ayant intégré par lentivirus la séquence codante de *BCR-ABL1* (BJ_Cas9i_BcrAbl1) que l'outils CRISPR-Cas9 a été appliqué afin de disrupter les gènes *TP53* et *RBI*.

La stratégie employée pour disrupter ces gènes consiste à apporter deux ARN guides ciblant simultanément le même exon du gène. Pour *TP53*, deux ARN guides ciblant chacun une séquence en 3' ou en 5' de l'exon 4, qui code en partie pour le domaine de transactivation. Les cellules ayant un knock-out (KO) du gène *TP53* ont été sélectionnées par la nutline-3a à 25 µM durant environs trois semaines. Au-delà de cette période plus de 95% des cellules ayant les versions sauvages du gène *TP53* étaient mortes. Pour chaque lignée cellulaire, le KO de ce gène est homozygote et c'est l'ensemble de l'exon 4 de ce gène qui est délété au niveau ARNm : 279

nucléotides soit 93 acides aminés (figure 41). Il n'y a plus d'allèle sauvage détecté par RT-PCR ou par séquençage. Soit la sélection par la nutline-3a ne permet la survie que des cellules ayant une absence totale d'expression du gène codant pour p53, soit le système CRISPR-Cas9 est suffisamment efficace pour cibler systématiquement les deux allèles du gène dans ces cellules. Les résultats de séquençage de la séquence codante de *TP53* après coupure par CRISPR-Cas9 et réparation par NHEJ montrent que la protéine qui sera traduite est tronquée : délétion de 93 acides-aminés, de la position 33 à la position 125. Une délétion de ces acides aminés conduit à une protéine p53 démise d'une partie de son domaine de transactivation ainsi que du domaine de liaison à l'ADN. Cette dernière caractéristique est favorable à la perte d'activité de p53 (Olivier et al. 2010).

Les résultats de western blot, bien qu'aléatoires concernant la détection de cette protéine de taille réduite, sont en accord avec cette observation. Là encore, dans les lignées KO pour le gène *TP53*, la forme sauvage de la protéine n'est pas détectable.

Concernant la capacité des cellules à croître en agar mou, les premiers résultats étaient concordants avec ceux obtenus avec le modèle de transformation par la voie des lentivirus. C'est-à-dire l'absence de capacité à former des colonies et donc pas de phénotype tumoral pour les cellules exprimant seulement *BCR-ABL1* ou *BCR-ABL1* ainsi qu'une inactivation de p53. Ces expériences de croissance en agar mou ont été réalisées en continu tout au long du projet afin de surveiller le comportement des cellules au cours du temps et des étapes de transformation. Ainsi il s'est avéré que toutes les lignées cellulaires, obtenues par la voie CRISPR-Cas9 ou par la voie lentivirale, ont acquises la capacité à former des colonies en agar mou, soit un comportement de cellule cancéreuse. Or ce phénotype est celui sur lequel repose le crible qui doit être réalisé lors de la suite de ce projet. Il n'était ainsi plus envisageable d'utiliser ces lignées cellulaires pour appliquer la banque d'ARN guide GeCKOv2. L'application de cette banque sur des cellules partiellement transformées mais n'ayant pas de phénotype tumoral devait nous permettre de déterminer quels sont les gènes, qui lorsqu'ils sont délétés, conduisent à une transformation totale des cellules. Avec comme hypothèse que ces gènes en question sont alors impliqués dans l'évolution de la LMC.

Plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer la dérive des lignées cellulaires. La première est liée à l'immortalisation des cellules par *hTERT*. En effet, les cellules immortalisées peuvent se diviser en culture sur un temps illimité. Or la culture cellulaire et les conditions de culture cellulaire constituent en soi un stress pour les cellules (Halliwell 1986). Un argument en faveur d'un stress lié à la simple culture des cellules BJ-5ta, c'est la détection de la protéine

p53 de façon constitutive sans nécessité de stresser au préalable les cellules (figures 42 et 43). Après application d'un stress, il y a une détection encore plus importante de la protéine (figure 55). Mais déjà, physiologiquement, dans les conditions standard de culture, cette protéine est détectée, ce qui est indicateur d'un état de stress. Les cellules peuvent alors accumuler des mutations au cours du temps sans que ceci ne modifie leur morphologie ou leur comportement en conditions de culture standard. Tout au long de ma thèse, j'ai cultivé ces cellules dans les conditions standard et n'ai pas observé de changement dans leur comportement. Mais j'ai aussi cultivé ces cellules en leur imposant une contrainte liée au support : la culture en agar mou. Par ces conditions de culture en revanche, j'ai observé un changement de comportement des cellules qui au cours du temps formaient de plus en plus de colonies et de taille de plus en plus importante (résultats non montrés).

Une autre hypothèse est liée à la présence de la séquence codante de la protéine Cas9 dans le génome de ces cellules. Bien que ce gène soit sous le contrôle d'un promoteur inducible à la doxycycline et nécessite l'apport d'un ARN guide pour couper l'ADN, il est possible que le système échappe aux contrôles mis en place. En effet, il a été observé une fuite du promoteur puisque la protéine Cas9 peut être détectée dans les cellules même en absence d'activation par la doxycycline. Même si cette détection est de faible intensité, la présence de la Cas9 constitue un premier biais à l'utilisation de ce système. De plus les ARN guides correspondent à de petits ARN non codants. Justement le génome humain code pour de très nombreux petits ARN non codants. Ajouter le fait que la Cas9 puisse être aspécifique, il s'agit là d'un système qui est capable d'induire des coupure double brin dans le génome des cellules en culture et ce de façon constitutive. Une telle activité de la Cas9 n'a pas été rapportée dans la littérature. Cette activité n'a pas non plus été vérifiée dans les cellules. Pour appuyer ces propos, une expérience de détection des SNP pourrait apporter des réponses quant-au taux de mutation dans les cellules en culture en fonction du temps ou en comparant les lignées entre elles. Par exemple comparer le génome des cellules BJ-5ta au génome des cellules BJ_Cas9i_BlastR. Ou encore les génomes de cellules BJ_Cas9i_BlastR à différents temps de culture.

Une autre possibilité à envisager est tout simplement celle d'un biais de manipulation ou dans les conditions de culture et qui favoriseraient la division des cellules. Le lot de sérum utilisé au cours de ma thèse n'a pas changé, il est donc peu probable que les changements observés dans le comportement des cellules soit lié à cet élément. Un problème dû aux conditions de culture en termes de température et d'oxygénation semble également peu envisageable étant donné que les réglages de l'étuve restent les mêmes au cours du temps. Cependant, les expériences de

croissance en agar mou ont été réalisées dans une autre étuve pour éliminer définitivement cette source.

Le milieu DMEM qui sert de base à la fabrication du milieu de culture en agar mou a été changé. Il s'agit d'une poudre qui est commandée au même fournisseur et qui possède la même référence (Gibco® by Life Technologies™ n°51100-039). Cependant ceci reste une possibilité. Un argument allant en faveur d'une anomalie des conditions de culture ou de manipulation tient au fait que les lignées cellulaires ayant été congelées très tôt après leur validation et qui ne permettaient la formation d'aucune colonie en agar mou à ce moment-là, avaient acquis cette capacité immédiatement et fortement suite à leur décongélation. Alors que ces mêmes cellules maintenues en culture pour les expérimentations avaient acquis ce phénotype progressivement et plus tardivement en termes de temps de culture.

Quoiqu'il en soit, les cellules BJ-5ta dont le génome de base devait être utilisé pour la construction du modèle de la LMC, semblent inadaptées pour cela. Plusieurs anomalies seront prises en compte pour amélioration lors de la construction du nouveau modèle. La lignée cellulaire utilisée sera la lignée de fibroblastes humains IMR90. Cette lignée est disponible au laboratoire et est bien caractérisée. Elle a notamment déjà été utilisée pour construire un modèle de transformation tumoral via des éléments génétiques définis (Durrieu-Gaillard et al. 2017). Ce modèle n'a pas montré, comme les BJ-5ta, l'acquisition d'un phénotype tumoral au cours de temps. Mais seulement au cours de la transformation.

Une nouvelle stratégie quant-au système CRISPR-Cas9 est également envisagée. Préalablement durant ce projet, la séquence codante de la Cas9 était intégrée dans le génome des cellules sous contrôle d'un promoteur inductible. L'ARN guide était lui apporté par transfection sous forme d'un plasmide d'expression. La nouvelle stratégie consistera à apporter le système CRISPR-Cas9 directement sous sa forme ribonucléoprotéique dans les cellules (S. Kim et al. 2014; Liang et al. 2015). Autrement dit, la forme protéique de la Cas9 et l'ARN guide seront complexé suite à une réaction d'hybridation in-vitro puis électroporés dans les cellules (4-D Nucleofector®). Cette stratégie est bien maîtrisée par le laboratoire partenaire et a déjà été appliqué efficacement par notre propre laboratoire dans le cadre d'un autre projet visant à interrompre l'expression des gènes *TP53* et *RBI* dans des cellules hématopoïétiques. Par cette voie les KO des gènes *TP53* et *RBI* pourront donc être réalisés par le système CRISPR-Cas9, exprimé de façon très transitoire, sans risques d'intégration de la séquence codante de l'un de ces deux éléments dans le génome des cellules.

Cette stratégie pourra également être développée afin d'induire la translocation entre les chromosomes 9 et 22. Il sera nécessaire de déterminer l'efficacité d'une double électroporation des formes ribonucléoprotéiques au préalable. En parallèle la stratégie d'intégration de la séquence codante de *BCR-ABL1* par la voie lentivirale est maintenue. Là encore des mises au point sont apportées avec la construction d'un nouveau vecteur pour la production des particules virales. Avec ce nouveau vecteur, le gène de sélection ne sera plus un gène de fluorescence (Tomato) qui est sous contrôle de son propre promoteur, mais le gène de résistance à l'hygromycine qui sera sous le contrôle du même promoteur que *BCR-ABL1* (figure 46). De plus, une séquence 3xFLAG a été ajoutée en amont de la séquence codante de *BCR-ABL1* et constitue une stratégie supplémentaire pour la détection de la protéine BCR-ABL1. De cette façon, la protéine pourra être détectée par un anticorps dirigé contre l'épitope FLAG en plus des anticorps dirigés contre les protéines BCR et ABL1 (figures 47 et 48). Ceci permet notamment de passer outre les défauts de détections rencontrés précédemment lors des western blot et d'être certain de l'identité de la protéine mise en évidence. Ce nouveau vecteur d'expression (p197_hygro_3xFLAG_Bcr-Abl1) a été testé en transfection transitoire dans des cellules Hela. Plusieurs informations ont alors été mises en évidence.

Tout d'abord l'ajout d'un 3xFLAG en N-terminal de la protéine BCR-ABL1 permet effectivement une validation supplémentaire de la présence de la protéine. Mais surtout, les expériences d'expression réalisées dans les cellules Hela mettent en évidence la production d'une protéine de la taille attendue aussi bien avec le premier vecteur p252_BcrAbl1, qu'avec le vecteur p197_hygro_3xFLAG_Bcr-Abl1. Ces résultats ont ainsi validé l'anomalie liée à l'utilisation des cellules BJ-5ta puisque dans ces dernières, l'oncoprotéine complète n'a été détectée qu'en très faible quantité et sur une courte période. Mais ce fut essentiellement une oncoprotéine tronquée qui a été révélée.

L'ajout d'hygromycine au milieu de culture des cellules a aussi montré l'efficacité du système de sélection. Les cellules Hela ayant reçu le plasmide p197_hygro_3xFLAG_Bcr-Abl1 montrent une résistance à cet antibiotique alors que les cellules n'ayant pas reçu ce plasmide sont toutes mortes sous l'action de ce traitement. C'est donc une sélection par un antibiotique qui permettra de sélectionner les cellules IMR90 exprimant l'oncogène *BCR-ABL1*. Etant donné la fragilité de ces cellules, une sélection par antibiotique plutôt qu'un passage en cytométrie permettra une meilleure sélection et une amplification plus rapide des cellules.

Chapitre 2

Les cellules BJ-5ta sauvages ($TP53^{WT}$) et les cellules BJ-5ta_p53⁻ ($TP53^{KO}$) servent de base à l'étude comparative permettant d'identifier de nouveaux gènes cibles de p53. Ceci est réalisé suite à un traitement par la nutline-3a, qui stabilise p53 dans les cellules traitées.

Cette expérience de traitement des cellules $TP53^{WT}$ et $TP53^{KO}$ à la même dose de nutline-3a et sur une même durée, permet plusieurs constats.

Premièrement cette molécule peut être utilisée pour étudier spécifiquement l'activation de p53 dans les cellules BJ-5ta. En effet, le fait qu'un seul gène subisse une régulation de sa transcription dans les cellules $TP53^{KO}$ ayant été traitées à nutline-3a, montre la grande spécificité de cette drogue pour sa cible : l'interaction entre p53 et son inhibiteur MDM2. Ainsi, les régulations transcriptionnelles observées pour les cellules $TP53^{WT}$ seront liées spécifiquement à l'activation de p53 seule.

Ensuite, pour la lignée $TP53^{WT}$ traitée à la nutline-3a, l'analyse des résultats de séquençage par le logiciel « STRING DB : Functional protein association network » (<https://string-db.org/>) accessible gratuitement en ligne, ne montre pas une activation de toutes les voies de signalisation régulées par p53. Une voie en particulier n'est pas activée dans cette expérience, celle impliquée dans la réparation de l'ADN. Il est plutôt logique que le traitement à la nutline-3a n'induit pas l'activation de la transcription des gènes impliqués dans cette voie puisque cette molécule n'induit pas de mutation dans l'ADN.

Il sera alors intéressant de réaliser un nouveau séquençage des ARN après avoir traité les cellules $TP53^{WT}$ et $TP53^{KO}$ à la doxorubicine. En effet, cette molécule agit comme intercalant de l'ADN et provoque donc des cassures double-brin (Meredith and Dass 2016). Ce stress génotoxique lié à la drogue induit une augmentation de l'expression de p53. Ceci a déjà été utilisé et démontré au laboratoire sur les cellules BJ-5ta. Cette expérience permettrait de mettre en évidence de nouveaux gènes cibles de p53 qui ne seraient pas activés lors d'un traitement à la nutline-3a ou de confirmer certains gènes nouvellement identifiés. Quoiqu'il en soit, se reposer sur une même expérience réalisée à partir de deux molécules ayant un mécanisme d'action différent serait une base solide à l'identification de nouveaux gènes cibles de p53. Là encore, le traitement des cellules $TP53^{KO}$ permettra d'éliminer les faux positifs dans la liste des transcrits identifiés par le séquençage.

Il me semble maintenant important de réaliser la même démarche expérimentale dans d'autres lignées de cellules humaines exprimant la forme sauvage du gène $TP53$. Le laboratoire possède

des cellules IMR90, décrites précédemment, ainsi que des cellules MCF10A. Ces dernières sont des cellules épithéliales de glande mammaire non-tumorigéniques et expriment la protéine p53 sous sa forme sauvage. Dans chacune de ces deux lignées cellulaires, il faudra réaliser le KO du gène *TP53* via le système CRISPR-Cas9 : IMR90_ *TP53*^{KO} et MCF10A_ *TP53*^{KO}. Le traitement de ces différentes lignées cellulaires à la nutline-3a d'une part et à la doxorubicine d'autre part, suivi d'une analyse transcriptomique permettra de valider les nouveaux gènes identifiés comme cibles de p53. Une analyse portée sur plusieurs lignées cellulaires humaines non tumorales et exprimant la forme sauvage de p53, constitue un outil idéal pour mesurer la reproductibilité des résultats obtenus à partir des BJ-5ta *TP53*^{WT} et *TP53*^{KO}.

Une autre démarche doit également être adoptée pour l'analyse transcriptomique. En effet, les expériences d'activation au cours du temps ont mis en évidence une activation de la transcription des gènes cibles directes de p53 visible dès 1 heure 30 de traitement à la nutline-3a (figure 53). Concernant les gènes cibles indirectes de p53, l'activation de la transcription n'est visible que 6 heures après traitement à la nutline-3a (figure 54).

Or, notre propre analyse transcriptomique a été menée sur des cellules ayant subi un traitement de 24 heures à la nutline-3a. Ce sont donc les cibles directes et indirectes qui sont mises en évidence. Et effectivement, l'analyse individuelle de l'activation de la transcription au cours du temps de certains des 50 gènes identifiés lors de notre séquençage montre qu'il s'agit de cibles indirectes. L'augmentation de leur transcription n'étant pas visible avant 6 heures de traitement.

Il sera donc nécessaire de réaliser une analyse transcriptomique sur des cellules traitées à la nutline-3a sur des temps plus courts. Un traitement de 2 heures avant extraction des ARN totaux devrait permettre une identification des cibles directes de p53 seulement. Des résultats préliminaires sont d'ailleurs disponibles pour cette démarche pour les cellules BJ-5ta *TP53*^{WT} +/- nutline-3a à 8µM durant 2 heures. Leur analyse est en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit.

Déterminer les temps de traitement à la nutline-3a nécessaires pour constater une activation de la transcription des gènes cibles directes de p53 sera également nécessaire pour les cellules IMR90 et MCF10A avant de réaliser les analyses transcriptomiques. Il faudra également faire cette démarche pour les cellules BJ-5ta, IMR90 et MCF10A traitées à la doxorubicine.

Une autre information révélée par les résultats obtenus lors du séquençage des transcrits extraits des cellules BJ-5ta *TP53*^{KO}, c'est l'activation de la transcription du gène *CXCL8* dans ces cellules suite à un traitement de 24 heures à 8µM de nutline-3a. L'étude de la transcription de ce gène dans les cellules BJ-5ta *TP53*^{KO} au cours du temps lors d'un traitement à la nutline-3a montre que l'activation de la transcription est visible dès 1 heure de traitement. En comparaison, dans la lignée *TP53*^{WT}, il n'y a pas de véritable changement visible au cours du temps, sauf après 24 heures de traitement. Il y a alors une forte diminution de la transcription de ce gène. Soit une réponse opposée à celle obtenue dans la lignée *TP53*^{KO} après 24 heures de traitement. On peut alors supposer une répression du promoteur *CXCL8* par la forme sauvage de p53. Cette supposition a d'ailleurs déjà été rapportée par (Yeudall et al. 2012). Cette répression étant mesurable seulement après 24 heures de traitement, c'est l'hypothèse d'une répression indirecte qui est privilégiée.

Une disruption du gène *TP53* suivie d'une analyse de la transcription du gène *CXCL8* dans les IMR90 et MCF10A, WT et KO pour p53, avec et sans traitement à la nutline-3a permettra de confirmer ce résultat. Cela montrera surtout si la réponse en particulier observée pour ce gène est liée spécifiquement au traitement à la nutline-3a des cellules qui n'expriment plus la protéine p53.

Car finalement l'étude du gène *CXCL8*, qui code pour la protéine Il-8, et de son lien avec le KO du gène *TP53* semble être une piste à approfondir et dont les mécanismes et liens sont à comprendre. En effet, une relation a déjà été établie entre ces deux protéines Il-8 et p53 (Yeudall et al. 2012; Hidaka et al. 2005). En revanche, dans mes résultats, je n'observe pas de surexpression de *CXCL8* suite à l'inactivation de *TP53* seule, mais après ajout d'un traitement à la nutline-3a. Par conséquent, ces résultats indiquent plutôt un rôle répresseur de p53 dans la transcription de *CXCL8*. Rôle aboli lors du KO de p53.

La relation entre ces deux protéines est d'autant plus intéressante que le gène *CXCL8* est exprimé de façon constitutive dans la plupart des cellules cancéreuses humaines (Ishiko et al. 1995). Et une inactivation de p53 est rapportée dans la plupart de cancers également, comme décrit précédemment. L'expression d'Il-8 semble augmenter le potentiel métastatique de ces cellules et semble impliquée dans des processus responsables de la progression de nombreux cancers (S. J. Kim et al. 2001; Shi et al. 1999; Singh et al. 1994; Luca et al. 1997). Il-8 semble ainsi fonctionner comme facteur de croissance autocrine pour les cellules cancéreuses (Zhu et al. 2004; Xu and Fidler 2000). La signalisation médiée par Il-8 favorise de cette façon la

prolifération, l'angiogenèse, la migration, l'invasion et la survie cellulaire (Campbell, Maxwell, and Waugh 2013).

Dans leur étude, (De Larco et al. 2003) ont mis en évidence une relation entre l'état de méthylation du promoteur de *CXCL8*, l'expression d'Il-8 et le potentiel métastatique. Suite aux résultats obtenus concernant la transcription de ce gène, j'ai voulu identifier si ces méthylations pouvaient également être mise en évidence dans les lignées cellulaires étudiées : BJ-5ta *TP53*^{KO} par rapport à la lignée de référence BJ-5ta *TP53*^{WT}. Cependant le temps nécessaire à la mise au point de cette expérience manquant, je n'ai pas de résultats à présenter.

Des études reposant sur une lignée cellulaire cancéreuse mais exprimant la forme sauvage de p53 semble indispensable. Dans ce cas, une disruption du gène *TP53* permettra d'observer le comportement des cellules quant à la transcription du gène *CXCL8* et leur potentiel invasif. De même, réaliser un sauvetage de l'expression de p53 dans les cellules *TP53*^{KO}, en permettant aux cellules d'exprimer à nouveau ce gène sous sa forme sauvage, permettra également de constater si une perte de la transcription de *CXCL8* est obtenue. De la même façon, il sera possible de faire s'exprimer une forme mutée de p53 pour constater des conséquences de la mutation en question.

Enfin, deux récepteurs d'Il-8 sont identifiés : CXCR1 et CXCR2. La présence de ces récepteurs dans les cellules BJ-5ta n'a pas été contrôlée. Vérifier leur présence semble nécessaire dans le cas d'une étude de la voie Il-8.

Finalement, la détection de la protéine Il-8 elle-même sera nécessaire. Car outre la détection de l'ANRm lui correspondant, la présence de la protéine doit être démontrée afin de valider son activité. Les anticorps utilisés sur les extraits totaux ne permettent pas la détection d'Il-8 dans mes conditions expérimentales de western blot. Il-8 étant une protéine sécrétée, sa détection dans le milieu de culture des cellules par la méthode ELISA sera à mettre au point. Cette méthode est souvent rapportée dans la littérature (Hidaka et al. 2005; De Larco et al. 2003; S. J. Kim et al. 2001; Zhu et al. 2004).

Avec les cellules BJ-5ta qui ont déjà été exploitées, des expériences réalisées sur les MCF10A et les IRM90 permettrait une étude fiable des gènes cibles de p53 et du gène *CXCL8*, reposant sur trois modèles cellulaires non tumoraux indépendants.

Bibliographie

- Abbas, Tarek, and Anindya Dutta. 2009. "P21 in Cancer: Intricate Networks and Multiple Activities." *Nature Reviews Cancer* 9 (6): 400–414. <https://doi.org/10.1038/nrc2657>.
- Adimoolam, S., and J. M. Ford. 2002. "P53 and DNA Damage-Inducible Expression of the Xeroderma Pigmentosum Group C Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (20): 12985–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.202485699>.
- Afar, D E, a Goga, J McLaughlin, O N Witte, and C L Sawyers. 1994. "Differential Complementation of Bcr-Abl Point Mutants with c-Myc." *Science (New York, N.Y.)* 264 (5157): 424–26. <https://doi.org/10.1126/science.8153630>.
- Agarwal, M L, A Agarwal, W R Taylor, and G R Stark. 1995. "P53 Controls Both the G2/M and the G1 Cell Cycle Checkpoints and Mediates Reversible Growth Arrest in Human Fibroblasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (18): 8493–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8493>.
- Ahuja, H.G, P.S Jat, A Foti, M Eli-Bar, and M.J Cline. 1991. "Abnormalities of the Retinoblastoma Gene in the Pathogenesis of Acute Leukemia." *Blood* 78 (12): 3259–68.
- Ahuja, H, M Bar-Eli, S H Advani, S Benchimol, and M J Cline. 1989. "Alterations in the P53 Gene and the Clonal Evolution of the Blast Crisis of Chronic Myelocytic Leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (17): 6783–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6783>.
- Albers, Joachim, Claudia Danzer, Markus Rechsteiner, Holger Lehmann, Laura P. Brandt, Tomas Hejhal, Antonella Catalano, et al. 2015. "A Versatile Modular Vector System for Rapid Combinatorial Mammalian Genetics." *Journal of Clinical Investigation* 125 (4): 1603–19. <https://doi.org/10.1172/JCI79743>.
- Baker, Suzanne J., Eric R. Fearon, Janice M. Nigro, Stanley R. Hamilton, Ann C. Preisinger, J. Milburn Jessup, Peter VanTuinen, et al. 1989. "Chromosome 17 Deletions and P53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas." *Science* 244: 217–21. <https://doi.org/10.1126/science.2649981>.
- Barak, Yaacov, Tamar Juven, Rebecca Haffner, and Moshe Oren. 1993. "Mdm2 Expression Is Induced By Wild Type P53 Activity." *The EMBO Journal* 12 (2): 461–68.
- Bargonetti, J, P N Friedman, S E Kern, B Vogelstein, and C Prives. 1991. "Wild-Type but Not Mutant P53 Immunopurified Proteins Bind to Sequences Adjacent to the SV40 Origin of Replication." *Cell* 65: 1083–1091.
- Beck, Zoltan, Attila Kiss, Ferenc D Toth, Judith Szabo, Attila Bacsi, Erzsebet Balogh, Agnes Borbely, et al. 2000. "Alterations of P53 and RB Genes and the Evolution of the Accelerated Phase of Chronic Myeloid Leukemia." *Leuk Lymphoma* 38 (5–6): 587–97. <https://doi.org/10.3109/10428190009059278>.
- Beggs, Andrew D., Angela Jones, Mona El-Bahwary, Muti Abulafi, Shirley V. Hodgson, and Ian P M Tomlinson. 2013. "Whole-Genome Methylation Analysis of Benign and Malignant Colorectal

- Tumours.” *Journal of Pathology* 229 (5): 697–704. <https://doi.org/10.1002/path.4132>.
- Belyi, V A, P Ak, E Markert, H Wang, W Hu, A Puzio-Kuter, and A J Levine. 2010. “The Origins and Evolution of the P53 Family of Genes.” *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (6): a001198. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001198>.
- Biernaux, C, M Loos, a Sels, G Huez, and P Stryckmans. 1995. “Detection of Major Bcr-Abl Gene Expression at a Very Low Level in Blood Cells of Some Healthy Individuals.” *Blood* 86 (8): 3118–22.
- Blick, M, P Romero, M Talpaz, R Kurzrock, M Shtalrid, B Andersson, J Trujillo, M Beran, and J Gutterman. 1987. “Molecular Characteristics of Chronic Myelogenous Leukemia in Blast Crisis.” *Cancer Genet.Cytogenet.* 27: 349–56.
- Bose, Shikha, Michael Deininger, J Gora-Tybor, John M Goldman, and Junia V Melo. 1998. “The Presence of Typical and Atypical BCR-ABL Fusion Genes in Leukocytes of Normal Individuals: Biologic Significance and Implications for the Assessment of Minimal Residual Disease.” *Blood* 92 (9): 3362–67. <https://doi.org/3362-3367>.
- Bourdon, Jean-christophe, Kenneth Fernandes, Fiona Murray-zmijewski, Geng Liu, Alexandra Diot, Dimitris P Xirodimas, Mark K Saville, and David P Lane. 2005. “P53 Isoforms Can Regulate P53 Transcriptional Activity.” *Genes & Development* 9: 2122–37. <https://doi.org/10.1101/gad.1339905.least>.
- Brooks, Christopher L., and Wei Gu. 2006. “P53 Ubiquitination: Mdm2 and Beyond.” *Molecular Cell* 21 (3): 307–15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.020>.
- Bunz, F, A Dutriaux, C Lengauer, T Waldman, S Zhou, J. P Brown, J. M Sedivy, K. W Kinzler, and B Vogelstein. 1998. “Requirement for P53 and P21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage.” *Science* 282 (5393): 1497–1501. <https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1497>.
- Burgering, B. M T, and G. J P L Kops. 2002. “Cell Cycle and Death Control: Long Live Forkheads.” *Trends in Biochemical Sciences* 27 (7): 352–60. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02113-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02113-8).
- Cam, Laurent Le, K Linares, Conception Paul, Eric Julien, Matthieu Lacroix, Elodie Hatchi, Laurent Le Cam, et al. 2006. “E4F1 Is an Atypical Ubiquitin Ligase That Modulates P53 Effector Functions Independently of Degradation.” *Cell* 127: 775–88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.031>.
- Campbell, Laura M., Pamela J. Maxwell, and David J J Waugh. 2013. *Rationale and Means to Target Pro-Inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer. Pharmaceuticals*. Vol. 6. <https://doi.org/10.3390/ph6080929>.
- Carlesso, Nadia, David A Frank, and James D Griffin. 1996. “Tyrosyl Phosphorylation and DNA Binding Activity of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Proteins in Hematopoietic Cell Lines Transformed by Bcr/Abl.” *Journal of Experimental Medicine* 183 (3): 811–20. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.811>.
- Chen, Jiandong, Xiangwei Wu, Jiayuh Lin, and Arnold J Levine. 1996. “Mdm-2 Inhibits the G 1 Arrest and Apoptosis Functions of the P53 Tumor Suppressor Protein.” *Molecular and Cellular Biology*

16 (5): 2445–52.

- Choi, Peter S., and Matthew Meyerson. 2014. “Targeted Genomic Rearrangements Using CRISPR/Cas Technology.” *Nature Communications* 5. Nature Publishing Group: 1–6. <https://doi.org/10.1038/ncomms4728>.
- Clarke, Cassie J., and Tessa L. Holyoake. 2017. “Preclinical Approaches in Chronic Myeloid Leukemia: From Cells to Systems.” *Experimental Hematology* 47. ISEH - International Society for Experimental Hematology: 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.11.005>.
- Cong, Le, F Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D Hsu, et al. 2013. “Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems.” *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 819–23. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
- Corbin, Amie S., Elisabeth Buchdunger, Furet Pascal, and Brian J. Druker. 2002. “Analysis of the Structural Basis of Specificity of Inhibition of the Abl Kinase by STI571.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 32214–19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111525200>.
- Craig, Ashley L, Lindsay Burch, Borek Vojtesek, Jaroslava Mikutowska, Alastair Thompson, and Ted R Hupp. 1999. “Novel Phosphorylation Sites of Human Tumour Suppressor Protein P53 at Ser20 and Thr18 That Disrupt the Binding of Mdm2 (Mouse Double Minute 2) Protein Are Modified in Human Cancers.” *The Biochemical Journal* 342: 133–41. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3420133>.
- Daley, George Q, Richard a V a N Erren, and David Baltimore. 2002. “Induction of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice by the P210bcr/Abl Gene of the Philadelphia Chromosome.” *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 247: 111–35.
- Daley, George Q, Richard A Van Etten, and David Baltimore. 1990. “Induction of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice by the P210BCR/ABL Gene of the Philadelphia Chromosome.” *Science* 247: 824–30. <https://doi.org/10.1097/00000478-200405000-00023>.
- Daley, George Q, Jami Mclaughlin, Owen N Witte, and David Baltimore. 1987. “The CML-Specific P210 Berlabl Protein , Unlike v-Abl , Toxic Does Not Transform NIH / 3T3 Fibroblasts.” *Science* 237 (10): 532–35.
- Danisz, Katarzyna, and Janusz Blasiak. 2013. “Role of Anti-Apoptotic Pathways Activated by BCR/ABL in the Resistance of Chronic Myeloid Leukemia Cells to Tyrosine Kinase Inhibitors.” *Acta Biochimica Polonica* 60 (4): 503–14.
- Deininger, Michael W N, John M Goldman, and Junia V Melo. 2000. “The Molecular Biology of Chronic Myeloid Leukemia” 96 (10): 3343–57.
- Deutsch, Eric, Aymeric Dugray, Bassam AbdulKarim, Elisabetta Marangoni, Laurence Maggiorella, Sabine Vaganay, Radia M’Kacher, et al. 2001. “BCR-ABL down-Regulates the DNA Repair Protein DNA-PKcs.” *Blood* 97 (7): 2084–90. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.7.2084>.
- Deutsch, Eric, Sylvie Jarrousse, Dorothée Buet, Aymeric Dugray, M arie-Laure Bonnet, Marie-Catherine Vozenin-Brotons, François Guilhot, Ali G Turhan, Jean Feunteun, and Jean Bourhis.

2003. "Down-Regulation of BRCA1 in BCR-ABL-Expressing Hematopoietic Cells." *Blood* 101 (11): 4583–88. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3011>.
- Dierov, Jamil, Raia Dierova, and Martin Carroll. 2004. "BCR/ABL Translocates to the Nucleus and Disrupts an ATR-Dependent Intra-S Phase Checkpoint." *Cancer Cell* 5 (3): 275–85. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00056-X).
- Donato, Nicholas J., Ji Yuan Wu, Jonathan Stapley, Gary Gallick, Hui Lin, Ralph Arlinghaus, and Moshe Talpaz. 2003. "BCR-ABL Independence and LYN Kinase Overexpression in Chronic Myelogenous Leukemia Cells Selected for Resistance to STI571." *Blood* 101 (2): 690–98. <https://doi.org/10.1182/blood.V101.2.690>.
- Dötsch, V., F. Bernassola, D. Coutandin, E. Candi, and G. Melino. 2010. "P63 and P73, the Ancestors of P53." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (9): 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004887>.
- Druker, Brian J, Charles L Sawyers, Hagop Kantarjian, Debra J Resta, Sofia Fernandes Reese, John M Ford, Capdeville Renaud, and Moshe Talpaz. 2001. "Activity of a Specific Inhibitor of the Bcr-Abl Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the Philadelphia Chromosome." *The New England Journal of Medicine* 344 (14): 1038–42.
- Druker, Brian J, Moshe Talpaz, Debra J Resta, Bin Peng, Elisabeth Buchdunger, John M Ford, Nicholas B Lydon, et al. 2001a. "Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the Bcr-Abl Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia." *English Journal* 344 (14): 1031–37. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401>.
- Durrieu-Gaillard, Stéphanie, Hélène Dumay-Odelot, Galina Boldina, Nicolas J. Tourasse, Delphine Allard, Fabrice André, Françoise Macari, et al. 2017. "Regulation of RNA Polymerase III Transcription during Transformation of Human IMR90 Fibroblasts with Defined Genetic Elements." *Cell Cycle* 4101. Taylor & Francis: 1–11. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1405881>.
- Efeyan, Alejo, Ana Ortega-Molina, Susana Velasco-Miguel, Daniel Herranz, Lyubomir T. Vassilev, and Manuel Serrano. 2007. "Induction of P53-Dependent Senescence by the MDM2 Antagonist Nutlin-3a in Mouse Cells of Fibroblast Origin." *Cancer Research* 67 (15): 7350–57. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0200>.
- El-Deiry, Wafik S., Scott E. Kern, Jennifer A. Pietenpol, Kenneth W. Kinzler, and Bert Vogelstein. 1992. "Definition of a Consensus Binding Site for P53." *Nature Genetics* 1 (1): 45–49. <https://doi.org/10.1038/ng0492-45>.
- Engeland, Kurt. 2017. "Cell Cycle Arrest through Indirect Transcriptional Repression by P53: I Have a DREAM." *Cell Death and Differentiation* 25 (1). Nature Publishing Group: 114–32. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.172>.
- Enriquez-Rios, Vanessa, Lavinia C. Dumitrache, Susanna M. Downing, Yang Li, Eric J. Brown, Helen

- R. Russell, and Peter J. McKinnon. 2017. "DNA-PKcs, ATM, and ATR Interplay Maintains Genome Integrity during Neurogenesis." *The Journal of Neuroscience* 37 (4): 893–905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4213-15.2017>.
- Era, Takumi, and Owen N Witte. 2000. "Regulated Expression of P210 Bcr-Abl during Embryonic Stem Cell Differentiation Stimulates Multipotential Progenitor Expansion and Myeloid Cell Fate." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (4): 1737–42. <https://doi.org/97/4/1737> [pii].
- Faderl, Stefan, Moshe Talpaz, Zeev Estrov, Susan O'Brien, Razelle Kurzrock, and Hagop M Kantarjian. 1999. "The Biology of Chronic Myeloid Leukemia." *The New England Journal of Medicine*.
- Fainstein, E., C. Marcelle, A. Rosner, E. Canaani, R. P. Gale, O. Drezzen, S. D. Smith, and C. M. Croce. 1987. "A New Fused Transcript in Philadelphia Chromosome Positive Acute Lymphocytic Leukaemia." *Nature* 330 (6146): 386–88. <https://doi.org/10.1038/330386a0>.
- Feinstein, E, G Cimino, R P Gale, G Alimena, R Berthier, K Kishi, J Goldman, a Zaccaria, a Berrebi, and E Canaani. 1991. "P53 in Chronic Myelogenous Leukemia in Acute Phase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (14): 6293–97.
- Fernández-Medarde, Alberto, and Eugenio Santos. 2011. "Ras in Cancer and Developmental Diseases." *Genes and Cancer* 2 (3): 344–58. <https://doi.org/10.1177/1947601911411084>.
- Fischer, M. 2017. "Census and Evaluation of P53 Target Genes." *Nature Publishing Group* 36 (28). Nature Publishing Group: 3943–56. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.502>.
- Freed-pastor, William a, and Carol Prives. 2012. "Mutant P53 : One Name , Many Proteins." *Genes & Development* 26: 1268–86. <https://doi.org/10.1101/gad.190678.112>.
- Freedman, D A, L Wu, and A J Levine. 1999. "Functions of the MDM2 Oncoprotein." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 55: 96–107.
- Freedman, Deborah A, and Arnold J Levine. 1998. "Nuclear Export Is Required for Degradation of Endogenous P53 by MDM2 and Human Papillomavirus E6." *Molecular and Cellular Biology* 18 (12): 7288–93.
- Friedrich, M J. 2003. "Scientists Probe Cancer Cell Resistance: New Insights May Help Development of New Drugs." *Medical News and Perspectives* 290 (11): 1435–37. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13129965.
- Fruman, David A., Rachel E. Meyers, and Lewis C. Cantley. 1998. "Phosphoinositide Kinases." *Annu. Rev. Biochem.* 67: 481–507. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.481>.
- Fu, Lining, Mark D Minden, and Sam Benchimol. 1996. "Translational Regulation of Human P53 Gene Expression." *The EMBO Journal* 15 (16): 4392–4401.
- Garin, Marina I, Jane F Apperley, and Junia V Melo. 2000. "Ex Vivo Expansion and Characterisation of CD34 + Cells Derived from Chronic Myeloid Leukaemia Bone Marrow and Peripheral Blood , and from Normal Bone Marrow and Mobilised Peripheral Blood." *Eur J Haematol* 64: 85–92.
- Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. 2012. "Cas9-CrRNA Ribonucleoprotein Complex Mediates Specific DNA Cleavage for Adaptive Immunity in Bacteria." *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences* 109 (39): E2579–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.
- Gesbert, Franck, James D Griffin, and Washington Dc. 2000. “Bcr / Abl Activates Transcription of TheBcl-X Gene through STAT5.” *Blood* 96 (6): 2269–76.
- Giannakakou, Paraskevi, Dan L Sackett, Yvona Ward, Kevin R Webster, Mikhail V Blagosklonny, and Tito Fojo. 2000. “P53 Is Associated with Cellular Microtubules and Is Transported to the Nucleus by Dynein.” *Nature Cell Biology* 2 (October).
- Gorre, Mercedes E, Mansoor Mohammed, Katharine Ellwood, Nicholas Hsu, P Nagesh Rao, and Charles L Sawyers. 2010. “Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by Gene Mutation or BCR-ABL Amplification.” *Advancement Of Science* 293 (5531): 876–80. <https://doi.org/10.1126/science.1062538>.
- Guernet, Alexis, Sathish Kumar Mungamuri, Dorthé Cartier, Ravi Sachidanandam, Anitha Jayaprakash, Sahil Adriouch, Myriam Vezain, et al. 2016. “CRISPR-Barcoding for Intratumor Genetic Heterogeneity Modeling and Functional Analysis of Oncogenic Driver Mutations.” *Molecular Cell* 63 (3): 526–38. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.017>.
- Hahn, W C, C M Counter, a S Lundberg, R L Beijersbergen, M W Brooks, and R a Weinberg. 1999. “Creation of Human Tumour Cells with Defined Genetic Elements.” *Nature* 400 (6743): 464–68. <https://doi.org/10.1038/22780>.
- Hahn, W C, S K Dessain, M W Brooks, J E King, B Elenbaas, D M Sabatini, J A DeCaprio, and R A Weinberg. 2002. “Enumeration of the Simian Virus 40 Early Region Elements Necessary for Human Cell Transformation.” *Mol Cell Biol* 22 (7): 2111–23. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.7.2111>.
- Halliwell, B. 1986. “Biochemistry of Oxidative Stress.” *Biochemical Society Transaction* 25 (12): 1058–71. <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>.
- Hanahan, D, and R A Weinberg. 2000. “The Hallmarks of Cancer.” *Cell* 100 (1): 57–70. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The next Generation.” *Cell* 144 (5). Elsevier Inc.: 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Harrod, A., J. Fulton, V. T.M. Nguyen, M. Periyasamy, L. Ramos-Garcia, C. F. Lai, G. Metodieva, et al. 2017. “Genomic Modelling of the ESR1 Y537S Mutation for Evaluating Function and New Therapeutic Approaches for Metastatic Breast Cancer.” *Oncogene* 36 (16). Nature Publishing Group: 2286–96. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.382>.
- Haupt, Susan, Michael Berger, Zehavit Goldberg, and Ygal Haupt. 2003. “Apoptosis - the P53 Network.” *Journal of Cell Science* 116: 4077–85. <https://doi.org/10.1242/jcs.00739>.
- Haupt, Ygal, Ruth Maya, Anat Kazaz, and Moshe Oren. 1997. “Mdm2 Promotes the Rapid Degradation of P53.” *Nature* 387: 296–99.
- Hay, Nissim, and Nahum Sonenberg. 2004. “Upstream and Downstream of MTOR.” *Biological Chemistry* 381 (5–6): 397–405. <https://doi.org/10.1515/BC.2000.052>.

- Heaney, Conor, Kathryn Kolibaba, Arun Bhat, Tsukasa Oda, Sayuri Ohno, Shane Fanning, and Brian J Druker. 1997. "Direct Binding of CRKL to BCR-ABL Is Not Required for BCR-ABL Transformation." *Blood* 89 (1): 297–306.
- Heisterkamp, Nora, Guido Jenster, Dimitris Kioussis, Paul K. Pattengale, and John Groffen. 1991. "Human Bcr-Abl Gene Has a Lethal Effect on Embryogenesis." *Transgenic Research* 1 (1): 45–53. <https://doi.org/10.1007/BF02512996>.
- Hidaka, H., T. Ishiko, S. Ishikawa, O. Ikeda, S. Mita, T. Iwamura, K. Chijiwa, and M. Ogawa. 2005. "Constitutive IL-8 Expression in Cancer Cells Is Associated with Mutation of P53." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 24 (1): 127–33.
- Honda, Hiroaki, and Hisamaru Hirai. 2001. "Model Mice for BCR/ABL-Positive Leukemias." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 27 (1): 265–78. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2000.0374>.
- Honda, Hiroaki, Toshikazu Ushijima, Kuniko Wakazono, Hideaki Oda, Yuji Tanaka, Shin-ichi Aizawa, and Takatoshi Ishikawa. 2000. "Acquired Loss of P53 Induces Blastic Transformation in P210 Bcr/Abl-Expressing Hematopoietic Cells : A Transgenic Study for Blast Crisis of Human CML." *Blood* 95 (4): 1144–51.
- Horita, Machiko, Enrique Jose Andreu, Adalberto Benito, Cristina Arbona, Cristina Sanz, Isana Benet, Felipe Prosper, and Jose Luis Fernandez-Luna. 2000. "Blockade of the Bcr-Abl Kinase Activity Induces Apoptosis of Chronic Myelogenous Leukemia Cells by Suppressing Signal Transducer and Activator of Transcription 5–Dependent Expression of Bcl-X L." *The Journal of Experimental Medicine* 191 (6): 977–84. <https://doi.org/10.1084/jem.191.6.977>.
- Huettner, Claudia S., Pu Zhang, Richard A. Van Etten, and Daniel G. Tenen. 2000. "Reversibility of Acute B-Cell Leukaemia Induced by BCR-ABL1." *Nature Genetics* 24 (1): 57–60. <https://doi.org/10.1038/71691>.
- Huettner, Claudia S, Steffen Koschmieder, Hiromi Iwasaki, Junko Iwasaki-arai, Hanna S Radomska, Koichi Akashi, and Daniel G Tenen. 2003. "Inducible Expression of BCR / ABL Using Human CD34 Regulatory Elements Results in a Megakaryocytic Myeloproliferative Syndrome." *Blood* 102 (9): 3363–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0768>.Supported.
- Hwang, B J, J M Ford, P C Hanawalt, and G Chu. 1999. "Expression of the P48 Xeroderma Pigmentosum Gene Is P53-Dependent and Is Involved in Global Genomic Repair." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (2): 424–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.424>.
- Ilaria, Robert L., and Richard A. Van Etten. 1996. "P210 and P190 BCR/ABL Induce the Tyrosine Phosphorylation and DNA Binding Activity of Multiple Specific STAT Family Members." *Journal of Biological Chemistry* 271 (49): 31704–10.
- Ilaria, Robert L, and Richard A Van Etten. 1995. "The SH2 Domain of P210 BCR/ABL Is Not Required for the Transformation of Hematopoietic Factor-Dependent Cells." *Blood* 86 (10): 3897–3904.
- Ishiko, Takatoshi, Kiyoshi Sakamoto, Shin-Ichi Yamashita, Yoshihiro Masuda, Hidenobu Kamohara,

- Seije Mita, Mitsuomi Hirashima, and Michio Ogawa. 1995. "Carcinoma Cells Express IL-8 and the IL-8 Receptor : Their Inhibition Attenuates the Growth of Carcinoma Cells." *International Journal of Oncology*, 119–22.
- Jafari, Naser, Hyunju Kim, Rackhyun Park, Liqing Li, Minsu Jang, Andrew J. Morris, Junsoo Park, and Cai Huang. 2017. "CRISPR-Cas9 Mediated Nox4 Knockout Inhibits Cell Proliferation and Invasion in Hela Cells." *PLoS ONE* 12 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170327>.
- Jain, S K, M Susa, M L Keeler, N Carlesso, B Druker, and L Varticovski. 1996. "PI 3-Kinase Activation in BCR/Abl-Transformed Hematopoietic Cells Does Not Require Interaction of P85 SH2 Domains with P210 BCR/Abl." *Blood* 88 (5): 1542–50.
- Jamieson, Catriona H.M., Laurie E. Ailles, Scott J. Dylla, Manja Muijtjens, Carol Jones, James L. Zehnder, Jason Gotlib, et al. 2004. "Granulocyte–Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML." *New England Journal of Medicine* 351 (7): 657–67. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040258>.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. "A Programmable Dual-RNA – Guided" 337 (August): 816–22. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Jinek, Martin, Alexandra East, Aaron Cheng, Steven Lin, Enbo Ma, and Jennifer Doudna. 2013. "RNA-Programmed Genome Editing in Human Cells." *ELife* 2013 (2): 1–9. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>.
- Johansson, Bertil, Thoas Fioretos, and Felix Mitelman. 2002. "Cytogenetic and Molecular Genetic Aspects of Chronic Myeloid Leukaemia." *Acta Haematol.* 107 (4): 76–94. <https://doi.org/65655>.
- Jones, Stephen N, Amy E Roe, Lawrence A Donehower, and Allan Bradley. 1995. "Rescue of Embryonic Lethality in Mdm2-Deficient Mice by Absence of P53." *Nature* 378: 206–8.
- Kaghad, Mourad, Helene Bonnet, Annie Yang, Laurent Creancier, Jean-Christophe Biscan, Alexandre Valent, Adrian Minty, et al. 1997. "Monoallelically Expressed Gene Related to P53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers." *Cell* 90 (4): 809–19. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80540-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80540-1).
- Kandoth, Cyriac, Michael D. McLellan, Mingchao Xie, Qunyuan Zhang, Joshua F McMichael, Matthew A Wyczalkowski, Michael C Wendl, Timothy J Ley, Richard K Wilson, and Benjamin J Raphael. 2014. "Mutational Landscape and Significance across 12 Major Cancer Types." *Nature* 502 (7471): 333–39. <https://doi.org/10.1038/nature12634.Mutational>.
- Kang, Zhi Jie, Yu Fei Liu, Ling Zhi Xu, Zi Jie Long, Dan Huang, Ya Yang, Bing Liu, and Jiu Xing Feng. 2016. "The Philadelphia Chromosome in Leukemogenesis." *Chinese Journal of Cancer*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0>.
- Kantarjian, Hagop M, and Moshe Talpaz. 2001. "Imatinib Mesylate: Clinical Results in Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias." *Semin. Oncol.* 28 (5, Suppl 17): 9–18. <https://doi.org/10.1053/sonc.2001.29184>.

- Kataoka, Keisuke, Yuichi Shiraishi, Yohei Takeda, Seiji Sakata, Misako Matsumoto, Seiji Nagano, Takuya Maeda, et al. 2016. "Aberrant PD-L1 Expression through 3'-UTR Disruption in Multiple Cancers." *Nature* 534 (7607). Nature Publishing Group: 402–6. <https://doi.org/10.1038/nature18294>.
- Kawase, T., H. Ichikawa, T. Ohta, N. Nozaki, F. Tashiro, R. Ohki, and Y. Taya. 2008. "P53 Target Gene AEN Is a Nuclear Exonuclease Required for P53-Dependent Apoptosis." *Oncogene* 27 (27): 3797–3810. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.32>.
- Kelliher, Michelle A., Jami McLaughlin, Owen N. Witte, and Naomi Rosenberg. 1990. "Induction of a Chronic Myelogenous Leukemia-like Syndrome in Mice with v-Abl and BCR/ABL." *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (17): 6649–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.22.9072a>.
- Kelman, Zvi, Miron Prokocimer, Shoshana Peller, Yael Kahn, Gideon Rechavi, Yosef Manor, Amos Cohen, and Varda Rotter. 1989. "Rearrangements in the P53 Gene in Philadelphia Chromosome Positive Chronic Myelogenous Leukemia." *Blood* 74 (7): 2318–24.
- Kern, Scott E., Kenneth W. Kinzler, Arthur Brushkin, David Jarosz, Paula Friedman, Carol Prives, and Bert Vodelstein. 1991. "Identification of P53 as a Sequence-Specific DNA Binding Protein." *Science* 252 (1989): 1708–11.
- Kharas, Michael G., and David A. Fruman. 2005. "ABL Oncogenes and Phosphoinositide 3-Kinase: Mechanism of Activation and Downstream Effectors." *Cancer Research* 65 (6): 2047–53. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3888>.
- Khoury, Marie P, and Jean-christophe Bourdon. 2010. "The Isoforms of the P53 Protein." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: 1–11.
- Kim, Hong Joo, and Dafna Bar-Sagi. 2004. "Modulation of Signalling by Sprouty: A Developing Story." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (6): 441–50. <https://doi.org/10.1038/nrm1400>.
- Kim, Sojung, Daesik Kim, Seung Woo Cho, Jungeun Kim, and Jin-Soo Kim. 2014. "Highly Efficient RNA-Guide Genome Editing in Human Cells via Delivery of Purified Cas9 Ribonucleoproteins." *Genome Research*, 1012–19. <https://doi.org/10.1101/gr.171322.113>.Freely.
- Kim, Sun Jin, Hisanori Uehara, Takashi Karashima, Marya Mccarty, Nancy Shih, and Isaiah J Fidler. 2001. "Expression of Lnterleukin-8 Correlates with Angiogenesis, Tumorigenicity, and Metastasis of Human Prostate Cancer Cells Implanted Orthotopically in Nude Mice." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 3 (1): 33–42. <https://doi.org/10.1038/sj/neo/7900124>.
- Klejman, Agata, Steven J Schreiner, Malgorzata Nieborowska-skorska, Artur Slupianek, Matthew Wilson, Thomas E Smithgall, and Tomasz Skorski. 2002. "The Src Family Kinase Hck Couples BCR / ABL to STAT5 Activation in Myeloid Leukemia Cells." *EMBO Journal* 21 (21): 1–9.
- Knights, Chad D, Jason Catania, Simone Di Giovanni, Selen Muratoglu, Ricardo Perez, Amber Swartzbeck, Andrew A Quong, et al. 2006. "Distinct P53 Acetylation Cassettes Differentially Influence Gene-Expression Patterns and Cell Fate." *The Journal of Cell Biology* 173 (4): 533–44. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512059>.

- Konermann, Silvana, Mark D Brigham, Alexandro E Trevino, Omar O Abudayyeh, Clea Barcena, Patrick D Hsu, Jonathan S Gootenberg, Hiroshi Nishimasu, and Osamu Nureki. 2015. "Genome-Scale Transcriptional Activation by an Engineered CRISPR-Cas9 Complex" 517 (7536): 61422–27. <https://doi.org/10.1038/nature14136>.Genome-scale.
- Konig, Heiko, Tessa L Holyoake, and Ravi Bhatia. 2008. "Effective and Selective Inhibition of Chronic Myeloid Leukemia Primitive Hematopoietic Progenitors by the Dual Src / Abl Kinase Inhibitor SKI-606." *Blood* 111 (4): 2329–38. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-092056>.The.
- Koschmieder, Steffen, Berthold Göttgens, Pu Zhang, Junko Iwasaki-arai, Koichi Akashi, L Jeffery, Tajhal Dayaram, et al. 2005. "Inducible Chronic Phase of Myeloid Leukemia with Expansion of Hematopoietic Stem Cells in a Transgenic Model of BCR-ABL Leukemogenesis Inducible Chronic Phase of Myeloid Leukemia with Expansion of Hematopoietic Stem Cells in a Transgenic Model of BCR-ABL." *Blood* 105 (1): 324–34. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4369>.
- Kubbutat, Michael H.G, Stephen N Jones, and Karen H Vousden. 1997. "Regulation of P53 Stability by Mdm2." *Nature* 387: 299–303.
- Kumar, Dushyant, Manoj Kumar Panigrahi, Deepti Dewangan, Sarjana Dutt, Khaliqur Rahman, and Anurag Mehta. 2014. "Atypical BCR-ABL Fusion Transcript (E6a2) in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia." *International Journal of Case Reports and Images* 5 (1): 45. <https://doi.org/10.5348/ijcri-2014-01-437-CR-10>.
- Kussie, Paul H, Svetlana Gorina, Vincent Marechal, Brian Elenbaas, Jacque Moreau, Arnold J Levine, and Nikola P Pavletich. 1996. "Structure of the MSM2 Oncoprotein Bound to the P53 Tumor Suppressor Transactivation Domain." *Science* 274 (5289): 948–53.
- Lain, Sonia, Carol Midgley, Alison Sparks, E Birgitte Lane, and David P Lane. 1999. "An Inhibitor of Nuclear Export Activates the P53 Response and Induces the Localization of HDM2 and P53 to U1A-Positive Nuclear Bodies Associated with the PODs." *Experimental Cell Research* 248: 457–72.
- Land, Hartmut, Luis F. Parada, and Robert A. Weinberg. 1983. "Tumorigenic Conversion of Primary Embryo Fibroblasts Requires at Least Two Cooperating Oncogenes." *Nature* 304 (5927): 596–602. <https://doi.org/10.1038/304596a0>.
- Lane, D P. 1992. "P53, Guardian of the Genome." *Nature* 358 (6381): 15–16. <https://doi.org/10.1038/358015a0>.
- Larco, Joseph E De, Beverly R K Wuertz, Douglas Yee, Brenda L Rickert, and Leo T Furcht. 2003. "Atypical Methylation of the Interleukin-8 Gene Correlates Strongly with the Metastatic Potential of Breast Carcinoma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (24): 13988–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335921100>.
- Levine, Arnold J., and Moshe Oren. 2009. "The First 30 Years of P53: Growing Ever More Complex." *Nature Reviews Cancer* 9 (10). Nature Publishing Group: 749–58. <https://doi.org/10.1038/nrc2723>.

- Li, Shaoguang, Robert L Jr Illaria, Ryan P Million, George Q Daley, and Richard A Van Etten. 1999. “The P190, P210, and P230 Forms of the BCR/ABL Oncogene Induce a Similar Chronic Myeloid Leukemia-like Syndrome in Mice but Have Different Lymphoid Leukemogenic Activity.” *Journal of Experimental Medicine* 189 (9): 1399–1412. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Liang, Xiquan, Jason Potter, Shantanu Kumar, Yanfei Zou, Rene Quintanilla, Mahalakshmi Sridharan, Jason Carte, et al. 2015. “Rapid and Highly Efficient Mammalian Cell Engineering via Cas9 Protein Transfection.” *Journal of Biotechnology* 208. Elsevier B.V.: 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.024>.
- Liu, Gang, and Xinbin Chen. 2006. “DNA Polymerase η , the Product of the Xeroderma Pigmentosum Variant Gene and a Target of P53, Modulates the DNA Damage Checkpoint and P53 Activation.” *Molecular and Cellular Biology* 26 (4): 1398–1413. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.4.1398>.
- Lu, Wan Jin, James F. Amatruda, and John M. Abrams. 2009. “P53 Ancestry: Gazing through an Evolutionary Lens.” *Nature Reviews Cancer* 9 (10). Nature Publishing Group: 758–62. <https://doi.org/10.1038/nrc2732>.
- Lu, Xiongbing, Bonnie Nannenga, and Lawrence A Donehower. 2005. “PPMD1 Dephosphorylates Chk1 and P53 and Abrogates Cell Cycle Checkpoints.” *Genes & Development* 19: 1162–74. <https://doi.org/10.1101/gad.1291305.tein>.
- Luca, Mario, Suyun Huang, Jeffrey E. Gershenwald, Rakesh K. Singh, Reuven Reich, and Menashe Bar-Eli. 1997. “Expression of Interleukin-8 by Human Melanoma Cells up-Regulates MMP-2 Activity and Increases Tumor Growth and Metastasis.” *The American Journal of Pathology* 151 (4): 1105–13.
- Lugo, Tracy Gross, and Owen N Witte. 1989. “The BCR-ABL Oncogene Transforms Rat-1 Cells and Cooperates with v-Myc.” *Molecular and Cellular Biology* 9 (3): 1263–70.
- Ma, WeiXu, Ning Ma, XiaoHui Chen, YiYue Zhang, and WenQing Zhang. 2015. “An Overview of Chronic Myeloid Leukemia and Its Animal Models.” *Science China Life Sciences* 58 (12): 1202–8. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4965-6>.
- Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M. Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E. DiCarlo, Julie E. Norville, and George M. Church. 2013. “RNA-Guide Human Genome Engineering via Cas9.” *Science* 339 (2013): 823–26. <https://doi.org/10.1107/S1600536812033132>.
- Malina, Abba, John R Mills, Regina Cencic, Yifei Yan, James Fraser, and Laura M Schippers. 2013. “Repurposing CRISPR / Cas9 for in Situ Functional Assays.” *Genes & Development* 27: 2602–14. <https://doi.org/10.1101/gad.227132.113>.
- Meek, David W., and Carl W. Anderson. 2009. “Posttranslational Modification of P53: Cooperative Integrators of Function.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (6): 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000950>.
- Melo, Junia V. 1996. “The Diversity of BCR-ABL Fusion Proteins and Their Relationship to Leukemia

- Phenotype.” *The R Journal* 3 (94): 1–102.
- Melo, Junia V, and David J Barnes. 2007. “Chronic Myeloid Leukaemia as a Model of Disease Evolution in Human Cancer.” *Nature Reviews* 7 (6): 441–53. <https://doi.org/10.1038/nrc2147>.
- Melo, Junia V, Timothy P Hughes, and Jane F Apperley. 2003. “Chronic Myeloid Leukemia.” *Hematology* 2003 (1): 132–52. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2003.1.132>.
- Meredith, Ann Marie, and Crispin R. Dass. 2016. “Increasing Role of the Cancer Chemotherapeutic Doxorubicin in Cellular Metabolism.” *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 68 (6): 729–41. <https://doi.org/10.1111/jphp.12539>.
- Momand, Jamil, David Jung, Sharon Wilczynski, and Joyce Niland. 1998. “The MDM2 Gene Amplification Database.” *Nucleic Acids Research* 26 (15): 3453–59. <https://doi.org/10.1093/nar/26.15.3453>.
- Nakano, Katsunori, and Karen H. Vousden. 2001. “PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by P53.” *Molecular Cell* 7 (3): 683–94. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00214-3).
- Neggers, Jasper E., Thomas Vercruyse, Maarten Jacquemyn, Els Vanstreels, Erkan Baloglu, Sharon Shacham, Marsha Crochiere, Yosef Landesman, and Dirk Daelemans. 2015. “Identifying Drug-Target Selectivity of Small-Molecule CRM1/XPO1 Inhibitors by CRISPR/Cas9 Genome Editing.” *Chemistry and Biology* 22 (1). Elsevier Ltd: 107–16. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.11.015>.
- Nowell, P, and D Hungerford. 1960. “A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia.” *Science* 132 (3438): 1488–1501. <https://doi.org/10.1126/science.132.3438.1488>.
- O’Brien, Wendy, Göran Stenman, and Ruth Sager. 1986. “Suppression of Tumor Growth by Senescence in Virally Transformed Human Fibroblasts.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (22): 8659–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8659>.
- O’Hare, Thomas, William C. Shakespeare, Xiaotian Zhu, Christopher A. Eide, Victor M. Rivera, Frank Wang, Lauren T. Adrian, et al. 2009. “AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance.” *Cancer Cell* 16 (5): 401–12. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.028>.
- Oda, Eri, Rieko Ohki, Hideki Murasawa, Jiro Nemoto, Tsukasa Shibue, Toshiharu Yamashita, Takashi Tokino, Tadatsugu Taniguchi, and Nobuyuki Tanaka. 2000. “Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of P53-Induced Apoptosis.” *Science* 288 (5468): 1053–58. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053>.
- Okamoto, Koji, Hongyun Li, Michael R. Jensen, Tingting Zhang, Yoichi Taya, Snorri S. Thorgeirsson, and Carol Prives. 2002. “Cyclin G Recruits PP2A to Dephosphorylate Mdm2.” *Molecular Cell* 9 (4): 761–71. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00504-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00504-X).
- Olivier, Magali, Monica Hollstein, and Pierre Hainaut. 2010. “TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>.

- Ottmann, Oliver G, Brian J Druker, Charles L Sawyers, John M Goldman, Jose Reiffers, Richard T Silver, Sante Tura, et al. 2002. "A Phase 2 Study of Imatinib in Patients with Relapsed or Refractory Philadelphia Chromosome – Positive Acute Lymphoid Leukemias." *Victoria* 100 (6): 1965–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0181>.
- Pane, Fabrizio, Ferdinand Frigeri, Maria Sindona, Luigia Luciano, Felicetto Ferrara, Renato Cimino, Giovanna Meloni, Giuseppe Saglio, Francesco Salvatore, and Bruno Rotoli. 1996. "Neutrophilic-Chronic Myeloid Leukemia : A Distinct Disease With a Specific." *Blood* 88 (7): 2410–14.
- Patrick, Hsu D., Lander S. Eric, and Feng Zhang. 2014. "Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering Patrick." *Cell* 157 (6): 1262–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010.Development>.
- Pear, Warren S., Juli P. Miller, Lanwei Xu, John C. Pui, Benny Soffer, Robert C. Quackenbush, Ann Marie Pendergast, et al. 1998. "Efficient and Rapid Induction of a Chronic Myelogenous Leukemia-like Myeloproliferative Disease in Mice Receiving P210 Bcr/Abl-Transduced Bone Marrow." *Blood* 92 (10): 3780–92. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90077-1).
- Pendergast, Ann Marie, Lawrence a Quilliam, Larry D Cripe, Craig H Bassing, Zonghan Dai, Nanxin Li, Andreas Batzer, et al. 1993. "BCR-ABL-Induced Oncogenesis Is Mediated by Direct Interaction with the SH2 Domain of the GRB-2 Adaptor Protein." *Cell* 75 (1): 175–85. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80094-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80094-7).
- Prior, Kim Kristin, Matthias S. Leisegang, Ivana Josipovic, Oliver Löwe, Ajay M. Shah, Norbert Weissmann, Katrin Schröder, and Ralf P. Brandes. 2016. "CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of P22phox Leads to Loss of Nox1 and Nox4, but Not Nox5 Activity." *Redox Biology* 9. Elsevier: 287–95. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.08.013>.
- Puttini, Miriam, Addolorata Maria Luce Coluccia, Frank Boschelli, Loredana Cleris, Edoardo Marchesi, Arianna Donella-Deana, Shaheen Ahmed, et al. 2006. "In Vitro and in Vivo Activity of SKI-606, a Novel Src-Abl Inhibitor, against Imatinib-Resistant Bcr-Abl+neoplastic Cells." *Cancer Research* 66 (23): 11314–22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1199>.
- Rajagopalan, Harith, and Christoph Lengauer. 2004. "Aneuploidy and Cancer." *Nature* 432 (7015): 338–41. <https://doi.org/10.1038/nature03099>.
- Raman, Venu, Shelby A. Martenser, David Reisman, Ella Evron, Wart F. Odenwald, Elizabeth Jaffee, Jeffrey Marks, and Saraswati Sukumar. 2000. "Compromised HOXA5 Function Can Limit P53 Expression in Human Breast Tumours." *Nature* 405 (6789): 974–78. <https://doi.org/10.1038/35016125>.
- Rasmussen, M. K., L. Iversen, C. Johansen, J. Finnemann, L. S. Olsen, K. Kragballe, and Borbala Gesser. 2008. "IL-8 and P53 Are Inversely Regulated through JNK, P38 and NF-KB P65 in HepG2 Cells during an Inflammatory Response." *Inflammation Research* 57 (7): 329–39. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-7220-1>.
- Reisman, D, N B Elkind, B Roy, J Beamon, and V Rotter. 1993. "C-Myc Trans-Activates the P53

- Promoter through a Required Downstream CACGTG Motif.” *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 4 (February): 57–65.
- Richardson, Celeste J., Stefanie S. Schalm, and John Blenis. 2004. “PI3-Kinase and TOR: PIKTORing Cell Growth.” *Seminars in Cell and Developmental Biology* 15 (2): 147–59. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.023>.
- Robles, Ana I, Nicole A Bemmels, Amy B Foraker, and Curtis C Harris. 2001. “APAF-1 Is a Transcriptional Target of P53 in DNA Damage-Induced Apoptosis Advances in Brief APAF-1 Is a Transcriptional Target of P53 in DNA Damage-Induced Apoptosis.” *Cancer Research* 61 (301): 6660–64.
- Roth, Judith, Matthias Dobbstein, Deborah A Freedman, Thomas Shenk, and Arnold J Levine. 1998. “Nucleo-Cytoplasmic Shuttling of the Hdm2 Oncoprotein Regulates the Levels of the P53 Protein via a Pathway Used by the Human Immunodeficiency Virus Rev Protein.” *The EMBO Journal* 17 (2): 554–64.
- Rowley, Janet D, and Joseph R Testa. 1982. “Chromosome Abnormalities in Malignant Hematologic Diseases.” *Advances in Cancer Research* 36: 103–48. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)60744-7](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)60744-7).
- Roy, B, J Beamon, E Balint, and D Reisman. 1994. “Transactivation of the Human P53 Tumor Suppressor Gene by C-Myc/Max Contributes to Elevated Mutant P53 Expression in Some Tumors.” *Molecular and Cellular Biology* 14 (12): 7805–15. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.12.7805>.Updated.
- Ruley, H. Earl. 1983. “Adenovirus Early Region 1A Enables Viral and Cellular Transforming Genes to Transform Primary Cells in Culture.” *Nature* 304 (5927): 602–6. <https://doi.org/10.1038/304602a0>.
- Salomoni, Paolo, Fabrizio Condorelli, Shawn M. Sweeney, and Bruno Calabretta. 2000. “Versatility of BCR/ABL-Expressing Leukemic Cells in Circumventing Proapoptotic BAD Effects.” *Blood* 96 (2): 676–84.
- Samanta, Ajoy K., Hui Lin, Tong Sun, Hagop Kantarjian, and Ralph B. Arlinghaus. 2006. “Janus Kinase 2: A Critical Target in Chronic Myelogenous Leukemia.” *Cancer Research* 66 (13): 6468–72. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0025>.
- Sattler, M., S. Verma, G. Shrikhande, C. H. Byrne, Y. B. Pride, T. Winkler, E. A. Greenfield, R. Salgia, and J. D. Griffin. 2000. “The BCR/ABL Tyrosine Kinase Induces Production of Reactive Oxygen Species in Hematopoietic Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 275 (32): 24273–78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002094200>.
- Sattler, Martin, M. Golam Mohi, Yuri B. Pride, Laura R. Quinnan, Nicole A. Malouf, Klaus Podar, Franck Gesbert, et al. 2002. “Critical Role for Gab2 in Transformation by BCR/ABL.” *Cancer Cell* 1 (5): 479–92. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00074-0](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00074-0).

- Sawyers, C L, M L Gishizky, S Quan, D W Golde, and O N Witte. 1992. "Propagation of Human Blastic Myeloid Leukemias in the SCID Mouse." *Blood* 79 (8): 2089–98.
- Sawyers, Charles L, Andreas Hochhaus, Eric Feldman, John M Goldman, Carole B Miller, G Oliver, Charles A Schiffer, et al. 2002. "Imatinib Induces Hematologic and Cytogenetic Responses in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia in Myeloid Blast Crisis : Results of a Phase II Study Imatinib Induces Hematologic and Cytogenetic Responses in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia." *Blood* 99 (10): 3530–39. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3530>.
- Scheffner, Martin, Bruce A. Werness, Jon M. Huibregtse, Arnold J. Levine, and Peter M. Howley. 1990. "The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of P53." *Cell* 63 (6): 1129–36. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90409-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90409-8).
- Schindler, Thomas, William Bornmann, Patricia Pellicena, W.Todd Miller, Bayard Clarkson, and John Kuriyan. 2000. "Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase." *Science* 289 (5486): 1938–42. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1938>.
- Schon, Oliver, Assaf Friedler, Mark Bycroft, Stefan M.V. Freund, and Alan R. Fersht. 2002. "Molecular Mechanism of the Interaction between MDM2 and P53." *Journal of Molecular Biology* 323 (3): 491–501. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00852-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00852-5).
- Senechal, Kristen, Jocelyn Halpern, and Charles L. Sawyers. 1996. "The CRKL Adaptor Protein Transforms Fibroblasts and Functions in Transformation by the BCR-ABL Oncogene." *Journal of Biological Chemistry* 271 (38): 23255–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23255>.
- Sessions, John W., Craig S. Skousen, Kevin D. Price, Brad W. Hanks, Sandra Hope, Jonathan K. Alder, and Brian D. Jensen. 2016. "CRISPR-Cas9 Directed Knock-out of a Constitutively Expressed Gene Using Lance Array Nanoinjection." *SpringerPlus* 5 (1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3037-0>.
- Shalem, Ophir, Neville E Sanjana, Ella Hartenian, Xi Shi, David A Scott, Dirk Heckl, Benjamin L Ebert, David E Root, and John G Doench. 2014. "Genome - Scale CRISPR - Cas9 Knockout Screening in Human Cells." *Science* 343 (6166): 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.1247005>.Genome-Scale.
- Shalem, Ophir, Neville E Sanjana, Ella Hartenian, Xi Shi, David A Scott, Tarjei S Mikkelsen, Dirk Heckl, et al. 2014. "Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells." *Science* 343 (6166): 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.1247005>.
- Sharma, Sreenath V, Daniel A Haber, and Jeff Settleman. 2010. "Cell Line-Based Platforms to Evaluate the Therapeutic Efficacy of Candidate Anticancer Agents." *Nature Publishing Group* 10 (4): 241–53. <https://doi.org/10.1038/nrc2820>.
- Shay, J W, and S Bacchetti. 1997. "A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer." *European Journal of Cancer* 33 (5): 787–91. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(97\)00062-2](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(97)00062-2).
- Shi, Qian, James L Abbruzzese, Suyun Huang, Isaiah J Fidler, Qinghua Xiong, and Keping Xie. 1999. "Constitutive and Inducible Interleukin 8 Expression by Hypoxia and Acidosis Renders Human

- Pancreatic Cancer Cells More Tumorigenic and Metastatic Constitutive and Inducible Interleukin 8 Expression by Hypoxia and Acidosis Renders Human Pancreatic Cancer C.” *Clinical Cancer Research* 5 (November 1999): 3711–21.
- Shieh, Sheau-yann, Masako Ikeda, Yoichi Taya, and Carol Prives. 1997. “DNA Damage-Induced Phosphorylation of P53 Alleviates Inhibition by MDM2.” *Cell* 91: 325–34.
- Shtivelman, Emma, Batia Lifshitz, Robert P Gale, and Eli Canaani. 1985. “Fused Transcript of Abl and Bcr Genes in Chronic Myelogenous Leukemia.” *Nature* 318: 556–57. <https://doi.org/10.1038/316507a0>.
- Sill, By Heinz, John M Goldman, and Nicholas C P Cross. 1995. “Homozygous Deletions of the P16 Tumor-Suppressor Gene Are Associated With Lymphoid Transformation of Chronic Myeloid Leukemia.” *Blood* 85 (8): 2013–16.
- Singh, R K, M Gutman, R Radinsky, C D Bucana, and I J Fidler. 1994. “Expression of Interleukin 8 Correlates with the Metastatic Potential of Human Melanoma Cells in Nude Mice.” *Cancer Res* 54 (12): 3242–47.
- Sirard, C, T Lapidot, J Vormoor, J D Cashman, M Doedens, B Murdoch, N Jamal, et al. 1996. “Normal and Leukemic SCID-Repopulating Cells (SRC) Coexist in the Bone Marrow and Peripheral Blood from CML Patients in Chronic Phase, Whereas Leukemic SRC Are Detected in Blast Crisis.” *Blood* 87 (4): 1539–48.
- Skorski, T, M Nieborowska-Skorska, P Wlodarski, D Perrotti, R Martinez, M a Wasik, and B Calabretta. 1996. “Blastic Transformation of P53-Deficient Bone Marrow Cells by P210bcr/Abl Tyrosine Kinase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (23): 13137–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13137>.
- Skorski, Tomasz, Alfonso Bellacosa, Margaret Nieborowska-Skorska, Miroslaw Majewski, Robert Martinez, John K. Choi, Rossana Trotta, et al. 1997. “Transformation of Hematopoietic Cells by BCR / ABL Requires Activation of a PI-3k / Akt-Dependent Pathway.” *The EMBO Journal* 16 (20): 6151–61.
- Smith, Martin L., I. Tsuen Chen, Qimin Zhan, Insoo Bae, Chaw Yuan Chen, Tona M. Gilmer, Michael B. Kastan, Patrick M. O’Connor, and Albert J. Fornace. 1994. “Interaction of the P53-Regulated Protein GADD45 with Proliferating Cell Nuclear Antigen.” *Science* 266 (5189): 1376–80. <https://doi.org/10.1126/science.7973727>.
- Socolovsky, Merav, Amy E.J Fallon, Stream Wang, Carlo Brugnara, and Harvey F Lodish. 1999. “Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} Mice: A Direct Role for Stat5 in Bcl-XL Induction.” *Cell* 98 (2): 181–91. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81013-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81013-2).
- Song, Jianbo, Danielle Mercer, Xiaofeng Hu, Henry Liu, and Marilyn M. Li. 2011. “Common Leukemia- and Lymphoma-Associated Genetic Aberrations in Healthy Individuals.” *Journal of Molecular Diagnostics* 13 (2): 213–19. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.10.009>.
- Sontakke, Pallavi, Jenny Jaques, Edo Vellenga, and Jan Jacob Schuringa. 2016. “Modeling of Chronic

- Myeloid Leukemia: An Overview of In Vivo Murine and Human Xenograft Models.” *Stem Cells International*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/1625015>.
- Soussi, Thierry, and Klas G. Wiman. 2007. “Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The P53 Mutation Paradigm.” *Cancer Cell* 12 (4): 303–12. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.10.001>.
- Soverini, Simona, Caterina De Benedittis, Manuela Mancini, and Giovanni Martinelli. 2015. “Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain and Elsewhere in Chronic Myeloid Leukemia.” *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* 15 (S): S120–28. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2015.02.035>.
- Soverini, Simona, Sabrina Colarossi, Alessandra Gnani, Gianantonio Rosti, Fausto Castagnetti, Angela Poerio, Ilaria Iacobucci, et al. 2006. “Contribution of ABL Kinase Domain Mutations to Imatinib Resistance in Different Subsets of Philadelphia-Positive Patients: By the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia.” *Clinical Cancer Research* 12 (24): 7374–79. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1516>.
- Staveren, W C G Van, D Y Weiss Solís, A Hébrant, V Detours, J E Dumont, and C Maenhaut. 2009. “Biochimica et Biophysica Acta Human Cancer Cell Lines : Experimental Models for Cancer Cells in Situ ? For Cancer Stem Cells ?” *BBA - Reviews on Cancer* 1795 (2). Elsevier B.V.: 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.12.004>.
- Stenger, Judith E., Gregory A. Mayr, Kristine Mann, and Peter Tegtmeyer. 1992. “Formation of Stable P53 Homotetramers and Multiples of Tetramers.” *Molecular Carcinogenesis* 5 (2): 102–6. <https://doi.org/10.1002/mc.2940050204>.
- Stevenson, Mario, and David J. Volsky. 1986. “Activated V-Myc and v-Ras Oncogenes Do Not Transform Normal Human Lymphocytes.” *Mol Cell Biol* 6 (10): 3410–17. <https://doi.org/10.1128/MCB.6.10.3410>.
- Stommel, Jayne M, Natalie D Marchenko, Gretchen S Jimenez, Ute M Moll, Thomas J Hope, and Geoffrey M Wahl. 1999. “A Leucine-Rich Nuclear Export Signal in the P53 Tetramerization Domain : Regulation of Subcellular Localization and P53 Activity by NES Masking.” *The EMBO Journal* 18 (6): 1660–72.
- Strano, S., S. Dell’Orso, S. Di Agostino, G. Fontemaggi, A. Sacchi, and G. Blandino. 2007. “Mutant P53: An Oncogenic Transcription Factor.” *Oncogene* 26 (15): 2212–19. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210296>.
- Sykes, Stephen M, Hestia S Mellert, Marc A Holbert, Keqin Li, Ronen Marmorstein, William S Lane, and Steven B McMahon. 2006. “Acetylation of the P53 DNA-Binding Domain Regulates Apoptosis Induction.” *Molecular Cell* 24: 841–51. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.026>.
- Takeda, Norifumi, Masabumi Shibuya, and Yoshiro Maru. 1999. “The BCR-ABL Oncoprotein Potentially Interacts with the Xeroderma Pigmentosum Group B Protein.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (January): 203–7.
- Talpaz, Moshe, Richard T Silver, Brian J Druker, John M Goldman, Carlo Gambacorti-passerini, Charles a Schiffer, Thomas Fischer, et al. 2002. “Imatinib Induces Durable Hematologic and

- Cytogenetic Responses in Patients with Accelerated Phase Chronic Myeloid Leukemia : Results of a Phase 2 Study.” *Blood* 99 (6): 1928–37. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.6.1928>.
- Tanaka, H, H Arakawa, T Yamaguchi, K Shiraishi, S Fukuda, K Matsui, Y Takei, and Y Nakamura. 2000. “A Ribonucleotide Reductase Gene Involved in a P53-Dependent Cell-Cycle Checkpoint for DNA Damage.” *Nature* 404 (6773): 42–49.
- Tang, Yi, Jianyuan Luo, and Wenzhu Zhang. 2006. “Tip60-Dependent Acetylation of P53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis.” *Molecular Cell* 24: 827–39. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.021>.
- Todaro, George J, and Howard Green. 1964. “An Assay for Cellular Transformation by SV401.” *Virology* 23 (1): 117–19.
- Tokarski, John S., John A. Newitt, Chieh Ying J. Chang, Janet D. Cheng, Michael Wittekind, Susan E. Kiefer, Kevin Kish, et al. 2006. “The Structure of Dasatinib (BMS-354825) Bound to Activated ABL Kinase Domain Elucidates Its Inhibitory Activity against Imatinib-Resistant ABL Mutants.” *Cancer Research* 66 (11): 5790–97. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4187>.
- Toledo, Franck, and Geoffrey M Wahl. 2006. “Regulating the P53 Pathway: In Vitro Hypotheses, in Vivo Veritas.” *Nature Reviews Cancer* 6 (December): 909–23. <https://doi.org/10.1038/nrc2012>.
- Torres, R., M. C. Martin, A. Garcia, Juan C. Cigudosa, J. C. Ramirez, and S. Rodriguez-Perales. 2014. “Engineering Human Tumour-Associated Chromosomal Translocations with the RNA-Guided CRISPR-Cas9 System.” *Nature Communications* 5. Nature Publishing Group: 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms4964>.
- Towatari, M, K Adachi, H Kato, and H Saito. 1991. “Absence of the Human Retinoblastoma Gene Product in the Megakaryoblastic Crisis of Chronic Myelogenous Leukemia.” *Blood* 78 (9): 2178–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1932738>.
- Tran, H., A. Brunet, E. C. Griffith, and M. E. Greenberg. 2003. “The Many Forks in FOXO’s Road.” *Science Signaling* 2003 (172): re5-re5. <https://doi.org/10.1126/stke.2003.172.re5>.
- Valente, Liz J., Brandon J. Aubrey, Marco J. Herold, Gemma L. Kelly, Lina Hoppo, Clare L. Scott, Andrea Newbold, et al. 2016. “Therapeutic Response to Non-Genotoxic Activation of P53 by Nutlin3a Is Driven by PUMA-Mediated Apoptosis in Lymphoma Cells.” *Cell Reports* 14 (8). The Authors: 1858–66. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.059>.
- Vanhaesebroeck, Bart, Sally J Leever, John Timms, Roy Katso, Paul C Driscoll, Rudiger Woscholski, Peter J Parker, and D Michael. 2001. “Synthesis and Function of 3- Phosphorylated Inositol Lipids.” *Annu. Rev. Biochem.* 535–602.
- Vassilev, Lyubomir T. 2005. “P53 Activation by Small Molecules: Application in Oncology.” *Journal of Medicinal Chemistry* 48 (14): 4491–99. <https://doi.org/10.1021/jm058174k>.
- Vassilev, Lyubomir T, Binh T Vu, Bradford Craves, Daisy Carvajal, Frank Podlaski, Zoran Filipovic, Norman Kong, et al. 2004. “In Vivo Activation of the P53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2.” *Science* 303 (5659): 844–48. <https://doi.org/10.1126/science.1092472>.

- Vassilev, Lyubomir T, Binh T Vu, Bradford Graves, Daisy Carvajal, Frank Podlaski, Zoran Filipovic, Norman Kong, et al. 2004. "In Vivo Activation of the P53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2." *Science* 303 (5659): 844–48. <https://doi.org/10.1126/science.1092472>.
- Vivanco, Igor, and Charles L. Sawyers. 2002. "The Phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT Pathway in Human Cancer." *Nature Reviews Cancer* 2 (7): 489–501. <https://doi.org/10.1038/nrc839>.
- Vogelstein, Bert, David Lane, and Arnold J. Levine. 2000. "Surfing the P53 Network." *Nature* 408 (6810): 307–10. <https://doi.org/10.1038/35042675>.
- Vogelstein, Bert, Nickolas Papadopoulos, Victor E Velculescu, Shibin Zhou, Luis a Diaz, and Kenneth W Kinzler. 2013. "Cancer Genome Lanscapes." *Science* 339 (6127): 1546–58. <https://doi.org/10.1126/science.1235122.Cancer>.
- Wade Harper, J., Guy R. Adami, Nan Wei, Khandan Keyomarsi, and Stephen J. Elledge. 1993. "The P21 Cdk-Interacting Protein Cip1 Is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases." *Cell* 75 (4): 805–16. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90499-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90499-G).
- Walton, Josephine, Julianna Blagih, Darren Ennis, Elaine Leung, Suzanne Dowson, Malcolm Farquharson, Laura A. Tookman, et al. 2016. "CRISPR/Cas9-Mediated Trp53 and Brca2 Knockout to Generate Improved Murine Models of Ovarian High-Grade Serous Carcinoma." *Cancer Research* 76 (20): 6118–29. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1272>.
- Webster, Gill A., and Neil D. Perkins. 1999. "Transcriptional Cross Talk between NF-KB and P53." *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3485–95. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3485>.
- Weisberg, E., P. Manley, J. Mestan, S. Cowan-Jacob, A. Ray, and J. D. Griffin. 2006. "AMN107 (Nilotinib): A Novel and Selective Inhibitor of BCR-ABL." *British Journal of Cancer* 94 (12): 1765–69. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603170>.
- Weisberg, Ellen, Paul W. Manley, Werner Breitenstein, Josef Brügger, Sandra W. Cowan-Jacob, Arghya Ray, Brian Huntly, et al. 2005. "Characterization of AMN107, a Selective Inhibitor of Native and Mutant Bcr-Abl." *Cancer Cell* 7 (2): 129–41. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.007>.
- Wetzler, M, M Talpaz, R a Van Etten, C Hirsh-Ginsberg, M Beran, and R Kurzrock. 1993. "Subcellular Localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl Proteins in Normal and Leukemic Cells and Correlation of Expression with Myeloid Differentiation." *The Journal of Clinical Investigation* 92 (March): 1925–39. <https://doi.org/10.1172/JCI116786>.
- Williams, R.T, and C.J Sherr. 2008. "The INK4-ARF (CDKN2A/B) Locus in Hematopoiesis and BCR-ABL – Induced Leukemias." *Cold Spring Harbor Symposia On LXXIII*: 461–67. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.039>.
- Wolff, N. C., and R L Ilaria. 2001. "Establishment of a Murine Model for Therapy-Treated Chronic Myelogenous Leukemia Using the Tyrosine Kinase Inhibitor STI571." *Blood* 98 (9): 2808–16. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.9.2808>.
- Wu, Hongyun, and Guillermina Lozanos. 1994. "NF-KB Activation of P53." *J Biol Chem* 269 (31):

20067–74.

- Xie, Shanhai, Hui Lin, Tong Sun, and Ralph B. Arlinghaus. 2002. “Jak2 Is Involved in C-Myc Induction by Bcr-Abl.” *Oncogene* 21 (47): 7137–46. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205942>.
- Xie, Shanhai, Yan Wang, Jiabin Liu, Tong Sun, Matthew B. Wilson, Thomas E. Smithgall, and Ralph B. Arlinghaus. 2001. “Involvement of Jak2 Tyrosine Phosphorylation in Bcr-Abl Transformation.” *Oncogene* 20 (43): 6188–95. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204834>.
- Xu, L, and I J Fidler. 2000. “Interleukin 8: An Autocrine Growth Factor for Human Ovarian Cancer.” *Oncology Research* 12 (2): 97–106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11132928>.
- Yang, Annie, Mourad Kaghad, Daniel Caput, and Frank McKeon. 2002. “On the Shoulders of Giants P63,P73 and the Rise of P53.” *Trends in Genetics* 18 (2): 90–95.
- Yang, Annie, Mourad Kaghad, Yunmei Wang, Emily Gillett, Mark D. Fleming, Volker Dötsch, Nancy C. Andrews, Daniel Caput, and Frank McKeon. 1998. “P63, a P53 Homolog At 3Q27-29, Encodes Multiple Products With Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities.” *Molecular Cell* 2 (3): 305–16. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80275-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80275-0).
- Yeudall, W. Andrew, Catherine A. Vaughan, Hiroshi Miyazaki, Mahesh Ramamoorthy, Mi Yon Choi, Christopher G. Chapman, Huixin Wang, et al. 2012. “Gain-of-Function Mutant P53 Upregulates CXC Chemokines and Enhances Cell Migration.” *Carcinogenesis* 33 (2): 442–51. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr270>.
- Zauberman, Arie, Deborah Flusberg, Ygal Haupt, Yaacov Barak, and Moshe Oren. 1995. “A Functional P53-Responsive Intronic Promoter Is Contained within the Human Mdm2 Gene.” *Nucleic Acids Research* 23 (14): 2584–92. <https://doi.org/10.1093/nar/23.14.2584>.
- Zhang, X, and R Ren. 1998. “Bcr-Abl Efficiently Induces a Myeloproliferative Disease and Production of Excess Interleukin-3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Mice: A Novel Model for Chronic Myelogenous Leukemia.” *Blood* 92 (10): 3829–40. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.4.911>.
- Zhu, Y. M., S. J. Webster, D. Flower, and P. J. Woll. 2004. “Interleukin-8/CXCL8 Is a Growth Factor for Human Lung Cancer Cells.” *British Journal of Cancer* 91 (11): 1970–76. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602227>.