

2m11.3482.10

Université de Montréal

**Étude de la survie cellulaire lors du processus de myélopoïèse induit par
le facteur de transcription PU.1 et la cytokine GM-CSF**

Par
Nicolas Duceppe

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Science (M.Sc.)
en Pharmacologie

31 août 2006

Copyright, Nicolas Duceppe, 2006



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
«Étude de la survie cellulaire lors du processus de myélopoïèse induit par le facteur de
transcription PU.1 et la cytokine GM-CSF»

présenté par :
Nicolas Duceppe

a été évalué par le jury composé des personnes suivantes :

Président Rapporteur : Dr Jean-Francois Gauchat
Directrice de recherche : Dr Trang Hoang
Membre du jury : Dr Christian Beauséjour

Mémoire accepté le : _____

Résumé

L'hématopoïèse est le processus par lequel l'ensemble des cellules sanguines est formé. Ce processus implique qu'une cellule multipotente, nommée « cellule souche hématopoïétique », produise des cellules qui ont un potentiel de différenciation plus limitée. C'est à partir de ces dernières, que l'on nomme « progéniteurs », que sont créées les composantes cellulaires du sang. Des aberrations dans ces mécanismes entraînent l'apparition de pathologies telles que les leucémies.

L'apparition et la progression des cancers s'associent, entre autres, aux dérèglements de trois aspects essentiels du développement des cellules : la différenciation, la prolifération et la survie. De multiples essais cliniques sont en cours pour traiter les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (AML). Certaines utilisent des cytokines telles que le GM-CSF, d'autres ont pour cible des protéines qui sont responsables d'assurer la survie cellulaire. Parallèlement, de nombreuses études ont clairement démontré le rôle majeur que joue le facteur de transcription PU.1 dans la production de cellules myéloïdes.

La première partie de mes travaux a servi à compléter des recherches qui avaient été produites au laboratoire. Ces travaux ont permis de relier l'augmentation de l'expression de PU.1 avec celle des protéines « anti-apoptotiques » A1 et Mcl-1, à la suite d'une activation du récepteur du GM-CSF.

La seconde partie de mes recherches a permis la mise au point d'une lignée cellulaire. Cette dernière exprime constitutivement le facteur de transcription PU.1 contenant une étiquette de double purification, nommée TAP. Celle-ci servira à identifier les partenaires d'interactions de PU.1, impliquées dans la production des granulocytes et de macrophages lors de la myélopoïèse.

L'ensemble des données de ce manuscrit présente des outils et des informations qui permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la différenciation et la survie des précurseurs myéloïdes ainsi que l'identification de cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de la leucémie.

Mots-clés : Hématopoïèse, Myélopoïèse, AML, Facteur de transcription, PU.1, Cytokine, GM-CSF, A1, Mcl-1, TAP, Différenciation cellulaire, Apoptose.

Summary

The haematopoiesis is the process by which all the blood cells are formed. This process implies that a multipotent cell, named haematopoietic stem cell, produces cells which have a more limited differentiation potential. It is from these last ones, that we name "progenitor", that the cellular constituents of the blood are created. Aberrations in these mechanisms are responsible for appearance of pathologies such as the leukaemia.

The appearance and the progress of cancers are caused by the disorders of three essential aspects of the development of cells: the differentiation, the proliferation and the survival. Multiple clinical trials are in progress to treat the patients affected by acute myeloid leukemia (AML). Some try to use cytokines such GM-CSF, others target the proteins responsible for assuring the cellular survival. At the same time, numerous studies clearly demonstrated the major role which plays the transcription factor PU.1 in the production of myeloid cells.

The first part of my works has started with researches data which had been produced in the laboratory. These works allowed connecting the increase of the PU.1 expression with that of the "anti-apoptotique" proteins A1 and Mcl-1, following an activation of the GM-CSF receptor.

The second part of my researches allowed the settling of a cellular lineage. This last one expresses constitutively the transcription factor PU.1 containing a label named TAP. This system allows producing a double purification of native protein complex associated with

PU.1 involved in the production of granulocytes and macrophages during the myelopoiesis.

All the data of this manuscript presents tools and informations which will allow understanding mechanisms involved in the differentiation and in the survival of the myeloid precursors as well as identification of potential therapeutic targets for the treatment of the leukaemia.

Keywords: Haematopoiesis, Myelopoiesis, AML, Transcription factor, Cytokine, PU.1, GM-CSF, A1, Mcl-1, TAP, Cellular differentiation, Apoptosis.

Références bibliographique

REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
<i>Hématopoïèse</i>	2
<i>Myélopoïèse</i>	2
CHAPITRE 1	4
GM-CSFR.....	4
<i>Facteur de croissance</i>	4
La chaîne « α »	5
La chaîne « β »	6
Fonction biologique et clinique	7
Surexpression et sous-expression du GMR	9
Le ligand GM-CSF	10
CHAPITRE 2	11
<i>Facteur de transcription</i>	11
PU.1	11
Découverte.....	11
Régulation de PU.1.....	12
Structure	13
Domaine ETS	14
Domaine PEST.....	15
Domaine de transactivation	15
Fonction biologique.....	16
Rôle de PU.1 pendant la différenciation	16
Gradation du niveau d'expression de PU.1	19
Partenaire d'interactions	21
Gènes cibles.....	22
CHAPITRE 3	24
<i>Apoptose</i>	24
Principaux acteurs de la mort cellulaire programmée	25
Les caspases	25
Famille Bcl-2.....	25
Mécanisme.....	26
Mcl-1	28
GM-CSF et Mcl-1.....	29
Bcl2-related A1.....	30
GM-CSF et A1	30
CHAPITRE 4	32
<i>Leucémie</i>	32
<i>AML</i>	32
Types	33
Causes moléculaires.....	35
Récepteur.....	35
Voies de signalisation.....	37
Facteur de transcription	38
PU.1 et les leucémies.....	41
Les Érythroleucémie et PU.1.....	41
Mutation de PU.1	41
Dérégulation de PU.1	42
Traitements	44
Utilisés actuellement	44

Cibles thérapeutiques potentielles	45
Ouverture.....	51
Objectifs et hypothèses de recherche	51
LÉGENDE DES FIGURES	53
<i>Figure I : Chaîne α et β du récepteur au GM-CSF</i>	54
<i>Figure II : Structure des protéines PU.1, Mcl-1 et A1</i>	54
<i>Figure III : Modulation de PU.1 lors de l'hématopoïèse</i>	55
<i>Figure IV : Modèle général de l'apoptose</i>	55
FIGURES COMPLÉMENTAIRES À LA REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	56
<u>RÉSULTATS</u>	61
MATÉRIEL ET MÉTHODES	62
<i>Culture cellulaire</i>	63
<i>Plasmides</i>	64
<i>Transfection transitoire</i>	64
<i>Buvardage Western</i>	64
<i>Immunoprécipitation de la chromatine</i>	65
<i>Les essais fonctionnels</i>	66
<i>Extraction d'ARN messager et PCR</i>	67
<i>Cytométrie de flux</i>	67
<i>Infection virale</i>	68
<i>Électroporation</i>	70
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	71
I. <i>Effet du GM-CSF sur le niveau et la fonction de PU.1</i>	72
Mise en contexte.....	72
Expression de PU.1 et de A1 en présence de GM-CSF	73
A1 et Mcl-1 sont des gènes cibles de PU.1	75
II. <i>Mise au point d'un modèle pour identifier les partenaires de PU.1</i>	76
Mise en contexte.....	76
1) <i>Mise au point d'une protéine de fusion PU.1-TAP</i>	77
Vecteur d'expression.....	78
a) MSCV	78
b) p514	78
2) <i>Expression transitoire de PU.1-TAP</i>	79
3) <i>Fonctionnalité de PU.1-TAP</i>	81
4) <i>Production d'une lignée myéloïde exprimant PU.1-TAP</i>	83
A. <i>Transfert de PU.1-TAP par infection virale</i>	83
B. <i>Production de 32D PU.1-TAP par électroporation</i>	85
Ouverture	86
LÉGENDE DES FIGURES	88
<i>Figure 1 : Effet du GM-CSF sur A1 et Mcl-1 via PU.1</i>	89
a) le GM-CSF entraîne une augmentation des protéines A1 et PU.1 dans les cellules 32D.....	89
b) le niveau d'expression de A1 double dans des cellules 32D traitées 48 heures au GM-CSF.....	89
c) A1 et Mcl-1 des gènes cible de PU.1 dans les cellules 32D en présence de GM-CSF.....	90
d) Validation de la spécificité de l'anticorps dirigé contre Mcl-1	91

<i>Figures 2 : Schéma synthèse de la relation entre PU.1, A1 et Mcl-1 et vecteurs d'expression de PU.1-TAP</i>	91
a) Les relations qui relient PU.1, A1 et Mcl-1.....	91
b) Plasmide MSCV.....	92
<i>Figure 3 : Expression transitoire de PU.1-TAP</i>	92
a) La construction de PU.1 TAP permet une expression correcte de la protéine.....	92
b) Le plasmide p514 permet des niveaux d'expression supérieure au vecteur MSCV pour la protéine PU.1 TAP.....	93
<i>Figure 4 : Essais fonctionnels</i>	94
a) PU.1 TAP conserve sa capacité à interagir avec c-jun pour activer le promoteur de l'IL-1B.....	94
b) p514 confère à PU.1 TAP un niveau d'activité fonctionnelle similaire à PU.1.....	94
<i>Figure 5 : Production de cellules 32D par infection virale</i>	95
a) Les virus sont fonctionnels et permettent l'expression de TAP, mais pas de PU.1 TAP dans les cellules 32D.....	95
b) Aucun clone ne permet une détection significative de PU.1 TAP.....	96
c) L'ARN messager de PU.1 TAP est détecté dans le clone numéro 6.....	96
d) Des signaux de différenciation induite par le G-CSF ou une inhibition du protéasome par le MG 132 ne permettent pas de détecter la protéine PU.1 TAP.....	97
<i>Figure 6 : Production de cellules 32D par électroporation</i>	98
a) L'électroporation permet l'insertion des vecteurs codant pour PU.1 TAP à l'intérieur des cellules 32D.....	98
b) Les taux de survie sont identiques pour les cellules incorporant les plasmides codant pour PU.1 TAP et les vecteurs vides.....	98
c) La protéine PU.1 TAP est détectée dans les cellules 32D qui ont été électroporées.....	99
<i>Figure 7 : Schéma synthèse des étapes qui ont permis la production de cellules 32D exprimant la protéine PU.1-TAP constitutivement</i>	99
<i>Figure 8 : Méthode de purification TAP</i>	99
a) Structure de l'étiquette TAP.....	99
b) Étape de double purification par affinité (TAP).....	100
FIGURES DES RÉSULTATS.....	101
DISCUSSION	110
CHAPITRE 8.....	111
« Première partie de mon projet : GM-CSF, PU.1, Bcl-2A1 et Mcl-1 ».....	111
CHAPITRE 9.....	114
« Deuxième partie de mon projet : PU.1-TAP, 32D, GM-CSF ».....	114
CHAPITRE 10.....	118
« Perspectives relatives aux recherches que j'ai effectuées ».....	118
Rôle de la concentration de PU.1 dans la composition des complexes transcriptionnels formés.....	118
Rôle de translocation impliquée dans les AML sur la fonction de PU.1.....	119
Détermination de la voie signalétique reliant le GM-CSF à PU.1.....	119
Caractérisation de la spécificité des membres de la famille Bcl-2 pour différents tissus.....	120
CONCLUSION.....	121
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	122

Liste des figures

Figures complémentaires de la revue de la littérature

FIGURE 1.....	57
FIGURE 2.....	58
FIGURE 3.....	59
FIGURE 4.....	60

Figures des résultats

FIGURE 1.....	102
FIGURE 2.....	103
FIGURE 3.....	104
FIGURE 4.....	105
FIGURE 5.....	106
FIGURE 6.....	107
FIGURE 7.....	108
FIGURE 8.....	109

Liste des abréviations

a.a.	Acide Aminée
A1	«Bcl2 related A1»
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AIF	Allograft Inflammatory Factor 1
AML	Acute Myeloid Leukemia
AP-1	Activator Protein 1
APL	Acute Promyelocytic Leukemia
ARNm	Acide RiboNucléique-Messenger
ATP	Adenosine-5'-Triphosphate
ATRA	All Trans Rétinoïque Acid
B220	Désigné par les termes suivants: «leukocyte common antigen precursor B-220» ou «cd-45»
Bak	Bcl-2 Associated Kinase
Bcl-2	B-Cell Leukemia/lymphoma-2
BH	Bcl-2 Homology domain
Bid	Bh3 Interringing Death domain
Bim	Bcl-2 Interringing Mediator of cell death
Bmi-1	B lymphoma Mo-mlv Insertion region 1
Boîte PU.1	Désigne une séquence d'ADN 5-prime-gaggaa-3-prime
Boîte TATA	Désigne une séquence d'ADN 5-prime-t-a-t-a -3-prime
C/EBP	Caat-Enhancer-Binding Protein
CBF	Core Binding Factor
CD	Cluster of Differentiation (incluant CD-33, CD19, CD11b)
c-fos	Cellular form of Finkel-biskis-jenkins Osteogenic Sarcomas
c-jun	Cellular form of-putative transforming gene of avian sarcoma virus 17 (le terme «jun» provient du mot japonais 'ju-nana,' qui désigne le chiffre 17)
CKII	Casein Kinase II
CML	Common Myeloid Leukemia
CMP	Common Myeloid Progenitor
COS	Cv-1 Ori-defective Sv40 cell line
CRM	Cytokine Receptor Module
Diablo	Direct lap-Binding protein with LOw pi
Diva	Bcl2-like 10
DNAseI	Désoxyribonucléase type I
ETS	E-Twenty Six ou «E26»
FAB	French-American-British
Fadd	Fas-Associating Death Domain
FAS	Protéine membranaire portant également le nom de cd95 ou «tumor necrosis factor ligand superfamily associated member six »
FcγRI-B	Fc fragment of IgG, Receptor high affinity I-B
FDA	Food and Drug Administration
FES	Feline Sarcoma oncogene
FIT3-ITD	Fms-like Tyrosine Kinase 3 Internal Tandem Duplication
FTI	Farnesyl Transferase Inhibitors

GATA	Transcription factors GATA (qui reconnaît la séquence «G-A-T-A»)
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GFP	Green Fluorescence Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GM-CSFR	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor
GMP	Granulocyte Macrophage Progenitor
GMR	Granulocyte Macrophage Receptor
GO	Gemtuzumab Ozogamicin
gp140	«GlycoProtein 140» ou « v-fms protein family»
GR	Glucocorticoid Receptor
HDAC	Histone Deacetylase
HLA-DR	D-Related Human Leukocyte Antigens
Hox	Homeo box
HSC	Hematopoietic Stem Cell
HSP90	Heat Shock Protein 90
IgG	ImmunoGlobuline de classe G
Ikaros	Transcription factor, Ikaros (ce nom tire ses origines de la mythologie grec)
IL	InterLeukine (incluant: il-1b, il-3 et il-7)
IRF	Interféron Regulating Factor
ISCBP	Interferon Sequence Consensus Binding Protein
JAK	Janus Kinase
kb	Kilo Base
kD	Kilo Dalton
Kd	Constante de Dissociation
LPS	LipoPolySaccharide
LTR	Long Terminal Repeat
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
mb-1	Membrane glycoprotein-1, portant également le nom de «cd79»
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia
M-CSF	«Macrophage Colony Stimulating Factor»
MDS	MyeloDysplasique Syndrome
MEF	Muscle-specific Enhancer Factor
MEP	Megakariocyte Erythrocyte Progenitor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLL	Mixed-Lineage Leukemia protein
MSCV	Murine Stem Cell retroviral Vector
NF-kB	Nuclear Factor kappa B
Oct	Octamer transcription factor
p514	Plasmide 514
PAC	P1 Artificiel Chromosome
pb	Pair de Base
pCMV	Promoteur du Cytomegalovirus
PEST	Acronyme désignant 4 acides aminés : (P) proline, (E) l'acide glutamique, (S) la sérine, (T) thréonine .
PIP	Pu.1 Interacting Protein
pM	Pico Mole
PML	Promyelocytic Leukemia protein

PU.1	Purine riche one (synonyme de spi-1)
Raidd	Rip-Associated protein with a Death Domain
RAR α	Retinoic Acid Receptor α
Ras	Retrovirus-Associated DNA Sequences protein
RB	Retino Blastoma protein
SCL	Stem Cell Leukemia
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
SH	Src Homology
SHC	Src Homology 2 domain-Containing transforming protein 1
SHP	Src-Homology domain-1 Protein
Smac	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SOCS	Suppressors Of Cytokine Signaling Proteins
SP-1	Trans-acting transcription factor 1
Spi-1	Sffv Proviral Integration 1 protein (synonyme de pu.1)
STAT	Signal Transducer and Activation of Transcription (incluant stat3, stat5)
SV40	Simian Virus 40
TAD	Transactivation Domain
TAP	Tandem Affinity Purification
TBP	Tata Binding Protein
TEV	Tobacco Etch Virus
TK	Tyrosine Kinase
Tnfr1	Tumor Necrosis Factor Receptor-1
TPA	12-0-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate
Tradd	Tumor necrosis factor Receptor Associated Death Domain
TRAIL	Tnf-Related Apoptosis-Inducing Ligand
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VpreB, γ 5	V(pre-b)-lambda5 surrogate light chain
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WHO	World Health Organisation
WSXWS	Tryptophane-Sérine-X-Tryptophane-Sérine domain
Wnt	Wingless-related mmtv integration site

Remerciements

La recherche dans le domaine médical nécessite beaucoup de passion, d'ingéniosité et de persévérance. L'importance des travaux que nous effectuons est d'une valeur inestimable. Mais rien de grand n'est accompli sans d'abord y croire. J'y ai cru, et beaucoup d'autres y ont cru.

J'aimerais tout d'abord remercier les membres de ma famille. Leur soutien a toujours été, à mes yeux, d'une grande valeur. Ceux-ci m'ont toujours montré que les rêves deviennent une réalité lorsque l'on décide de les entreprendre.

Ensuite, je salue mes collègues de laboratoire. La science consiste à émettre des hypothèses et à les vérifier. La méthode empirique est, de façon incontournable, la voie pour y parvenir. Mais à la base, de bonnes hypothèses sont souvent le fruit d'échanges fructueux. Rien de cela n'est possible sans être entouré de personnes attentives, sympathiques et rigoureuses.

Enfin, je remercie la Dre Trang Hoang, qui a rendu possible la réalisation de mes études de maîtrise. Celle-ci m'a initié à la recherche en hématologie et m'a soutenu tout au long de mon projet. J'ai beaucoup apprécié que les différentes approches proposées, tout au long de la progression de mon projet de recherche, aient toujours été bien accueillies. J'ai appris au cours de mes études que l'avancement résulte d'idées innovatrices. Mes travaux en sont la démonstration.

À tous, un gros merci.

Revue de la littérature

Hématopoïèse

L'hématopoïèse est le phénomène par lequel le sang est produit à l'intérieur de l'organisme. Les cellules sanguines sont produites à partir d'un seul type de cellules dites multipotentes. Dans le système hématopoïétique, on les nomme cellules souches hématopoïétiques (HSC). Ces dernières se subdivisent en deux catégories, les cellules souches à long terme et les cellules souches à court terme. Les cellules HSC à long terme se distinguent des cellules à court terme par leur capacité à renouveler le système hématopoïétique de souris irradiées pour une période supérieure à quatre mois. Les HSC peuvent se différencier et donner naissance à des cellules nommées progénitrices. Les cellules progénitrices ont un pouvoir de différenciation moins étendue. Trois grandes catégories de cellules peuvent être produites à partir des progéniteurs, dits oligopotents : les cellules de la lignée érythroïde, les cellules de la lignée lymphoïde ainsi que les cellules de la lignée myéloïde {Kondo, 2003 }.

Myélopoïèse

La myélopoïèse se définit comme étant le processus par lequel les monocytes et les granulocytes sont produits. Cette branche de l'hématopoïèse prend son origine de cellules progénitrices que l'on nomme « Common Myéloid Progenitor », d'où l'acronyme de CMP. Les cellules myéloïdes sont responsables des défenses innées de l'organisme. Leur formation est régulée par différents éléments intrinsèques (facteur de transcription) et extrinsèques (cytokines) à la cellule. Un dérèglement dans ces mécanismes entraîne la formation de différentes pathologies telle que le syndrome myélodysplasique (MDS), la leucémie myéloïde chronique (CML), ainsi que la leucémie myéloïde aiguë (AML)

{Rosmarin, 2005}. Dans les chapitres qui vont suivre, vous verrez l'importance de la cytokine GM-CSF, du facteur de transcription PU.1 ainsi que des protéines, nommées A1 et Mcl-1, favorisant la survie de la cellule. Le tout sera complété par une documentation portant sur les leucémies myéloïdes aiguës (AML) et les traitements qui y sont associés.

Chapitre 1

Les facteurs de croissance sont des substances, par lesquelles une cellule reçoit des signaux extérieurs, leur indiquant de proliférer ou de se différencier. Cette famille de ligand comprend de multiples sous-embranchements, incluant entre autres les interleukines (IL) et les facteurs qui stimulent la formation de colonies (CSF). Dans la myélopoïèse, les trois cytokines suivantes ont un rôle prédominant : le GM-CSF (granulocytes, macrophages), le G-CSF (granulocytes) et finalement, le M-CSF (macrophages). Favorisant à la fois la production de granulocytes et de macrophages, le GM-CSF présente un atout remarquable pour étudier les processus de différenciation de la lignée myéloïde. Celui-ci fait donc partie des éléments importants de mon étude. Le chapitre 1 présentera les principales informations concernant le récepteur GM-CSFR et son ligand.

GM-CSFR

Facteur de croissance

Le récepteur du GM-CSF (GM-CSFR ou GMR) fait partie de la famille gp140 des récepteurs à cytokine de type 1. Celui-ci est un hétérodimère composé des chaînes « α » et « β » dont la constante de dissociation (K_D) est de 30 – 100 pM {Chiba, 1990;Hayashida, 1990;Gorman, 1990;Park, 1992}. Ce récepteur est exprimé dans les cellules des macrophages, des neutrophiles et des éosinophiles des souris, ainsi que des humains {DiPersio, 1988}. Mais ces dernières ne sont pas les seules à exprimer ce récepteur, puisqu'on le retrouve sur des précurseurs des érythrocytes et des mégacaryocytes, sur des lymphocytes B et T fœtaux, des fibroblastes, des cellules

utérines et des cellules de type ostéoclaste {Lanza, 1997;Nicola, 1993;Stacchini, 1996 1;Wognum, 1994;Jubinsky, 1994}. Des cellules cancéreuses, telles que les leucémies lymphoïdes, myéloïdes et même des cancers non hématopoïétiques, peuvent présenter l'expression de ce récepteur à leur surface cellulaire {Gasson, 1986;Kelleher, 1988;Dedhar, 1988;Baldwin, 1993;Budel, 1990}. Le GM-CSFR ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque. Celui-ci est associé à des protéines de la famille JAK (janus kinase), qui représente une famille de tyrosine kinase intracellulaire possédant deux domaines kinases. Celles-ci permettent la phosphorylation du récepteur ainsi que la liaison d'adaptateurs protéïniques possédant des domaines de la famille SH2, responsable d'engager le déclenchement de la cascade signalétique intracellulaire {Reddy, 2000;Itoh, 1998;de Groot, 1998}.

La chaîne « α »

La chaîne « α » du récepteur du GM-CSF, à un rôle important, c'est elle qui confère au récepteur la spécificité pour son ligand. Seule, cette chaîne présente une faible affinité de liaison pour le GM-CSF, possédant une constante de dissociation (Kd) qui se situe aux alentours 1-10 nM.

La forme humaine de cette chaîne à une taille 80 kD (voir *figure 1*). Celle-ci est composée principalement d'un domaine extracellulaire de 298 a.a. ainsi que d'un domaine transmembranaire de 26 a.a. et d'une queue cytoplasmique de 54 a.a. {Gearing, 1989}. Le domaine extracellulaire comporte 11 sites potentiels de N-glycosylation, ainsi qu'un motif WSXWS, qui est commun au récepteur de cette famille {Ding, 1995; Nicola, 1991}. Pour ce qui est de l'homologie de séquences, entre la forme humaine (400 a.a.) et murine (387 a.a.) de cette chaîne, on retrouve une identité de 35 % {Park, 1992}. Si on

regarde la région promotrice en 5' de la séquence de cette chaîne du récepteur, on retrouve des motifs de reconnaissance de facteurs de transcription tels que PU.1, AP – 1, GATA, c - ETS, SP1, C/EBP, NF - κ B {Akagawa, 2003}. Malgré le rôle primordial de la chaîne « α » pour la liaison et l'activation du récepteur, la chaîne « β » est essentielle à la transmission du signal émanant du récepteur.

La chaîne « β »

C'est la chaîne « β » de ce récepteur qui est responsable de la transduction du signal (voir *figure 1*). D'une taille de 95 kD chez l'humain, cette protéine est composée de 880 a.a. divisés en trois grandes régions : un domaine extracellulaire (400 a.a.), un domaine transmembranaire (30 a.a.) et un domaine intracellulaire (450 a.a.). Sa séquence globale comporte 55 % d'homologie avec son analogue murin {Hayashida, 1990}. Enfin, le promoteur proximal de la chaîne « β » présente un site de liaison pour PU.1, qui contribue à la régulation de son expression basale {Nicola, 1991}.

La région extracellulaire, à elle seule, n'a qu'une faible affinité pour le GM-CSF. La liaison avec la chaîne « α » est donc primordiale. On retrouve à cet endroit trois sites potentiels de N-glycosylation {Hayashida, 1990} et deux domaines de 200 a.a. nommés CRM (Cytokine Receptor Module). Du côté cytoplasmique, le domaine intracellulaire se compose d'une région proximale et distale. La région proximale lie les membres de la famille Jak, entraînant l'activation de protéines telles que STAT5, c-myc et pim-1. Cela a pour conséquence l'induction d'un signal de prolifération {Quelle, 1994;Sato, 1993}. Complémentairement, le domaine distal est responsable de la signalisation par

l'intermédiaire des protéines PI3K, Shc-Ras-MAPK, ainsi que des facteurs de transcription tels que c-jun et c-fos. Cette dernière est associée aux fonctions de différenciation, d'atténuation du niveau d'apoptose, ainsi que de la rétro-inhibition du récepteur {Nicola, 1997; Sakamaki, 1992; Liu, 1999; de Groot, 1998; Smith, 1997; Sato, 1993}.

Au niveau de la signalisation, différents inhibiteurs de cette voie sont connus. Pour commencer, on retrouve la phosphatase SHP-1 qui s'associe à la chaîne « β_c » du GM-CSFR. Cette dernière peut également se lier aux protéines Jak1 ou Jak2 pour inhiber la signalisation de cette voie {Bone, 1997; Yi, 1993}. Il y a aussi les protéines de la famille SOCS qui agissent en inhibant l'activité JAK. {Starr, 1997; Greenhalgh, 2001; Alexander, 1999; Nicola, 1999}.

La voie signalétique découlant de l'activation de cet hétérodimère entraîne des changements majeurs au niveau des cellules, ce qui a des répercussions sur le bon fonctionnement de l'organisme en entier.

Fonctions biologiques et cliniques

Multiples sont les fonctions biologiques du récepteur au GM-CSF. Le premier aspect que je vais traiter concerne l'importance de la concentration du ligand sur la fonction des signaux émis par le GMR. Une faible concentration du GM-CSF est connue pour favoriser la survie cellulaire {Williams, 1990}. À l'opposé, une forte concentration du GM-CSF va favoriser la prolifération {Metcalf, 1982; Nicola, 1982}. Ce même type de processus est remarqué pour la différenciation cellulaire. Tandis qu'une faible concentration du GM-CSF favorise la production de macrophages, une forte concentration favorisera plutôt l'apparition des granulocytes. Ceci est le cas même en

présence ex vivo de M-CSF dans le milieu de culture, qui est responsable normalement de favoriser l'apparition de macrophages {Metcalf, 1992}. Une fois que la concentration circulante du GM-CSF a atteint des niveaux importants et que les fonctions biologiques qui en découlent ont eu lieu, le surplus de ligands doit être éliminé. La dégradation du GM-CSF s'effectue principalement au niveau du foie {Bartocci, 1987; Burgess, 1977; Metcalf, 1988}. De plus, la littérature présente des études à propos de mécanismes par lesquels l'internalisation du récepteur a lieu {Nicola, 1988; Martinez-Moczygemba, 2001}.

Outre les effets que peut avoir la concentration du GM-CSF sur la fonction de son récepteur, celui-ci a un rôle à jouer dans d'autres processus biologiques importants. Il agit dans le processus d'inflammation permettant des réponses biologiques telles que l'augmentation de la présentation d'antigènes, d'agents chimiotactiques, d'histamine, d'espèces d'oxygène réactives et de la stimulation de la phagocytose. Cela a pour effet d'activer la défense de l'organisme contre les bactéries, les virus, les champignons, les parasites ainsi que contre les cellules cancéreuses.

D'un point de vue clinique, cette cytokine est utilisée pour favoriser l'hématopoïèse en réponse à un traitement de chimiothérapie. L'élimination de bactéries et d'organismes fongiques représente une autre application thérapeutique découlant de l'activation de ce type de récepteur {Hubel, 2002}. Néanmoins, il faut noter que la progression de certaines maladies telles que l'arthrite rhumatoïde {Williamson, 1988} et l'asthme {Yamashita, 2002} implique l'action du GM-CSF. En effet, celui-ci favoriserait l'activation des cellules T, en augmentant le niveau de HLA-DR ainsi qu'en augmentant la dégradation de la matrice cartilagineuse, par la voie de signaux transmis aux neutrophiles {Monfardini,

2002}. Enfin, l'utilisation du GM-CSF dans des traitements anticancéreux est actuellement en élaboration. Le GVAX est un exemple de vaccin anticancéreux qui pourrait être utilisé pour traiter le cancer de la prostate, des poumons et des leucémies de type AML {Nemunaitis, 2004 ;Simons, 2006 ;Soiffer, 1998}. En ce moment, le potentiel thérapeutique de cette molécule est la cible d'une très grande attention dans le domaine de l'oncologie. Ceci érige une vue d'ensemble sur l'action physiologique du GM-CSF à l'intérieur de l'organisme.

Surexpression et sous-expression du GMR

Les faits rapportés ont clairement illustré l'importance qu'avait la concentration circulante du GM-CSF sur les effets biologiques découlant de l'activation du GMR. Dans le volet suivant, c'est l'effet d'une surexpression ou d'une sous-expression du GMR qui sera présentée. Une surexpression de récepteurs du GM-CSF entraîne des effets pathologiques notables. Les souris transgéniques démontrent en effet une accumulation du nombre de macrophages et ceci, en plus de devenir aveugles {Lang, 1987}. À son opposé, l'ablation du gène du GM-CSF ainsi que celui de la chaîne « β » du récepteur du GM-CSF ont été rapportés dans la littérature. Le principal phénotype se trouve à être la perte des macrophages alvéolaires accompagnés d'une susceptibilité aux pneumonies {Paine, 2001;LeVine, 1999}. Pour ces résultats, il semble que le facteur de transcription PU.1 soit impliqué {Shibata, 2001;Bonfield, 2003;Dirksen, 1997}.

Le ligand GM-CSF

À la suite de ces informations concernant le récepteur du GM-CSF, voici un passage traitant de son ligand, dont la découverte a été faite en 1977. La cytokine GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) est un peptide d'une longueur de 127 a.a. chez l'humain et de 124 a.a. chez la souris. Son poids moléculaire se situe aux alentours de 14.7 à 33 kD, variant selon le niveau de glycosylation et les modifications post-transcriptionnelles qui lui sont rattachées {Cebon, 1990; Schrimsher, 1987}. Ce dernier a des ponts disulfures à deux endroits ainsi que deux sites de glycosylation aux positions Asn27 et Asn37 pour la forme humaine. Pour la forme murine, c'est aux positions Asn66 et Asn75 qu'on retrouve les sites de N-glycosylation {Schrimsher, 1987; Cebon, 1990; DeLamarter, 1985}. Les ponts disulfures sont responsables de maintenir la structure tertiaire de la molécule {DeLamarter, 1985 ;Moonen, 1987} et les sites de glycosylation influencent la spécificité de l'activité biologique de la molécule {Nicola, 1979; Shanafelt, 1989}. Les réactions croisées ne sont pas possibles entre la forme humaine et la forme murine due au fait qu'il existe très peu d'homologie entre les deux ligands.

Ceci complète l'information pertinente relative à la caractérisation et la compréhension des fonctions du récepteur GMR. Ce dernier représente une porte d'entrée pour les signaux extracellulaires (extrinsèques) régulant les fonctions des cellules myéloïdes et de leurs précurseurs. La voie signalétique découlant de l'activation du GMR a plusieurs conséquences sur la régulation transcriptionnelle des gènes des cellules. L'une d'elles concerne le facteur de transcription PU.1, qui est un élément essentiel à l'hématopoïèse, et plus précisément, dans les recherches que j'ai effectuées, pour la myélopoïèse.

Chapitre 2

Facteur de transcription

Deux grandes catégories de signaux peuvent influencer la destinée de la cellule : les signaux extrinsèques, tels que ceux présentés au chapitre 1, ainsi que les signaux intrinsèques. Les facteurs responsables de réguler la transcription des gènes représentent une voie majeure dans le contrôle de l'hématopoïèse. Parmi les plus connues, il y a PU.1, SCL, Ikaros, C/EBP α , C/EBP β , GATA-1 et GATA-2, pour ne nommer que ceux-là. La perte de chacun de ces gènes a des conséquences draconiennes sur l'hématopoïèse. De façon plus pointue, le présent chapitre démontrera l'importance capitale qu'a le facteur de transcription PU.1 dans la myélopoïèse. Par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes dans lesquels cette protéine est impliquée est primordiale à obtenir.

PU.1

Découverte

La découverte de la séquence qui code pour PU.1 (nommé Spi-1) a été faite parallèlement par deux groupes de recherche indépendants. Le premier groupe a effectué le crible d'une librairie d'expression. Pour ce faire, ils ont décidé d'utiliser une sonde qui est capable de s'hybrider à la boîte Y, du promoteur du complexe d'histocompatibilité de la classe II I-A- β . La séquence riche en purine lui a valu le nom de PU.1 signifiant « Purine Riche One » {Klemsz, 1990}. Le deuxième groupe a identifié un locus nommé Spi-1 (Spleen focus forming virus Proviral Integration One), un site d'intégration du virus SFFV qui produit, dans 95 % des cas, l'apparition d'érythroleucémies. Ce n'est que quelque temps après que l'on a découvert que la séquence de Spi-1 produisait la surexpression d'un

proto-oncogène qui fut identifié comme étant PU.1 {Goebel, 1990}. Depuis, on a découvert de nombreuses fonctions que jouait PU.1 dans l'hématopoïèse, la myélopoïèse ainsi que dans la fonction des cellules myéloïdes matures.

Régulation de PU.1

La régulation transcriptionnelle de PU.1 est effectuée à partir de trois principales régions. Celles-ci sont : une région proximale allant du site d'initiation à une position située à -334 pb, une région distale localisée à une distance d'approximativement 14 kb en amont du codon d'initiation de la transcription, ainsi qu'une dernière à l'intérieur du deuxième intron de PU.1. Par rapport à la région proximale, on retrouve les sites Sp1 à -39 pb, Oct à -54 pb et GATA-1 à -15 pb ainsi que la boîte PU.1 à + 20 pb. Les quatre premières protéines correspondantes, soit Oct-1, Sp1, GATA-1 et Sp1B, sont exprimées dans les cellules HSC, et pourraient être importantes pour l'augmentation du niveau d'expression de PU.1 pendant les premiers stades de la différenciation. Enfin, la présence d'une région régulatrice propre à PU.1 indique que celui-ci aurait un rôle à jouer dans le contrôle de sa propre expression, comme différentes études l'indiquent {Moreau-Gachelin, 1989;Chen, 1995;Chen, 1996;Li, 2001}. Toutefois, un fragment de 2.1 kb en amont du site d'initiation de PU.1 est incapable, à lui seul, d'activer un gène rapporteur dans des souris transgéniques ou dans des lignées cellulaires {Chen, 1995;Chen, 1996}. Ceci s'explique par l'importance des autres régions régulatrices, qui ont été découvertes par la suite. Les deux autres régions régulatrices ont été découvertes grâce au test d'hypersensibilité à la DNaseI. Ce test a été effectué sur le chromosome artificiel PAC (P1 Artificiel Chromosome) contenu dans des souris transgéniques. Ce dernier contient la

séquence du gène PU.1 en plus de 30 kb de la séquence en amont et en aval {Li, 2001}. La région proximale (-334 pb) et la région distale (-14 kb) sont capables d'activer l'expression de gène rapporteur dans les souris transgéniques. De plus, leur schéma d'expression est similaire à celui observé pour la forme de PU.1 endogène. En surcroît, une délétion de la région promotrice distale, par recombinaison homologue chez la souris, entraîne une diminution de l'expression à 20 % du niveau normal {Rosenbauer, 2004}. Deux sites hautement conservés, d'une longueur de 200 pb, contiennent les séquences de liaison de la protéine AML, ainsi que de PU.1. Ceci explique d'ailleurs que l'expression de PU.1 soit diminuée dans les souris AML1^{-/-}.

En ce qui concerne la régulation post-traductionnelle, la modulation de PU.1 se fait par l'intermédiaire de la phosphorylation de différentes régions de la protéine. Ce contrôle est effectué par des protéines telles que CKII (Casein Kinase II) à la suite d'une stimulation des cellules au LPS ou au TPA {Lodie, 1997}. Il semblerait que ces phosphorylations aient une action déterminante sur la capacité de PU.1 à activer différents promoteurs {Lodie, 1997}, tel que cela a été démontré par les études de sa structure.

Structure

Le premier aspect que je vais aborder porte sur la séquence de PU.1. La forme murine de PU.1 est codée par une séquence de 816 paires de bases, ce qui correspond à une protéine de 272 ou de 266 acides aminés, selon le codon d'initiation qui est employé pour la transcription {Lloberas, 1999}. Ce gène est contenu dans le chromosome 2 à la bande E3. Pour ce qui est de sa contrepartie humaine de 264 acides aminés, celle-ci comporte 85 % d'homologie avec la forme murine. Cette dernière est localisée sur le chromosome 11, à la

position p11.22 {Kodandapani, 1996 }. Voici maintenant une description plus détaillée de chacun des domaines qui le composent (voir *figure II*).

Domaine ETS

Le facteur de transcription PU.1 fait partie de la famille ETS (E Twenty Six) caractérisée par un domaine de liaison à l'ADN comportant 85 résidus {Leprince, 1983;Nunn, 1983 }. Ce domaine a une forme similaire au domaine « hélice tour hélice », liant l'ADN contenant une séquence minimale GGA {Kodandapani, 1996;Werner, 1995;Donaldson, 1996}. Le domaine ETS de PU.1 n'a que 35 % d'homologie avec les autres membres de cette famille {Rosmarin, 2005}. C'est ce dernier qui est responsable de reconnaître et de lier les « boîtes PU.1 », composées de la séquence 5' -GAGGAA-3' {Klemsz, 1990}. Jusqu'à maintenant, seul le domaine de liaison à l'ADN a été cristallisé {Kodandapani, 1996}. Les acides aminés R232 et R235, de l'hélice α -3, sont ceux qui entrent en contact avec le sillon majeur de la séquence d'ADN reconnue {Kodandapani, 1996}. Le résidu K245 de l'« aile » lie en amont, et le résidu K219 de la partie « tour » lie l'ADN en aval de la séquence centrale 5' -GGAA-3'. La première boucle est formée des feuillets β 3 et β 4 tandis que la deuxième boucle est constituée du repliement entre les feuillets β 2 et β 3. Cette liaison de PU.1 sur son site de reconnaissance entraîne une courbure de l'ADN de 8° à l'intérieur du sillon majeur {Behre, 1999}. Certaines protéines ont été identifiées pour interagir directement avec cette région. Parmi celles-ci, on retrouve c-Jun, GATA-1, GATA-2, C/EBP α , C/EBP β et AML1 {Rekhtman, 1999;Nerlov, 2000;Petrovick, 1998;Reddy, 2002;Behre, 1999}. Juxtaposés à cette région, on retrouve le domaine PEST qui sera décrit dans la section qui suit.

Domaine PEST

Le domaine PEST se situe entre le 118e et le 160e acide aminé de la forme humaine de PU.1. Son nom est un acronyme représentant quatre acides aminés à forte teneur dans cette région : la proline (P), l'acide glutamique (E), la sérine (S) ainsi que la thréonine (T). Ce domaine est reconnu pour faciliter la protéolyse de la protéine qui le contient {Rogers, 1986}. Parmi les protéines connues pour interagir avec ce domaine dans PU.1, on retrouve des IRF (Interféron Regulating Factor) tels que PIP (PU.1 Interacting Factor) et ISCBP (Interferon Sequence Consensus Binding Protein). Un site de phosphorylation est connu pour être essentiel à la liaison de PU.1 avec PIP, soit la sérine 148 {Kodandapani, 1996}. De plus, les sérines 132 et 133 pourraient être des cibles de régulation pour la phosphorylation de PU.1. Malheureusement, il y a encore très peu de documentation à ce sujet. Bien que ces sites de phosphorylation aient un rôle régulateur sur la fonction de PU.1, c'est le domaine de transactivation, décrit dans les paragraphes qui suivent, qui possède un rôle majeur en la matière.

Domaine de transactivation

Située à l'extrémité N-terminale de la protéine, cette grande région nommée TAD (TransActivation Domain) se subdivise en quatre domaines. La position 1 à 74 regroupe trois régions riches en résidus acides. Ces dernières sont suivies d'une zone contenant beaucoup de résidus de glutamine, délimitant une région comprise entre la position 74 et 118. Les sérines 41 et 45, du domaine TAD, sont connues pour être des sites de phosphorylation essentiels pour la prolifération des macrophages {Celada, 1996}. En effet, des expériences utilisant des protéines PU.1 mutées aux différentes sérines ont

démontré que ces deux résidus étaient nécessaires pour la prolifération des macrophages en présence de la cytokine M-CSF.

Parmi les protéines qui interagissent avec ce domaine, on retrouve des membres de la machinerie basale de transcription tels que TFIID, TBP (TATA binding protein) ainsi que d'autres protéines telles que RB (retino blastoma protein), GATA-1, GATA-2, GR (glucocorticoid receptor) et HSP90 (Heat shock protein 90) {Hagemeier, 1993;Nagulapalli, 1995}. Il serait alors intéressant de savoir comment cette protéine est régulée. La section qui suit va fournir les informations concernant son contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel.

Fonction biologique

Rôle de PU.1 pendant la différenciation

L'expression du facteur de transcription PU.1 se limite au système hématopoïétique. Parmi les cellules sanguines ayant atteint la maturité, on retrouve PU.1 exprimé dans les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes B ainsi que les mastocytes. {Ray, 1992;Hromas,1993 ;Galson, 1993;Chen, 1995;Pettersson, 1995}. La nécessité de ce facteur de transcription a également largement été découverte par l'étude de délétion de gènes (knock-out) chez la souris. Les groupes de Maki et de Singh {McKercher, 1996;Scott, 1994} ont produit des souris déficientes pour le gène PU.1. Les souris homozygotes pour la délétion de PU.1, produites par le groupe de Singh, sont mortes aux jours de gestation 18.5, dû à une déficience au niveau hématopoïétique. Ces derniers présentaient une absence de lymphocytes B, de lymphocytes T matures, ainsi que de macrophages. De même, il a été décrit, à la suite d'analyses de cytométrie de flux, que la

population KSLT (c-kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻, Thy^{low}) riche en cellules souches était fortement diminuée dans le foie fœtal au jour embryonnaire 12.5 à 15.5. Au jour 14.5 embryonnaire, des diminutions marquées des progéniteurs hématopoïétiques CMP (Common Myeloid Progenitor) et GMP (Graculocyte Macrophage Progenitor) mais pas des MEP (Megakariocyte Erythrocyte Progenitor) ont été notés. Ceci indique que PU.1 n'est pas nécessaire à la maturation des cellules de la lignée érythroïde. Pour ce qui est des résultats obtenus par le groupe de Maki et collègues, la majorité des résultats obtenus converge avec ceux du groupe de Singh. Toutefois, on retrouve certaines différences notables en ce qui a trait entre autres à la durée de vie des souris homozygotes. Celles-ci meurent deux à trois jours après la naissance, causée par des problèmes de septicémie. Avec l'ajout de traitement aux antibiotiques, leur durée de vie est prolongée pour atteindre deux semaines. Dans ces souris, l'apparition de neutrophiles, dont certaines fonctions sont défailantes, s'effectue 2 à 3 jours après la naissance. L'apparition de lymphocytes T est remarquée au jour 5 à 8 tandis qu'aucun monocyte/macrophage n'est détectable jusqu'à deux semaines après la naissance. De surcroît, on remarque une absence de l'expression des récepteurs GM-CSF, G-CSF et M-CSF. D'autres gènes essentiels pour la fonction des neutrophiles sont aussi affectés par l'absence de ce facteur de transcription.

La lignée cellulaire 503, a été créée à partir de ces souris PU.1^{-/-} par le groupe de Torbett et coll. {Anderson, 1999}. Ces cellules n'expriment pas le facteur de transcription PU.1, ne répondent pas à la présence de GM-CSF, G-CSF et M-CSF dans le milieu de culture. Ce phénomène s'explique par l'absence des récepteurs correspondants à la surface des cellules. La restitution de PU.1 par l'utilisation de rétrovirus permet à nouveau

l'expression des récepteurs GM-CSF, G-CSF et M-CSF. Il en est de même pour l'expression de gènes qui sont propres aux neutrophiles tels que ceux des granules secondaires. Cette expression permet du même fait l'induction des cellules à se différencier en granulocytes et en monocytes matures.

Pour ce qui a trait au rôle distinctif de PU.1, dans la prolifération des macrophages, il a déjà été démontré dans la littérature que la surexpression de ce facteur de transcription dans des cellules dérivées de la moelle osseuse augmente la prolifération dépendante de la cytokine M-CSF. Au contraire, l'induction d'un antisens de PU.1 diminue ce pouvoir prolifératif. Il en est de même pour l'expression d'un « dominant négatif » n'exprimant que le domaine ETS. L'expression de ce dernier, dans les cellules, entraîne une diminution de leur capacité à proliférer {Singh, 1999}.

En plus d'être essentiel pour l'expression de récepteurs de la voie myéloïde, PU.1 est aussi essentiel pour l'expression de la chaîne « α » du récepteur à l'IL-7. Ceci permet d'expliquer les problèmes de prolifération et de différenciation à l'intérieur de la lignée lymphoïde qui ressortent en l'absence de PU.1. En effet, lorsque l'on restaure l'expression de la chaîne « α » du récepteur à l'IL-7 dans les cellules déficientes en PU.1, on retrouve la capacité de ces précurseurs à proliférer, mais pas celle à se différencier. Par contre, lorsqu'on restaure l'expression de la forme endogène de PU.1, il est de nouveau possible d'obtenir des cellules pro-B qui expriment les marqueurs B220 et CD19. Les marqueurs de surface mb-1, B-29, $\gamma 5$ et VpreB, associés à la formation de lymphocytes B matures, sont aussi retrouvés. De plus, la capacité à réarranger le locus de l'immunoglobuline H est retrouvée par ces cellules. Enfin, PU.1 est essentiel pour le développement des

mastocytes et une réinsertion de PU.1 dans les précurseurs qui en sont déficients rétablit la production de ce type de cellules {Singh, 1999}. L'ensemble de ces informations indique donc que PU.1 est impliqué dans des mécanismes essentiels pour la différenciation de la lignée myéloïde et lymphoïde.

Gradation du niveau d'expression de PU.1

Un concept qui est important de comprendre dans l'étude de l'hématopoïèse est celui du « confinement » (commitment en anglais). Le confinement des cellules lors de la différenciation cellulaire s'explique par la perte du potentiel qu'ont les cellules à pouvoir produire différents types de tissus matures. Par exemple, les cellules souches embryonnaires sont dites totipotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la propriété de se différencier et de produire tous les types cellulaires présents dans l'organisme. Toutefois, les cellules souches hématopoïétiques dites multipotentes ne peuvent plus produire toutes les cellules d'un organisme, mais seulement ceux d'un tissu particulier. On peut donner, à titre d'exemple, les cellules du système sanguin. Enfin, des progéniteurs, que l'on dit oligopotents, ne peuvent produire qu'un type cellulaire particulier à l'intérieur d'un tissu. Par exemple, les cellules GMP ne peuvent produire que des granulocytes et des macrophages. En regard à PU.1, le niveau d'expression de ce dernier influence le confinement des cellules (voir *figure III*). Si on commence au début de l'hématopoïèse, dans les cellules souches hématopoïétiques (HSC), PU.1 est présent, mais à de faibles niveaux. Lorsque les cellules arrivent à l'embranchement entre la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde, une augmentation du niveau d'expression de PU.1 favorise le confinement vers la lignée myéloïde par rapport à la lignée lymphoïde. Dans la lignée

lymphoïde, les cellules qui se confinent à devenir des lymphocytes B conservent l'expression de la protéine PU.1 tandis que l'expression de PU.1 s'éteint dans les cellules confinées à devenir des lymphocytes T. Si on regarde du côté de l'embranchement entre la lignée myéloïde et érythroïde, les cellules qui se dirigent vers la lignée érythroïde voient l'expression de PU.1 chuter de façon impérative. Il a été démontré, que cette diminution de PU.1 est due, en partie, à une répression qui est effectuée par le facteur de transcription GATA-1. Ce dernier est un des éléments clés pour la différenciation érythroïde. À l'opposé, l'expression de PU.1 est conservée lors du confinement permettant de produire des granulocytes et des macrophages. Enfin, au point de jonction entre la production de granulocytes et de monocytes/macrophages, une très forte augmentation de ce facteur de transcription est normalement reliée à la production monocytes/macrophages. Il est maintenant possible de comprendre à quel point la régulation d'expression de cette protéine est primordiale pour la destinée des cellules sanguines qui seront produites. {Scott, 1997;Orkin, 2000;Nerlov, 1998;DeKoter, 2000 ;Cross, 1994;Voso, 1994 ;Voso, 1994 }. Il est à noter que la concentration de PU.1 n'est pas le seul élément important dans le confinement hématopoïétique. L'étape du processus d'hématopoïèse pour laquelle le niveau de PU.1 s'accroît ou s'amointrit ainsi que les partenaires d'interaction présents sont tous des éléments qui ont un rôle déterminant clairement établi dans la littérature.

Partenaire d'interactions

De multiples protéines s'associent à PU.1 pour induire une fonction précise à l'intérieur de la cellule (*voir Figure II*). Parmi les plus connues, on retrouve la protéine GATA-1, un facteur de transcription essentielle de la lignée érythroïde. Lorsque GATA-1 s'associe avec l'extrémité C-terminale de PU.1, plus précisément sur le feuillet $\beta 3/\beta 4$, celle-ci empêche la liaison avec le facteur de transcription c-jun, pouvant normalement lier cette région. {Behre, 1999;Nerlov, 2000;Rekhtman, 1999;Zhang, 1999;Zhang, 2000}. Cela a pour effet de séquestrer PU.1, le rendant ainsi inopérant. Inversement, la protéine PU.1 peut séquestrer la protéine GATA-1 en effectuant une liaison avec son extrémité N-terminale, qui contient le domaine de transactivation. {Cantor, 2001;Zhang, 2000;Rekhtman, 1999}. Il en résulte, cette fois-ci, en une inhibition de la protéine GATA-1. Par conséquent, la formation de ce complexe empêche le confinement vers la lignée érythroïde. Dans la même famille de protéine, on retrouve GATA-2 qui interagit avec PU.1 favorisant la différenciation des mastocytes {Glimcher, 1999;Georgopoulos, 1997;Henkel, 1994}.

La protéine TBP (TATA binding protein) ainsi que les autres TAFs (TATA associated factors) sont aussi des partenaires d'interaction de PU.1. Ceci confère un rôle central dans la transcription des gènes hématopoïétiques. Ceci permet d'ailleurs d'expliquer l'absence de boîte TATA sur certaines des régions promotrice régulées par PU.1 { Eichbaum, 1994}. En effet, de nombreux gènes nécessitent la présence de la boîte TATA pour que la transcription des gènes puisse avoir lieu. Toutefois, il y a des exceptions dont fait partie la protéine PU.1, qui peut assembler la machinerie transcriptionnelle en l'absence de

celle-ci. Ceci permet également de mieux comprendre le rôle central que joue ce facteur de transcription dans le processus de myélopoïèse, puisque son expression est, par conséquent, nécessaire à la transcription de plusieurs gènes en permettant l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle.

Gènes cibles

De multiples gènes contiennent des régions régulatrices contrôlées par PU.1. Parmi ceux-ci, on compte le récepteur du GM-CSF, du G-CSF et du M-CSF (c-fms) ainsi que les marqueurs de surface CD11b, CD18, CD16, CD64, les récepteurs scavenger de type I et II ainsi que les récepteurs au mannose. Mis à part les récepteurs de surface cellulaire, PU.1 est retrouvé sur les régions promotrice des immunoglobulines telles que la chaîne légère κ et λ , la chaîne lourde μ , la chaîne J ainsi que la protéine membranaire MB-1. Finalement, d'autres gènes, qui ne font pas partie des groupes présentés précédemment, sont régulés par PU.1. C'est le cas de la protéinase-3, des tyrosines kinases c-fes, c-fos, de l'IL-1 β , de l'IL-4, du MHC class II I-A- β , du gp91 et du p47. {Kominato, 1995;Buras, 1995, Eklund, 1998;Shin, 1993;Rosmarin, 1995;Pahl, 1993 ;Feinman, 1994;Aittomaki, 2000;Zhang, 1994 ;Hohaus, 1995, Henkel, 1994}. PU.1 lui-même figure parmi ses propres cibles de régulation, ce qui lui permet d'effectuer une autorégulation de son activité {Chen, 1996;Chen, 1995;Li, 2001;Moreau-Gachelin, 1989 }. Une caractéristique importante, souvent retrouvée sur les sites de liaison de PU.1, est l'absence de boîte TATA. La boîte PU.1 semble en quelque sorte remplacer ce site de liaison, associé avec d'autres sites de liaison pour des régulateurs ubiquitaires tels que Sp1, AML1, C/EBP, TBP et TAFs {Petrovick, 1998;Hagemeier, 1993}. Ceci a d'ailleurs été démontré dans le

cas du promoteur du FcγRI-B. Dans ce cas, les chercheurs ont supprimé la boîte PU.1, entraînant la perte de fonction du promoteur. Lorsque ceux-ci ont inséré une boîte TATA pour remplacer la boîte PU.1, le promoteur est devenu fonctionnel à nouveau. {Petrovick, 1998;Eichbaum, 1994 }. Ce dernier exemple permet de comprendre le rôle déterminant que joue PU.1 dans des processus biologiques fondamentaux. Comme vous le verrez plus loin, de nombreux faits laissent également croire que ce facteur de transcription pourrait avoir un rôle important à jouer dans l'apparition et le développement des leucémies.

Sommairement, le facteur de transcription PU.1 est essentiel au fonctionnement de l'hématopoïèse. Chaque domaine qui le compose lui attribue des caractéristiques distinctes et uniques. Parmi ces dernières, les sites de liaison à des partenaires protéiniques jouent un rôle déterminant sur son activité. Ce dernier va alors réguler une vaste gamme de gènes, incluant des récepteurs, des cytokines (IL-1β, IL-4), des immunoglobulines et d'autres facteurs de transcription; pour ne nommer que ceux-là. Parmi les nombreuses cibles énumérées précédemment, deux nouvelles viennent de s'y ajouter : A1 et Mcl-1. Les recherches que j'ai effectuées en laboratoire m'ont permis de constater que PU.1 avait également un rôle important à jouer dans les mécanismes de régulation de la vie et de la mort cellulaire. Le prochain chapitre vous introduira aux principaux concepts associés aux protéines régulatrices de l'apoptose.

Chapitre 3

Apoptose

L'apoptose est un phénomène qui se définit comme étant la mort programmée de la cellule. Celui-ci est caractérisé par une fragmentation de l'ADN, une condensation du noyau, un rétrécissement de la cellule et la libération de corps que l'on dit « apoptotique » {Kerr, 1972}. Ce phénomène a une fonction bien définie dans de nombreux processus biologiques. Les deux situations les plus connues dans lesquelles le processus d'apoptose est déclenché sont le développement embryonnaire ainsi que l'éradication des cellules fortement endommagées. L'apoptose est aussi retrouvée dans divers types de pathologie. L'apparition des cancers, la neurodégénérescence et les maladies auto-immunitaires figurent parmi ces derniers. {Vaux, 1999;Pellegrini, 1999 }. Différentes espèces ont permis de mieux comprendre les voies signalétiques responsables de l'apoptose. Ceci inclut la drosophile, *C. elegans* et la souris {Pellegrini, 1999;Ellis, 1991}. Les paragraphes qui suivent présenteront les principaux concepts reliés à ce processus.

Principaux acteurs de la mort cellulaire programmée

Pour bien comprendre les rouages qui conduisent à une mort cellulaire programmée, il est important de bien connaître les principaux acteurs qui entrent en jeu. Les deux principales catégories sont : les caspases et les membres de la famille Bcl-2.

Les caspases

Pour ce qui est des caspases, elles agissent à titre de « Cystéine et ASpartate protéASE » intracellulaire. Celles-ci se retrouvent dans les cellules normales sous la forme inactive de pro-caspase. Un clivage de la protéine est alors nécessaire pour les activer. Cette famille se subdivise en deux groupes : les caspases initiatrices et les caspases effectrices. Les caspases initiatrices englobent, entre autres, la caspase 8 ainsi que la caspase 9, qui jouent un rôle dans la cascade signalétique qui mène à l'apoptose. De l'autre côté, on retrouve les caspases effectrices regroupant, parmi les plus connues, la caspase 3, 6 et 7, qui ont une action directe sur les processus d'autodestruction de la cellule.

Famille Bcl-2

Le second groupe, mais non le moindre, est la famille Bcl-2. Deux grandes catégories ressortent de ce groupe : les anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques {Gross, 1999}. Les protéines anti-apoptotiques, de la famille Bcl-2, se caractérisent par la présence de quatre domaines BH (Bcl-2 homology domain) et d'un domaine transmembranaire. Toutefois, certaines exceptions sont présentes, car la protéine Bcl2A1 ne contient pas de domaine transmembranaire. De plus, on constate que les protéines Diva et Nr13 ne contiennent pas de domaine BH3. Maintenant, si on regarde les membres de la famille Bcl-2 « pro-apoptotiques », deux grandes sous-familles peuvent être représentées. Les membres ne

contenant qu'un domaine BH3 sont nommés « BH3-only » et ceux contenant plusieurs domaines BH. Maintenant que les principaux joueurs sont connus, les principaux concepts décrivant la cascade initiatrice de l'apoptose vont être présentés (voir *figure IV*).

Mécanisme.

Les cellules entrent en apoptose en réponse à différents stimuli. Ceux-ci proviennent d'une source externe ou interne à la cellule. Les signaux externes sont représentés par des toxines, des radiations ultraviolettes, une privation de facteurs de croissance essentielle pour la survie des cellules. D'autre part, des signaux internes peuvent provenir de différentes situations telles que la transformation d'une cellule normale en cellules cancéreuses.

Les récepteurs de la mort (traduction libre de : death receptor), regroupant entre autres CD95 (Fas), Tnfr1, TRAIL, représentent les premiers éléments responsables de communiquer à la cellule l'ordre d'amorcer l'apoptose. Ces récepteurs activés emploient des adaptateurs moléculaires incluant Fadd, Tradd et Raidd pour déclencher la cascade signalétique amenant à l'apoptose. Le premier élément de cette cascade signalétique est la caspase-8 initiatrice.

C'est à ce moment que la famille Bcl-2 entre en jeu. Le signal est d'abord acheminé, par l'intermédiaire de protéine telle que Bim et Bid, à la membrane mitochondriale. Sur la membrane externe de cette organelle, on retrouve des protéines de la famille Bcl-2 « pro » et « anti » apoptotiques. La première catégorie, c'est-à-dire les pro-apoptotiques telles que Bak, serait responsable de former des canaux qui permettraient la libération d'éléments contenus dans la membrane mitochondriale lors du déclenchement de l'apoptose. À l'opposé, on retrouve la seconde classe de protéine, les anti-apoptotiques

telles que Bcl-2 et Bcl-X_L. Celles-ci seraient responsables de former, en termes figurés, des « bouchons » permettant de fermer des canaux produits par les protéines « pro-apoptotiques ». Le ratio entre les membres de la famille Bcl-2, qui sont pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques, serait responsable de déterminer si la cellule devrait amorcer une mort cellulaire programmée. Pour compléter cette figuration, si on retrouve plus de canaux (pro-apoptotique) que de bouchons (anti-apoptotique), le processus d'apoptose sera engagé. Cela sera suivi d'un déversement du contenu retrouvé entre la membrane externe et interne de la mitochondrie.

Ce déversement inclut la libération du cytochrome c, ainsi que les protéines Smac/Diablo et AIF {Li, 1997; Gross, 1999 }. La libération du cytochrome c entraîne d'une part le dysfonctionnement de la mitochondrie et la perte de sa production d'ATP. D'autre part, le cytochrome c est responsable d'activer Apaf-1 qui, à son tour, s'associera avec la procaspase 9. La première étape consistera en une auto-activation de cette dernière. Ensuite, elle ira activer la caspase 3 effectrice. Cette dernière produira de multiples coupures à l'intérieur de la cellule. Ceci entraînera la mort de la cellule sans qu'aucun phénomène d'inflammation soit présent. Cette description de l'apoptose représente le schéma généralement accepté. Toutefois, ce mécanisme est bien plus complexe. Différentes variantes peuvent être appliquées selon le contexte. Par exemple, il existe une voie qui ne passe pas par la mitochondrie pour induire le phénomène de mort cellulaire programmé. Dans ce dernier cas, l'activation de la caspase 8 va directement activer la caspase-3 effectrice. Maintenant qu'une description du phénomène d'apoptose a été présentée, deux membres anti-apoptotiques, qui ont eu une grande importance dans mes études, vont être présentés. Ceux-ci se nomment Mcl-1 et A1.

Mcl-1

En 1993, la protéine Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia) a été découverte, par le groupe de Kozopas et coll., dans des cellules de la lignée myéloïde engagée dans le processus de différenciation {Kozopas, 1993 }. Depuis ce moment, celle-ci a été le sujet de plusieurs études visant à mieux comprendre son rôle dans l'hématopoïèse et dans les leucémies. Voici les principales informations qui sont répertoriées à son sujet. Cette dernière est d'une longueur de 350 acides aminés. Sa séquence comprend à l'extrémité C-terminale les domaines BH 1 à 3 ainsi qu'un domaine transmembranaire (voir *figure II*). Du côté de l'extrémité N-terminale sont retrouvés deux domaines PEST {Yang, 1995}. Les domaines BH sont connus pour être responsables des interactions « protéines/protéines ». L'ancrage de Mcl-1 dans la membrane mitochondriale est assuré par le domaine transmembranaire. Le domaine PEST est de la même catégorie que celui qui est rencontré dans la protéine PU.1. Celui-ci permet une dégradation rapide de la protéine, ce qui assure une fine régulation de cette dernière {Nijhawan, 2003;Cuconati, 2003;Craig, 2002 }. La séquence PEST comporte deux sites de phosphorylation dont la fonction a été étudiée : soit la sérine 121 et la thréonine 163. Lorsque la thréonine 163 est la seule à être phosphorylée, Mcl-1 favorise la survie de la cellule. Par contre, s'il y a plusieurs résidus phosphorylés, Mcl-1 adoptera plutôt une fonction pro-apoptotique {Domina, 2004;Inoshita, 2002;Domina, 2000 }.

Mcl-1 possède deux isoformes qui sont produites par épissage alternatif, soit une forme longue (Mcl-1L) et une forme courte (Mcl-1S). La séquence qui code pour la forme longue est composée de trois exons. La protéine est d'une longueur de 350 acides aminés, comme indiqué précédemment. La séquence qui code pour la forme courte ne contient

pas le deuxième exon et la longueur de la protéine qui en résulte est de 272 acides aminés. Cette forme contient que le domaine PEST et le domaine BH3. Cette isoforme, contrairement à Mcl-1L, est une protéine appartenant à la catégorie pro-apoptotique {Bae, 2000 ; Bingle, 2000}.

Enfin, Mcl-1L peut-être coupé à deux endroits, soit au 128^e acide aminé ou 158^e acide aminé. La coupure produisant le fragment « Mcl-1 : 128-350 » acquiert des propriétés « pro-apoptotique » tandis que la formation du fragment « Mcl-1 : 158-350 » perd toutes activités reliées à l'activation ou à l'inhibition de l'apoptose {Clohessy, 2004 }.

On sait aussi que Mcl-1 a un rôle important à jouer dans la survie des cellules cancéreuses. Une déplétion de Mcl-1 par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens déclenche l'apoptose dans les cellules cancéreuses {Derenne, 2002;Michels, 2004 }. À l'opposé, la surexpression, dans des souris transgéniques, de Mcl-1 augmente l'incidence de l'apparition de lymphomes. {Zhou, 2001}.

GM-CSF et Mcl-1

Différents facteurs extrinsèques sont capables de réguler Mcl-1. Parmi ceux-ci, on retrouve les interleukines dont fait partie l'IL-3, les facteurs de stimulation de colonies telles que le GM-CSF ainsi que les facteurs de croissance, les interférons et le TPA {Craig, 2002; Chao, 1998 }. La présence de l'IL-3 ou du GM-CSF est connue pour faire augmenter la concentration de la protéine Mcl-1 à l'intérieur de la cellule, favorisant ainsi la survie de cette dernière.

Bcl2-related A1

A1 a été cloné pour la première fois à partir de cellules hématopoïétiques stimulées au GM-CSF et provenant de la moelle osseuse {Lin, 1993 }. Celui-ci est principalement retrouvé dans la moelle osseuse, les organes lymphoïdes, les poumons, dans les tissus hématopoïétiques tels que les lymphocytes T helper, les macrophages et les neutrophiles {Lin, 1993;Hamasaki, 1998 }. Dans la souris, contrairement à chez l'homme, on retrouve quatre isoformes : A1-a, -b, -c et -d. La séquence de Bcl-2A1 se retrouve sur le chromosome 9 chez la souris et sur le chromosome 15 chez l'humain {Lin, 1997}. L'homologie de séquence qui existe entre les isoformes « a », « b » et « d » est d'environ 95 % {Hatakeyama, 1998 }.

Une surexpression de cette protéine, A1, est retrouvée dans de nombreux cancers {Favre, 2003;Kenny, 1997;Karsan, 1996;Choi, 1995 }. Elle est composée des domaines BH1, BH2, BH3 et BH4 (voir *figure II*). Toutefois, celle-ci ne possède pas de domaine transmembranaire, contrairement aux autres membres de la famille Bcl-2.

GM-CSF et A1

A1 est normalement induit par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-3 et le VEGF. {Lin, 1996 }. On sait également que la protéine A1 voit son expression augmentée suite à une stimulation au GM-CSF {Lin, 1993 }. De plus, la présence de cette dernière se trouve à être supérieure à la fin de la différenciation myéloïde en réponse à un traitement au GM-CSF ou au G-CSF {Lin, 1993 }. Finalement, des études d'ablation de A1 (A1-a) ont montré une augmentation accrue de l'apoptose dans la population des neutrophiles {Hamasaki, 1998 }.

Bcl2-related A1

A1 a été cloné pour la première fois à partir de cellules hématopoïétiques stimulées au GM-CSF et provenant de la moelle osseuse {Lin, 1993 }. Celui-ci est principalement retrouvé dans la moelle osseuse, les organes lymphoïdes, les poumons, dans les tissus hématopoïétiques tels que les lymphocytes T helper, les macrophages et les neutrophiles {Lin, 1993;Hamasaki, 1998 }. Dans la souris, contrairement à chez l'homme, on retrouve quatre isoformes : A1-a, -b, -c et -d. La séquence de Bcl-2A1 se retrouve sur le chromosome 9 chez la souris et sur le chromosome 15 chez l'humain {Lin, 1997}. L'homologie de séquence qui existe entre les isoformes « a », « b » et « d » est d'environ 95 % {Hatakeyama, 1998 }.

Une surexpression de cette protéine, A1, est retrouvée dans de nombreux cancers {Favre, 2003;Kenny, 1997;Karsan, 1996;Choi, 1995 }. Elle est composée des domaines BH1, BH2, BH3 et BH4 (voir *figure II*). Toutefois, celle-ci ne possède pas de domaine transmembranaire, contrairement aux autres membres de la famille Bcl-2.

GM-CSF et A1

A1 est normalement induit par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-3 et le VEGF. {Lin, 1996 }. On sait également que la protéine A1 voit son expression augmentée suite à une stimulation au GM-CSF {Lin, 1993 }. De plus, la présence de cette dernière se trouve à être supérieure à la fin de la différenciation myéloïde en réponse à un traitement au GM-CSF ou au G-CSF {Lin, 1993 }. Finalement, des études d'ablation de A1 (A1-a) ont montré une augmentation accrue de l'apoptose dans la population des neutrophiles {Hamasaki, 1998 }.

Comme vous le verrez dans le prochain chapitre, les aberrations au niveau de l'hématopoïèse peuvent causer des maladies graves. Une meilleure compréhension des mécanismes qui contrôlent la myélopoïèse ainsi que l'identification de cible thérapeutique potentielle, telle que certains membres de la famille Bcl-2, pourrait éventuellement grandement changer le pronostic associé à ce type de maladie.

Chapitre 4

Leucémie

Le cancer représente une population de cellules qui échappe au contrôle de l'organisme et dont la croissance désordonnée se fait au détriment des tissus environnants. Ces cellules ne répondent plus aux signaux de croissance environnants. Avec l'évolution de la maladie, ces cellules peuvent envahir d'autres tissus sains, un phénomène que l'on appelle métastase.

La leucémie se présente comme étant un type de cancer affectant le tissu sanguin. L'une des premières personnes à avoir caractérisé cette pathologie se nomme Rudolf Virchow, qui nota une très grande quantité de globules blancs dans le sang de personnes décédées. Les origines étymologiques du terme leucémies proviennent d'ailleurs de l'union des mots « blanc » et « sang ». Aujourd'hui, on regroupe deux grandes catégories de leucémies : les lymphoblastiques et les non lymphoblastiques, que l'on désigne aussi par le terme « myéloïde ».

AML

L'abréviation AML signifie « Acute Myeloid Leukemia ». La prévalence de ce type de leucémie augmente généralement avec l'âge, rendant les personnes du troisième âge plus sujettes à cette pathologie. Selon une étude faite aux États-Unis, l'âge médian des personnes atteintes du cancer est de 68 ans. Contrairement aux ALL, les enfants représentent seulement 20 % des personnes qui sont atteintes par cette maladie. Les 80 % restant représentent des personnes adultes dont la majorité d'entre eux ont un âge

supérieur à 65 ans. La fréquence des personnes atteintes par ce type de cancer, pour la population âgée de plus de 65 ans est de 17,6 par 100 000 habitants, comparée à une fréquence de 1,8 par 100 000 habitants pour des personnes de moins de 65 ans {Stone, 2004}. Les hémorragies et les infections représentent les deux principales causes de décès des personnes atteintes de cette maladie. Parmi les facteurs de risque connus, on retrouve les personnes atteintes du syndrome de Down, du syndrome de Bloom, de l'anémie de Falconi's, de la neurofibromatose, du syndrome de Wiskott-Aldrich, du syndrome de Klinefelter's, du syndrome Li-Fraumeni et de l'ataxie telangiectasia. Les personnes exposées au benzène, aux radiations, aux agents alkylants ainsi qu'aux inhibiteurs de la topoisomérase de type II ont également une prévalence plus grande à développer une AML. En fait, ce type de leucémie est très hétérogène et se sous-divise en plusieurs catégories qui seront présentées dans le prochain paragraphe.

Types

L'identification des aberrations, à l'intérieur des cellules cancéreuses, aide à la classification des leucémies et permet de déterminer la gravité du pronostic pour les personnes atteintes. Pour nommer les aberrations cytogénétiques, on utilise la nomenclature suivante : la lettre « t » représente une translocation entre deux chromosomes tandis que les lettres inv présentent une inversion. L'utilisation de la lettre « p » ou « q » représente les bras des chromosomes affectés. Les translocations t(8;21), inv 16 ou t(16;16) et t(15;17), q(22,22) sont souvent associées à un pronostic favorable. À l'opposé, des anomalies au niveau du chromosome 3 bandes q26, des délétions au niveau des chromosomes 5 et 7 ainsi que des duplications au niveau des chromosomes 8 et 13 représentent généralement un pronostic défavorable. Il en est de même pour les anomalies

multiples au niveau du caryotype cellulaire. Finalement, on retrouve des pronostics intermédiaires pour ce qui est des translocations entre les chromosomes 9 et 11. Différentes études ont démontré que les personnes âgées (65 ans et plus) atteintes d'AML ont, dans une proportion importante, une cytogénétique défavorable. De plus, ceux qui présentent des anomalies cytogénétique favorables ont tout de même un taux de survie inférieure aux personnes de moins de 65 ans. {Bauduer, 1999;Leith, 1997;Rowe, 2004;Grimwade, 2001;Grimwade, 1998;Byrd, 2002 }.

Il existe deux modes reconnus de classification : la méthode FAB (French-American-British) ainsi que la méthode WHO (World Health Classification). La première a été créée en 1976 et se subdivise en huit catégories allant de M₀ à M₇. La gradation M₀ à M₃ représente le niveau de différenciation des cellules leucémiques tandis que la gradation M₄ à M₇ représente la lignée des blastes {Colby-Graham, 2003}.

- M0:** Myeloblastique sans différentiation
- M1:** Myeloblastique sans maturation
- M2:** Myeloblastique avec maturation
- M3:** Promyelocytique
- M4:** Myelomonocytaire
- M5a:** Monocytaire sans différentiation (monoblastique)
- M5b:** Monocytaire avec différentiation
- M6:** Erythroleukémique
- M7:** Megakaryocytaire

La classification WHO comporte quatre grandes catégories : les AML qui ont une translocation chromosomique récurrente, les AML qui ont une dysplasie de lignage multiple, les AML avec une thérapie relative au syndrome myélodysplasique et les AML n'appartenant pas aux trois premiers groupes. Ce dernier groupe comprend des sous-types classés de façon similaire à la classification FAB. Enfin, on retrouve un cinquième groupe qui inclut toutes les catégories d'AML à lignage ambigu. La classification WHO a

été créée dans le but de regrouper les AML dans des catégories plus représentatives des pronostics et des traitements utilisés.

Causes moléculaires

On retrouve trois principales classes de désordre présentes dans les cellules leucémiques : les récepteurs dysfonctionnels, les translocations et des défauts dans certaines voies précises de signalisation intracellulaire.

Récepteur

Le récepteur Flt-3 (Fms-like tyrosine kinase 3) a un niveau d'expression augmenté dans 60 à 92 % des AML {Birg, 1992;Drexler, 1996;Rosnet, 1996;Stacchini, 1996;Carow, 1996}. En ce qui concerne l'hématopoïèse, ce récepteur n'est pas exprimé dans les cellules souches. Celui-ci est exprimé dans les précurseurs oligopotents, ainsi que dans les précurseurs se différenciant en monocytes et en lymphocytes B. Par contre, il n'est pas observé dans la phase tardive de la maturation des lymphocytes B ni des granulocytes matures {Lyman, 1998;Rappold, 1997;Christensen, 2001;Adolfsson, 2001}. Il a été découvert, en 1996, qu'une forme, nommée Flt3-ITD, contenait une duplication dans le domaine juxtamembranaire du récepteur (Internal Tandem Duplication). Cette forme erronée a une prévalence d'environ 23 % dans la population des personnes atteintes d'AML {Moreno, 2003;Boissel, 2002;Whitman, 2001;Kainz, 2002;Kottaridis, 2001;Thiede, 2002;Schnittger, 2002;Frohling, 2002 ;Kiyoi, 1999;Xu, 1999;Xu, 1999;Yokota, 1997;bu-Duhier, 2000;Stirewalt, 2001}. Le récepteur Flt3-ITD, qui est constitutivement actif, augmenterait l'activité de protéines telle que STAT5, Ras/MAPK

et PI3K/AKT {Tse, 2000;Hayakawa, 2000;Fenski, 2000;Kiyoi, 1998;Mizuki, 2000 }. Celui-ci est souvent retrouvé dans les sous-groupes de FAB M₂, M₃ et M₆ {Boissel, 2002;bu-Duhier, 2001;Kainz, 2002;Kiyoi, 1997;Moreno, 2003;Schnittger, 2002;Whitman, 2001 }. La plupart du temps, sa présence est associée à un mauvais pronostic {Whitman, 2001;Thiede, 2002;Schnittger, 2002;Kottaridis, 2001;Kiyoi, 1999;Kainz, 2002;Frohling, 2002;bu-Duhier, 2000 }. On note, parmi les faits intéressants, que l'induction de FLT3-ITD dans la lignée cellulaire 32D entraînait un blocage de la différenciation ainsi qu'une suppression de l'expression des facteurs de transcription PU.1 et C/EBP α {Mizuki, 2003; Zheng, 2002}. Les 32D proviennent des cellules de la moelle osseuse de souris C3H/HeJ. Elles ont, à l'origine, été infectées avec le « Friend murine leukemia virus » et doivent être maintenues en présence d'IL-3 dans leur milieu de culture. Celles-ci représentent un modèle de précurseurs myéloïdes couramment utilisés dans le domaine de la recherche en hématologie.

Pour ce qui a trait au récepteur « kit », il y a peu d'informations concernant son importance dans les AML. Il semblerait que les AML impliquant le CBF (Core Binding Factor) seraient souvent associés avec des mutations au niveau de l'asparagine 816 de la boucle activatrice du récepteur Kit. {Beghini, 2000}. D'autres mutations, au niveau de l'exon 8 du récepteur « kit », ont été observées dans les AML avec inv 16 et dans quelques cas de t(8;21) {Gari, 1999 }.

Enfin, des mutations se situant au niveau du récepteur c-fms (M-CSFR) pourraient être impliquées dans des leucémies de type M₄ et M₅ {Springall, 1993;Meshinchi, 2003;McGlynn, 1998;Roussel, 1988;Tobal, 1990;Ridge, 1990;Gari, 1999}. En regard au récepteur du G-CSF, il semblerait que des mutations de son récepteur causeraient la

neutropénie chez les sujets atteints. Aussi, ce groupe de personnes serait plus à risque de développer une AML. {Freedman, 2002;Dong, 1995;Dong, 1997}. Par contre, ce récepteur ne semble pas être un facteur initiateur d'AML.

Mis à part les récepteurs, les voies de signalisation en aval à ce dernier peuvent également être mises en cause pour expliquer le développement de leucémies.

Voies de signalisation

Commençons par la protéine RAS. Son implication dans les leucémies fut remarquée pour la première fois en 1984, par la présence d'une mutation activatrice dans la forme N-Ras. On rapporte actuellement une incidence allant de 10 à 27 % pour les mutations dans N-Ras {Vogelstein, 1990;Ahuja, 1990;Farr, 1988, Neubauer, 1994 }, 5 à 10 % pour la forme K-RAS {Vogelstein, 1990;Meshinchi, 2003;Neubauer, 1994 } et quelques rares mutations pour H-Ras {Ahuja, 1990 } qui sont associées aux AML. Les mutations dans RAS ne sont pas reconnues pour être à la source de l'apparition des AML, mais leur présence est un facteur qui aide à la progression de la maladie.

D'après plusieurs recherches, la protéine STAT serait un autre élément impliqué dans l'apparition des cancers. Une suractivation des protéines STAT telles que stat3 et stat5 semble fortement associée aux AML. Il a déjà été démontré que la présence de stat3 et/ou stat5 était nécessaire à la transformation de cellules cancéreuses présentant des déficiences au niveau de leurs RTK {Mizuki, 2000;Schwaller, 2000;Ning, 2001}. De plus, des expériences ont déjà fait la démonstration qu'une forme constitutivement active de STAT5 possédait des pouvoirs transformant sur les cellules qui l'exprimaient. {Schwaller, 2000}.

Finalement, des études ont démontré une implication de la voie PI3K dans le développement des leucémies. Des inhibiteurs de cette voie ont été utilisés sur des cellules de patients atteints d'AML en conjugaison avec d'autres médicaments anticancéreux. Cet essai a permis de faire diminuer le niveau de survie des cellules cancéreuses. C'est pour cette raison qu'il est possible de croire que l'activation de cette voie a conféré un avantage aux cellules cancéreuses. {Xu, 2003}.

Les différentes voies de signalisation découlant de l'activation de récepteurs spécifiques terminent généralement leur cascade signalétique par l'activation de facteurs de transcription. Un grand nombre, de ces facteurs de transcription, sont maintenant connus pour jouer un rôle primordial dans le déclenchement et l'évolution des leucémies. La prochaine section en fera la présentation.

Facteur de transcription

Au niveau des facteurs de transcription, on remarque que plus de 50 % des personnes atteintes d'AML comportent une fusion, entre différents facteurs de transcription, qui provient de la recombinaison homologue des chromosomes {Mrozek, 2001;Rowley, 1973}. Les plus fréquentes dans les AML sont t(8;21), t(15;17) et l'inversion 16.

Le CBF (Core Binding Factor) est impliqué dans les aberrations t(8;21), inv16 et t(16;16) que l'on retrouve dans 25 % des leucémies. Celui-ci est composé de la protéine AML-1 et de CBF β . La plus fréquente est la translocation AML1-ETO t(8;21). Elle est retrouvée dans 10 à 15 % des patients adultes atteints d'AML {Langabeer, 1997;Langabeer, 1997}. Des analyses de détection des cibles géniques ont démontré que AML1-ETO, contrairement à la forme endogène d'AML, induisait la répression des récepteurs du GM

- CSF et de l'IL-3 {Uchida, 1999;Mao, 1999}. AML1-ETO est aussi connu pour inhiber la différenciation hématopoïétique en dérégulant l'expression ou la fonction de facteurs de transcription tels que PU.1, MEF, C/EBP α et AP-1 {Vangala, 2003;Mao, 1999;Pabst, 2001;Elsasser, 2003;Frank, 1999}.

Les leucémies de type FAB M3, que l'on nomme APL (Acute Promyelocytic Leukemia), sont principalement associées à la présence d'une fusion du facteur de transcription RAR α . Ces dernières représentent 10 % des AML {Grimwade, 2001}. Dans la grande majorité des cas, il s'agit d'une translocation avec PML de type t(15;17) {Pandolfi, 2001}. Les leucémies causées par cette translocation reçoivent généralement une combinaison de traitement incluant l'administration de l'ATRA (All-Trans-Rétinoïque Acid). Cela permet de détacher les co-répresseurs de type HDAC de la protéine de fusion et ainsi induire leur différenciation. {Lin, 1998;He, 1998;Grignani, 1998;Melnick, 1999;Lin, 2000 }.

Pour ce qui est de la voie de signalisation de Wnt, celle-ci est impliquée dans les mécanismes de renouvellement et de prolifération des cellules hématopoïétiques. Par contre, des informations présentes dans la littérature semblent indiquer que cette voie de signalisation pourrait également avoir un rôle à jouer dans le développement de leucémies {Reya, 2003;Murdoch, 2003;Austin, 1997;Polakis, 2000 }. Toutefois, son importance ainsi que son rôle précis restent à être définis.

Au niveau de la myélopoïèse, on sait que les facteurs de transcription PU.1, C/EBP α et GATA-1 sont essentiels. Malheureusement, ceux-ci pourraient également avoir des rôles à jouer dans le développement de leucémies myéloïdes. Le rôle de PU.1 sera décrit avec plus de détails dans la section *PU.1 et les leucémies*. Pour ce qui est de C/EBP α , il serait

impliqué dans environ 10 % des AML, représenté par les catégories FAB M₁ et M₂. Celui-ci serait généralement associé à un bon pronostic. {Frohling, 2004;Barjesteh van Wa.a.lwijk van Doorn-Khosrovani, 2003}. Deux types de mutation sont fréquemment retrouvés dans sa structure. D'une part, elles se situent au niveau du domaine basique de la « glissière à leucine ». D'autre part, on retrouve parfois un déplacement dans le cadre de lecture de la séquence qui code pour son gène, ce qui entraîne la formation d'une protéine tronquée. {Gombart, 2002;Preudhomme, 2002;Pabst, 2001 }.

GATA-1 fait, lui aussi, partie des protéines impliquées dans les AML. Toutefois, son implication serait principalement restreinte aux personnes atteintes du syndrome de Down. Chez ces patients, on retrouve des mutations qui insèrent un codon-Stop à l'intérieur de la séquence codant pour GATA-1 {Wechsler, 2002}.

Le gène MLL (multi lineage leukemia) est impliqué dans les AML impliquant la translocation 11q23. Trois types de modification de ces gènes sont principalement responsables de l'apparition de cancers. Par contre, on ne dénombre pas moins de 30 partenaires de translocation de ce gène dans des AML. Ceci est sans compter les duplications partielles en tandem de ce gène ainsi que des amplifications de type « intra-chromosomale». Ce type d'aberration associée à la protéine MML est retrouvé dans environ 2 à 5 % des AML ainsi que dans certains cas d'ALL (Acute Lymphoid Leukemia).

Pour terminer, les gènes de la famille HOX ont un rôle essentiel à jouer dans le processus d'hématopoïèse ainsi que dans l'apparition des leucémies. La surexpression ou la translocation de certains gènes de cette famille a été associée au développement d'AML. {Owens, 2002;Lawrence, 1992;Krumlauf, 1994;Lawrence, 1996;Thorsteinsdottir, 1997}.

À titre d'exemple, on remarque que les gènes HoxA7 et HoxA9 voient leur expression augmentée dans des blastocytes d'AML d'origine murine suite à certaines intégrations virales {Moskow, 1995; Nakamura, 1996}. Comme on peut le constater, différents facteurs de transcription ont un rôle à jouer dans l'apparition et le développement des leucémies.

PU.1 et les leucémies

Les Érythroleucémie et PU.1

La situation la plus connue de la surexpression de PU.1 est celle qui a amené sa découverte par l'infection des cellules érythroïdes par le virus SFFV (voir section *découverte de PU.1*). En effet, 95 % des infections, produites avec ce virus, entraînent l'apparition d'érythroleucémies chez les souris. Ceci est dû à l'insertion, en 5' du promoteur de PU.1 nommé Spi-1, d'un élément LTR qui entraîne une expression ectopique de PU.1 dans des précurseurs des érythrocytes. {Delgado, 1994;Goebel, 1990;Schuetze, 1992 ;Schuetze, 1993 }. Similairement, des données rapportent que le même processus est présent dans la lignée cellulaire murine érythroleucémique MEL {Delgado, 1994;Yamada, 1997;Rao, 1997;Galson, 1993 }.

Mutation de PU.1

Selon la classification FAB (Française-Américaine-Britannique), PU.1 aurait une implication dans les AML qui appartiennent aux sous-catégories M0 (stade primitif), M4 et M5 (myélomonocytaire ou monocytique) ainsi que M6 (érythroleucémique). Selon une étude dirigée par le groupe de Tenen et coll., on retrouve, sur 126 patients atteints

d'AML, 9 qui ont des mutations au niveau de la région qui code pour PU.1 {Mueller, 2002 }. Parmi ceux-ci, on compte 5 points de mutation au niveau du domaine ETS, qui est responsable de la liaison à l'ADN. D'autres mutations ont été retrouvées dans le domaine PEST (2 patients) et dans le domaine de transactivation (1 patient). Ces mutations du facteur de transcription PU.1 ne sont pas retrouvées dans les patients ayant une translocation t(15;17), t(8;21) ou Inv 16. Toutefois, certaines corréleraient avec la présence du récepteur chimérique FLT3-ITD. Les auteurs expliquent que ces mutations pourraient inhiber l'interaction de PU.1 avec certains de ces partenaires et ainsi favoriser l'apparition de leucémies. Par contre, la fréquence des mutations retrouvée dans PU.1 chez les patients atteints d'AML n'est pas encore claire. En effet, d'autres études indiquent que la fréquence des mutations, retrouvées dans la protéine PU.1 des patients atteints d'AML, serait plus faible que ce qui a été présenté précédemment {Mueller, 2002; Lamandin, 2002; Dohner, 2003 }. Par ailleurs, les souris hétérozygotes pour des mutations atteignant PU.1 ne développent pas de tumeurs. {Scott, 1997 }. Or, ce sont justement des mutations hétérozygotes que l'on retrouve chez les patients humains. On peut donc conclure que les mutations retrouvées dans PU.1 ne sont pas suffisantes à elles seules pour expliquer l'apparition de leucémies. Toutefois, d'autres voies pourraient impliquer PU.1 dans les leucémies de type AML.

Dérégulation de PU.1

Selon des études se rapportant aux AML comportant une translocation de type t(8;21), il a été rapporté que la protéine de fusion AML-ETO aurait un impact négatif sur la fonction de PU.1 {Vangala, 2003, Westendorf, 1998}. Un autre problème fréquemment rapporté dans les cellules de patients atteints d'AML est la présence du récepteur Flt3-

ITD. Un des effets néfastes de ce récepteur chimérique serait associé à une dérégulation de l'expression et de la fonction de PU.1 {Mizuki, 2003}. Enfin, des souris hypomorphes pour l'expression de PU.1, ont été obtenues à la suite d'une ablation du promoteur distal (voir section *Régulation de PU.1*). Plus précisément, cela indique que la région distale du promoteur de PU.1 est nécessaire pour obtenir un niveau d'expression normale. L'absence de ces dernières entraîne une réduction de l'expression de PU.1. On remarque également une instabilité génomique ainsi que l'apparition de leucémies de type AML ou de type lymphome-T chez ces dernières. De plus en plus d'observations indiquent que le facteur de transcription PU.1 aurait un rôle important à jouer dans le développement des leucémies soit par un dysfonctionnement direct ou par une dérégulation de ce dernier.

Les diverses informations qui ont été présentées au sujet des leucémies myéloïdes aiguës permettent de mieux comprendre cette maladie. Toutefois, cette pathologie n'est pas encore très bien comprise, c'est pourquoi les recherches qui se font dans ce domaine sont très importantes. Voici un aperçu des traitements utilisés actuellement ainsi que des cibles thérapeutiques les plus prometteuses.

Traitements

Utilisés actuellement

Bien que l'approche thérapeutique puisse varier selon les causes moléculaires propres à chaque leucémie, le traitement standard est le suivant : 3 jours d'anthracycline qui sont suivis de 7 jours de cytarabine. Ce traitement confère un taux de rémission d'environ 80 % chez des patients dont l'âge varie entre 18-60 ans {Stone, 2004}. L'anthracycline est un antibiotique que l'on utilise à titre d'agent alkylant dans le traitement des leucémies. Le mécanisme d'action, de ce dernier, consiste à s'intercaler entre les doubles brins d'ADN, ce qui interfère avec la fonction de la topoisomérase. On retrouve à l'intérieur de cette famille la daunorubicine, la doxorubicine, la dactinomycine, le mitoxanthione pour ne nommer que ceux-là. Pour ce qui est de la cytarabine, celle-ci est un analogue de la désoxycytidine. Son mode d'action est le suivant : il consiste à inhiber l'ADN polymérase ainsi que d'empêcher la transformation de la cytidine en désoxycytidine par l'incorporation de cytosine arabinoside triphosphate (ARA-C) à l'intérieur des cellules. Ce composé anti-métabolite entraîne alors un arrêt de la prolifération des cellules. Son élimination par l'organisme est rapide et les effets secondaires sont limités. L'utilisation de ce médicament se limite aux leucémies aiguës et aux lymphomes. Le but global de ce traitement consiste à vider la moelle osseuse ainsi que l'ensemble du système hématopoïétique de toutes les cellules sanguines aberrantes qui l'occupent. Ensuite, une phase de rémission est appliquée afin que les cellules souches de la moelle osseuse puissent reconstituer le système hématopoïétique.

Par contre, certains sous-types d'AML ont des traitements qui leur sont propres. C'est le cas pour les APL (Acute Promyélocytic Leukémie de sous type M3 dans la classification FAB). Dans ce cas, l'utilisation de l'ATRA (All Trans Rétinoïque Acid) permet d'agir sur une classe de protéine chimérique constituée de la protéine de fusion RAR α avec une autre protéine (voir section *Cause moléculaire ; facteur de transcription*). En effet, dans la grande majorité des cas, le facteur de transcription PML se trouve à être fusionné avec le récepteur nucléaire RAR α lors d'une translocation aberrante. En l'absence de ligand, ce récepteur recrute des protéines que l'on dit co-répressives tels que les HDAC. Dans le cas de la protéine chimérique PML-RAR α , le niveau physiologique d'acide rétinoïque n'est pas suffisant pour permettre le relâchement des co-répresseurs qui y sont associés. Les gènes, qui sont sous le contrôle de régions régulatrices de PML ou de RAR α , sont alors réprimés. L'ATRA agit alors comme ligand pour la protéine chimérique. Celle-ci entraîne le relâchement des protéines associées à la partie composée de RAR α . Ainsi, la protéine de fusion peut alors activer les régions régulatrices correspondant aux deux protéines endogènes qui la composent. Cet exemple illustre bien l'utilité de bien comprendre les mécanismes qui sont en cause dans l'apparition des leucémies afin de produire de nouveaux traitements efficaces et spécifiques.

Cibles thérapeutiques potentielles

Comme il a été mentionné antérieurement, des problèmes liés aux voies signalétiques sont souvent retrouvés dans les AML. L'Imatinib, qui est un médicament qui a un grand succès dans le traitement des leucémies de type CML (Common Myéloid Leukemia),

pourrait inspirer la conception de nouveaux médicaments pour traiter de multiples sous catégories d'AML. La fonction de l'Imatinib consiste à inhiber certains types de « tyrosines kinases » (TK) qui sont devenues constitutivement actives. Dans le cas présent, l'Imatinib agit à titre inhibiteur compétitif pour le site de liaison de l'ATP de la protéine de fusion bcr-abl. L'Imatinib agit aussi en provoquant l'internalisation nucléaire de bcr-abl à l'intérieur du noyau de la cellule, ce qui bloque le pouvoir anti-apoptotique de cette protéine de fusion {Vigneri, 2001}. Le même concept pourrait être transposé pour produire des inhibiteurs de FLT3 dans les leucémies contenant une activité accrue de ce récepteur ou de ses formes mutées. Différentes molécules sont en essai clinique à l'heure actuelle {Karp, 2004}.

Une autre cible thérapeutique intéressante serait un inhibiteur visant les protéines de la voie RAS, où une mutation activatrice est répertoriée dans 10 à 50 % des personnes atteintes d'AML. Pour résoudre ce problème, des médicaments de la classe FTI (farnesyl transférase inhibitors) ont été développés tels que le tipifarnib {Karp, 2001}.

Voici deux médicaments qui ont été approuvés cliniquement pour leur utilisation dans le traitement des AML : l'arsenic trioxyde et le gemtuzumab ozogamicin {Byrd, 2004; Soignet, 2001 }.

Le gemtuzumab ozogamicin (GO) consiste en une fusion d'un anticorps monoclonal humanisé ciblant le marqueur de surface CD33 avec un antibiotique nommé calicheamicin. Le CD-33 est une protéine de surface que l'on retrouve, dans 90 % des cas, à la surface des cellules cancéreuses des patients atteints d'AML ainsi que sur les cellules souches hématopoïétiques {McGavin, 2001}. Pour ce qui est de la calicheamicin,

c'est un antibiotique hydrophile qui coupe, à des endroits spécifiques, l'ADN double-brins {Larson, 2002;Giles, 2003}. Lorsque le GO lie une cellule, ce dernier est internalisé, ce qui entraîne la libération de la calicheamicin dans les lysosomes, puis dans le noyau. Les cellules ciblées entrent alors en apoptose.

Pour ce qui est du deuxième composé, soit «l'arsenic trioxyde », celui-ci est utilisé pour le traitement de patients, atteints d'AML de type APL, qui ne répondent plus à l'administration d'ATRA. Toutefois, les mécanismes d'action de ce médicament sont encore méconnus.

Des études sont en cours pour évaluer l'efficacité thérapeutique à grande échelle de ces deux médicaments.

Parmi les cibles thérapeutiques intéressantes, on retrouve les pompes à efflux, de la famille gp170, qui font ressortir les composés actifs des médicaments à l'extérieur des cellules. Ces pompes permettent aux cellules leucémiques d'acquérir une résistance aux médicaments en expulsant certains composés, tels que les médicaments anticancéreux, qui entrent dans la cellule. Il y a donc des molécules qui sont en élaboration visant cette cible thérapeutique {List, 2001}.

Il y a aussi des groupes qui ont mis au point des traitements ciblant la famille des gènes Bcl-2. Ceci est basé sur le fait que le niveau d'expression des protéines de la famille Bcl-2, dans les cellules leucémiques de patients atteints d'AML, est souvent augmenté, conférant aux cellules cancéreuses une plus grande résistance face à l'apoptose. Des essais cliniques de phase I/II ont déjà démontré que les 18 oligonucléotides oblimeresens (G3139) étaient sécuritaires à utiliser sur des patients atteints d'AML {Marcucci, 2003; Moore, 2006}. L'apparition de fièvre se présente comme étant l'un des principaux effets

secondaires. En effet, ce traitement utilise un anti-sens correspondant aux six premiers codons de BCL2, ce qui permet d'inhiber grandement l'expression de la protéine. Ceci rend les cellules cancéreuses plus sensibles aux traitements habituels. D'autres molécules thérapeutiques, visant des protéines anti-apoptotiques, sont aussi rendues à des essais cliniques {Mita, 2005}.

Astucieusement, d'autres équipes ont décidé de produire des inhibiteurs du protéasome pour diminuer la dégradation de protéines importantes telles que p53, I κ B α , cycline E ou p27. Le bortezomib (ou velcade) est justement un inhibiteur de protéasomes qui, conjugué avec la chimiothérapie habituelle, pourrait éventuellement augmenter l'efficacité des traitements utilisés pour traiter les personnes atteintes d'AML {Cortes, 2004}.

Depuis longtemps maintenant, un intérêt important est porté sur la possible utilisation des facteurs de croissance pour le traitement des leucémies. L'objectif est de permettre aux cellules cancéreuses d'entrer plus rapidement en phase-S ainsi que de diminuer, après traitement avec la chimiothérapie habituelle, la période de neutropénie. Ainsi, on pourrait diminuer la mortalité reliée aux infections. Présentement, la cytokine GM-CSF, n'a pas répondu aux attentes, lorsqu'elle a été administrée à la suite d'un traitement de chimiothérapie. Les dernières études sorties indiquent que le GM-CSF ne présente pas davantage lors du traitement des patients atteints d'AML. Par contre, en regard au G-CSF, une étude présentée par le groupe de Lowenberg et coll. en 2003 a montré que l'utilisation de cette dernière, avant et pendant le traitement avec la chimiothérapie conventionnelle, avait des effets bénéfiques. Il a été rapporté que le taux de survie et de

rémission se trouvait augmenter chez les personnes qui avaient reçu l'administration du G-CSF. Actuellement, l'emploi du G-CSF ou GM-CSF est considéré comme optionnel et des études supplémentaires seront nécessaires pour prouver qu'il y a un avantage accru à l'utilisation de ces facteurs de croissance pour le traitement des patients atteints d'AML {Lowenberg, 2003}.

D'un point de vue épigénétique, la méthylation des îlots CpG se retrouve augmentée dans différentes catégories de désordre myélodysplasique. À la suite de cette constatation, un agent favorisant hypométhylation de l'ADN, nommé azacitidine, a été produit, testé et approuvé par la FDA (food and drug administration) pour le traitement de différents sous-types de syndrome myélodysplasique (MDS) {Silverman, 2002 }.

Toujours d'un point de vue épigénétique, les anti-HDAC (histone déacétylase) pourraient représenter une cible intéressante pour le traitement des AML impliquant CBF et les fusions MLL {Kosugi, 1999;Gottlicher, 2001}. Des molécules telles que l'acide valproïque, le depsipeptide et le MS-275 sont en ce moment en cours d'étude pour leur utilisation sur des personnes souffrant d'AML.

Les biopsies effectuées sur la moelle osseuse de patients atteints d'AML permettent de constater qu'il y a une augmentation de l'angiogenèse comparativement aux groupes témoins. De plus, il semblerait que le VEGF augmenterait la prolifération des cellules leucémiques et que l'augmentation de son expression serait associée à un mauvais pronostic. Le développement d'agents anti-angiogéniques représenterait une cible thérapeutique de choix pour le développement des médicaments. Par exemple, le bevacizumab, un anticorps dirigé contre VEGF, est déjà dans une étude de phase II, utilisée avec la cytarabine et le mitoxanthrone. {Karp, 2004}.

Des recherches devront être effectuées pour mieux comprendre les mécanismes impliquant la voie de l'auto renouvellement. En ce moment, des gènes, tels que Wnt, Bmi-1, Notch et ceux dans la famille Hox n'ont pas permis le développement de molécules permettant de contrer les effets néfastes de ces derniers dans l'évolution des AML {Antonchuk, 2002;Kyba, 2002;Lessard, 2003; Ohishi, 2003 272 ;Reya, 2003 273}.

Pour permettre une amélioration des traitements, certains buts devront être atteints. En premier lieu, il faudra utiliser une batterie de traitement qui pourra cibler les différentes lésions retrouvées dans les cellules cancéreuses. Ensuite, il faudra mieux comprendre le rôle des cellules souches dans la réapparition des cancers suite à un traitement. Enfin, si les cellules souches ont un rôle clairement établi dans la réapparition des cancers suite à une chimiothérapie, il faudra trouver un traitement qui nous permettra de les atteindre.

Pour terminer, il faudra mieux comprendre les phénomènes de complémentation des différentes voies signalétiques impliquées dans l'apparition des cancers. De là toute l'importance des études que j'ai effectuées sur PU.1, car on sait que ce dernier est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques (faiblement) et tout au long de la myélopoïèse, jusque dans les cellules myéloïdes matures. De plus, comme je l'ai indiqué précédemment (voir *PU.1 et les leucémies; Dérégulation de PU.1*), des données récentes indiquent que plusieurs translocations importantes pourraient induire l'apparition d'une AML en dérégulant, entre autres, PU.1. Les recherches que j'ai effectuées permettront de mieux définir le rôle et les mécanismes qui feraient intervenir PU.1 dans le développement de leucémies. Ainsi, une meilleure compréhension du phénomène permettra, potentiellement, le développement d'agents thérapeutiques plus efficaces et plus spécifiques.

Ouverture

Il reste encore beaucoup à apprendre sur chacune de ces protéines malgré les recherches pertinentes qui ont été répertoriées dans la littérature. Réunissant les informations provenant de part et d'autre, on constate qu'une stimulation au GM-CSF entraîne l'augmentation des trois protéines suivantes dans différents contextes : PU.1, A1 et Mcl-1. Par contre, la relation qui existe entre PU.1 et les protéines « anti-apoptotiques » A1 et Mcl-1, a été la source de mes recherches de maîtrise. Cette découverte a ajouté une pièce importante à l'échiquier de la lutte contre le cancer. Toutefois, les mécanismes précis, permettant d'expliquer le rôle de PU.1 dans le développement des AML, sont encore méconnus; d'où l'importance des travaux que j'ai réalisés. Ceux-ci permettront de mieux comprendre les phénomènes qui gouvernent des processus normaux d'hématopoïèse, ainsi que l'apparition et l'évolution des leucémies.

Objectifs et hypothèses de recherche

Voici les différents éléments qui sont à l'origine des hypothèses de recherche de ce mémoire. Les données de la littérature indiquent que le récepteur du GM-CSF (GMR), le facteur de transcription PU.1 et différentes protéines anti-apoptotiques ont un rôle important à jouer dans la myélopoïèse et dans l'apparition de leucémies de type myéloïde aiguë. Cet ouvrage présente des travaux qui traitent de l'activation du récepteur GM-CSF et le déclenchement d'un mécanisme anti-apoptotique, impliquant la protéine Mcl-1 et A1. La relation qui existe entre le GMR et Mcl-1 ou A1 avait déjà été rapportée {Lin, 1993; Chao, 1998}. L'Hypothèse que j'ai émise a été que ces protéines anti-apoptotiques seraient régulées par PU.1 suite à l'activation du GMR. La relation qui existe entre le

GMR et PU.1 est un fait déjà bien établi {Shibata, 2001}. Par contre, aucune recherche n'a démontré, jusqu'à maintenant, que le contrôle de Mcl-1 et A1 suite à l'activation du récepteur du GM-CSF se faisait par l'intermédiaire du facteur de transcription PU.1. Cette découverte permet de relier conjointement les mécanismes de survie avec ceux de différenciation cellulaire lors du processus de myélopoïèse.

Cet ouvrage présente également les différentes étapes de l'adaptation d'un modèle de lignée cellulaire. Celui-ci a été produit afin de permettre l'identification de complexes protéiniques formés par PU.1 lors du processus de myélopoïèse. Ceci permettra éventuellement de mieux comprendre l'importance du niveau d'expression et des partenaires d'interactions de PU.1 dans les différentes étapes conduisant à la production de cellules myéloïdes matures.

Légende des figures
de la revue de la littérature

Figure I : Chaîne α et β du récepteur au GM-CSF

Cette figure présente les chaînes α et β qui composent le récepteur au GM-CSF (GMR ou GM-CSFR). La chaîne la plus courte, qui est la chaîne α , est principalement responsable d'assurer une haute affinité de liaison du récepteur avec son ligand. La chaîne la plus longue, soit la chaîne β , permet la transduction du signal, provenant du récepteur activé, vers le reste de la cellule. Des exemples, de protéines impliquées dans des voies signalétiques responsables de transmettre les signaux de prolifération ou de différenciation, sont illustrés sur ce schéma.

Figure II : Structure des protéines PU.1, Mcl-1 et A1

Trois protéines sont illustrées dans cette figure : PU.1, A1 et Mcl-1. Les différents domaines, qui composent la protéine PU.1 (transactivation, PEST, ETS) ainsi que des exemples de partenaires d'interactions connus, sont présentés dans cette figure. Dans la structure de PU.1 et Mcl-1, les résidus identifiés, par la lettre « P », représentent les sites de phosphorylation qui sont répertoriés. Les triangles blancs représentent les sites de coupures de Mcl-1 présentés dans la *revue de la littérature*. Les acronymes BH et TM, associés aux protéines A1 et Mcl-1, signifient respectivement « Bcl-2 homologie domain » et « domaine transmembranaire ».

Figure III : Modulation de PU.1 lors de l'hématopoïèse

Ce diagramme indique, aux différentes étapes du confinement hématopoïétique, l'importance du niveau d'expression de PU.1 pour la différenciation des cellules. Voici la signification des symboles : « ↑ » représente une augmentation du niveau d'expression de PU.1, « ↓ » représente une diminution du niveau d'expression de PU.1 et enfin « → » représente un maintien du niveau d'expression de PU.1. Les cellules sont présentées de gauche à droite, dans un ordre croissant de maturation, allant des cellules souches hématopoïétiques aux cellules sanguines matures.

Figure IV : Modèle général de l'apoptose

Cette figure illustre le modèle généralement accepté pour décrire les processus qui sont impliqués dans le déclenchement de l'apoptose. Les différents éléments importants décrits dans la section « *Apoptose , mécanisme* » de la revue de la littérature sont présentés dans ce schéma. Ceci inclut les récepteurs de mort (death receptor), les caspases ainsi que les membres « pro et anti » apoptotiques de la famille Bcl-2

Figures complémentaires
à la revue de la littérature

Figure I

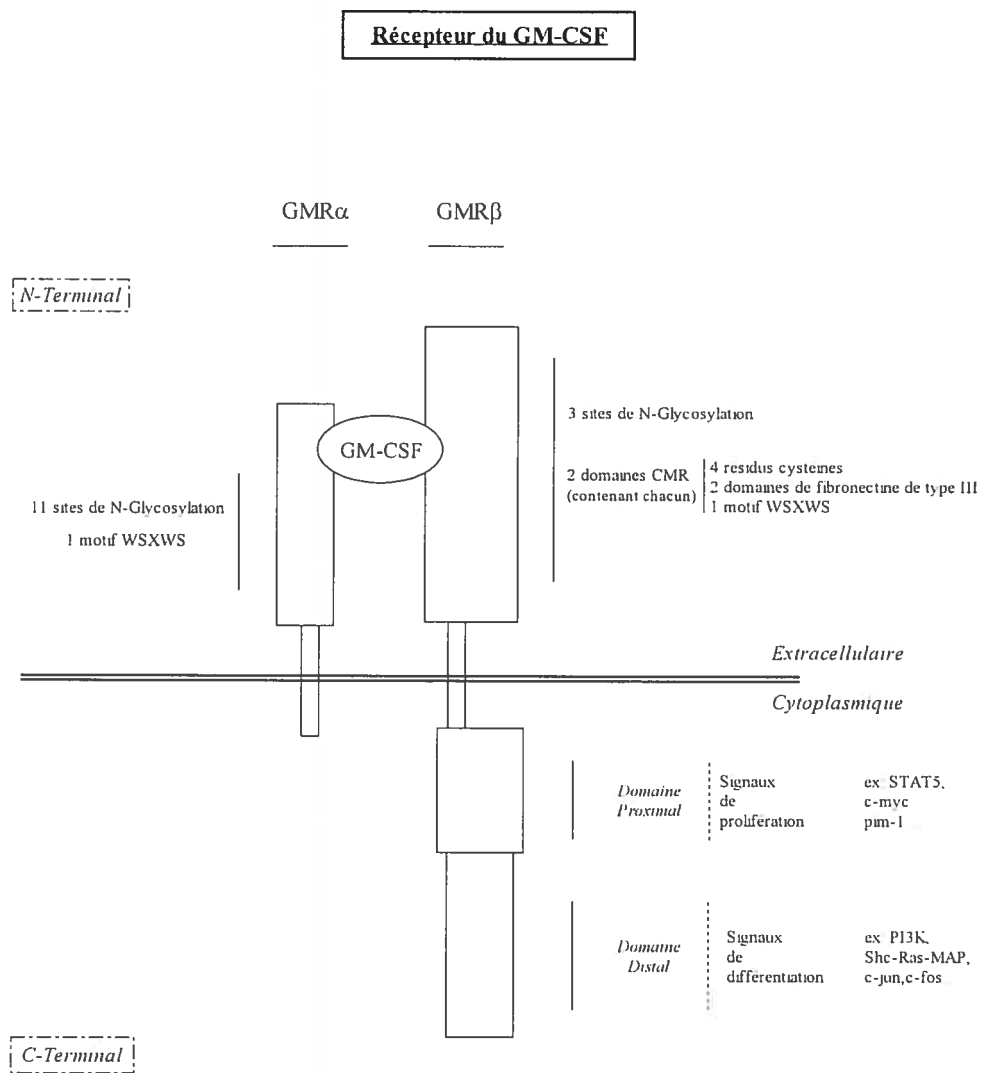


Figure II

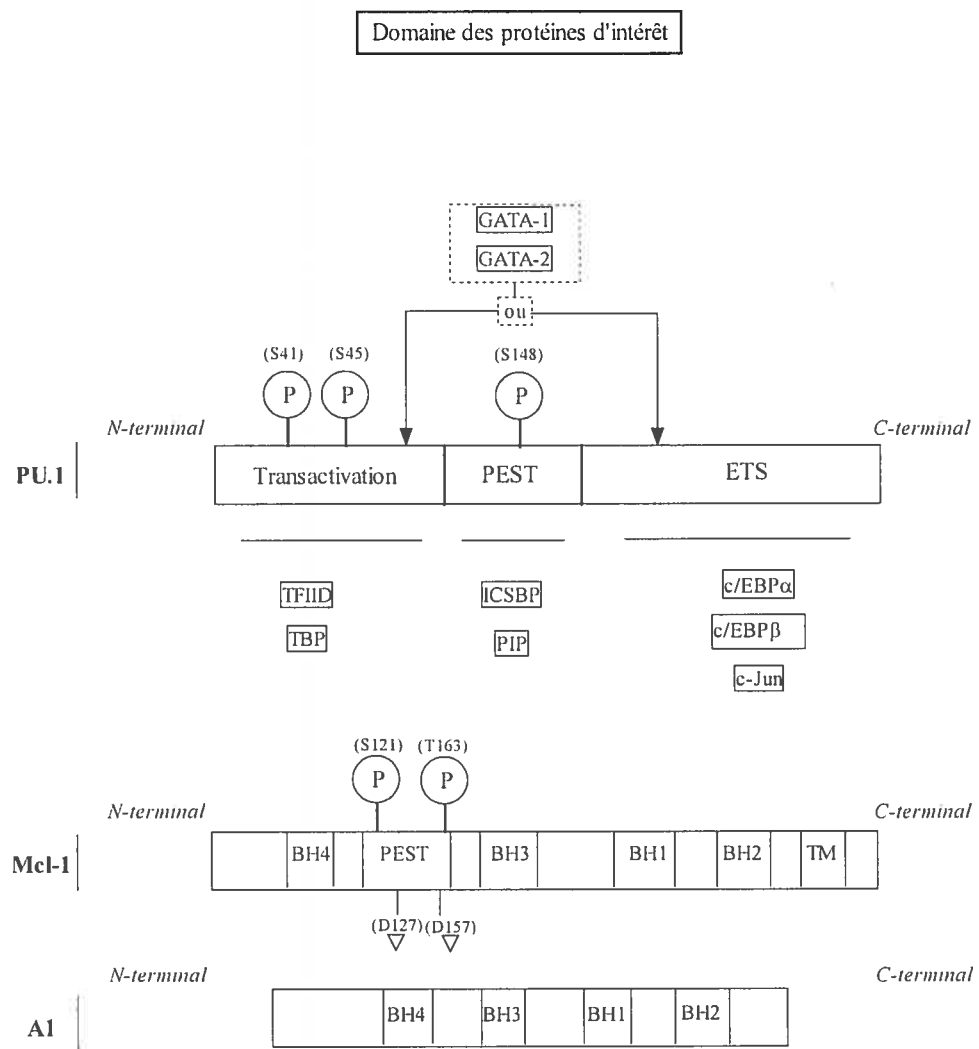


Figure III

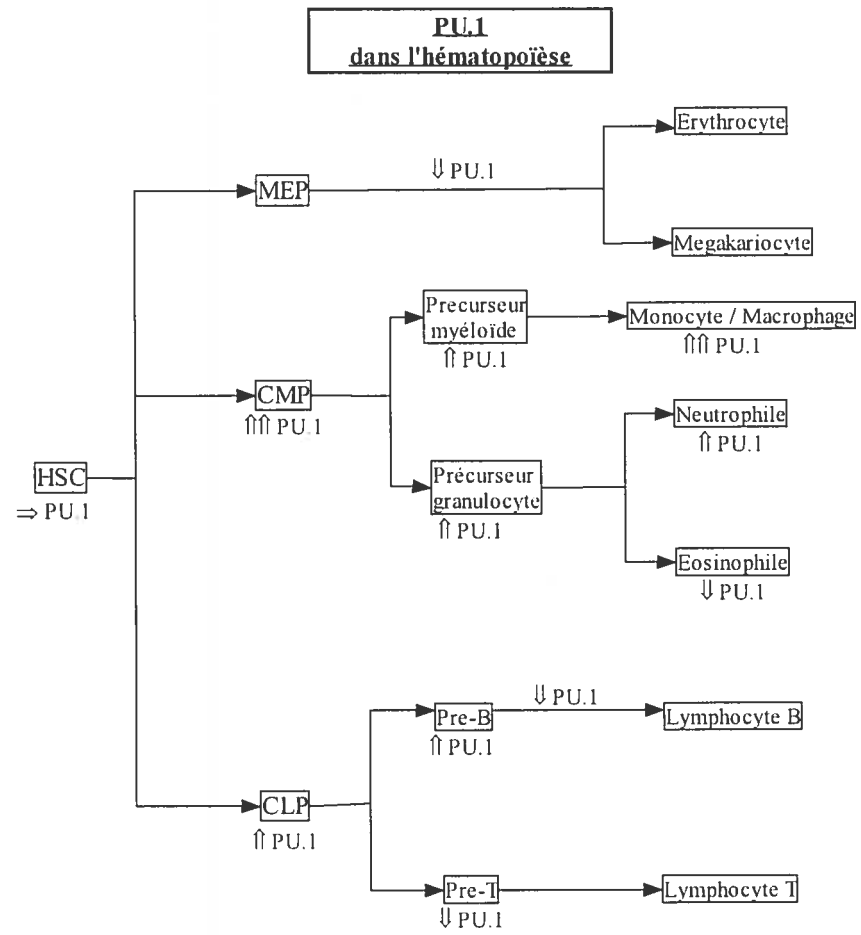
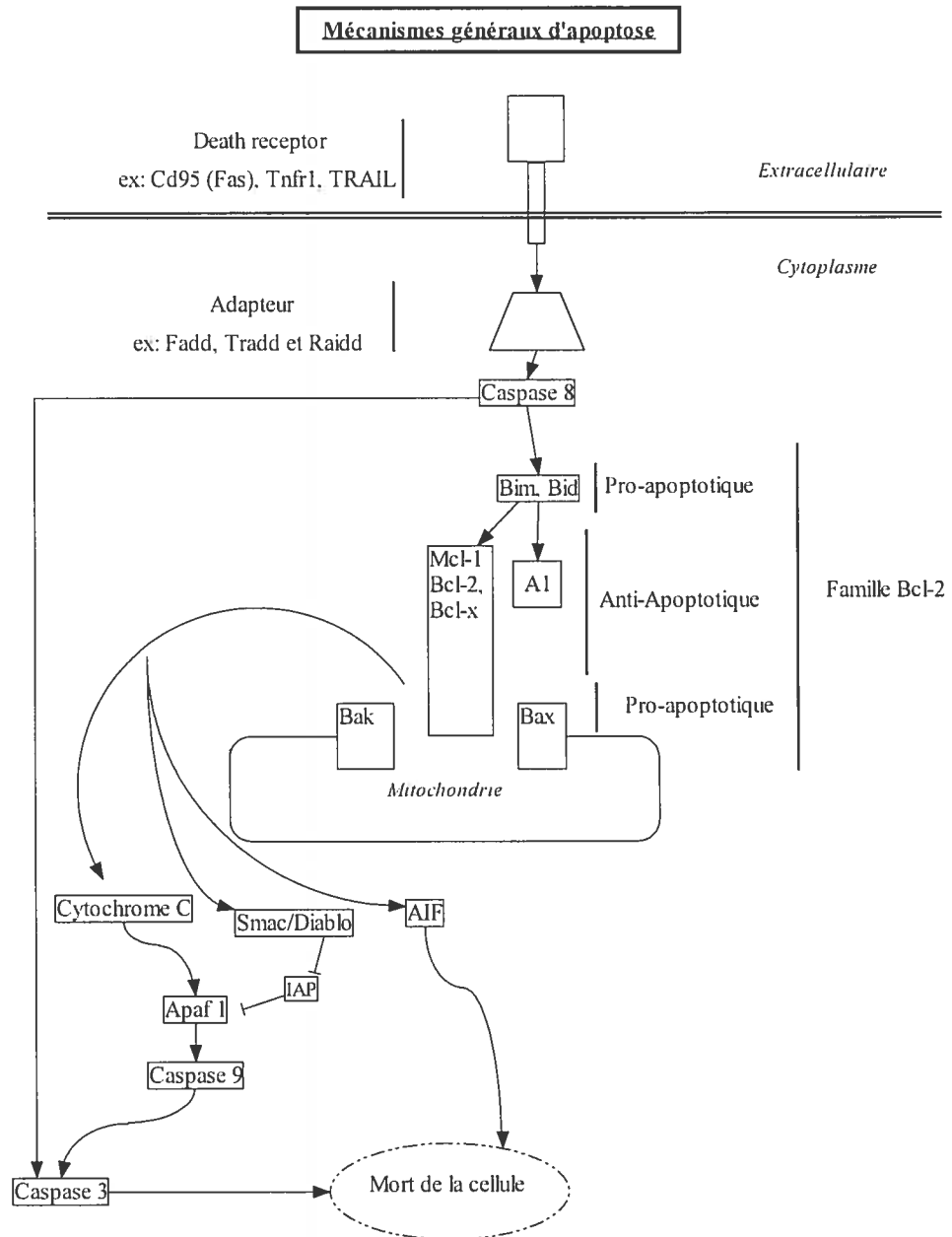


Figure IV



Résultats

Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Les 32D sont des cellules de type myéloblaste originellement dérivées de la moelle osseuse de souris. Celles-ci ont été données par le Dr Quesenberry (Roger Williams Medical Center, Providence, RI). Elles ont été maintenues dans un milieu IMDM avec 10 % de FBS et 10 ng/ml d'IL-3 murin /G-CSF humain / GM-CSF murin. Les cellules initialement utilisées ont été maintenues en présence de la cytokine IL-3 dans leur milieu de culture. Cette dernière permet de les maintenir à un état de précurseurs myéloïdes non différenciés. Toutes les cytokines sont produites à partir de cellules COS et sont calibrées à partir de standards de protéines recombinantes, sauf le G-CSF humain (Amgen Inc, Thousand Oaks, California, USA). Les cellules 32D sont ramenées à une concentration de 25 000 cellules/mL tous les deux ou trois jours.

Les cellules F-9, provenant de la banque de cellules ATCC, originent d'un carcinome de souris. Elles ont été maintenues dans un milieu contenant de l'IMDM avec 10 % de FBS dans des boîtes de pétri enduit avec de la gélatine (de peau de porc; Sigma). Une solution de 0.1 % de gélatine d'origine porcine (porcine skim catalogue G-1890), a été incubée pendant 24 heures à 4 °C. Ceci a permis de produire un revêtement de gélatine dans des boîtes de pétri et des plaques servant à cultiver les cellules F-9. Des dilutions des cellules à 1/15 ont été effectuées lorsque la confluence des cellules adhérentes atteignait 80 %.

Les cellules COS originent de la transformation de cellules de rein de type fibroblaste provenant du «African green monkey» avec le virus de SV40 dont l'origine de réplication a été mutée. Ces cellules proviennent de la banque de cellules ATCC. Elles ont été maintenues dans un milieu contenant de l'IMDM avec 10 % de FBS. Lorsque les cellules atteignaient une confluence de 90 %, celles-ci étaient ramenées à une concentration de 100 000 cellules/mL.

Plasmides

L'ADNc de PU.1 (Dr D.G. Tenen, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) a été amplifié par PCR (Fw : 5'- GCA CCT GAC GAG GAG ATT TTC T -3' ; Rv 5'- GTC AAG AAG AAG CTC ACC TAC C -3') pour enlever le codon-Stop à l'extrémité C-terminale. L'étiquette TAP provient du laboratoire du docteur Guy Sauvageau. La protéine PU.1-TAP, que nous avons produite, a été sous clonées dans les vecteurs MSCV IRES GFP et p514 (p514 a été donné par le laboratoire du Dr David Lohnes). Les plasmides pcDNA3 TAP c-term et pcDNA3 TAP N-term ont été donné par Dr Anne Claude Gingras (Institute for Systems Biology Seattle, WA, USA). C'est la séquence codante de c-jun contenu dans le vecteur pSV-sport1 provenant du laboratoire du Dr Nemer qui a été employé. Dans le vecteur pxp2, la région -132 à + 11 du promoteur de IL-1B murin, en amont du gène codant pour la luciférase servant d'un rapporteur, a servi aux essais fonctionnels

Transfection transitoires

Des transfections transitoires ont été effectuées sur des cellules Bosc et Cos par l'utilisation d'une précipitation au CaPO₄, suivant les procédures décrites par Lecuyer et coll. {Lecuyer, 2002}. Les extractions de protéines ont été effectuées 48 heures suivant les transfections. Le test d'inhibition du protéasome a été effectué avec le MG-132 (Calbiochem). Les cellules ont été traitées avec 12.5mM de MG-132 (Calbiochem) pendant les périodes de 12 heures.

Buvardage Western

Les extraits totaux de protéines ont été produits de la façon suivante. Les cellules ont été rincées trois fois au PBS puis elles ont immédiatement été chauffées à 100 °C dans du tampon de chargement Laemmli (25 mM Tris, 0.192 M Glycine and 0.1 % SDS sans colorants) pendant 15 minutes. Les extraits de protéines ont ensuite été centrifugés à

20 000 rpm pendant 20 minutes à 4 °C, puis ils ont été aliquotés et conservés à - 80 °C. Des gels de 10 % SDS-PAGE ont été utilisés pour les bavardages Western.

Voici la liste des anticorps utilisés : PU.1 polyclonal (sc-352x, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), contre l'étiquette TAP monoclonale (reconnaît la région : CSSGALDYDIPTTASENLYFQ; No de catalogue : CAB1001 Open Biosystems 6705 Odyssey Drive Huntsville), Mcl-1 polyclonal (S-19, Sc-819, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), Bcl-2A1 polyclonal (MAB851, R&D systems, Minneapolis, MN, USA), PTP-1D polyclonal (No de catalogue : 610622 BD Bioscience BD, Mississauga, ON, Canada) et finalement GFP (FL) (catalogue : sc8334 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA).

Voici la liste des anticorps secondaires utilisés : Goat (chèvre) Anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugated (Catalogue: 170-6515, Bio-Rad Laboratories Mississauga, Ontario, Canada), Anti-Rat IgG (H+L) (Catalogue: 401416, Calbiochem, San Diego, USA), Anti-mouse IgG (H+L) – HRP conjugate (Catalogue: 170-6516, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada).

La quantification des protéines a été effectuée avec la trousse « Bio-Rad protein assay ».

Immunoprécipitation de la chromatine

L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a été effectuée sur les cellules 32D avec 10ng/mL soit de l'IL-3, du G-CSFh ou du GM-CSF murin. Les cellules traitées au GM-CSF ont d'abord subi un traitement de 24 heures au G-CSF humain. Les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde (concentration finale de 1 %) pendant 10 minutes à température de la pièce. La réaction a ensuite été arrêtée en utilisant de la glycine (à une concentration finale de 0.125 M). Les cellules ont ensuite été lavées avec un tampon Triton (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.25 % Triton X-100) suivi de 15 min de lavage avec un tampon au NaCl (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 200 mM NaCl). Les cellules ont été solubilisées dans du tampon RIPA (radioimmunoprecipitation assay; 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 0.1 % deoxycholate) suivi d'une lyse par sonification (une série de 6 impulsions de 10 secondes), permettant ainsi d'obtenir des fragments de chromatine soluble d'une longueur se situant entre 500 et 1000 pb. Un

aliquot a été congelé et a servi de contrôle pour le signal non spécifique. Le reste de l'échantillon a été nettoyé avec le Staph A cells (Calbiochem) pendant 30 minutes suivies de l'incubation pendant une nuit complète avec l'anticorps, spécifique pour l'immunoprécipitation, contenu dans le tampon RIPA, décrit précédemment. Un volume de 5 μ L d'anticorps polyclonaux dirigés contre PU.1 (sc-352x, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) et 5 μ L de sérum de lapin (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) a été utilisé pour immunoprécipiter l'ADN. Le complexe ADN/protéine a été lavé séquentiellement deux fois avec du tampon RIPA, du tampon LiCl (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% deoxycholate), et du TE. La chromatine liée aux protéines a ensuite été éluée à 65 °C pendant 15 minutes avec 300 μ L de tampon d'éluion (50 mM de Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 1 % SDS). Les échantillons ont été dilués avec 300 μ L de TE et chauffés durant une nuit complète à 65 °C, pour rompre la liaison entre les protéines et l'ADN. Après avoir effectué une digestion de l'ARN et des protéines, l'ADN a été extrait avec une solution de phénol/chloroforme et précipité avec 10 μ g ARNt. Les procédures d'amplification PCR ont ensuite été appliquées sur les échantillons.

Les régions promotrices ont été amplifiées par PCR quantitatif avec les oligonucléotides suivants : A1 Fw 5'- GTA CTG AGT TTA TAG CCG GAT GC -3' , A1 Rv 5'- GGT CTG TGA AAG CCA AAG TTC -3'; Mcl-1 Fw TAT GCA GAG TTCCAG GGC AGC, Mcl-1 Rv GTT TCT CCG CAG GCC AAA CAT; c-kit Fw 5'-AGGTCTATAGGTGGCTGCTTAACT-3, c-kit Rv 5'-TGGCTTGTTTGAAAATGTGTTAGCA-3'

Les essais fonctionnels

Une précipitation au CaPO₄ a été utilisée afin d'introduire les plasmides d'intérêt à l'intérieur des cellules F-9 lors des essais fonctionnels. La transfection a été produite après une période de 24 heures suivant l'ajout de cellules (30 000 cellules/mL) au fond des plaques de culture cellulaire. Toutes les lectures ont été effectuées après une période de 48 heures suivant les transfusions. Les conditions expérimentales employées correspondent à ceux présentés dans la section résultats. Les essais luciférase ont été effectués avec l'appareil : LUMIstar (Compagnie BMG Lab Tech.). Les mesures de

normalisation utilisant le B-galactosidase ont été effectuées avec l'appareil suivant : Genios Plus compagnie Tecan.

Extraction d'ARN messager et PCR

L'extraction d'ARN messager a été effectuée conformément au protocole présenté par Invitrogen pour l'utilisation du Trizol (Invitrogen St Burlington, Ontario Canada). Les cellules 32D ont été maintenues soit en présence d'IL-3, soit en présence de G-CSFh pendant une période de 48 heures. Les cellules traitées avec 12,5mM de MG-132 (Calbiochem) l'ont été pendant les périodes de 12 heures. Les autres ont reçu le même volume (5ul dans 10 mL) du solvant seul (DMSO) dans lequel le MG132 était contenu.

Voici les oligonucléotides utilisés pour amplifier la séquence de PU-TAP : PUTAPc Fw RT-PCR 5'- GTC AAG AAG AAG CTC ACC TAC C -3' et PUTAPc Rv RT-PCR 5'- GCA CCT GAC GAG GAG ATT TTC T -3'. Voici des oligonucléotides utilisés pour amplifier la séquence de la protéine qui est ubiquitairement exprimée HPRT : mHPRT Fw 5'-GGC CAG ACT TTG TTG GAT TTG-3' et mHPRT Rv 5'-CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC -3'.

Cytométrie de flux

Les anticorps primaires utilisés dans les analyses de cytométrie de flux sont les mêmes que ceux utilisés pour la méthode du buvardage western. Voici maintenant les anticorps secondaires, conjugués à des fluorochromes, utilisés les analyses en cytométrie de fluxP : FITC labeled goat (chèvre) anti-rabbit (Catalogue: 554020 Bioscience BD, Mississauga, ON, Ca) et Goat (chèvre) Anti-Rat IgG (H+L) R-Phycoérythrin conj. (Catalogue: R40004-1, CALTAG Laboratories Burlingame CA).

Les marquages de protéines intracellulaires, produits pour la détection en cytométrie de flux, ont employé l'appareil nommé LSRII (BD Bioscience BD, Mississauga, ON,

Canada). Voici la procédure qui a été appliquée aux cellules pour permettre la détection de protéines intracellulaires. D'abord, les cellules subissent deux rinçages au PBS (4 °C). Ils ont ensuite été suspendus à une concentration de 5×10^6 cellules/mL dans 750 uL de solution de Bouin's (150 ml saturated picric acid (1,2%), 50 ml formaldéhyde (37%), 10 ml of glacial acetic acid) et incubées pendant 20 minutes à température de la pièce. Par la suite, les cellules ont été centrifugées à 1500 rpm, suivies d'un rinçage avec 15 mL de PBS froid. Ces deux dernières procédures ont été répétées 3 fois.

Pour effectuer le blocage des sites non-spécifiques, les procédures suivantes ont été appliquées. Les cellules ont été suspendues dans 1×10^6 cellules avec 100 uL de PBS (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}) et contenant 10 % de sérum correspondant à l'isotype du deuxième anticorps. Ensuite, elles ont été incubées une heure à température pièce puis, elles ont subi un lavage d'une durée de 10 min.

Les mêmes procédures que celles employées pour le blocage ont été utilisées pour l'incubation du premier et du deuxième anticorps. Les cellules ont ensuite été suspendues dans 350 uL de PBS et analysées au LSRII.

Les procédures, de triage des cellules, ont été effectuées à partir de l'appareil nommé FACS ARIA (BD Bioscience BD, Mississauga, ON, Canada). Les cellules mortes ont été exclues des analyses par une coloration à l'iodure de propidium. (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

Infection virale

Les cellules 293GPG {Ory, 1996}, servant à la production de virus avec une enveloppe virale de type VSV-G, ont été maintenues dans un milieu contenant du DMEM, 10% de sérum FCS inactivé, de la Puromycin (sigma) (2ug/ml), du G418 (gibco) (0.3mg/ml) et 5 ug/mL de tétracycline (sigma).

Lorsque les cellules ont été transfectées avec le plasmide d'intérêt, un changement de milieu ainsi que plusieurs rinçages ont été appliqués afin d'enlever tous les antibiotiques présents dans le milieu. Pour la transfection des cellules 293GPG, celle-ci a

été effectuée lorsque les cellules ont atteint une confluence de 85 %. La Lipofectamine et l'OptiMem 2000 (Invitrogen St Burlington, Ontario Canada) ont été employés ainsi que des plasmides contenant séparément les gènes qui codent pour gag, pol, l'enveloppe du virus et le vecteur contenant le gène d'intérêt. Le milieu de culture (DMEM + 10 % FCS inactivé) des cellules 293GPG est changé 5 heures après l'ajout des réactifs présentés précédemment. Le milieu des cultures contenant les virus est récolté tous les deux jours jusqu'à ce que les cellules se détachent du fond de la boîte de pétri. La solution virale a ensuite été concentrée en procédant à une centrifugation d'une durée 1h 40min et d'une vitesse de 24 000 rpm. Les virus ont été dissous dans un volume de 600 μ L de DMEM puis congelés à -80 °C.

Le titre des virus a été effectué selon la procédure suivante. Dans une plaque de 24 puits, des cellules NIH-3T3 ont été déposées au nombre de 1000 cellules par puits. Le lendemain du polybrene a été ajouté à chacun des puits avec une concentration finale 0.8 μ g/ml. Au même moment, une solution virale a été incorporée au milieu de culture avec une concentration décroissante partant de 10^{-2} dans le premier puits suivi de dilutions successives de 1/10. Cette opération a été effectuée jusqu'à atteindre une dilution 10^{-11} de la concentration d'origine. La plaque contenait également avec uniquement une addition de polybrene et un puits de cellules sans aucun ajout. Après deux jours, du G - 418 a été ajoutée afin d'obtenir une concentration finale de 1,5 mg/mL dans chacun des puits (sauf aux cellules sans ajouts qui correspondent au contrôle de croissance normale des cellules). Le lendemain et par la suite, des remplacements du milieu de culture sont effectués tous les deux jours. Le titre a été déterminé par la dilution la plus grande correspondant au puit où des cellules sont encore vivantes peuvent être retrouvées. Les titres obtenus ont été de $1 \cdot 10^6$ CFU/ml pour les virus qui ont incorporé la protéine TAP ou PU.1-TAP.

La veille de la procédure d'infection, les 32D (10 000 cellules/mL) ont été déposées dans une boîte de pétri de 35 mm de diamètre. Ces dernières ont été infectées avec la solution virale en présence 1 μ g/uL de polybrene. Les cellules infectées ont été

sélectionnées avec de la néomycine (G418) pendant une période de deux semaines avant que des ampoules soient congelées.

Électroporation

L'appareil Gene Pulser II (Bio-Rad) a été employé pour électroporer les cellules 32D. Les paramètres suivants ont été employés lors de l'électroporation : 1000 μ F, 320 V. Les cellules vivantes ayant incorporé l'ADN ont été sélectionnées par la fluorescence émise par la protéine GFP, ceci 48 heures après l'électroporation.

Résultats expérimentaux

I. Effet du GM-CSF sur le niveau et la fonction de PU.1

Mise en contexte

La première partie de mes recherches a permis de mettre en relation deux processus fondamentaux lors de l'hématopoïèse : la différenciation et les mécanismes assurant la survie des cellules. Le facteur de transcription PU.1 a une fonction essentielle lors de la myélopoïèse, favorisant une différenciation en un type cellulaire donné. D'un autre côté, on sait que les membres anti-apoptotiques A1 et Mcl-1, de la famille des cellules Bcl-2, sont connus pour jouer un rôle important dans le système hématopoïétique. En effet, en absence de tous signaux extracellulaires, les cellules hématopoïétiques entrent en apoptose. Pour que la cellule puisse survivre, des signaux, tels que le GM-CSF, doivent communiquer avec des éléments, tels que A1 et Mcl-1, qui sont responsables d'empêcher la cellule d'entrer en apoptose. Finalement, l'activation du récepteur du GM-CSF est connue pour être un événement initiateur de la différenciation des progéniteurs myéloïdes en granulocytes ou en macrophages. Comme il a été mentionné à la section *Revue de la littérature*, des relations séparées avaient déjà été établies entre l'activation du GM-CSFR et les protéines A1, Mcl1 et PU.1. Par contre, aucun lien n'avait encore été établi entre le facteur de transcription PU.1 et les protéines A1 et Mcl-1. Des données provenant de notre laboratoire ont démontré, dans des précurseurs myéloïdes de la souris, que la cytokine GM-CSF entraînait l'augmentation du niveau d'ARNm de PU.1, A1 et Mcl-1. De plus, il a été démontré que ces augmentations corrélaient avec une diminution du niveau d'apoptose chez les cellules étudiées. J'ai alors entrepris des recherches afin de me pencher sur le sujet. Celles-ci ont eu pour objectif d'analyser, au niveau protéinique, les

corrélations observées pour les ARNm ainsi que de vérifier si PU.1 pouvait agir directement au niveau des régions promotrices de A1 et Mcl-1.

Expression de PU.1 et de A1 en présence de GM-CSF

L'étape initiale a consisté à vérifier si la cytokine GM-CSF permettait d'induire l'expression de protéines « anti-apoptotiques » dans les cellules 32D, un modèle d'étude de la myélopoïèse. Cette lignée provient de cellules de moelle osseuse de souris C3H/HeJ infectées avec le Friend murine leukemia virus. Ces cellules, lors de leur maintien à l'état basal, sont en présence de la cytokine IL-3. Dans ces conditions, celles-ci arborent la présence de la protéine Mcl-1 ainsi qu'une faible expression de PU.1 (figure 1a). En présence de certaines cytokines telles que le G-CSF, celles-ci peuvent terminer leur différenciation et produire des cellules hématopoïétiques matures. Se basant sur les expériences rapportées par le groupe de Bigas et coll. {Bigas, 1998}, on sait qu'une stimulation au G-CSF des 32D permettait d'entraîner l'expression des récepteurs du GM-CSF à la surface de ces cellules. Dans le milieu de culture cellulaire, l'IL-3 a donc été remplacée par la cytokine G-CSF pour une période de 24 heures. Par la suite, une cinétique de stimulation des cellules à la cytokine GM-CSF a été effectuée afin d'évaluer les changements du niveau d'expression de certaines protéines. Comme l'indique la figure 1a, on remarque une nette augmentation de la protéine PU.1 après 48 heures de stimulation au GM-CSF. Dans les mêmes conditions, on remarque également une bande représentative de la protéine A1. On ne remarque pas d'augmentation de l'expression de la protéine Mcl-1. De plus, la spécificité de l'anticorps a été validée sur des extraits totaux de cellules Jurkat, qui expriment constitutivement la protéine Mcl-1 (figure 1d).

Cependant, ces données sont cohérentes avec des résultats antérieurs de notre groupe de recherche. Ceux-ci démontraient une augmentation, par RT-PCR, de l'ARNm de Mcl-1 pour des conditions expérimentales similaires. Ceci avait lieu suite à une augmentation de l'expression de PU.1 dans les cellules 32D (St-Denis et coll. pas publié). Cette augmentation était toutefois très faible après 48 heures de stimulation au GM-CSF, contrairement à ce qui était observé pour le niveau d'ARN messager de PU.1 et A1. Les données présentées, à la figure « 1a », ont été confirmées par une mesure quantitative en cytométrie de flux, qui est plus sensible que les buvardages westerns (voir figure 1b). L'augmentation de la concentration de la protéine Mcl-1 aurait donc lieu ultérieurement à celle de la protéine A1. En somme, ces données indiquent que lorsque des précurseurs de la lignée myéloïde sont soumis à des signaux de différenciation provenant de la cytokine GM-CSF, on remarque que les cellules amorces des mécanismes leur permettant de se différencier (via PU.1) ainsi que de promouvoir la survie au niveau cellulaire (via A1). En plus, des données de notre groupe de recherche, employant un anti-sens de PU.1 sur des cellules de moelle osseuse murine, démontrent clairement une diminution simultanée de l'expression de la protéine Mcl-1 et PU.1 par buvardage western (St-Denis et coll. pas publié). Dans les mêmes conditions, des études en cytométrie de flux indiquent une augmentation de la détection de l'annexin V sur la population de cellules ayant reçu l'anti-PU.1. Ces données permettent d'établir une relation entre l'augmentation de la présence de la protéine PU.1 et la survie cellulaire induite par A1 et Mcl-1. Dans des précurseurs myéloïdes en contact avec la cytokine GM-CSF.

A1 et Mcl-1 sont des gènes cibles de PU.1

Après avoir remarqué un changement dans l'expression d'éléments clés à l'intérieur des cellules soumises à la cytokine GM-CSF, j'ai approfondi la relation existante entre ces deux processus distincts, soit la différenciation et la survie cellulaire. Partant du fait que PU.1 est un facteur de transcription, j'ai vérifié si les gènes Mcl-1 et A1 ne pourraient pas être des gènes cibles de PU.1. La figure 1C présente des signaux provenant d'une immunoprécipitation de la chromatine avec des anticorps dirigés contre PU.1. Sur cette dernière, on a procédé à une amplification PCR d'oligonucléotides spécifiques à la région promotrice des gènes A1 et Mcl-1. Les données présentées ont été effectuées pour des stimulations avec les cytokines G-CSF et GM-CSF (voir section *matériel et méthodes*). Suite à la stimulation au GM-CSF, on remarque une relation plus prononcée de l'occupation par PU.1 du promoteur A1 en comparaison à celle de Mcl-1. En conclusion, on remarque une augmentation de l'occupation des promoteurs proximaux des gènes A1 et Mcl-1 par le facteur de transcription PU.1 lorsque le GM-CSF remplace la cytokine IL-3 dans le milieu de culture (figure 1c).

Globalement, ces données permettent de soutenir le modèle suivant. La cytokine GM-CSF induit, dans les précurseurs myéloïdes, une augmentation du facteur de transcription PU.1. Ce dernier augmente alors sa présence sur les promoteurs des gènes A1 et Mcl-1. Le niveau d'ARNm de la protéine A1 augmente, puis il est suivi d'une augmentation plus tardive de l'ARNm de Mcl-1. Après 48 heures, on peut facilement détecter la protéine A1. Lorsque l'on induit une diminution de l'expression de PU.1 via un anti-sens, on remarque au même moment une diminution des protéines anti-apoptotique telle que Mcl-

1 ainsi qu'une augmentation de la détection de l'annexin V et par conséquent, de l'apoptose. Somme toute, le GM-CSF augmente la présence de la protéine PU.1, qui favorise à son tour la survie cellulaire par l'intermédiaire de A1 et Mcl-1.

II. Mise au point d'un modèle pour identifier les partenaires de PU.1

Mise en contexte

Ces premières expériences que j'ai effectuées s'ajoutent à celles produites par d'autres étudiants, dont la somme pourra bientôt faire l'objet d'une publication. J'ai continué mes recherches afin de décrire les rouages qui mettent en relation la différenciation myéloïde guidée par PU.1 et le déclenchement de mécanismes assurant la survie cellulaire. Mon objectif a alors été le suivant : mettre en place un système permettant d'identifier les partenaires d'interactions ainsi que les complexes formés par le facteur de transcription PU.1. Le tout serait effectué sur des précurseurs myéloïdes (32D) soumis à un agent permettant la différenciation cellulaire, soit le GM-CSF. J'ai alors décidé de recourir à la méthode de double purification d'affinités, décrites par Séraphin et collègues {Puig, 2001}, pour identifier la formation de complexes. Bien qu'il existe plusieurs variantes à cette méthode, voici les principes directeurs.

1) Mise au point d'une protéine de fusion PU.1-TAP

La première étape consiste à ajouter une étiquette TAP {Puig, 2001} à l'extrémité N ou C terminale de notre gène d'intérêt. Avec l'objectif de produire la protéine chimérique PU.1-TAP, j'ai procédé à la modification de la séquence codant pour le gène PU.1 murin afin d'enlever le codon-Stop. Suite à cette modification, j'ai ajouté l'étiquette TAP à l'extrémité C-terminale.

L'étiquette TAP se subdivise en trois segments majeurs (voir figure 8a). Deux séquences de purification par affinité séparées par un site de clivage reconnu par l'enzyme TEV. Voici les informations se rapportant à la séquence que j'ai utilisée. Le premier domaine de purification présente une haute affinité avec les IgG. Un clivage avec l'enzyme TEV est nécessaire pour libérer les complexes protéiniques de la colonne de purification. La deuxième séquence de purification se lie à la calmoduline, dont un simple ajout de chélateur de calcium à la solution d'élution est nécessaire pour décrocher le complexe de la colonne (figure 8b). Cette méthode a l'avantage de permettre l'identification de complexes natifs se formant à l'intérieur des cellules lorsque celles-ci sont soumises à des conditions particulières, tel qu'à la présence de GM-CSF. À la suite de ces étapes de purification, les protéines composant ce complexe peuvent être déterminées par spectrométrie de masse. Il est important de noter que les protéines isolées dans ces complexes n'ont pas nécessairement toutes des interactions directes. Cette courte description qui a été faite permet de bien comprendre la méthode qui pourra être utilisée à la suite de mes travaux pour définir les complexes dans lesquels PU.1 est impliqué lors du processus de différenciation myéloïde. Dans le paragraphe suivant, je vais vous

présenter les constructions génétiques que j'ai utilisées pour produire la protéine PU.1 incorporant cette étiquette de purification.

Vecteur d'expression

Tout au long des expériences que j'ai produites, j'ai eu recours à deux catégories de plasmides pour permettre l'expression de la protéine de fusion PU.1-TAP. Ces vecteurs sont MSCV et p514.

a) MSCV

La première catégorie de vecteur contient des séquences flanquantes de type pCMV-LTR (figure 2b). C'est un vecteur rétroviral, il est conçu pour permettre la production de virus. Ce plasmide est optimisé pour les cellules hématopoïétiques, permettant une meilleure expression d'une protéine d'intérêt à l'intérieur de ces dernières. Ce vecteur contient également un marqueur de sélection à la néomycine. Il faut noter que ce vecteur permet également d'effectuer des transfections transitoires sans que l'on soit obligé de produire des virus.

b) p514

Pour ce qui est du vecteur p514, celui-ci contient un promoteur de type SV40, qui permet une très forte expression de la protéine d'intérêt (figure 2c). Par contre, ce dernier ne contient pas les éléments nécessaires à la production de virus. De plus, aucun marqueur de sélection n'est intégré à l'intérieur de ce plasmide.

Comme vous le verrez, c'est par l'utilisation de ces deux outils que mon projet a pu évoluer. Ils ont permis la création de cellules exprimant la construction PU.1-TAP

servant de modèle pour l'étude des progéniteurs de la lignée myéloïde. Le texte qui suit décrira les différentes étapes qui ont permis de construire et de valider ce modèle.

2) Expression transitoire de PU.1-TAP

Après avoir terminé les constructions génétiques, ma première initiative a été de vérifier si ces protéines pouvaient être exprimées. Une lignée cellulaire, nommée Bosc, reconnue pour permettre des expressions transitoires à de hauts niveaux a alors été employée pour effectuer les transfections utilisant la précipitation au CaPO₄. J'ai tout d'abord commencé mes travaux avec le vecteur MSCV. Comme le démontre la figure 3a, la construction PU.1-TAP est très bien détectée avec l'anticorps dirigé contre la protéine PU.1 ou contre l'étiquette TAP. De plus, la bande se trouve à une hauteur d'environ 60 kD, ce qui correspond au poids moléculaire attendu. Comme prévu, l'anticorps dirigé contre la protéine TAP ne détecte pas la forme endogène de PU.1. Enfin, lorsque les cellules ne sont pas transfectées, les anticorps dirigés contre la protéine PU.1 ou TAP ne sont pas en mesure de détecter des protéines dans les extraits cellulaires. Il est important de noter, que tous les anticorps secondaires ont le potentiel de détecter la protéine TAP. Bien que ces données n'ont pas été présentées dans la figure 3a, l'extrait transfecté avec la protéine TAP seule présente une bande à environ 20 kD pour toutes les immunodétections (c.-à-d. : immunomarquage de GFP, PTP-1D et PU.1). Ceci n'a rien de surprenant, puisque la protéine TAP permet d'effectuer une purification d'affinités en se liant à une colonne de bille contenant des IgG. Cette bande correspondant à la protéine TAP n'est donc pas représentative du manque de spécificité de l'anticorps primaire, mais spécifique à la reconnaissance de l'anticorps secondaire. Ces données ont d'ailleurs été

validées dans des recherches antérieures de notre groupe de recherches sur d'autres fusions TAP en effectuant la détection de cette protéine seulement avec un anticorps secondaire. Enfin, l'anticorps primaire dirigé contre la protéine TAP a pour avantage d'être plus sensible que l'utilisation seule d'un anticorps secondaire dirigé contre des IgG. Pour valider la quantité de protéine présente sur chaque colonne du gel, j'ai eu recours à un anticorps dirigé contre PTP-1D qui est exprimé de façon ubiquitaire dans ces cellules. Ce contrôle indique clairement que tous les puits contiennent la même quantité de protéine. Toutefois, on remarque que le signal correspondant à la construction PU.1-TAP est moindre que celui qu'on retrouve pour la transfection seule de l'étiquette TAP ou de la forme endogène de PU.1. Lorsque j'ai élaboré cette expérience, j'ai également pensé à introduire un contrôle qui me permettrait d'évaluer l'efficacité de transfection. Ce contrôle consiste à procéder à une co-transfection des échantillons avec la protéine GFP. Comme on peut l'observer, l'efficacité de transfection est constante pour tous les échantillons et aucun signal n'est détectable pour les cellules endogènes qui n'ont pas été transfectées. Ceci indique que l'efficacité de transfection a été constante d'une fois à l'autre et que cette efficacité ne permet pas d'expliquer la diminution du signal observé pour l'expression de PU.1-TAP.

Une des hypothèses permettant d'expliquer le faible niveau d'expression de la protéine PU.1 TAP fut que la quantité d'ADN transfectée soit été trop grande. En employant le vecteur p514, il a été possible d'obtenir des niveaux d'expression largement supérieure en utilisant environ 40 fois moins d'ADN contenant les plasmides codant pour PU.1 TAP. Les paramètres de transfection que j'ai utilisés avaient déjà mis au point dans le laboratoire, pour le vecteur p514 et les cellules COS. Cette différence entre les niveaux

d'expression transitoire effectuée par transfection au CaPO_4 des vecteurs p514 et MSCV permet d'expliquer les différences observées entre les figures 4a et 4b, pour les essais fonctionnels de la protéine PU.1 TAP. L'image de la figure 3B fait ressortir clairement une augmentation marquée de l'expression de la protéine lorsque l'on utilise le vecteur p514. Cette étape m'a donc permis de valider que la protéine PU.1-TAP était correctement exprimée, c'est-à-dire qu'elle a la bonne taille et qu'elle est reconnue de façon spécifique par des anticorps.

3) Fonctionnalité de PU.1-TAP

PU.1 est un facteur de transcription dont on connaît plusieurs cibles actuelles. L'une d'elle, le promoteur proximal de IL-1B, a été étudiée par notre groupe de recherches dans les années antérieures. Notre bonne connaissance de ce système m'a poussé à choisir cette cible de PU.1 pour valider la fonctionnalité de ma construction de PU.1-TAP. Profitant de la même occasion, ceci m'a permis de valider si la protéine produite par cette construction était encore capable d'interagir avec la protéine c-jun, un partenaire connu de PU.1. Celui-ci se fixe normalement du côté C-terminal de la forme endogène de PU.1, juste à côté de l'extrémité à laquelle a été ajoutée l'étiquette TAP. J'ai alors procédé à des essais fonctionnels utilisant le rapporteur luciférase en aval du promoteur de l'IL-1B. Mes expérimentations ont commencé en utilisant la construction contenue dans le vecteur MSCV. Comme il est illustré à la figure 4a, la construction PU.1-TAP conserve sa capacité à activer le promoteur de IL-1B, mais à un niveau légèrement moindre que son homologue endogène. Cette différence de fonctionnalité se remarque aussi au niveau de sa synergie avec le partenaire c-jun. Par contre, la présence de c-jun entraîne une

augmentation, d'environ trois fois, du signal d'expression de la luciférase. Ceci est le cas autant pour la forme endogène que pour que celle qui contient l'étiquette TAP. Me rapportant aux résultats présentés à la figure 3a, j'ai alors émis l'hypothèse que les différences d'intensité des signaux entre PU.1 ou PU.1-TAP fussent fort probablement dues à leur niveau d'expression protéinique respectif.

Pour confirmer cette hypothèse, j'ai repris les essais luciférases transfectant les cellules avec la construction PU.1 TAP contenue dans le vecteur p514. Ma prédiction s'est alors avérée fructueuse puisque cette fois-ci, pour les mêmes conditions données, on retrouve un niveau d'activité de la luciférase égale, pour la forme endogène ou étiquetée de PU.1 (figure 4b).

Ces tests m'ont permis de garantir que la construction que j'utilisais conservait sa propriété à interagir avec ses partenaires d'interactions habituelles. En plus, cette dernière conserve la propriété fonctionnelle d'activer des promoteurs connus, avec la même efficacité que son homologue endogène.

4) Production d'une lignée myéloïde exprimant PU.1-TAP

A. Transfert de PU.1-TAP par infection virale

Une fois les premières étapes validant l'expression et la fonctionnalité traversées, j'ai démarré le processus permettant de sélectionner des cellules 32D exprimant la construction PU.1-TAP.

À cette étape, l'utilisation du vecteur MSCV présentait des avantages considérables. Premièrement, les 32D sont des cellules en suspension, pour lesquelles il existe seulement deux manières d'introduire des gènes à l'intérieur du génome : les virus ou l'électroporation. Le vecteur MSCV permet la production de virus, grâce à différents éléments contenus dans sa séquence. Dans mes expériences, les virus ont été produits à partir de cellules que l'on nomme 293 GPG {Ory, 1996}. Ces virus sont dits «amphotropes», c'est-à-dire qu'ils peuvent infecter des cellules de différentes espèces. De plus, ce plasmide contient dans sa séquence un marqueur de sélection qui permet d'isoler les cellules qui ont intégré correctement l'ADN viral. La figure 5a dévoile les résultats présentant l'expression de protéines dans les cellules 32D infectées. Ces expressions sont comparées aux extraits totaux de protéine provenant de transfections transitoires dans les cellules BOSC. On remarque clairement que lorsque l'étiquette TAP est insérée seule dans les cellules 32D, le signal est comparable à celui des contrôles. Malheureusement, on constate au même moment que la protéine PU.1-TAP n'est pas exprimée dans les cellules ayant été traitées pendant plus de deux semaines à la néomycine. Lorsque j'ai configuré les paramètres de cette expérience, j'ai procédé à l'infection de cellules de contrôle, soit les 293 T. Le but était de valider la capacité de mes virus à exprimer les protéines désirées dans les cellules infectées. Cette image du gel (figure 5a) ne laisse

aucun doute sur la capacité des virus à exprimer soit l'étiquette TAP seule ou soit la protéine PU.1-TAP. De plus, l'expérience a été reprise avec une deuxième production de virus et les résultats ont été identiques. Après avoir discuté avec mon groupe de recherches, j'ai procédé à une sélection de plusieurs clones résistants à la néomycine. J'ai isolé chaque clone et je les ai laissés se multiplier afin d'obtenir une vingtaine de populations clonales. Une ampoule de chaque population clonale a été congelée dans l'azote liquide. La figure 5b met en relief un gel contenant des extraits totaux de chaque population clonale immunodéTECTÉES avec un anticorps dirigé contre la protéine TAP. Cet anticorps se trouve à être plus sensible que celui dirigé contre PU.1 pour détecter ma protéine de fusion. Seul le clone 6 semble posséder une bande qui pourrait représenter la protéine PU.1-TAP; mais la spécificité de cette bande est incertaine. Malgré tout, ces résultats se sont révélés très peu satisfaisant pour permettre la purification de complexes protéiniques.

Étant donné que ces résultats ne me permettaient pas d'affirmer, avec conviction, que la détection de la protéine PU.1 TAP était spécifique, j'ai procédé à l'analyse d'ARNm contenu dans les cellules. J'ai également profité de l'occasion pour vérifier si cette absence de détection était due à une dégradation précoce de la protéine d'intérêt. Par la même occasion, j'ai procédé à un ajout de G-CSF au milieu de culture afin de forcer ces dernières à se différencier. Je voulais déterminer, par ce test, si une augmentation de l'expression, comparable à celle que l'on observe pour PU.1 (voir section *revue de la littérature*), allait se produire pour la protéine de fusion PU.1-TAP. Les résultats présentés à la figure 5c indiquent que le clone 6 exprime de l'ARNm spécifique à la construction PU.1-TAP. En effet, cette bande n'est pas retrouvée dans les extraits

provenant de cellules de type sauvage. L'intensité de la bande détectée est la même pour les cellules 32D en présence d'IL-3 que pour les cellules 32D maintenues en présence de G-CSF. Parallèlement à l'isolation d'ARN messager que j'avais effectuée, j'ai procédé à une extraction totale de protéines pour détecter une seconde fois la présence ou l'absence de PU.1-TAP. Cette fois-ci, les résultats sont clairs, puisqu'on ne retrouve aucune trace de PU.1-TAP autant pour les cellules de type sauvage que pour celles provenant du clone 6. L'inhibition du protéasome avec le MG 132 n'a rien changé à ce fait. Ces données m'ont indiqué que l'infection virale a bien fonctionné, mais que l'absence de détection de la protéine d'intérêt n'était pas due à sa dégradation. Par la même occasion, l'expérience m'a permis de constater que l'induction de la différenciation dans ces cellules n'avait d'influence que sur la forme endogène de la protéine. Une nouvelle stratégie devait donc être employée.

B. Production de 32D PU.1-TAP par électroporation

Pour pallier ce problème, j'ai procédé à l'électroporation des vecteurs MSCV et p514 dans les cellules 32D. Tout d'abord, j'ai modifié la construction MSCV PU.1-TAP afin de remplacer le marqueur de sélection à la néomycine par celui de la GFP. Pour ce qui est du vecteur p514, j'ai co-transfecté ce dernier par électroporation avec le plasmide MSCV-GFP. Comme le montre la figure 6a, les cellules positives ont été triées en éliminant celles qui étaient mortes avec un marquage au PI. Ensuite, un triage a été effectué en sélectionnant les cellules émettant de la fluorescence provenant du marqueur de sélection GFP. Il est intéressant de noter à la figure 6b que le taux de cellules fluorescentes est similaire pour ceux de type 32D MSCV GFP que pour les 32D p514 PU.1-TAP co-transfectées avec MSCV GFP.

L'étape finale a été de déterminer si ces cellules triées exprimaient PU.1 TAP. Les résultats étalés à la figure 6c démontrent que ces cellules expriment correctement cette protéine d'intérêt. On peut conclure que ce signal est spécifique puisqu'aucune bande n'est détectée dans les puits d'extraits protéiniques de cellules de type sauvage ou dans ceux n'exprimant que le marqueur GFP. De plus, les contrôles positifs indiquent que le poids moléculaire de la bande détectée est exact. Comme on pouvait le prévoir, l'expression de PU.1-TAP est environ trois fois plus forte dans les cellules qui ont été transfectées avec le vecteur p514 comparativement à celles ayant reçu le plasmide MSCV. Ces démarches (figure 7) ont donc permis d'obtenir, à l'intérieur des cellules 32D, l'expression des protéines PU.1 fonctionnelles contenant une étiquette de purification TAP.

Ouverture

Deux points majeurs ressortent de ces expériences. En premier, une relation directe a été établie entre le facteur de transcription PU.1 et les protéines anti-apoptotiques A1 et Mcl-1, lorsque la différenciation est induite par le GM-CSF. Ensuite, ces travaux ont amené la mise au point d'un système permettant d'étudier les complexes formés lors de la différenciation myéloïde.

Malgré tout, certaines optimisations pourront être apportées au système que j'ai mis sur pied. En effet, les résultats qui ont été présentés indiquent que l'expression constitutive de PU.1 est incompatible à long terme dans les cellules 32D. Comme je l'ai mentionné précédemment, cette lignée cellulaire représente un modèle de précurseurs de la lignée myéloïde. Étant donné que PU.1 est connu pour avoir un rôle actif lors de la différenciation de ce type de cellule, il est possible que la présence de cette protéine soit

réprimée à l'intérieur de cellules maintenues à un stade inactif, tel que c'est le cas pour les 32D.

La solution que je suggère, pour contourner cet obstacle, serait de mettre au point un système inductible, qui contrôlerait le moment et la période pendant laquelle ce facteur de transcription est exprimé. De cette façon, il serait possible d'extraire une grande quantité de complexes protéiniques sans que des mécanismes, servant à diminuer la présence de la protéine, aient le temps d'être activés. Ainsi, il sera possible de produire un modèle exprimant la protéine PU.1 TAP qui permettra l'étude du processus de myélopoïèse lorsque la différenciation est induite en présence de GM-CSF.

Légende des figures

Figure 1 : Effet du GM-CSF sur A1 et Mcl-1 via PU.1**a) Le GM-CSF entraîne une augmentation des protéines A1 et PU.1****dans les cellules 32D**

Buvardage western présentant une cinétique de stimulation des cellules 32D. Ces dernières ont soit été maintenues en présence d'IL-3 pendant 72 heures ou soit avec du GM-CSF pendant 24 heures suivi du GM-CSF pendant 48 heures. Le gel SDS-PAGE de 10 % contenant 30ug/puits de protéine a été employé pour la migration des protéines. Les extraits totaux de protéines cellulaires ont été obtenus en faisant chauffer à 100 °C la solution de Laemmli, comme il est présenté dans la section « matériel et méthodes ». Les anticorps dirigés contre les protéines suivantes ont servi à l'immunomarquage de la membrane : PU.1, A1, Mcl-1 et PTP-1D.

b) Le niveau d'expression de A1 double dans des cellules 32D traitées 48 heures au GM-CSF

Analyse en cytométrie de flux permettant de mesurer l'augmentation de la présence, à l'intérieur de la cellule, de la protéine A1 et Mcl-1 pour un temps de stimulation au GM-CSF de 24 heures, suivi d'une période de 48 heures au GM-CSF. Cette dernière a été effectuée sur les cellules 32D traitées avec la méthode de fixation de Bouin's. Les cellules mortes ont été exclues du compte par l'utilisation de l'iodure de propidium. Les paramètres de cinétiques sont les mêmes que ceux présentés à la figure 1a. Le signal du non spécifique, représenté par la courbe en noir, correspond à un marquage utilisant seulement le deuxième anticorps conjugué à un fluorochrome. L'espace que l'on retrouve

sous la courbe, qui est coloré en bleu, représente le signal provenant de la culture cellulaire maintenue à son état de bases avec la cytokine IL-3. La coloration en vert représente les cellules maintenues avec le GM-CSF, comme il a été mentionné précédemment. Dans le graphique de gauche, l'immunodétection a été effectuée avec un anticorps primaire polyclonal dirigé contre la protéine Mcl-1 et un anticorps secondaire contre les IgG de lapin couplé au fluorochrome FITC. Pour le graphique de droite, l'anticorps primaire ciblait la protéine A1 et l'anticorps secondaire était dirigé contre les IgG de rats couplés au fluorochrome R-Phycoérythrin. Le signal du non spécifique, représenté par la courbe en noir, correspond à un marquage utilisant seulement l'anticorps secondaire correspondant. Les chiffres présentés en dessous des figures représentent la valeur moyenne du signal.

c) A1 et Mcl-1 : des gènes cibles de PU.1 dans les cellules 32D en présence de GM-CSF

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) permettant d'identifier une relation directe entre le facteur de transcription PU.1 et les protéines anti-apoptotiques A1 et Mcl-1. Cette dernière a été effectuée avec les cellules 32D stimulées à l'IL-3 ou pendant 24 heures au GM-CSF suivi d'une période de 96 heures au GM-CSF. Les extraits de chromatine fragmentée ont été sujets à une immunoprécipitation avec une solution d'anticorps ciblant PU.1 ou des IgG de lapin non spécifique. Un test de PCR quantitatif a été employé pour détecter des régions promotrices de A1, Mcl-1 et c-Kit. Les signaux présentés correspondent au ratio suivant : signal obtenu par l'immunoprécipitation de PU.1 sur les signaux provenant des 10 % de l'extrait total de chromatine qui n'a pas été

immunoprécipité (input). Les ratios d'amplification PCR de A1 donnent 0.4 %, 3.8 % et 8.1 % correspondant respectivement à une stimulation des cellules 32D avec l'IL-3, le G-CSF et le GM-CSF. Dans le même ordre, les valeurs de 0.2 %, 1.2 % et 4.5 % correspondent à l'amplification PCR du promoteur de Mcl-1. Ces ratios sont représentatifs des signaux d'amplification PCR spécifique pour A1 ou Mcl-1, sur ceux provenant de l'amplification PCR de la chromatine non précipitée par des anticorps (« input » en anglais). Le ratio correspondant à l'immunoprécipitation IgG non spécifique présente, dans tous les cas, une valeur nulle (Données pas montrées).

d) Validation de la spécificité de l'anticorps dirigé contre Mcl-1

Buvardage western présentant un extrait total de protéine provenant de cellules Jurkat. Un gel SDS-PAGE de 10 % contenant 30 µg/puits de protéine a été employé pour la migration des protéines. Un anticorps dirigé contre la protéine Mcl-1 a servi l'immunomarquage de la membrane selon les mêmes paramètres que ceux présentés à la figure 1a.

Figures 2 : Schéma synthèse de la relation entre PU.1, A1 et Mcl-1 et les vecteurs d'expression de PU.1-TAP

a) Les relations qui relient PU.1, A1 et Mcl-1.

Ce schéma récapitule les travaux que j'ai effectués sur la relation qui existe entre la différenciation myéloïde contrôlée par le facteur de transcription PU.1 et les mécanismes assurant la survie des cellules promues par A1 et Mcl-1. Les cinétiques d'expression de protéines ainsi que des expériences de ChIP sont résumées dans ce diagramme.

b) Plasmide MSCV

Ce plasmide contient la protéine de fusion PU.1-TAP. Ce vecteur est optimisé pour permettre l'expression de protéines dans les cellules pluripotentes humaines ou murines. Ce vecteur contient des régions LTR (Long Terminal Repeat) provenant du virus de cellules souches murines «PCMV », permettant la production de virus incorporant le gène d'intérêt à exprimer. Le marqueur de sélection à la néomycine est sous le contrôle du promoteur pgk.

c) Plasmide p514

Ce plasmide contient la protéine de fusion PU.1-TAP. L'expression de la protéine d'intérêt est sous le contrôle du promoteur SV40. Ce vecteur ne contient pas de marqueurs de sélection pour les cellules de mammifères.

Figure 3 : Expression transitoire de PU.1-TAP

a) La construction de PU.1 TAP permet une expression correcte de la protéine.

Buvarpage western présentant l'expression transitoire de la protéine PU.1 TAP. Chaque puits, du gel SDS-PAGE de 10 %, contient 30ug d'extrait total de protéine, qui a été obtenu par la méthode qui utilise la solution de Laemmli, chauffée à 100 °C, sur des cellules Bosc. Ces cellules ont subi une transfection transitoire par précipitation au CaPO4. Les anticorps dirigés contre les protéines suivantes ont été utilisés pour l'immunodétection : PU.1, TAP, PTP-1D et GFP. Au-dessus de chaque colonne du gel sont indiqués les gènes qui ont été introduits à l'intérieur des cultures cellulaires. Les acronymes P-T et WT indiquent respectivement « PU.1 TAP » et « cellules de type

sauvage ». Dans les cultures cellulaires correspondantes, une quantité correspondant à 12 µg de plasmides codant pour le gène PU.1 ou TAP ou PU.1 TAP a été transfectée. Toutes les cultures cellulaires ayant subi une transfection ont également reçu 5 µg du vecteur MSCV GFP ainsi que 15 µg du plasmide pGEM4 vide. Les flèches noires en gros pointent la bande correspondant à la protéine PU.1 TAP. Les petites flèches noires pointent soit la protéine PU.1 ou soit la protéine TAP selon l'indication présente sur la figure. Enfin, l'astérisque indique la détection de la protéine TAP par la liaison de l'anticorps secondaire avec les sites de liaison aux IgG de cette dernière. Cette bande est présente pour toutes les immunodétections de cette figure, bien qu'elle ne soit illustrée que pour la détection de la protéine PU.1.

b) Le plasmide p514 permet des niveaux d'expression supérieure au vecteur MSCV pour la protéine PU.1 TAP.

Buvarpage western comparant les niveaux d'expression de la protéine PU.1-TAP exprimée soit à partir du vecteur MSCV ou du vecteur p514. Chacun des puits contient 10ug d'extrait total de protéine chargé sur un gel SDS-PAGE de 10 %, obtenu en chauffant la solution de Laemmli à 100 °C. Ces extraits ont été produits à partir de cellules COS ayant subi une transfection transitoire au CaPO₄. Un anticorps dirigé contre PU.1 a été utilisé pour l'immunodétection. Au-dessus de la figure est représentée p514 ou MSCV. Ces derniers correspondent au choix du vecteur qui a été utilisé pour produire l'expression transitoire de la protéine PU.1 TAP. Enfin, l'indication WT correspond aux extraits de cellules COS de type sauvage qui n'ont pas subis de transfusions.

Figure 4 : Essais fonctionnels**a) PU.1 TAP conserve sa capacité à interagir avec c-jun pour activer le promoteur de l'IL-1B**

Essais luciférase permettant de confirmer la fonctionnalité de la protéine PU.1-TAP exprimée à partir du vecteur MSCV. Cette dernière a été effectuée 48 heures après que les cellules F-9 eurent subi d'une transfection transitoire au CaPO4. Tous les essais présentés dans cet histogramme ont reçu les vecteurs suivants pendant leur transfection : CMV B-Galactosidase (250ng), pXP2m région -131 à + 11 du promoteur de l'IL-1B (1000ng). Selon le cas, les cellules ont reçu la séquence qui code soit pour la protéine PU.1 (1000ng) ou soit PU.1-TAP (1000ng), contenue dans le vecteur MSCV ainsi que Sport c-jun (100ng). Le vecteur pGem4 vide a été ajouté dans tous les essais afin que la quantité d'ADN totale soit de 3 µg pour toutes les conditions. Les valeurs indiquées représentent en moyenne ± l'écart type des essais effectués en triplicata. Ce sont les valeurs moyennes du ratio provenant des signaux luciférase/B-galactosidase qui sont illustrées dans ce graphique, pour chacune des conditions données.

b) p514 confère à PU.1 TAP un niveau d'activité fonctionnelle similaire à PU.1.

Essais luciférase permettant de confirmer la fonctionnalité de la protéine PU.1-TAP exprimée à partir du vecteur p514. Ce dernier a été effectué 48 heures après que les cellules F-9 eurent subi une transfection transitoire au CaPO4. Les paramètres de l'expérience sont les mêmes que ceux présentés à la figure 4a à l'exception des détails suivants. Les protéines PU.1 (25ng) et PU.1 TAP (25ng) sont contenues, cette fois-ci, à

l'intérieur du vecteur p514. Les valeurs indiquées représentent en moyenne \pm l'écart type des essais effectués en triplicata. Ce sont les valeurs moyennes du ratio, provenant des signaux luciférase/B-galactosidase pour chacune des conditions données, qui sont illustrées dans ce graphique.

Figure 5 : Production de cellules 32D par infection virale

a) Les virus sont fonctionnels et permettent l'expression de TAP, mais pas de PU.1 TAP dans les cellules 32D.

Buvardage western illustrant une immunodétection des protéines PU.1 TAP et TAP dans différents types cellulaires infectés avec les virus VSV produits à partir de cellules 293GPG. Les extraits totaux de protéine (30ug/puits) proviennent soit de cellules 32D, 293T ou Bosc. Les cellules 32D et les cellules 293T ont été infectées avec des virus VSV produits à partir des vecteurs « MSCV TAP » ou « MSCV PU.1 TAP ». Les extraits de protéine provenant des cellules Bosc proviennent de la même expérience que celle présentée à la figure 3a. Les cellules 32D ont été sélectionnées pendant deux semaines avec de la néomycine avant de subir l'extraction de protéine. L'anticorps utilisé était dirigé contre la protéine TAP. Les acronymes P-T, TAP et WT représentent respectivement des cellules ayant incorporé l'ADN codant pour les protéines PU.1-TAP, TAP et les cellules de type sauvage sans aucune insertion d'ADN. Les flèches noires représentent les poids moléculaires théoriques auxquels les protéines PU.1 TAP et TAP devraient se retrouver.

b) Aucun clone ne permet une détection significative de PU.1 TAP

Buvarpage western présentant des extraits totaux (30ug/puit) de différentes populations provenant de clones de cellules 32D. Ces dernières ont été infectées avec des virus VSV produits à partir du plasmide MSCV PU.1 TAP. L'extraction de protéine a été effectuée par la méthode qui emploie la solution de Laemmli chauffée à 100 °C. Un anticorps dirigé contre la protéine TAP a été employé pour effectuer l'immunodétection. La flèche noire pointe à la hauteur théorique à laquelle on devrait retrouver la protéine de fusion PU.1-TAP. Le puits identifié WT représente les cellules de type sauvage qui n'ont pas subi d'infection virale. Chaque numéro représente une population clonale de cellules 32D infectées.

c) L'ARN messenger de PU.1 TAP est détecté dans le clone numéro 6

RT-PCR permettant de déterminer si l'ARNm qui code pour PU.1 TAP est exprimé à l'intérieur des cellules provenant de clones 6 des cellules 32D infectées. Gel d'agarose de 1 % présentant des amplifications par RT-PCR, produits à partir d'extraits de l'ARNm provenant de la population clonale n° 6, tel que présenté à la figure 5B. À droite de l'indication « conditions », l'utilisation des lettres « W, C, I, G, V » représentent respectivement les cellules de type sauvage (sans infections) « W », clone n° 6 « C », traitement à l'IL3 pendant 48 heures « I », traitement au G-CSF pendant 48 heures « G », réactifs pour la réaction de PCR ne contenant pas d'ADN (vide) « V ». La séquence des oligonucléotides utilisés pour l'amplification PCR est décrite dans la section « Matériel et méthodes ». La rangée du haut représente à l'amplification par RT-PCR, de la séquence qui code pour PU.1 TAP. La rangée du bas représente l'amplification par RT-PCR de la

séquence codant pour HPRT. Cette dernière est exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules 32D.

d) Des signaux de différenciation induite par le G-CSF ou une inhibition du protéasome par le MG 132 ne permettent pas de détecter la protéine PU.1 TAP

Buvardage western permettant de vérifier si les mécanismes de différenciation ou de dégradation des protéines par le protéasome sont impliqués dans la stabilité de la protéine PU.1 TAP. Les extraits de protéine (30 µg/puits), obtenue par la méthode qui emploie la solution de Laemmli chauffée à 100 °C, ont été produits à partir des cellules provenant du clone 6. Un anticorps dirigé contre la protéine TAP a été employé pour l'immunodétection. Le type de cytokine utilisé pour le maintien des cultures cellulaires a été IL-3 ou le G-CSF, comme il est indiqué en bas de la figure. Les lettres « O » et « N » représentent respectivement « oui, présence de MG 132 » et « non, absence de MG 132 ». La colonne « conditions » indique si les cellules sont du type sauvage, identifié par le terme « normal », ou si elles proviennent du clone 6 (voir la légende de la figure 5b). Le contrôle de PU.1 TAP provient des mêmes extraits de protéine que ceux présentés à la figure 3a.

Figure 6 : Production de cellules 32D par électroporation

a) L'électroporation permet l'insertion des vecteurs codant pour PU.1

TAP à l'intérieur des cellules 32D

Triage en cytométrie de flux permettant de sélectionner les cellules vivantes exprimant le rapporteur GFP. La signification des couleurs est la suivante : en vert les cellules mortes, en rouge les cellules vivantes qui ne contiennent pas de GFP et en bleu, les cellules qui sont vivantes et qui émettent de la luminescence par l'intermédiaire de la GFP. Dans la figure du haut, une population de 30 000 cellules est représentée. Dans la figure du bas, seules les cellules vivantes sont présentées. Les cellules 32D présentées dans cette figure ont subi une électroporation avec le vecteur p514 PU.1 TAP, avec les paramètres décrits dans la section Matériel et méthodes.

b) Les taux de survie sont identiques pour les cellules incorporant les plasmides codant pour PU.1 TAP et les vecteurs vides.

Analyse en cytométrie de flux, permettant de comparer le taux de survie des cellules ayant reçu le matériel génétique permettant d'exprimer la protéine PU.1-TAP aux cellules n'exprimant que le rapporteur GFP. Les cellules 32D ont été électroporées soit avec le vecteur MSCV-pgk-GFP ou avec le vecteur p 514 PU.1 TAP. Les courbes en rouges représentent les échantillons électroporés avec les plasmides d'intérêt. En vert sont représentées les cellules 32D qui ont subi une électroporation contenant des vecteurs vides. Les chiffres de couleurs rouges ou verts représentent le pourcentage de cellules GFP positives.

c) La protéine PU.1 TAP est détectée dans les cellules 32D qui ont été électroporées.

Buvardage western permettant de détecter l'expression de la protéine PU.1 TAP dans les cellules 32 D. Les extraits totaux de protéine (2 µg par puits) proviennent des cellules triées à la figure 6a et 6b. Les cellules qui ont été isolées sont celles qui exprimaient la protéine GFP. Un anticorps dirigé contre la protéine TAP a été employé pour l'immunodétection. Les lettres W-T représentent des extraits de protéines produites à partir de cellules 32D de type sauvage. Trois conditions ont été utilisées pour l'électroporation : l'insertion du vecteur MSCV GFP identifié « GFP », l'insertion du vecteur MSCV GFP PU.1 TAP identifié « MSCV PU.1-TAP », l'insertion des vecteurs p514 PU.1 TAP et MSCV GFP identifiés « p514 PU.1-TAP ». Les extraits de protéine, servant de contrôles positifs pour l'expression de la protéine PU.1-TAP, proviennent de la même source que ceux présentés à la figure 3a.

Figure 7 : Schéma synthèse des étapes qui ont permis la production de cellules 32D exprimant la protéine PU.1-TAP constitutivement.

Ce diagramme résume les différentes étapes qui ont dû être franchies pour permettre de valider le modèle des cellules 32D exprimant constitutivement la protéine PU.1 TAP.

Figure 8 : Méthode de purification TAP

a) Structure de l'étiquette TAP

L'étiquette de purification TAP lie la protéine PU.1 à son extrémité C-terminale. La protéine TAP est composée de trois domaines : de la protéine A permettant une liaison

avec des IgG, du site de reconnaissance de la protéase TEV ainsi que d'une région qui a une affinité avec la calmoduline.

b) Étape de double purification par affinité (TAP)

Voici les principales étapes de double purification par affinité « Tandem Affinity Purification ». La première étape représente une liaison aux billes IgG, qui est rompue par une coupure de l'étiquette TAP au site de reconnaissance de la protéase TEV. La deuxième étape consiste en une liaison avec le fragment restant de l'étiquette TAP. Cette liaison est défait par l'élution de chélateur d'ion de calcium, tel que l'EGTA, dans la colonne de purification. L'identification des protéines composant le complexe liant PU.1 est effectuée par la méthode de spectrométrie de masse.

Figures des résultats

Figure 1

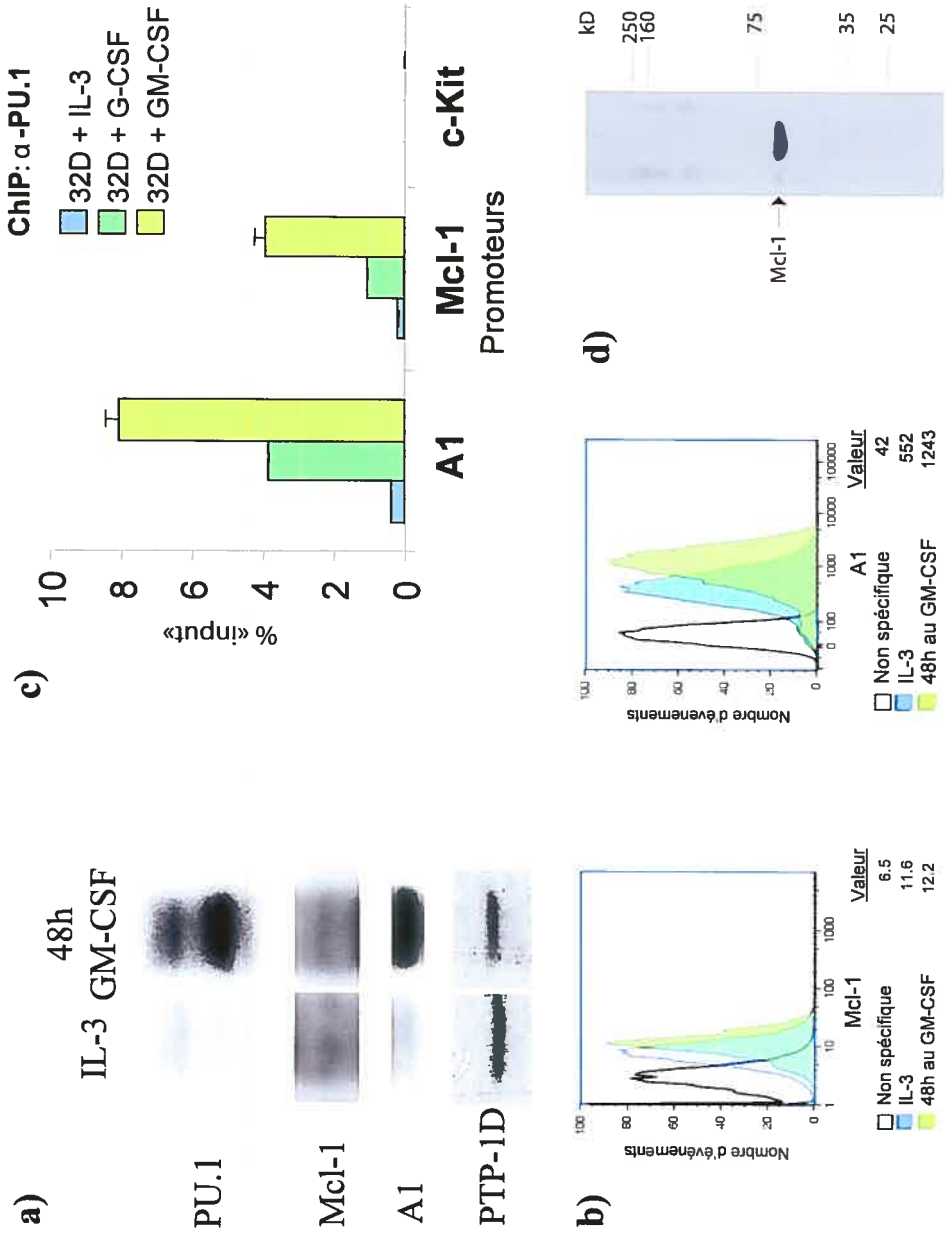
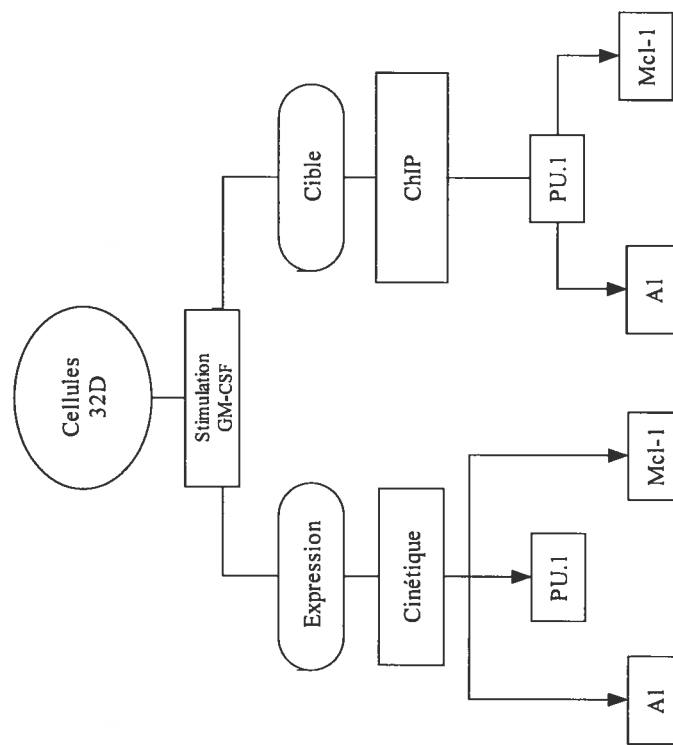
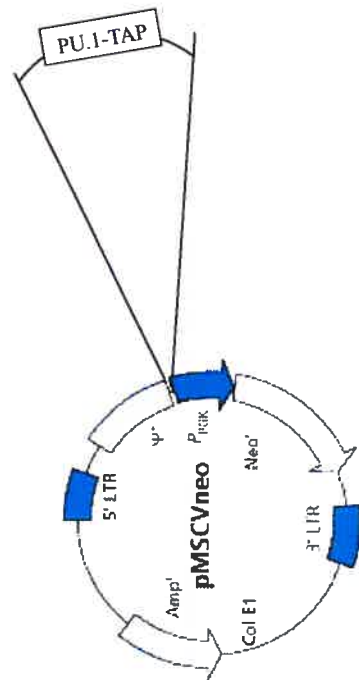


Figure 2

a)



b)



c)

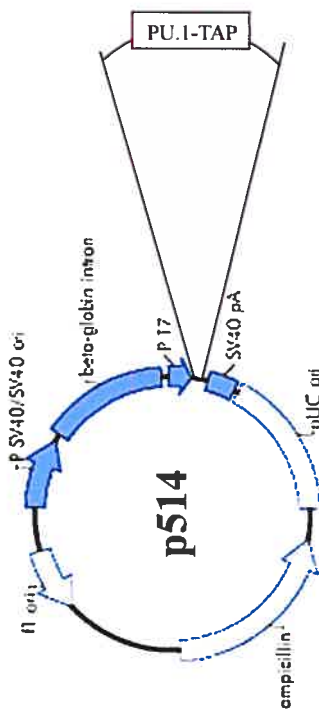


Figure 3

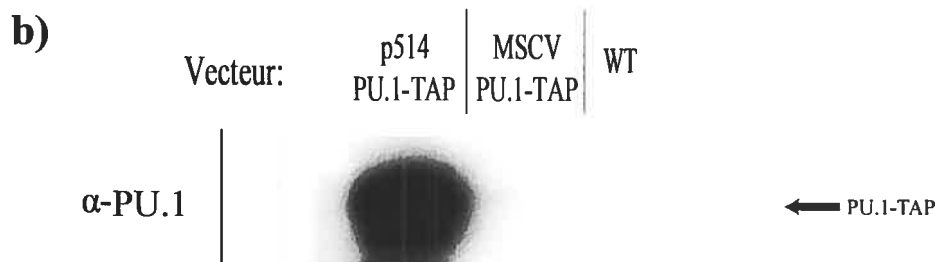
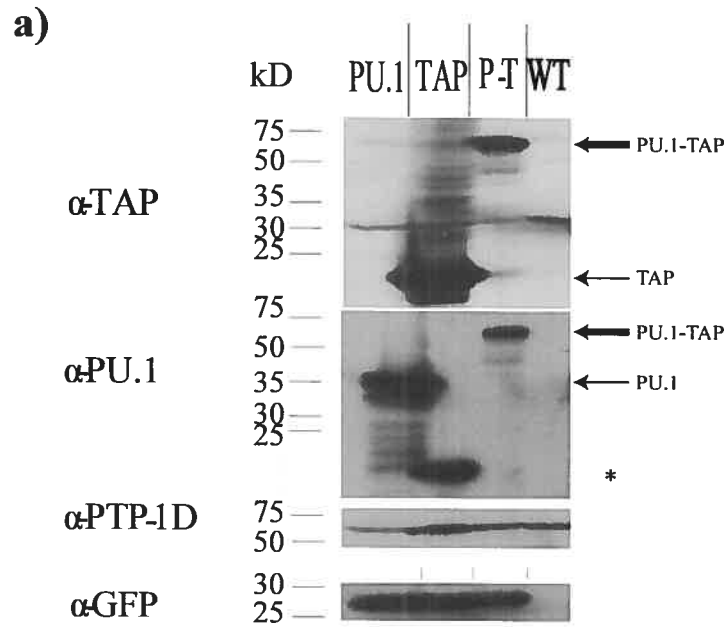


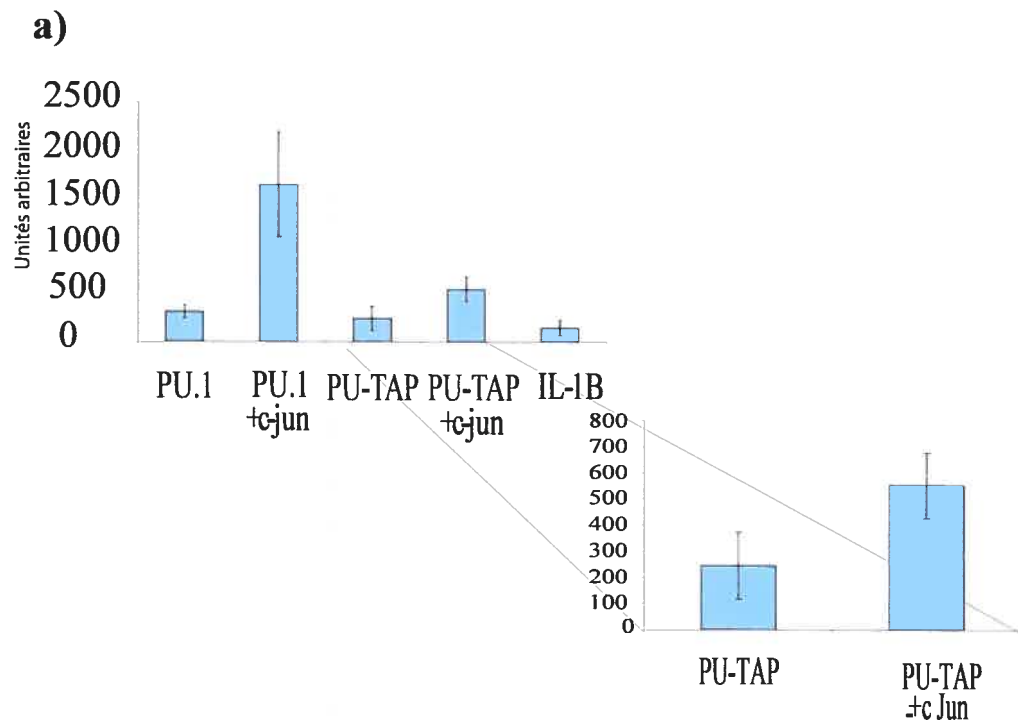
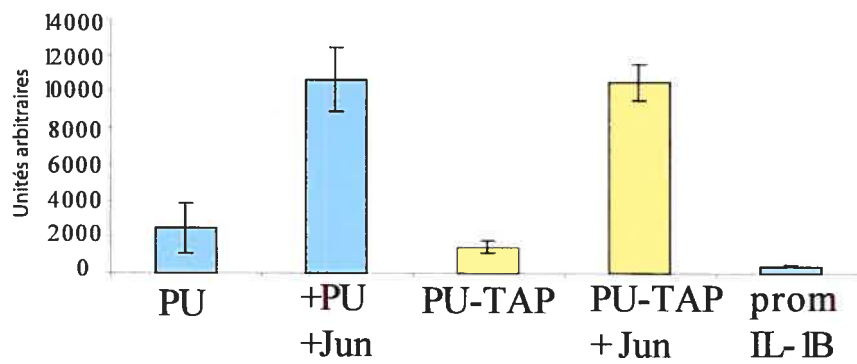
Figure 4**b)**

Figure 6

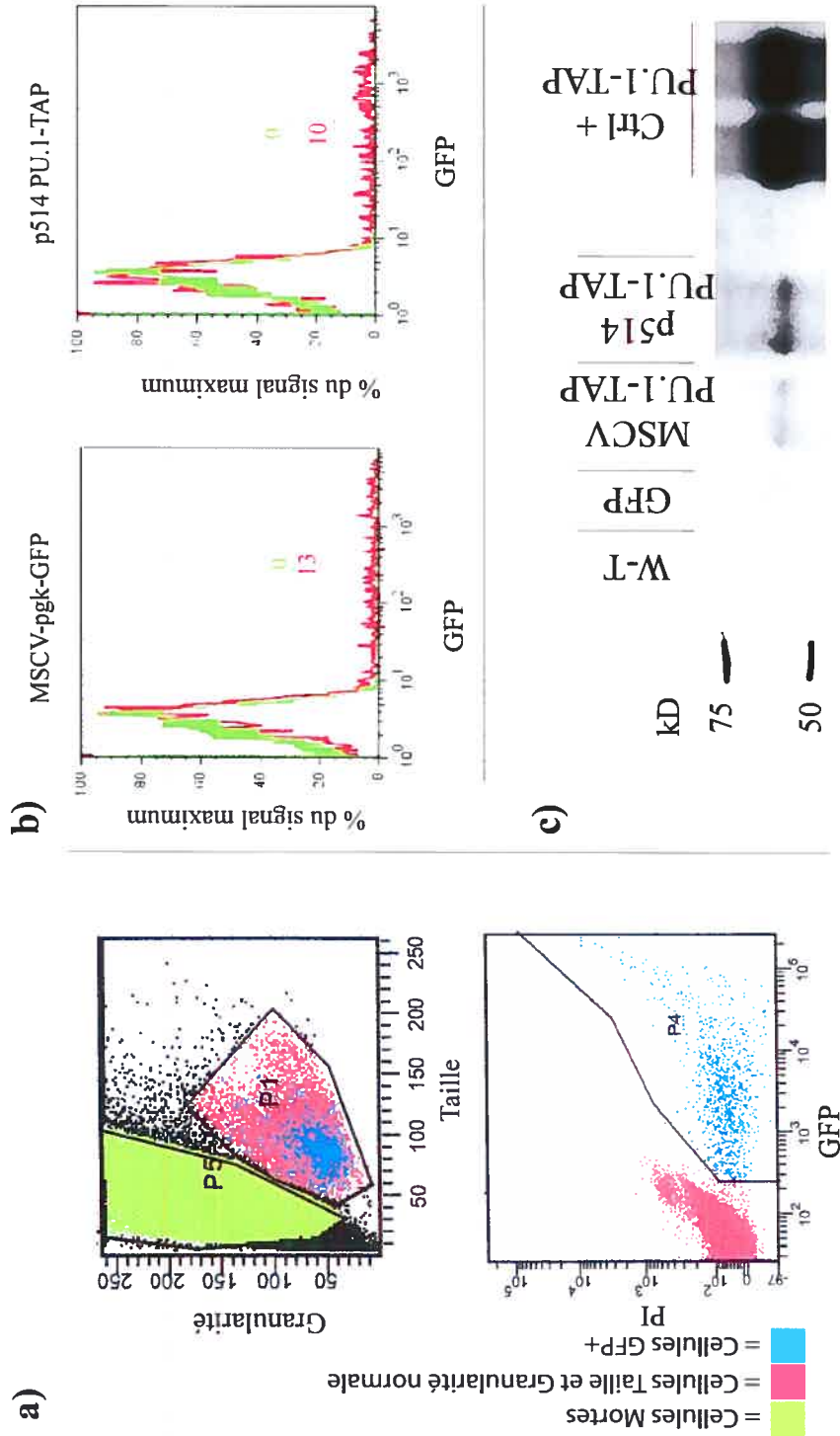


Figure 7

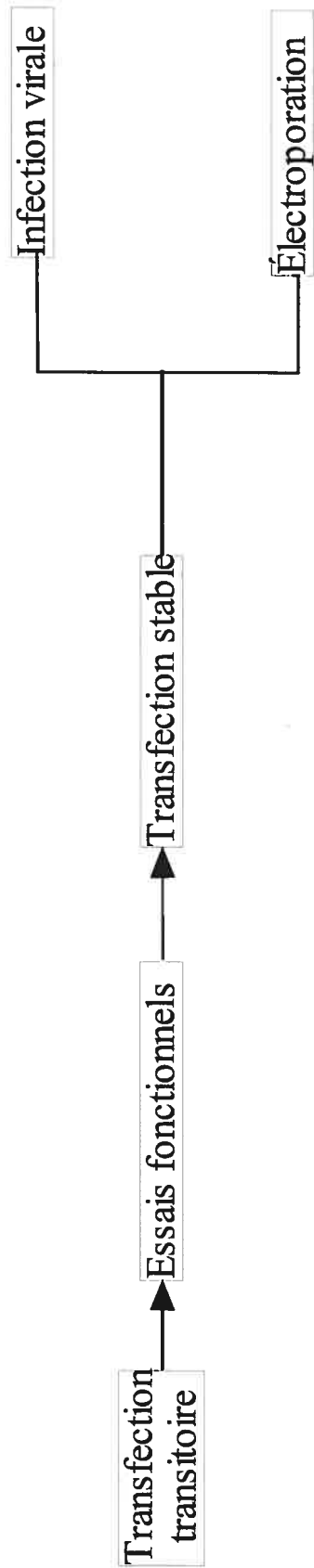
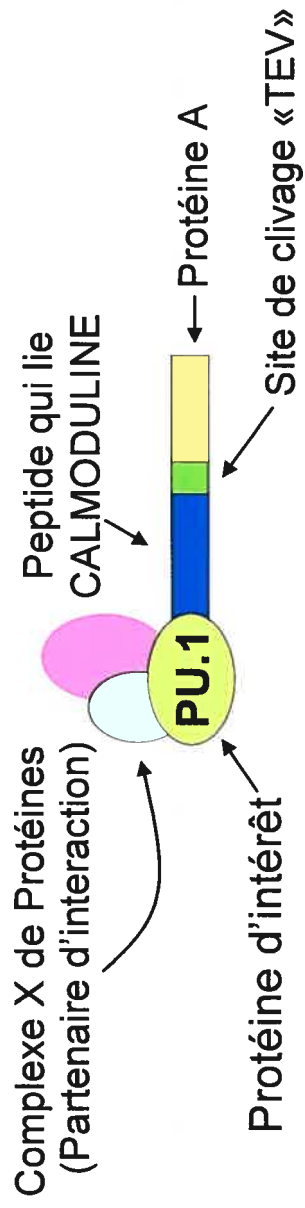
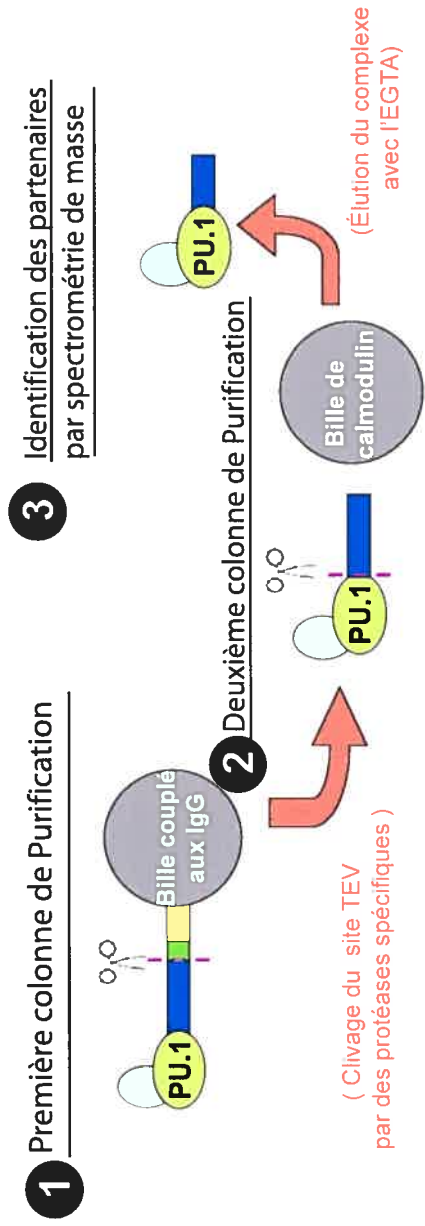


Figure 8

a)



b)



Discussion

Chapitre 8

« Première partie de mon projet : GM-CSF, PU.1, Bcl-2A1 et Mcl-1 »

La première partie de mon projet a permis de relier deux concepts fondamentaux en hématologie : le processus de différenciation cellulaire ainsi que le mécanisme de régulation de l'apoptose. Avant que ces recherches aient été amorcées, ces deux mécanismes étaient vus comme des entités distinctes dont la régulation était indépendante. Grâce aux données que j'ai apportées par des approches bien ciblées, on est maintenant en mesure de constater que ces deux types d'événement sont en fait reliés. Voici le schéma fonctionnel qui ressort de ces expériences. Lorsqu'un précurseur myéloïde entre en contact avec un agent permettant la différenciation, tel que le G-CSF ou le GM-CSF, une cascade signalétique s'active dans la cellule. Le niveau d'expression du facteur de transcription PU.1 s'accroît alors progressivement dans les 48 premières heures. Celui-ci va activer les promoteurs de gènes cibles pour permettre la différenciation myéloïde. De plus, ce dernier empêchera la cellule d'entrer en apoptose, en favorisant l'expression de certaines protéines anti-apoptotiques telles que A1 et Mcl-1. En effet, le système hématopoïétique maintient son homéostasie par l'intermédiaire de différents signaux incluant les facteurs de croissance et les cytokines. En absence de ces signaux, les cellules contenues dans le sang entrent en apoptose. Par conséquent, pour que les cellules sanguines soient maintenues en vie, des mécanismes contre la mort cellulaire doivent nécessairement être activés. Dans le cas présent, le facteur de

transcription PU.1, activé par le récepteur GM-CSF, communique à la cellule l'ordre d'engager son processus de différenciation et d'inhiber l'entrée en apoptose.

Ce type de relations a également été décrit pour la cytokine IL-3. Le groupe de Hsin-Fang Yang-Yen et coll. a démontré en 2003 une relation existante entre une stimulation du récepteur de l'IL-3 et l'activation du promoteur de Mcl-1 par le facteur de transcription PU.1 {Wang, 2003}. Enfin, des travaux provenant de notre groupe recherche ont aussi remarqué des relations qui existaient entre d'autres éléments importants pour la différenciation et la survie des cellules hématopoïétiques. C'est le cas des travaux de Martin R. et coll. sur le facteur de croissance VEGF ainsi que le facteur de transcription SCL {Martin, 2004}. C'est donc plusieurs évidences retrouvées dans différents contextes qui soutiennent l'idée que la différenciation cellulaire et l'inhibition de l'apoptose sont en relation étroite.

Ces nouveaux éléments de compréhension de l'hématopoïèse ont un impact des plus importants. Dans les leucémies, trois éléments majeurs confèrent à cette maladie son potentiel si néfaste pour l'organisme. Premièrement, les cellules adaptent un rythme de prolifération anarchique. Deuxièmement, les progéniteurs n'arrivent plus à se différencier. Troisièmement, les cellules cancéreuses déjouent les mécanismes d'apoptose normalement responsables de l'élimination des cellules dysfonctionnelles dans l'organisme. L'apport de mes travaux permet de placer en relation deux des trois éléments énumérés ci-dessus; la différenciation et l'apoptose. Ces données permettent en partie d'expliquer pourquoi les essais cliniques utilisant le GM-CSF pendant la chimiothérapie n'ont pas été concluants {Rowe, 2004}. L'utilisation du GM-CSF avait pour but de promouvoir la différenciation des cellules cancéreuses pour les rendre plus vulnérables aux autres traitements anticancéreux utilisés en combinaison avec cette cytokine. Les travaux que j'ai effectués permettent d'expliquer en partie pourquoi ce traitement n'a pas

été aussi efficace que prévu. En effet, le GM-CSF promeut la différenciation cellulaire par le facteur de transcription PU.1. Toutefois, lorsque l'expression de PU.1 est augmentée par une signalisation provenant du GM-CSF, celui-ci va se fixer aux promoteurs d'agents « anti-apoptotiques » tels que A1 et Mcl-1 et favorise la survie de la cellule. Dans cet exemple, c'est la promotion de la survie des cellules leucémiques que le GM-CSF favorise. Les résultats obtenus par les études cliniques récentes n'ont donc rien de surprenant (voir *Revue de la littérature; GM-CSF--&-- Traitements potentiels*). Le GM-CSF devrait, par conséquent, être administré préférentiellement pendant la période de rémission. Par contre, il pourrait être intéressant de développer un inhibiteur propre à la protéine A1, qui pourrait être utilisé en combinaison avec le GM-CSF lors de la chimiothérapie. En effet, les études de délétion de gènes, chez la souris, ont démontré que l'absence de A1, contrairement à Mcl-1, n'était pas létale {Rinkenberger, 2000}. En fait, l'absence A1-a (l'équivalent de A1 chez l'homme) présente comme principal phénotype, l'accélération de l'apoptose dans les cellules de neutrophiles {Hamasaki, 1998}. Ainsi, le GM-CSF permettrait de forcer les cellules cancéreuses à se différencier et l'inhibition de A1 entraînerait les cellules leucémiques myéloïdes à entrer en apoptose. De plus, mes travaux de maîtrise indiquent que le GM-CSF promeut la survie des cellules par l'activation de A1 par la protéine PU.1. L'utilisation du GM-CSF en combinaison avec un inhibiteur de la protéine A1 semble donc être une voie intéressante pour la mise au point d'un traitement pour les personnes atteintes de leucémie myéloïde.

Chapitre 9

« Deuxième partie de mon projet : PU.1-TAP, 32D, GM-CSF »

La seconde partie de mes recherches avait pour objectif d'identifier les partenaires d'interaction de la protéine PU.1 lors du processus de myélopoïèse. Afin d'atteindre ce but, j'ai décidé de mettre au point un système de purification des complexes protéiniques contenant PU.1 dans une lignée cellulaire (32D) servant de modèle pour la myélopoïèse. Lors du déroulement de mes expériences, il m'a fallu utiliser deux méthodes, l'infection virale et l'électroporation, pour exprimer la protéine PU.1 TAP à l'intérieur des cellules 32D. Il semble que certains mécanismes complexes empêchent l'expression, à long terme, de cette protéine chimérique à l'intérieur de ses cellules. Dans la littérature, PU.1 est connu pour être finement régulé aux différentes étapes de l'hématopoïèse {DeKoter, 2000;Hoang, 2004;Dahl, 2003}. Malgré tout, ces mécanismes de contrôle de PU.1 sont encore méconnus. Lors de l'infection virale que j'ai produite dans les cellules 32D, j'ai constaté que l'ARN messager est exprimé dans les cellules infectées présélectionnées pendant deux semaines avec la néomycine. Voici la première hypothèse que j'ai émise : que l'absence de la détection de la protéine pouvait être due à une rapide dégradation de celle-ci par le protéasome. Étant donné que la taille de l'étiquette TAP représente pratiquement le tiers de la taille totale de la protéine de fusion PU.1 TAP, un mauvais repliement de cette dernière aurait pu entraîner sa dégradation. Ce n'est pas le cas, puisqu'une inhibition de protéasomes par le MG 132 ne permet pas de faire apparaître de signal représentatif de la présence de la protéine PU.1 TAP. Une deuxième idée que j'ai eue a été d'émettre l'hypothèse que l'addition de l'expression de PU.1 TAP avec la forme

endogène de PU.1 pouvait nuire au maintien des précurseurs myéloïdes. Il est très bien connu, tel que présenté dans la section *Introduction*, que la concentration intracellulaire de PU.1 a un rôle déterminant sur le devenir de la cellule {Dahl, 2003;DeKoter, 2000}. Par exemple, au moment où un précurseur myéloïde a la possibilité de se différencier en granulocytes ou en macrophages, une plus forte augmentation de PU.1 favorise la production de macrophage (et vice versa). J'ai donc pensé que l'addition de l'expression de PU.1 TAP à l'intérieur de certaines cellules pouvait avoir des effets majeurs. Ma première idée a été qu'un trop haut niveau de « PU.1/PU.1 TAP » puisse déclencher des mécanismes inhibiteurs pour la transcription de ce gène. Une seconde hypothèse était qu'une trop forte concentration de « PU.1/PU.1 TAP » soit toxique pour les cellules maintenues dans un état qui empêche la différenciation. Pourtant, une stimulation au G-CSF pendant 48 heures, permettant normalement d'augmenter significativement le niveau de PU.1 à l'intérieur des cellules, n'a pas plus permis d'enrayer les mécanismes empêchant la traduction de l'ARNm de PU.1 TAP. Aussi, il est intéressant de noter que l'insertion du même plasmide, par électroporation, m'a permis de détecter la présence de la protéine, mais a de faibles niveaux. Ceci me laisse donc croire que l'expression constitutive de la protéine PU.1 TAP est incompatible avec le maintien des précurseurs myéloïdes à un état non différencié, comme c'est le cas dans les cellules 32D. De plus, les informations recueillies par mes analyses indiquent que ces mécanismes d'inhibition auraient lieu au niveau de la traduction de l'ARNm en protéine. En effet, l'ARNm de PU.1-TAP a été détecté, de façon spécifique, dans la lignée infectée et sélectionnée avec la néomycine. Toutefois, aucune détection de la protéine n'a été observée, même après avoir procédé à l'inhibition de protéasomes avec le MG 132. Enfin, l'électroporation que j'ai effectuée

m'a démontré que la protéine PU.1-TAP pouvait être exprimée dans les cellules 32D, mais a des niveaux très faibles et seulement de façon transitoire. Dans ce cas, il n'est pas possible d'effectuer une purification TAP avec une quantité de protéine aussi petite.

Les données de la littérature ont déjà présenté un papier dans lequel l'expression de PU.1 a été induite dans les cellules 32D {Bellon, 1997}. Ceux-ci ont utilisé une infection des cellules 32D en utilisant des virus produits à partir des cellules GP+E86 électroporées avec le plasmide LXSU-PU.1. Selon cet article, la protéine PU.1 ne serait pas toxique, mais accélérerait la différenciation cellulaire lorsque les cellules sont mises en présence de G-CSF. Finalement, la protéine TAP elle-même n'est pas toxique pour les cellules 32D (voir figure 5a) et la protéine PU.1 peut être induite constitutivement dans les cellules 32D, selon les informations de la littérature mentionnée précédemment. Par contre, la protéine PU.1 TAP peut être exprimée transitoirement dans les cellules 32D (voir figure 6), mais son expression à long terme ne semble pas possible (voir figure 5 b,c,d).

J'émet donc l'hypothèse suivante : si on insère la séquence qui code pour le gène de PU.1-TAP à l'intérieur de précurseurs myéloïdes et que l'on inhibe son expression par l'emploi d'un système inductible, il sera possible d'obtenir, au moment voulu, une très grande concentration de la protéine, comme le démontre l'expression transitoire de la figure 6.

De nombreux systèmes inductibles sont en ce moment disponibles, présentant chacun leurs avantages. Parmi ceux-ci, le système d'induction aux stéroïdes présente des atouts

intéressants pour ce projet de recherche. Celui-ci, offert par la compagnie Stratagène, permet un contrôle serré de l'induction d'un gène d'intérêt par l'intermédiaire d'un stéroïde (ponasterone A) provenant de la drosophile. Ceci a comme avantage de réduire grandement l'interférence du système de vecteurs inductibles avec celui des cellules de mammifères. Voici les principes généraux expliquant son fonctionnement. Les cellules de mammifères (dans ce cas, les 32D) doivent incorporer deux plasmides : le pERV3 et le pEGSH. Le premier est responsable d'exprimer constitutivement les récepteurs nucléaires, VgEcR et RXR. Ceux-ci forment un hétérodimère qui, associé à des co-répresseurs, empêche l'expression du gène cible inséré dans le plasmide pEGSH. Les plasmides contiennent chacun de marqueur de sélection, soit la néomycine et l'hygromycine. Ce système est approprié pour permettre une expression transitoire de protéine toxique pour la cellule, comme l'est probablement PU.1 TAP, à long terme dans les 32D.

Il sera alors possible d'induire une différenciation cellulaire à l'aide du GM-CSF et d'identifier, à différents temps de stimulation, les complexes qui seront formés à partir de PU.1. Ceci permettra d'une part, de mieux comprendre de quelle façon le facteur de transcription PU.1 est régulé au niveau de ses interactions « protéine/protéine ». D'autre part, cette expérience permettra de mieux concevoir le processus de myélopoïèse. Il sera ainsi possible de mieux comprendre les dérèglements qui interviennent dans les cellules leucémiques.

Chapitre 10

« Perspectives relatives aux recherches que j'ai effectuées »

Rôle de la concentration de PU.1 dans la composition des complexes transcriptionnels formés

Un des champs de recherche qu'il serait intéressant d'explorer porte sur l'influence qu'a la concentration de PU.1 à l'intérieur de la cellule sur les complexes transcriptionnels formés pendant le processus de myélopoïèse. Pour ce faire, il serait intéressant d'employer la lignée cellulaire « 503 », qui est dérivée de souris déficientes pour l'expression de PU.1 (voir section *Revue de la littérature; rôle de PU.1 pendant la différenciation*). Il a déjà été démontré qu'une réintroduction, de la forme endogène de PU.1 à l'intérieur de cette lignée, permettait aux cellules de retrouver leur capacité à se différencier en présence de cytokines telles que le GM-CSF. Le projet que je décris consisterait à réintroduire la forme étiquetée PU.1 TAP à l'intérieur des cellules, sous le contrôle d'un promoteur inductible (voir *chapitre 9*). Il serait alors possible de faire varier la concentration ainsi que le moment d'expression de PU.1 dans des conditions fixes, suite à l'induction de la différenciation myéloïde. Ceci permettrait de savoir par quel mécanisme la concentration de PU.1 influence le processus de différenciation cellulaire. De plus, en utilisant ce modèle cellulaire, tout titre des partenaires d'interaction par la forme endogène de PU.1 serait éliminé. Ceci représenterait donc un projet intéressant à développer.

Rôle de translocation impliquée dans les AML sur la fonction de PU.1

Une autre idée de projets, qui serait intéressante d'entreprendre, consisterait à déterminer quels sont les effets de translocations qui sont fréquemment retrouvées dans les leucémies, sur les fonctions de PU.1. Certaines publications parues dans les dernières années indiquent que des translocations particulières telles que AML1/ETO et FLT3-ITD peuvent influencer la fonction normale de PU.1 {Mizuki, 2000;Vangala, 2003}. Par exemple, on pourrait induire à la fois, dans des précurseurs myéloïdes d'origine murine, l'expression de PU.1 TAP et de FLT3-ITD. Il serait alors possible de voir les changements, dans les complexes formés par PU.1, en présence d'autres protéines connues pour être impliquées dans le développement de leucémies de type myéloïdes.

Détermination de la voie signalétique reliant le GM-CSF à PU.1

Il y a, finalement, un troisième axe de recherche qui pourrait être intéressant à examiner. Différents éléments responsables de la régulation du facteur de transcription PU.1 ont déjà été établis (voir la section *Revue de la littérature ; régulation transcriptionnelle de PU.1*) {Li, 2001;Vangala, 2003}. De même, on connaît les différentes voies de signalisation empruntée par le récepteur du GM-CSF activé (voir la section *Revue de la littérature ; GM-CSF-chaîne β*). Par contre, on ne sait pas laquelle de ces voies de signalisation est responsable de réguler PU.1. Il serait aussi pertinent de savoir quel élément régulateur du promoteur de PU.1 est contrôlé par l'activation du récepteur au GM-CSF. Pour ce faire, on pourrait inhiber individuellement certaines voies de signalisation et regarder laquelle est responsable de la transduction du signal entre le récepteur du GM-CSF activé et l'expression du facteur de transcription PU.1. Une autre

possibilité serait d'utiliser des ARNi pour certains facteurs de transcription responsable de la régulation de PU.1. On pourrait ainsi voir lequel est contrôlé par l'activation du récepteur du GM-CSF.

Caractérisation de la spécificité des membres de la famille Bcl-2 pour différents tissus

Finalement, mes travaux de maîtrise ont permis de mettre en relation le processus de différenciation cellulaire ainsi que celui de régulation de l'apoptose. Ces deux processus sont importants pour la progression des cancers. C'est d'ailleurs pour cette raison que différents groupes tentent de cibler ces deux mécanismes. Comme je l'ai mentionné précédemment, des essais cliniques ont tenté d'utiliser des cytokines telles que le GM-CSF et le G-CSF pour forcer la différenciation des cellules leucémiques {Rowe, 2004; Schiffer, 2003}. D'un autre côté, on retrouve des essais cliniques dont les molécules actives tentent d'inhiber les membres de la famille Bcl-2 (voir section *Revue de la littérature ; traitement potentiel*). Ces deux voies de recherche sont intéressantes et méritent bien toute l'attention qui leur est portée.

De plus, les recherches présentées dans ce mémoire ont apporté un nouvel élément important à notre compréhension de ces processus. Il existe une relation directe entre les facteurs de transcription qui gouvernent la différenciation des progéniteurs vers une lignée cellulaire spécifique et les éléments responsables de la survie/mort cellulaire programmée. Ceci indique donc que certains facteurs « pro ou anti » apoptotiques ont un rôle plus important à jouer, de façon précise, dans certaines lignées cellulaires. On peut donc en déduire qu'en ciblant une protéine spécifique de la famille Bcl-2 dans une région bien déterminée, il serait possible d'induire la mort cellulaire programmée de façon ciblée pour un tissu donné (voir chapitre 8). Des recherches, telles que celles que j'ai effectuées,

sont importantes pour établir la relation qui existe entre les agents « pro ou anti » apoptotiques et les tissus dans lesquels ils sont exprimés.

Conclusion

En somme, les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis d'établir un lien entre les mécanismes qui gouvernent la différenciation et ceux qui font la promotion de la survie des cellules de la lignée myéloïde. La mise au point de la protéine de fusion PU.1-TAP procure un excellent modèle pour étudier les mécanismes qui contrôlent la myélopoïèse. De plus, de nombreuses évidences indiquent que ce facteur de transcription serait impliqué dans l'apparition de leucémies. Une meilleure compréhension, du rôle exact de PU.1 dans l'apparition et le développement de leucémies, pourrait, par les approches que j'ai développées, ouvrir la voie à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Références Bibliographiques

1. Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, strand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y, and Jacobsen SE (2001) Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*, **15**, 659-669.
2. Ahuja HG, Foti A, Bar-Eli M, and Cline MJ (1990) The pattern of mutational involvement of RAS genes in human hematologic malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing. *Blood*, **75**, 1684-1690.
3. Aittomaki S, Pesu M, Groner B, Janne OA, Palvimo JJ, and Silvennoinen O (2000) Cooperation among Stat1, glucocorticoid receptor, and PU.1 in transcriptional activation of the high-affinity Fc gamma receptor I in monocytes. *J Immunol*, **164**, 5689-5697.
4. Akagawa E, Muto A, Arai K, and Watanabe S (2003) Analysis of the 5' promoters for human IL-3 and GM-CSF receptor alpha genes. *Biochem Biophys Res Commun*, **300**, 600-608.
5. Alexander WS, Starr R, Metcalf D, Nicholson SE, Farley A, Elefanty AG, Brysha M, Kile BT, Richardson R, Baca M, Zhang JG, Willson TA, Viney EM, Sprigg NS, Rakar S, Corbin J, Mifsud S, DiRago L, Cary D, Nicola NA, and Hilton DJ (1999) Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol*, **66**, 588-592.
6. Anderson KL, Smith KA, Perkin H, Hermanson G, Anderson CG, Jolly DJ, Maki RA, and Torbett BE (1999) PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood*, **94**, 2310-2318.
7. Antonchuk J, Sauvageau G, and Humphries RK (2002) HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*, **109**, 39-45.
8. Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, and Matthews W (1997) A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood*, **89**, 3624-3635.
9. Bae J, Leo CP, Hsu SY, and Hsueh AJ (2000) MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem*, **275**, 25255-25261.
10. Baldwin GC, Benveniste EN, Chung GY, Gasson JC, and Golde DW (1993) Identification and characterization of a high-affinity granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor on primary rat oligodendrocytes. *Blood*, **82**, 3279-3282.

11. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Erpelinck C, Meijer J, van OS, van Putten WL, Valk PJ, Berna BH, Tenen DG, Lowenberg B, and Delwel R (2003) Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J*, **4**, 31-40.
12. Bartocci A, Mastrogiannis DS, Migliorati G, Stockert RJ, Wolkoff AW, and Stanley ER (1987) Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6179-6183.
13. Bauduer F, Ducout L, Dastugue N, Capdupuy C, and Renoux M (1999) De novo and secondary acute myeloid leukemia in patients over the age of 65: a review of fifty-six successive and unselected cases from a general hospital. *Leuk Lymphoma*, **35**, 289-296.
14. Beghini A, Peterlongo P, Ripamonti CB, Larizza L, Cairoli R, Morra E, and Mecucci C (2000) C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood*, **95**, 726-727.
15. Behre G, Whitmarsh AJ, Coghlan MP, Hoang T, Carpenter CL, Zhang DE, Davis RJ, and Tenen DG (1999) c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J Biol Chem*, **274**, 4939-4946.
16. Bellon T, Perrotti D, and Calabretta B (1997) Granulocytic differentiation of normal hematopoietic precursor cells induced by transcription factor PU.1 correlates with negative regulation of the c-myb promoter. *Blood*, **90**, 1828-1839.
17. Bigas A, Martin DI, and Milner LA (1998) Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol*, **18**, 2324-2333.
18. Bingle CD, Craig RW, Swales BM, Singleton V, Zhou P, and Whyte MK (2000) Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem*, **275**, 22136-22146.
19. Birg F, Courcoul M, Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S, Tabilio A, Mannoni P, and Birnbaum D (1992) Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood*, **80**, 2584-2593.
20. Boissel N, Cayuela JM, Preudhomme C, Thomas X, Grardel N, Fund X, Tigaud I, Raffoux E, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Castaigne S, Fenaux P, and Dombret H (2002) Prognostic significance of FLT3 internal tandem repeat in patients with de novo acute myeloid leukemia treated with reinforced courses of chemotherapy. *Leukemia*, **16**, 1699-1704.
21. Bone H, Dechert U, Jirik F, Schrader JW, and Welham MJ (1997) SHP1 and SHP2 protein-tyrosine phosphatases associate with betac after interleukin-3-induced receptor tyrosine phosphorylation. Identification of potential binding sites and substrates. *J Biol Chem*, **272**, 14470-14476.

22. Bonfield TL, Raychaudhuri B, Malur A, Abraham S, Trapnell BC, Kavuru MS, and Thomassen MJ (2003) PU.1 regulation of human alveolar macrophage differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **285**, L1132-L1136.
23. bu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, Vandenberghe EA, Winship PR, and Reilly JT (2000) FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol*, **111**, 190-195.
24. bu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, and Reilly JT (2001) Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, **113**, 983-988.
25. Budel LM, Elbaz O, Hoogerbrugge H, Delwel R, Mahmoud LA, Lowenberg B, and Touw IP (1990) Common binding structure for granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on human acute myeloid leukemia cells and monocytes. *Blood*, **75**, 1439-1445.
26. Buras JA, Reenstra WR, and Fenton MJ (1995) NF beta A, a factor required for maximal interleukin-1 beta gene expression is identical to the ets family member PU.1. Evidence for structural alteration following LPS activation. *Mol Immunol*, **32**, 541-554.
27. Burgess AW and Metcalf D (1977) Serum half-life and organ distribution of radiolabeled colony stimulating factor in mice. *Exp Hematol*, **5**, 456-464.
28. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, and Bloomfield CD (2002) Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, **100**, 4325-4336.
29. Byrd JC, Ruppert AS, Mrozek K, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Stamberg J, Koduru PR, Moore JO, Mayer RJ, Davey FR, Larson RA, and Bloomfield CD (2004) Repetitive cycles of high-dose cytarabine benefit patients with acute myeloid leukemia and inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22): results from CALGB 8461. *J Clin Oncol*, **22**, 1087-1094.
30. Cantor AB and Orkin SH (2001) Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 513-519.
31. Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, Witte L, Borowitz MJ, Civin CI, and Small D (1996) Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*, **87**, 1089-1096.

32. Cebon J, Nicola N, Ward M, Gardner I, Dempsey P, Layton J, Duhrsen U, Burgess AW, Nice E, and Morstyn G (1990) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity. *J Biol Chem*, **265**, 4483-4491.
33. Celada A, Borrás FE, Soler C, Lloberas J, Klemsz M, Van BC, McKercher S, and Maki RA (1996) The transcription factor PU.1 is involved in macrophage proliferation. *J Exp Med*, **184**, 61-69.
34. Chao JR, Wang JM, Lee SF, Peng HW, Lin YH, Chou CH, Li JC, Huang HM, Chou CK, Kuo ML, Yen JJ, and Yang-Yen HF (1998) mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol Cell Biol*, **18**, 4883-4898.
35. Chen H, Ray-Gallet D, Zhang P, Hetherington CJ, Gonzalez DA, Zhang DE, Moreau-Gachelin F, and Tenen DG (1995) PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene*, **11**, 1549-1560.
36. Chen H, Zhang P, Radomska HS, Hetherington CJ, Zhang DE, and Tenen DG (1996) Octamer binding factors and their coactivator can activate the murine PU.1 (spi-1) promoter. *J Biol Chem*, **271**, 15743-15752.
37. Chen HM, Zhang P, Voso MT, Hohaus S, Gonzalez DA, Glass CK, Zhang DE, and Tenen DG (1995) Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood*, **85**, 2918-2928.
38. Chiba S, Shibuya K, Piao YF, Tojo A, Sasaki N, Matsuki S, Miyagawa K, Miyazono K, and Takaku F (1990) Identification and cellular distribution of distinct proteins forming human GM-CSF receptor. *Cell Regul*, **1**, 327-335.
39. Choi SS, Park IC, Yun JW, Sung YC, Hong SI, and Shin HS (1995) A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene*, **11**, 1693-1698.
40. Christensen JL and Weissman IL (2001) Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14541-14546.
41. Clohessy JG, Zhuang J, and Brady HJ (2004) Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *Br J Haematol*, **125**, 655-665.
42. Colby-Graham MF and Chordas C (2003) The childhood leukemias. *J Pediatr Nurs*, **18**, 87-95.
43. Cortes J, Thomas D, Koller C, Giles F, Estey E, Faderl S, Garcia-Manero G, McConkey D, Ruiz SL, Guerciolini R, Wright J, and Kantarjian H (2004) Phase I

- study of bortezomib in refractory or relapsed acute leukemias. *Clin Cancer Res*, **10**, 3371-3376.
44. Craig RW (2002) MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia*, **16**, 444-454.
 45. Cross MA, Heyworth CM, Murrell AM, Bockamp EO, Dexter TM, and Green AR (1994) Expression of lineage restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line. *Oncogene*, **9**, 3013-3016.
 46. Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, and White E (2003) DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev*, **17**, 2922-2932.
 47. Dahl R, Walsh JC, Lancki D, Laslo P, Iyer SR, Singh H, and Simon MC (2003) Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol*, **4**, 1029-1036.
 48. de Groot RP, Coffey PJ, and Koenderman L (1998) Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal*, **10**, 619-628.
 49. Dedhar S, Gaboury L, Galloway P, and Eaves C (1988) Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor active on a variety of cell types of nonhemopoietic origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9253-9257.
 50. DeKoter RP and Singh H (2000) Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*, **288**, 1439-1441.
 51. DeLamarter JF, Mermod JJ, Liang CM, Eliason JF, and Thatcher DR (1985) Recombinant murine GM-CSF from *E. coli* has biological activity and is neutralized by a specific antiserum. *EMBO J*, **4**, 2575-2581.
 52. Delgado MD, Hallier M, Meneceur P, Tavitian A, and Moreau-Gachelin F (1994) Inhibition of Friend cells proliferation by spi-1 antisense oligodeoxynucleotides. *Oncogene*, **9**, 1723-1727.
 53. Derenne S, Monia B, Dean NM, Taylor JK, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, and Amiot M (2002) Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*, **100**, 194-199.
 54. Ding DX, Vera JC, Heaney ML, and Golde DW (1995) N-glycosylation of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit is essential for ligand binding and signal transduction. *J Biol Chem*, **270**, 24580-24584.

55. DiPersio J, Billing P, Kaufman S, Eghtesady P, Williams RE, and Gasson JC (1988) Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *J Biol Chem*, **263**, 1834-1841.
56. Dirksen U, Nishinakamura R, Groneck P, Hattenhorst U, Noguee L, Murray R, and Burdach S (1997) Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta chain expression. *J Clin Invest*, **100**, 2211-2217.
57. Dohner K, Tobis K, Bischof T, Hein S, Schlenk RF, Frohling S, and Dohner H (2003) Mutation analysis of the transcription factor PU.1 in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia: a study of the AML Study Group Ulm (AMLSG ULM). *Blood*, **102**, 3850-3851.
58. Domina AM, Smith JH, and Craig RW (2000) Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition. *J Biol Chem*, **275**, 21688-21694.
59. Domina AM, Vrana JA, Gregory MA, Hann SR, and Craig RW (2004) MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene*, **23**, 5301-5315.
60. Donaldson LW, Petersen JM, Graves BJ, and McIntosh LP (1996) Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1: a winged helix-turn-helix DNA binding motif. *EMBO J*, **15**, 125-134.
61. Dong F, Brynes RK, Tidow N, Welte K, Lowenberg B, and Touw IP (1995) Mutations in the gene for the granulocyte colony-stimulating-factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *N Engl J Med*, **333**, 487-493.
62. Dong F, Dale DC, Bonilla MA, Freedman M, Fasth A, Neijens HJ, Palmblad J, Briars GL, Carlsson G, Veerman AJ, Welte K, Lowenberg B, and Touw IP (1997) Mutations in the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene in patients with severe congenital neutropenia. *Leukemia*, **11**, 120-125.
63. Drexler HG (1996) Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*, **10**, 588-599.
64. Eichbaum QG, Iyer R, Raveh DP, Mathieu C, and Ezekowitz RA (1994) Restriction of interferon gamma responsiveness and basal expression of the myeloid human Fc gamma R1b gene is mediated by a functional PU.1 site and a transcription initiator consensus. *J Exp Med*, **179**, 1985-1996.

65. Eklund EA, Jalava A, and Kakar R (1998) PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91(phox) expression. *J Biol Chem*, **273**, 13957-13965.
66. Ellis RE, Yuan JY, and Horvitz HR (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*, **7**, 663-698.
67. Elsasser A, Franzen M, Kohlmann A, Weisser M, Schnittger S, Schoch C, Reddy VA, Burel S, Zhang DE, Ueffing M, Tenen DG, Hiddemann W, and Behre G (2003) The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. *Oncogene*, **22**, 5646-5657.
68. Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, McCormick F, and Marshall CJ (1988) Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 1629-1633.
69. Favre CJ, Mancuso M, Maas K, McLean JW, Baluk P, and McDonald DM (2003) Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **285**, H1917-H1938.
70. Feinman R, Qiu WQ, Pearse RN, Nikolajczyk BS, Sen R, Sheffery M, and Ravetch JV (1994) PU.1 and an HLH family member contribute to the myeloid-specific transcription of the Fc gamma RIIIA promoter. *EMBO J*, **13**, 3852-3860.
71. Fenski R, Flesch K, Serve S, Mizuki M, Oelmann E, Kratz-Albers K, Kienast J, Leo R, Schwartz S, Berdel WE, and Serve H (2000) Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol*, **108**, 322-330.
72. Frank RC, Sun X, Berguido FJ, Jakubowiak A, and Nimer SD (1999) The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1. *Oncogene*, **18**, 1701-1710.
73. Freedman MH and Alter BP (2002) Risk of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in congenital neutropenias. *Semin Hematol*, **39**, 128-133.
74. Frohling S, Schlenk RF, Breittruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, and Dohner K (2002) Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*, **100**, 4372-4380.
75. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, and Dohner K (2004) CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*, **22**, 624-633.

76. Galson DL, Hensold JO, Bishop TR, Schalling M, D'Andrea AD, Jones C, Auron PE, and Housman DE (1993) Mouse beta-globin DNA-binding protein B1 is identical to a proto-oncogene, the transcription factor Spi-1/PU.1, and is restricted in expression to hematopoietic cells and the testis. *Mol Cell Biol*, **13**, 2929-2941.
77. Gari M, Goodeve A, Wilson G, Winship P, Langabeer S, Lynch D, Vandenberghe E, Peake I, and Reilly J (1999) c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, **105**, 894-900.
78. Gasson JC, Kaufman SE, Weisbart RH, Tomonaga M, and Golde DW (1986) High-affinity binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to normal and leukemic human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 669-673.
79. Gearing DP, King JA, Gough NM, and Nicola NA (1989) Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J*, **8**, 3667-3676.
80. Georgopoulos K (1997) Transcription factors required for lymphoid lineage commitment. *Curr Opin Immunol*, **9**, 222-227.
81. Giles F, Estey E, and O'Brien S (2003) Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer*, **98**, 2095-2104.
82. Glimcher LH and Singh H (1999) Transcription factors in lymphocyte development--T and B cells get together. *Cell*, **96**, 13-23.
83. Goebel MK (1990) The PU.1 transcription factor is the product of the putative oncogene Spi-1. *Cell*, **61**, 1165-1166.
84. Gombart AF, Hofmann WK, Kawano S, Takeuchi S, Krug U, Kwok SH, Larsen RJ, Asou H, Miller CW, Hoelzer D, and Koeffler HP (2002) Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood*, **99**, 1332-1340.
85. Gorman DM, Itoh N, Kitamura T, Schreurs J, Yonehara S, Yahara I, Arai K, and Miyajima A (1990) Cloning and expression of a gene encoding an interleukin 3 receptor-like protein: identification of another member of the cytokine receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5459-5463.
86. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo CF, Nervi C, Pelicci PG, and Heinzl T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*, **20**, 6969-6978.
87. Greenhalgh CJ and Hilton DJ (2001) Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol*, **70**, 348-356.

88. Grignani F, De MS, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S, and Pelicci PG (1998) Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*, **391**, 815-818.
89. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, and Goldstone A (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, **92**, 2322-2333.
90. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, and Goldstone AH (2001) The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, **98**, 1312-1320.
91. Gross A, McDonnell JM, and Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 1899-1911.
92. Hagemeyer C, Bannister AJ, Cook A, and Kouzarides T (1993) The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID in vitro: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1580-1584.
93. Hamasaki A, Sendo F, Nakayama K, Ishida N, Negishi I, Nakayama K, and Hatakeyama S (1998) Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J Exp Med*, **188**, 1985-1992.
94. Hatakeyama S, Hamasaki A, Negishi I, Loh DY, Sendo F, Nakayama K, and Nakayama K (1998) Multiple gene duplication and expression of mouse bcl-2-related genes, A1. *Int Immunol*, **10**, 631-637.
95. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, and Naoe T (2000) Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*, **19**, 624-631.
96. Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K, Yokota T, and Miyajima A (1990) Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9655-9659.
97. He LZ, Guidez F, Tribioli C, Peruzzi D, Ruthardt M, Zelent A, and Pandolfi PP (1998) Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet*, **18**, 126-135.

98. Henkel G and Brown MA (1994) PU.1 and GATA: components of a mast cell-specific interleukin 4 intronic enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7737-7741.
99. Hoang T (2004) The origin of hematopoietic cell type diversity. *Oncogene*, **23**, 7188-7198.
100. Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, and Tenen DG (1995) PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol*, **15**, 5830-5845.
101. Hromas R, Orazi A, Neiman RS, Maki R, Van BC, Moore J, and Klemsz M (1993) Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood*, **82**, 2998-3004.
102. Hubel K, Dale DC, and Liles WC (2002) Therapeutic use of cytokines to modulate phagocyte function for the treatment of infectious diseases: current status of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma. *J Infect Dis*, **185**, 1490-1501.
103. Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, Umezawa A, and Ichijo H (2002) Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem*, **277**, 43730-43734.
104. Itoh T, Liu R, Yokota T, Arai KI, and Watanabe S (1998) Definition of the role of tyrosine residues of the common beta subunit regulating multiple signaling pathways of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol*, **18**, 742-752.
105. Jubinsky PT, Laurie AS, Nathan DG, Yetz-Aldepe J, and Sieff CA (1994) Expression and function of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit. *Blood*, **84**, 4174-4185.
106. Kainz B, Heintel D, Marculescu R, Schwarzingler I, Sperr W, Le T, Weltermann A, Fonatsch C, Haas OA, Mannhalter C, Lechner K, and Jaeger U (2002) Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). *Hematol J*, **3**, 283-289.
107. Karp JE, Lancet JE, Kaufmann SH, End DW, Wright JJ, Bol K, Horak I, Tidwell ML, Liesveld J, Kottke TJ, Ange D, Buddharaju L, Gojo I, Highsmith WE, Belly RT, Hohl RJ, Rybak ME, Thibault A, and Rosenblatt J (2001) Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. *Blood*, **97**, 3361-3369.
108. Karp JE, Gojo I, Pili R, Gocke CD, Greer J, Guo C, Qian D, Morris L, Tidwell M, Chen H, and Zwiebel J (2004) Targeting vascular endothelial growth factor for

relapsed and refractory adult acute myelogenous leukemias: therapy with sequential 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine, mitoxantrone, and bevacizumab. *Clin Cancer Res*, **10**, 3577-3585.

109. Karp JE and Lancet JE (2004) Farnesyltransferase inhibitors (FTIs) in myeloid malignancies. *Ann Hematol*, **83 Suppl 1**, S87-S88.
110. Karsan A, Yee E, Kaushansky K, and Harlan JM (1996) Cloning of human Bcl-2 homologue: inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells. *Blood*, **87**, 3089-3096.
111. Kelleher CA, Wong GG, Clark SC, Schendel PF, Minden MD, and McCulloch EA (1988) Binding of iodinated recombinant human GM-CSF to the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia*, **2**, 211-215.
112. Kenny JJ, Knobloch TJ, Augustus M, Carter KC, Rosen CA, and Lang JC (1997) GRS, a novel member of the Bcl-2 gene family, is highly expressed in multiple cancer cell lines and in normal leukocytes. *Oncogene*, **14**, 997-1001.
113. Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
114. Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, Takeshita A, Saito K, Hasegawa S, Shimodaira S, Tamura J, Shimazaki C, Matsue K, Kobayashi H, Arima N, Suzuki R, Morishita H, Saito H, Ueda R, and Ohno R (1997) Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia*, **11**, 1447-1452.
115. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, and Naoe T (1998) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, **12**, 1333-1337.
116. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, and Ueda R (1999) Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, **93**, 3074-3080.
117. Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van BC, and Maki RA (1990) The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell*, **61**, 113-124.
118. Kodandapani R, Pio F, Ni CZ, Piccialli G, Klemsz M, McKercher S, Maki RA, and Ely KR (1996) A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex. *Nature*, **380**, 456-460.

119. Kominato Y, Galson D, Waterman WR, Webb AC, and Auron PE (1995) Monocyte expression of the human prointerleukin 1 beta gene (IL1B) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. *Mol Cell Biol*, **15**, 58-68.
120. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, and Weissman IL (2003) Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*, **21**, 759-806.
121. Kosugi H, Towatari M, Hatano S, Kitamura K, Kiyoi H, Kinoshita T, Tanimoto M, Murate T, Kawashima K, Saito H, and Naoe T (1999) Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: a new approach to anti-leukemia therapy. *Leukemia*, **13**, 1316-1324.
122. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, and Linch DC (2001) The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, **98**, 1752-1759.
123. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, and Craig RW (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3516-3520.
124. Kreider BL, Phillips PD, Prystowsky MB, Shirsat N, Pierce JH, Tushinski R, and Rovera G (1990) Induction of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) receptor by granulocyte CSF increases the differentiative options of a murine hematopoietic progenitor cell. *Mol Cell Biol*, **10**, 4846-4853.
125. Krumlauf R (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell*, **78**, 191-201.
126. Kumano K, Chiba S, Shimizu K, Yamagata T, Hosoya N, Saito T, Takahashi T, Hamada Y, and Hirai H (2001) Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood*, **98**, 3283-3289.
127. Kyba M, Perlingeiro RC, and Daley GQ (2002) HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*, **109**, 29-37.
128. Lamandin C, Sagot C, Roumier C, Lepelley P, De BS, Cosson A, Fenaux P, and Preudhomme C (2002) Are PU.1 mutations frequent genetic events in acute myeloid leukemia (AML)? *Blood*, **100**, 4680-4681.
129. Lang RA, Metcalf D, Cuthbertson RA, Lyons I, Stanley E, Kelso A, Kannourakis G, Williamson DJ, Klintworth GK, Gonda TJ, and . (1987) Transgenic mice

- expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage. *Cell*, **51**, 675-686.
130. Langabeer SE, Walker H, Gale RE, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, and Linch DC (1997) Frequency of CBF beta/MYH11 fusion transcripts in patients entered into the U.K. MRC AML trials. The MRC Adult Leukaemia Working Party. *Br J Haematol*, **96**, 736-739.
 131. Langabeer SE, Walker H, Rogers JR, Burnett AK, Wheatley K, Swirsky D, Goldstone AH, and Linch DC (1997) Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. MRC Adult Leukaemia Working Party. *Br J Haematol*, **99**, 925-928.
 132. Lanza F, Castagnari B, Rigolin G, Moretti S, Latorraca A, Ferrari L, Bardi A, and Castoldi G (1997) Flow cytometry measurement of GM-CSF receptors in acute leukemic blasts, and normal hemopoietic cells. *Leukemia*, **11**, 1700-1710.
 133. Larson RA, Boogaerts M, Estey E, Karanes C, Stadtmauer EA, Sievers EL, Mineur P, Bennett JM, Berger MS, Eten CB, Munteanu M, Loken MR, Van Dongen JJ, Bernstein ID, and Appelbaum FR (2002) Antibody-targeted chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). *Leukemia*, **16**, 1627-1636.
 134. Lawrence HJ and Largman C (1992) Homeobox genes in normal hematopoiesis and leukemia. *Blood*, **80**, 2445-2453.
 135. Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, and Largman C (1996) The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*, **14**, 281-291.
 136. Lecuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, Martin R, Begley CG, Porcher C, Orkin SH, and Hoang T (2002) The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood*, **100**, 2430-2440.
 137. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, Head DR, Appelbaum FR, and Willman CL (1997) Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood*, **89**, 3323-3329.
 138. Leprince D, Gegonne A, Coll J, de TC, Schneeberger A, Lagrou C, and Stehelin D (1983) A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature*, **306**, 395-397.
 139. Lessard J and Sauvageau G (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, **423**, 255-260.

140. LeVine AM, Reed JA, Kurak KE, Cianciolo E, and Whitsett JA (1999) GM-CSF-deficient mice are susceptible to pulmonary group B streptococcal infection. *J Clin Invest*, **103**, 563-569.
141. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, and Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
142. Li Y, Okuno Y, Zhang P, Radoska HS, Chen H, Iwasaki H, Akashi K, Klemsz MJ, McKercher SR, Maki RA, and Tenen DG (2001) Regulation of the PU.1 gene by distal elements. *Blood*, **98**, 2958-2965.
143. Lin EY, Orlofsky A, Berger MS, and Prystowsky MB (1993) Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol*, **151**, 1979-1988.
144. Lin EY, Orlofsky A, Wang HG, Reed JC, and Prystowsky MB (1996) A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*, **87**, 983-992.
145. Lin EY, Kozak CA, Orlofsky A, and Prystowsky MB (1997) The bcl-2 family member, Bcl2a1, maps to mouse chromosome 9 and human chromosome 15. *Mamm Genome*, **8**, 293-294.
146. Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH, Jr., and Evans RM (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature*, **391**, 811-814.
147. Lin RJ and Evans RM (2000) Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Mol Cell*, **5**, 821-830.
148. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, Dorr R, Karanes C, Hynes HE, Doroshow JH, Shurafa M, and Appelbaum FR (2001) Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*, **98**, 3212-3220.
149. Liu R, Itoh T, Arai KI, and Watanabe S (1999) Two distinct signaling pathways downstream of Janus kinase 2 play redundant roles for antiapoptotic activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Biol Cell*, **10**, 3959-3970.
150. Lloberas J, Soler C, and Celada A (1999) The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol Today*, **20**, 184-189.
151. Lodie TA, Savedra R, Jr., Golenbock DT, Van Beveren CP, Maki RA, and Fenton MJ (1997) Stimulation of macrophages by lipopolysaccharide alters the

- phosphorylation state, conformation, and function of PU.1 via activation of casein kinase II. *J Immunol*, **158**, 1848-1856.
152. Lowenberg B, van PW, Theobald M, Gmur J, Verdonck L, Sonneveld P, Fey M, Schouten H, de GG, Ferrant A, Kovacsovics T, Gratwohl A, Daenen S, Huijgens P, and Boogaerts M (2003) Effect of priming with granulocyte colony-stimulating factor on the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **349**, 743-752.
 153. Lyman SD and Jacobsen SE (1998) c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*, **91**, 1101-1134.
 154. Mao S, Frank RC, Zhang J, Miyazaki Y, and Nimer SD (1999) Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8;21)-positive leukemias. *Mol Cell Biol*, **19**, 3635-3644.
 155. Marcucci G, Byrd JC, Dai G, Klisovic MI, Kourlas PJ, Young DC, Cataland SR, Fisher DB, Lucas D, Chan KK, Porcu P, Lin ZP, Farag SF, Frankel SR, Zwiebel JA, Kraut EH, Balcerzak SP, Bloomfield CD, Grever MR, and Caligiuri MA (2003) Phase I and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood*, **101**, 425-432.
 156. Martin R, Lahlil R, Damert A, Miquerol L, Nagy A, Keller G, and Hoang T (2004) SCL interacts with VEGF to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development*, **131**, 693-702.
 157. Martinez-Moczygemba M and Huston DP (2001) Proteasomal regulation of betac signaling reveals a novel mechanism for cytokine receptor heterotypic desensitization. *J Clin Invest*, **108**, 1797-1806.
 158. McGavin JK and Spencer CM (2001) Gemtuzumab ozogamicin. *Drugs*, **61**, 1317-1322.
 159. McGlynn H, Baker AH, and Padua RA (1998) Biological consequences of a point mutation at codon 969 of the FMS gene. *Leuk Res*, **22**, 365-372.
 160. McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ, and Maki RA (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J*, **15**, 5647-5658.
 161. Melnick A and Licht JD (1999) Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, **93**, 3167-3215.

162. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Zhang Q, Sweetser DA, Woods WG, Bernstein ID, Arceci RJ, and Radich JP (2003) Activating mutations of RTK/ras signal transduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*, **102**, 1474-1479.
163. Metcalf D and Merchav S (1982) Effects of GM-CSF deprivation on precursors of granulocytes and macrophages. *J Cell Physiol*, **112**, 411-418.
164. Metcalf D and Nicola NA (1988) Tissue localization and fate in mice of injected multipotential colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 3160-3164.
165. Metcalf D and Nicola NA (1992) The clonal proliferation of normal mouse hematopoietic cells: enhancement and suppression by colony-stimulating factor combinations. *Blood*, **79**, 2861-2866.
166. Michels J, O'Neill JW, Dallman CL, Mouzakiti A, Habens F, Brimmell M, Zhang KY, Craig RW, Marcusson EG, Johnson PW, and Packham G (2004) Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene*, **23**, 4818-4827.
167. Mita M and Tolcher AW (2005) Novel apoptosis inducing agents in cancer therapy. *Curr Probl Cancer*, **29**, 8-32.
168. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, Gruning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Buchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, and Serve H (2000) Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*, **96**, 3907-3914.
169. Mizuki M, Schwable J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Bohmer FD, Muller-Tidow C, Berdel WE, and Serve H (2003) Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood*, **101**, 3164-3173.
170. Monfardini C, Canziani G, Plugariu C, Kieber-Emmons T, Godillot AP, Kwah J, Bajgier J, Chaiken I, and Williams WV (2002) Structure-based design of mimetics for granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *Curr Pharm Des*, **8**, 2185-2199.
171. Moonen P, Mermod JJ, Ernst JF, Hirschi M, and DeLamararter JF (1987) Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 4428-4431.
172. Moore J, Seiter K, Kolitz J, Stock W, Giles F, Kalaycio M, Zenk D, and Marcucci G (2006) A Phase II study of Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) combined with

gemtuzumab ozogamicin in older patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Leuk Res*, **30**, 777-783.

173. Moreau-Gachelin F, Ray D, Mattei MG, Tambourin P, and Tavitian A (1989) The putative oncogene Spi-1: murine chromosomal localization and transcriptional activation in murine acute erythroleukemias. *Oncogene*, **4**, 1449-1456.
174. Moreno I, Martin G, Bolufer P, Barragan E, Rueda E, Roman J, Fernandez P, Leon P, Mena A, Cervera J, Torres A, and Sanz MA (2003) Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **88**, 19-24.
175. Moskow JJ, Bullrich F, Huebner K, Daar IO, and Buchberg AM (1995) Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol Cell Biol*, **15**, 5434-5443.
176. Mrozek K, Heinonen K, and Bloomfield CD (2001) Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, **14**, 19-47.
177. Mueller BU, Pabst T, Osato M, Asou N, Johansen LM, Minden MD, Behre G, Hiddemann W, Ito Y, and Tenen DG (2002) Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood*, **100**, 998-1007.
178. Murdoch B, Chadwick K, Martin M, Shojaei F, Shah KV, Gallacher L, Moon RT, and Bhatia M (2003) Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3422-3427.
179. Nagulapalli S, Pongubala JM, and Atchison ML (1995) Multiple proteins physically interact with PU.1. Transcriptional synergy with NF-IL6 beta (C/EBP delta, CRP3). *J Immunol*, **155**, 4330-4338.
180. Nakamura T, Largaespada DA, Shaughnessy JD, Jr., Jenkins NA, and Copeland NG (1996) Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nat Genet*, **12**, 149-153.
181. Nemunaitis J, Sterman D, Jablons D, Smith JW, Fox B, Maples P, Hamilton S, Borellini F, Lin A, Morali S, and Hege K (2004) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 326-331.
182. Nerlov C and Graf T (1998) PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev*, **12**, 2403-2412.
183. Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, and Graf T (2000) GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood*, **95**, 2543-2551.

184. Neubauer A, Dodge RK, George SL, Davey FR, Silver RT, Schiffer CA, Mayer RJ, Ball ED, Wurster-Hill D, Bloomfield CD, and . (1994) Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood*, **83**, 1603-1611.
185. Nicola NA, Burgess AW, and Metcalf D (1979) Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors produced by different mouse organs in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **254**, 5290-5299.
186. Nicola NA and Metcalf D (1982) Analysis of purified fetal liver hemopoietic progenitor cells in liquid culture. *J Cell Physiol*, **112**, 257-264.
187. Nicola NA, Peterson L, Hilton DJ, and Metcalf D (1988) Cellular processing of murine colony-stimulating factor (Multi-CSF, GM-CSF, G-CSF) receptors by normal hemopoietic cells and cell lines. *Growth Factors*, **1**, 41-49.
188. Nicola NA (1991) Receptors for colony-stimulating factors. *Br J Haematol*, **77**, 133-138.
189. Nicola NA, Wycherley K, Boyd AW, Layton JE, Cary D, and Metcalf D (1993) Neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies to the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha-chain. *Blood*, **82**, 1724-1731.
190. Nicola NA, Smith A, Robb L, Metcalf D, and Begley CG (1997) The structural basis of the biological actions of the GM-CSF receptor. *Ciba Found Symp*, **204**, 19-27.
191. Nicola NA, Nicholson SE, Metcalf D, Zhang JG, Baca M, Farley A, Willson TA, Starr R, Alexander W, and Hilton DJ (1999) Negative regulation of cytokine signaling by the SOCS proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **64**, 397-404.
192. Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, and Wang X (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev*, **17**, 1475-1486.
193. Ning ZQ, Li J, and Arceci RJ (2001) Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood*, **97**, 3559-3567.
194. Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, and Duesberg PH (1983) Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature*, **306**, 391-395.
195. Ohishi K, Katayama N, Shiku H, Varnum-Finney B, and Bernstein ID (2003) Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol*, **14**, 143-150.

196. Orkin SH (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*, **1**, 57-64.
197. Ory DS, Neugeboren BA, and Mulligan RC (1996) A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11400-11406.
198. Owens BM and Hawley RG (2002) HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*, **20**, 364-379.
199. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, and Tenen DG (2001) AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med*, **7**, 444-451.
200. Pahl HL, Scheibe RJ, Zhang DE, Chen HM, Galson DL, Maki RA, and Tenen DG (1993) The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J Biol Chem*, **268**, 5014-5020.
201. Paine R, III, Morris SB, Jin H, Wilcoxon SE, Phare SM, Moore BB, Coffey MJ, and Toews GB (2001) Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **281**, L1210-L1218.
202. Pandolfi PP (2001) Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum Mol Genet*, **10**, 769-775.
203. Park LS, Martin U, Sorensen R, Luhr S, Morrissey PJ, Cosman D, and Larsen A (1992) Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4295-4299.
204. Pellegrini M and Strasser A (1999) A portrait of the Bcl-2 protein family: life, death, and the whole picture. *J Clin Immunol*, **19**, 365-377.
205. Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Tenen DG, and Zhang DE (1998) Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol*, **18**, 3915-3925.
206. Pettersson M, Sundstrom C, Nilsson K, and Larsson LG (1995) The hematopoietic transcription factor PU.1 is downregulated in human multiple myeloma cell lines. *Blood*, **86**, 2747-2753.
207. Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, **14**, 1837-1851.
208. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, De BS, Thomas X, Raffoux E, Lamandin C, Castaigne S, Fenaux P, and Dombret H (2002) Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute

myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*, **100**, 2717-2723.

209. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, and Seraphin B (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218-229.
210. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, and Seraphin B (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218-229.
211. Quelle FW, Sato N, Witthuhn BA, Inhorn RC, Eder M, Miyajima A, Griffin JD, and Ihle JN (1994) JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Mol Cell Biol*, **14**, 4335-4341.
212. Rao G, Rekhman N, Cheng G, Krasikov T, and Skoultschi AI (1997) Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. *Oncogene*, **14**, 123-131.
213. Rappold I, Ziegler BL, Kohler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino AC, Hill B, Neu S, Knapp W, Alitalo R, Alitalo K, Ullrich A, Kanz L, and Buhning HJ (1997) Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood*, **90**, 111-125.
214. Ray D, Bosselut R, Ghysdael J, Mattei MG, Tavitian A, and Moreau-Gachelin F (1992) Characterization of Spi-B, a transcription factor related to the putative oncoprotein Spi-1/PU.1. *Mol Cell Biol*, **12**, 4297-4304.
215. Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, and Rane S (2000) IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene*, **19**, 2532-2547.
216. Reddy VA, Iwama A, Iotzova G, Schulz M, Elsasser A, Vangala RK, Tenen DG, Hiddemann W, and Behre G (2002) Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood*, **100**, 483-490.
217. Rekhman N, Radparvar F, Evans T, and Skoultschi AI (1999) Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev*, **13**, 1398-1411.
218. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, and Weissman IL (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, **423**, 409-414.

219. Ridge SA, Worwood M, Oscier D, Jacobs A, and Padua RA (1990) FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1377-1380.
220. Rinckenberger JL, Horning S, Klocke B, Roth K, and Korsmeyer SJ (2000) Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev*, **14**, 23-27.
221. Rogers S, Wells R, and Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-368.
222. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, Akashi K, Fiering S, and Tenen DG (2004) Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet*, **36**, 624-630.
223. Rosmarin AG, Caprio D, Levy R, and Simkevich C (1995) CD18 (beta 2 leukocyte integrin) promoter requires PU.1 transcription factor for myeloid activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 801-805.
224. Rosmarin AG, Yang Z, and Resendes KK (2005) Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol*, **33**, 131-143.
225. Rosnet O, Buhring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainy D, Arnoulet C, Chabannon C, Kanz L, Hannum C, and Birnbaum D (1996) Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*, **10**, 238-248.
226. Roussel MF, Downing JR, Rettenmier CW, and Sherr CJ (1988) A point mutation in the extracellular domain of the human CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) activates its transforming potential. *Cell*, **55**, 979-988.
227. Rowe JM, Neuberg D, Friedenber W, Bennett JM, Paietta E, Makary AZ, Liesveld JL, Abboud CN, Dewald G, Hayes FA, Tallman MS, and Wiernik PH (2004) A phase 3 study of three induction regimens and of priming with GM-CSF in older adults with acute myeloid leukemia: a trial by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Blood*, **103**, 479-485.
228. Rowley JD (1973) Chromosomal patterns in myelocytic leukemia. *N Engl J Med*, **289**, 220-221.
229. Sakamaki K, Miyajima I, Kitamura T, and Miyajima A (1992) Critical cytoplasmic domains of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation. *EMBO J*, **11**, 3541-3549.
230. Sato N, Sakamaki K, Terada N, Arai K, and Miyajima A (1993) Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic

regions of the common beta subunit responsible for different signaling. *EMBO J*, **12**, 4181-4189.

231. Schiffer CA (2003) Hematopoietic growth factors and the future of therapeutic research on acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **349**, 727-729.
232. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Loffler H, Sauerland CM, Serve H, Buchner T, Haferlach T, and Hiddemann W (2002) Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, **100**, 59-66.
233. Schrimsher JL, Rose K, Simona MG, and Wingfield P (1987) Characterization of human and mouse granulocyte-macrophage-colony-stimulating factors derived from *Escherichia coli*. *Biochem J*, **247**, 195-199.
234. Schuetze S, Paul R, Gliniak BC, and Kabat D (1992) Role of the PU.1 transcription factor in controlling differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol*, **12**, 2967-2975.
235. Schuetze S, Stenberg PE, and Kabat D (1993) The Ets-related transcription factor PU.1 immortalizes erythroblasts. *Mol Cell Biol*, **13**, 5670-5678.
236. Schwaller J, Parganas E, Wang D, Cain D, Aster JC, Williams IR, Lee CK, Gerthner R, Kitamura T, Frantsve J, Anastasiadou E, Loh ML, Levy DE, Ihle JN, and Gilliland DG (2000) Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol Cell*, **6**, 693-704.
237. Scott EW, Simon MC, Anastasi J, and Singh H (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, **265**, 1573-1577.
238. Scott EW, Fisher RC, Olson MC, Kehrli EW, Simon MC, and Singh H (1997) PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity*, **6**, 437-447.
239. Shanafelt AB and Kastelein RA (1989) Identification of critical regions in mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by scanning-deletion analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 4872-4876.
240. Shibata Y, Berclaz PY, Chroncos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, and Trapnell BC (2001) GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*, **15**, 557-567.
241. Shin MK and Koshland ME (1993) Ets-related protein PU.1 regulates expression of the immunoglobulin J-chain gene through a novel Ets-binding element. *Genes Dev*, **7**, 2006-2015.

242. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, and Holland JF (2002) Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*, **20**, 2429-2440.
243. Simons JW, Carducci MA, Mikhak B, Lim M, Biedrzycki B, Borellini F, Clift SM, Hege KM, Ando DG, Piantadosi S, Mulligan R, and Nelson WG (2006) Phase I/II trial of an allogeneic cellular immunotherapy in hormone-naive prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **12**, 3394-3401.
244. Singh H, DeKoter RP, and Walsh JC (1999) PU.1, a shared transcriptional regulator of lymphoid and myeloid cell fates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **64**, 13-20.
245. Smith A, Metcalf D, and Nicola NA (1997) Cytoplasmic domains of the common beta-chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors that are required for inducing differentiation or clonal suppression in myeloid leukaemic cell lines. *EMBO J*, **16**, 451-464.
246. Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Cohen LK, Mulligan RC, and Dranoff G (1998) Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13141-13146.
247. Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, Stone RM, Kalaycio M, Scheinberg DA, Steinherz P, Sievers EL, Coutre S, Dahlberg S, Ellison R, and Warrell RP, Jr. (2001) United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*, **19**, 3852-3860.
248. Springall F, O'Mara S, Shounan Y, Todd A, Ford D, and Iland H (1993) c-fms point mutations in acute myeloid leukemia: fact or fiction? *Leukemia*, **7**, 978-985.
249. Stacchini A, Fubini L, and Aglietta M (1996) Flow cytometric detection and quantitative analysis of the GM-CSF receptor in human granulocytes and comparison with the radioligand binding assay. *Cytometry*, **24**, 374-381.
250. Stacchini A, Fubini L, Severino A, Sanavio F, Aglietta M, and Piacibello W (1996) Expression of type III receptor tyrosine kinases FLT3 and KIT and responses to their ligands by acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia*, **10**, 1584-1591.

251. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, and Hilton DJ (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, **387**, 917-921.
252. Steffen B, Muller-Tidow C, Schwable J, Berdel WE, and Serve H (2005) The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, **56**, 195-221.
253. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, and Radich JP (2001) FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **97**, 3589-3595.
254. Stone RM, O'Donnell MR, and Sekeres MA (2004) Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 98-117.
255. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhauser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, and Illmer T (2002) Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, **99**, 4326-4335.
256. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, and Humphries RK (1997) Hox homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis. *Hematol Oncol Clin North Am*, **11**, 1221-1237.
257. Tobal K, Pagliuca A, Bhatt B, Bailey N, Layton DM, and Mufti GJ (1990) Mutation of the human FMS gene (M-CSF receptor) in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **4**, 486-489.
258. Tse KF, Mukherjee G, and Small D (2000) Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia*, **14**, 1766-1776.
259. Uchida H, Downing JR, Miyazaki Y, Frank R, Zhang J, and Nimer SD (1999) Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 promoter. *Oncogene*, **18**, 1015-1022.
260. Vangala RK, Heiss-Neumann MS, Rangatia JS, Singh SM, Schoch C, Tenen DG, Hiddemann W, and Behre G (2003) The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood*, **101**, 270-277.
261. Vaux DL and Korsmeyer SJ (1999) Cell death in development. *Cell*, **96**, 245-254.
262. Vigneri P and Wang JY (2001) Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med*, **7**, 228-234.

263. Vogelstein B, Civin CI, Preisinger AC, Krischer JP, Steuber P, Ravindranath Y, Weinstein H, Elfferich P, and Bos J (1990) RAS gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Genes Chromosomes Cancer*, **2**, 159-162.
264. Voso MT, Burn TC, Wulf G, Lim B, Leone G, and Tenen DG (1994) Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7932-7936.
265. Wang JM, Lai MZ, and Yang-Yen HF (2003) Interleukin-3 stimulation of *mcl-1* gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Mol Cell Biol*, **23**, 1896-1909.
266. Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, Anastasi J, Karp JE, Le Beau MM, and Crispino JD (2002) Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*, **32**, 148-152.
267. Werner MH, Clore M, Fisher CL, Fisher RJ, Trinh L, Shiloach J, and Gronenborn AM (1995) The solution structure of the human ETS1-DNA complex reveals a novel mode of binding and true side chain intercalation. *Cell*, **83**, 761-771.
268. Westendorf JJ, Yamamoto CM, Lenny N, Downing JR, Selsted ME, and Hiebert SW (1998) The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol Cell Biol*, **18**, 322-333.
269. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrozek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, and Caligiuri MA (2001) Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*, **61**, 7233-7239.
270. Williams GT, Smith CA, Spooncer E, Dexter TM, and Taylor DR (1990) Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature*, **343**, 76-79.
271. Williamson DJ, Begley CG, Vadas MA, and Metcalf D (1988) The detection and initial characterization of colony-stimulating factors in synovial fluid. *Clin Exp Immunol*, **72**, 67-73.
272. Wognum AW, Westerman Y, Visser TP, and Wagemaker G (1994) Distribution of receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on immature CD34+ bone marrow cells, differentiating monomyeloid progenitors, and mature blood cell subsets. *Blood*, **84**, 764-774.

273. Xu F, Taki T, Yang HW, Hanada R, Hongo T, Ohnishi H, Kobayashi M, Bessho F, Yanagisawa M, and Hayashi Y (1999) Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br J Haematol*, **105**, 155-162.
274. Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, and Carroll M (2003) Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*, **102**, 972-980.
275. Yamada T, Kondoh N, Matsumoto M, Yoshida M, Maekawa A, and Oikawa T (1997) Overexpression of PU.1 induces growth and differentiation inhibition and apoptotic cell death in murine erythroleukemia cells. *Blood*, **89**, 1383-1393.
276. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Kaneko F, Nakano J, Kato H, Hirai K, Horiuchi T, and Ohta K (2002) Attenuation of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model by neutralization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Cell Immunol*, **219**, 92-97.
277. Yang T, Kozopas KM, and Craig RW (1995) The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol*, **128**, 1173-1184.
278. Yi T and Ihle JN (1993) Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol Cell Biol*, **13**, 3350-3358.
279. Yi T, Mui AL, Krystal G, and Ihle JN (1993) Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol Cell Biol*, **13**, 7577-7586.
280. Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Kahsima K, Matsuo Y, and Naoe T (1997) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*, **11**, 1605-1609.
281. Zhang DE, Hetherington CJ, Chen HM, and Tenen DG (1994) The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol*, **14**, 373-381.
282. Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS, Auron PE, Tenen DG, and Sun Z (1999) Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8705-8710.
283. Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith KA, Mueller BU, Narravula S, Torbett BE, Orkin SH, and Tenen DG (2000) PU.1 inhibits GATA-1 function and

erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood*, **96**, 2641-2648.

284. Zheng R, Friedman AD, and Small D (2002) Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations. *Blood*, **100**, 4154-4161.
285. Zhou P, Levy NB, Xie H, Qian L, Lee CY, Gascoyne RD, and Craig RW (2001) MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood*, **97**