

Université de Montréal

Identification de gènes ciblés par ETV6-AML1, un facteur de transcription chimérique  
retrouvé dans la leucémie de l'enfant.

Par  
Sylvie Langlois

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Maîtrise en science (M.Sc.)  
En Biologie Moléculaire

Décembre 2005

© Sylvie Langlois, 2005



QH

506

1154

2006

V.022

## 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 :  
Identification de gènes ciblés par ETV6-AML1, un facteur de transcription chimérique  
retrouvé dans la leucémie de l'enfant.

Présenté par :  
Sylvie Langlois

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand

.....  
Président-rapporteur

Daniel Sinnett

.....  
Directeur de recherche

Josée Hébert

.....  
Membre du jury

## Résumé :

La leucémie lymphoblastique aïgue (LLA) représente près de 26% de l'ensemble des cas de cancers pédiatriques. La translocation t(12;21), observée chez environ 25 % des enfants avec LLA de type pré-B, provoque la fusion des gènes ETV6 et AML1. La protéine chimérique ETV6-AML1 ainsi produite possède le domaine de liaison à l'ADN de AML1 et l'activité de répression de transcription de ETV6. Peu de choses sont connues sur le rôle de ETV6-AML1 dans la leucémogénèse. Nous proposons que ce facteur de transcription chimérique agirait comme un répresseur de certaines cibles normalement activées par AML1. Le principal but de notre étude est l'identification de gènes ciblés par le facteur de transcription ETV6-AML1 permettant ainsi d'approfondir la compréhension de son rôle dans la leucémogénèse. Les micropuces sont un bon outil qui permet d'étudier l'impact d'une protéine sur le profil d'expression globale d'une cellule. Le modèle cellulaire HeLa utilisé, développé dans notre laboratoire, permet de contrôler l'expression de ETV6-AML1 qui est sous le contrôle d'un système inductible (TetON). Les ARNm obtenus en 3 répliquas biologiques à divers temps d'induction de ETV6-AML1 (0h, 4h, 12h, 48h) ont été hybridés à des micropuces de gènes humains (Affymetrix : HG-U133A) afin de détecter l'impact de ETV6-AML1 sur le profil d'expression global. Le traitement statistique des données a mené à l'identification de 65 cibles potentielles. L'expression de 15 de ces candidats a été validée par RT-PCR quantitatif en temps réel et leur profil d'expression a été déterminé dans le matériel provenant de patients LLA avec ou sans t(12;21) afin d'évaluer la pertinence de ces cibles dans la leucémie. Les gènes JUN et F3 ont montré une différence significative dans leur niveau d'expression en comparaison avec le statut de translocation des patients. Ces deux gènes ont été soumis à une analyse fonctionnelle à l'aide d'un gène rapporteur, dans 3 lignées cellulaires. JUN présente une modulation d'expression dans au moins une des lignées cellulaires en fonction de ETV6-AML1. Cette étude amènera donc l'identification des gènes modulés suite à l'expression de ETV6-AML1 et permettra d'approfondir notre compréhension de son rôle dans la leucémogénèse de l'enfant.

Mots clés : Leucémie, ETV6-AML1, facteur de transcription, micropuces, validation fonctionnelle, analyse *in silico*.

### Summary :

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer according to approximately 26% of the cases. Moreover, chromosomal abnormalities, such as translocations, are often present in leukemia. The translocation t(12;21) is observed in approximately 25% of children with pre-B ALL. The resulting chimeric protein, ETV6-AML1, consists of the DNA binding domain of AML1 and the repression domain of ETV6. Very little is known about the role of ETV6-AML1 in leukemogenesis. We propose that this chimeric transcription factor acts as a transcriptional repressor of genes usually activated by AML1. The objective of this study is to identify genes targeted by ETV6-AML1, to further understand its role in leukemogenesis. Microarray is a good tool to study the impact of a protein on the global expression profile. We have developed a HeLa cellular model, in which ETV6-AML1 expression is under control of an inducible system (Tet-On). The mRNA obtained from 3 replicates at different ETV6-AML1 induction times (0h-4h-12h-48h) was hybridized to human microarrays (HG-U133A Affymetrix), to detect the impact of ETV6-AML1 induction on the global expression profile. Statistical analysis of the microarray data led to the identification of 65 genes significantly modulated. So far, the expression of 15 of these candidate target genes has been validated by quantitative real-time PCR and the modulation of 67% of these 15 genes has been confirmed. Then, we determined the expression profile of the validated genes in 17 ALL patients with or without the translocation t(12;21), in order to evaluate the behavior of these targets in leukemia in respect to ETV6-AML1 expression status. JUN and F3 showed significant differences in their expression level according to the t(12;21) translocation status of the patients. JUN is less expressed in patients with the translocation whereas F3 is more expressed in these same patients. The promoter region of both genes has been studied by a gene reporter assays in 3 cell lines. JUN shown a modulation of expression in at least one cell line according to ETV6-AML1. This study will help to understand the impact of ETV6-AML1 on the global expression and will give clues on his implication in childhood leukemogenesis.

Key words: Leukemia, ETV6-AML1,transcription factor, microarrays, functional validation, *in silico* analysis.

**Table des matières:**

Résumé	ii
Summary	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiii
<b><u>Chapitre I : Introduction:</u></b>	<b>1</b>
<b>1 Cancer</b>	<b>2</b>
1.1 Incidence	2
1.2 Cancer : maladie complexe	2
1.2.1 Environnement et cancer	4
1.2.2 Génétique du cancer	4
1.3 Leucémie	7
1.3.1 Leucémie lymphoblastique aiguë (LLA)	7
<b>2 Translocations</b>	<b>10</b>
2.1 Translocations et pronostique	10
2.2 La translocation(12;21)(p13;q22)	12
2.2.1 Le facteur de transcription AML1	15
2.2.2 Le facteur de transcription ETV6	19
2.2.3 Protéine chimérique ETV6-AML1	23
<b>3 Détection de gènes ciblés par un facteur de transcription</b>	<b>25</b>
3.1 Micropuces	28
<b>4 Hypothèses</b>	<b>31</b>
<b>5 Objectifs du projet</b>	<b>32</b>
<b><u>Chapitre II : Matériel et méthodes :</u></b>	<b>33</b>
<b>1 Approche expérimentale</b>	<b>34</b>
<b>2 Clones stables inductibles pour ETV6-AML1</b>	<b>35</b>
2.1 Établissement des clones	35
2.1.1 HeLa TetON	35
2.1.2 Construction	36
2.1.3 Transfection	37
2.2 Induction des clones stables	37
<b>3 Préparation des échantillons pour les micropuces</b>	<b>38</b>
3.1 Isolement des protéines	38

3.2 Immunoblots	38
<b>4 Hybridation avec les micropuces</b>	<b>38</b>
<b>5 Traitement des données de micropuces</b>	<b>39</b>
5.1 Normalisation	39
5.2 Analyse ANOVA	39
5.3 Niveau de modulation	40
5.4 Test t de student	40
<b>6 Sélection des gènes candidats</b>	<b>40</b>
6.1 Regroupement des gènes	40
6.1.1 Regroupement selon le profil d'expression	40
6.1.2 Regroupement selon les termes 'Gene Ontology'	41
6.1.3 Regroupement selon les sites de liaison prédits pour des facteurs de transcription	41
6.1.4 Regroupement selon la similarité de promoteur	42
6.1.5 Combinaison des approches et choix des gènes candidats	42
<b>7 Validation des gènes candidats dans les lignées cellulaires et dans les patients</b>	<b>42</b>
7.1 ARN et patients	42
7.2 RT-PCR quantitatif en temps réel	43
7.2.1 Transcription inverse	43
7.2.2 Choix des amorces	43
7.2.3 Amplification par PCR quantitatif en temps réel	45
7.3 Expression des gènes cibles par rapport aux données cliniques des patients	45
<b>8 Études fonctionnelles à l'aide du gène rapporteur luciférase</b>	<b>46</b>
8.1 Constructions	46
8.2 Transfection et détection de la luciférase	49
<b><u>Chapitre III : Résultats</u></b>	<b>50</b>
1. Clones stables inductibles pour ETV6-AML1	51
2. Traitement des données de micropuces	52
3. Choix des gènes candidats	60
4. Validation par RT-PCR quantitatif en temps réel	68
5. Étude d'expression chez les patients leucémiques	70
6. Études fonctionnelles à l'aide du gène rapporteur luciférase	73
<b><u>Chapitre IV : Discussion et conclusion</u></b>	<b>76</b>

Bibliographie	95
Annexe I	xiv
Annexe II	xxxii
Annexe III	xxxv
Curriculum vitae	xxxvi

## Liste des tableaux:

Tableau I : Les sous-types biologiques majeurs de la leucémie pédiatrique et les changements chromosomiques associés	9
Tableau II: Différentes translocations impliquant le gène AML1.	18
Tableau III : Différentes translocations impliquant le gène ETV6.	21
Tableau IV : Différentes méthodes permettant la détection d'un gène ciblé par un facteur de transcription.	27
Tableau V : Amorces utilisées pour le PCR quantitatif en temps réel	44
Tableau VI : Amorces utilisées lors de l'amplification des régions régulatrices de F3, Jun et Il3 pour les constructions dans le vecteur firefly luciférase pGL3-basic.	47
Tableau VII : Gènes modulés par ETV6-AML1 classés par catégories.	57
Tableau VIII : Gènes modulés par ETV6-AML1 et sélectionnés pour la validation par RT-PCR quantitatif en temps réel.	67
Tableau IX : Données cliniques des patients ayant la LLA pré-B et expression des gènes modulés par ETV6-AML1 chez ces patients.	71
Tableau X : Étude d'association de l'expression de cibles de ETV6-AML1 avec les données cliniques des patients atteints de LLA pré-B.	72
Tableau XI : Valeur d'expression des 804 sondes ayant une valeur de $p \leq 0,05$ suite à un test ANOVA pour chaque temps d'induction de ETV6-AML1 suite à l'hybridation aux micropuces (HU-133A).	xiv
Tableau XII : Facteurs de transcription dont la séquence consensus, conservés entre l'homme et la souris, est retrouvée dans la région régulatrice des 65 gènes modulés et le nombre de gènes associé à chacun.	xxxii

## Liste des figures :

Figure 1 : Carcinogenèse environnementale et susceptibilité de l'hôte au développement du cancer.	3
Figure 2: Processus multi-étapes pour le développement d'un cancer.	6
Figure 3: Fréquence des altérations génétiques retrouvées dans la LLA des enfants et des adultes.	11
Figure 4 : Modèle à deux étapes pour le développement de la leucémie pédiatrique aiguë.	14
Figure 5 : Formation de complexes transcriptionnels par AML1.	16
Figure 6: Représentation de la protéine AML1.	17
Figure 7: Représentation de la protéine ETV6.	22
Figure 8 : Représentation des protéines ETV6, AML1 et de la protéine chimérique ETV6-AML1 produite suite à la translocation t(12;21).	24
Figure 9: Principe de l'hybridation aux micropuces	29
Figure 10: Approche expérimentale	34
Figure 11 : Principe du système Tet-On.	35
Figure 12 : Vecteur pTRE2hyg/ETV6-AML1.	36
Figure 13 : Constructions utilisées pour l'étude des régions promotrices de F3, Jun et IL3 à l'aide du gène rapporteur luciférase.	48
Figure 14 : Immunoblot montrant l'induction de la protéine ETV6-AML1 dans le clone HeLaTetON/ETV6-AML1-13.	51
Figure 15: Reproductibilité des données de micropuces entre les répliques pour les expériences dans le clone ETV6-AML1-13 (EA-13).	53
Figure 16 : Reproductibilité des données de micropuces entre les répliques pour les expériences dans le clone vecteur seul (V1).	54
Figure 17 : Traitement des données de micropuces en 4 étapes.	55
Figure 18 : Distribution par catégories des 65 gènes modulés en fonction des termes de 'Gene Ontology'	56

Figure 19: Représentation hiérarchique selon sur le profil d'expression des 65 gènes modulés par ETV6-AML1.	61
Figure 20 : Exemple de profils d'expression.	62
Figure 21 : Regroupement hiérarchique selon les termes de 'Gene Ontology' des 65 gènes modulés par ETV6-AML1.	63
Figure 22 : Représentation hiérarchique selon les sites de liaison pour des facteurs de transcription conservés entre l'homme et la souris présent dans la région 1kb en amont de l'exon 1 des 65 gènes modulés par ETV6-AML1.	65
Figure 23: Regroupement des 65 gènes modulés par ETV6-AML1 selon leur similarité de promoteur.	66
Figure 24 : Exemple de validation par RT-PCR quantitatif en temps réel montrant les gènes JUN et F3.	69
Figure 25 : Représentation graphique de la corrélation de JUN et F3 avec le statut de translocation des patients LLA pré-B.	72
Figure 26 : Sites de liaison pour des facteurs AML dans la région régulatrice des gènes JUN et F3.	74
Figure 27 : Évaluation de l'impact fonctionnel de ETV6-AML1 sur les gènes JUN et F3 à l'aide du gène rapporteur luciférase.	75
Figure 28 : Formation du complexe AP1 par la dimérisation de deux protéines leucine-zipper et régulation de la protéine Jun.	86
Figure 29: Validation par RT-PCR quantitatif en temps réel des gènes candidats modulés suite à l'induction de ETV6-AML1.	xxxv

**Liste des abréviations :**

- ABL: abelson murine leukemia viral oncogene homologue 1
- ADN : acide déoxyribonucléique
- ADNc : ADN complémentaire
- ARNc : acide ribonucléique complémentaire
- AML1 : Acute myeloid leukemia 1 gene
- ANOVA: Analysis of variance
- ARN : acide ribonucléique
- ARNm : ARN messenger
- ATF: cAMP-dependent transcription factor
- BCL-XL : BCL-X like
- BCR: breakpoint cluster region
- CBF : Core Binding Factor
- CBP: CREB binding protein
- ChIP: Chromatine immunoprecipitation
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- dNTP: Deoxyribonucleotide triphosphate
- DTT : Dithiothreitol
- EBS: ETS binding sequence
- EBV: Epstein-Barr virus
- ETS : E-26 transforming specific
- ETV6 : ETS-variant gene 6
- F3: coagulation factor III
- FBS : fetal bovin serum
- Fas: TNF receptor superfamily, member 6
- Fos: v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
- GO : Gene Ontology
- HeLa : cellules épithéliales humaines dérivées d'un carcinome utérin
- HepG2 : Human hepatocellular liver carcinoma cell line
- HIV: human immunodeficiency virus
- HL60: Human acute promyelocytic leukemia cell line

HTLV-I: human T-lymphotropic virus type I  
IL3: Interleukine-3  
JEG3 : human choriocarcinoma-derived cell line  
Jun: v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog  
Kb : kilo base  
KCl: chlorure de potassium  
LLA : Leucémie lymphoblastique aiguë  
Maf : v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)  
MAS5: Microarrays analysis suit 5  
M-CSFR : Macrophage colony-stimulating factor receptor  
MgCl<sub>2</sub> : chlorure de magnésium  
µg : microgramme  
µl : microlitre  
ml : millilitre  
mM : millimolaire  
MLL: mixed-lineage leukemia  
MMLV : Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase  
MMP3 : matrix metallopeptidase 3  
MPO : Myeloperoxydase  
mSin3A: SIN3 homolog A, transcription regulator  
NaCl : chlorure de sodium  
N-CoR : nuclear receptor corepressor  
NIH3T3 : fibroblastes de souris  
P300 : E1A binding protein p300  
Pb : paire de bases  
PCR : polymerase chain reaction  
phase G1: phase Gap1  
phase M: phase de Mitose  
phase S: phase de Synthèse  
PMSF : Phenylmethylsulphonylfluoride (protease inhibitor)  
PNT : Pointed domaine (domaine d'oligomérisation)

% : pourcent

PVDF : Polyvinylidene fluoride (membrane)

Ras : RAS viral (v-ras) oncogene homolog

RT: reverse transcription

RT-PCR-Q : RT-PCR quantitatif en temps réel

SDS : Sodium dodecyl-sulfate

TA : transactivation domaine

TBS: Tris Buffered Saline

TCR- $\beta$  : T-cell receptor- $\beta$

TEL : Translocation ETS leukemia

UV : ultra-violet

## Remerciements :

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Daniel Sinnett, pour sa disponibilité, son aide et ses précieux conseils tout au long de ma maîtrise.

J'aimerais aussi remercier tout le monde de l'étage B du pavillon vidéotron pour leur agréable compagnie, leur support moral, leur aide et les discussions constructives. J'aimerais remercier plus particulièrement les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pendant mon projet : Josiane, Hélène, Gino, Patrick, Caroline, Rocio, Nina, Dominika, Claude.

Finalement, j'aimerais remercier mon père, ma mère, mes frères et Simon pour m'avoir encouragé dans mes décisions et mon cheminement et d'avoir cru en moi.

**Chapitre I**

**- Introduction -**

## **1. Cancer**

### **1.1 Incidence**

Le cancer est une des maladies les plus répandues dans les pays occidentaux. On estime que 149 000 nouveaux cas de cancer seront diagnostiqués et 69 500 décès seront dus au cancer en 2005 (Statistiques canadiennes sur le cancer, 2005). Les cancers pédiatriques sont différents des cancers d'adulte et représentent environ 1% de l'ensemble des cas. Les cancers infantiles peuvent apparaître à des sites différents et ont parfois une apparence histologique différente. Ils ont souvent une croissance plus rapide mais répondent généralement mieux aux traitements de chimiothérapie (Miller, Young et al. 1995). Les leucémies, les cancers encéphaliques et les lymphomes sont prédominants chez les enfants tandis que chez l'adulte le cancer du sein, de la prostate, du poumon et du colon sont les plus fréquents. Entre les années 1997-2001, 1 285 cas de cancer ont été diagnostiqués chez des enfants et 227 enfants sont morts du cancer chaque année au Canada. Grâce à la recherche, le taux de mortalité de ces cancers a reculé de plus de 50 % depuis le début des années 50. L'amélioration de la survie a été particulièrement visible dans le cas du cancer infantile le plus fréquent, la leucémie aiguë lymphocytaire, de même que pour les lymphomes et le cancer du rein.

### **1.2 Cancer : Maladie complexe**

Le cancer est une maladie complexe puisque son développement implique des facteurs environnementaux et des événements génétiques. En effet, le risque de cancer diffère entre les populations, mais aussi sur une base individuelle. Cette variabilité inter-individuelle peut être due à plusieurs facteurs comme l'âge, le sexe, l'état général de santé, l'alimentation, les habitudes de vie, mais aussi la variabilité génétique (figure 1). La réponse de l'hôte à son environnement dépend notamment de polymorphismes et d'altérations chromosomiques qui impliquent des gènes essentiels au bon fonctionnement de la cellule.

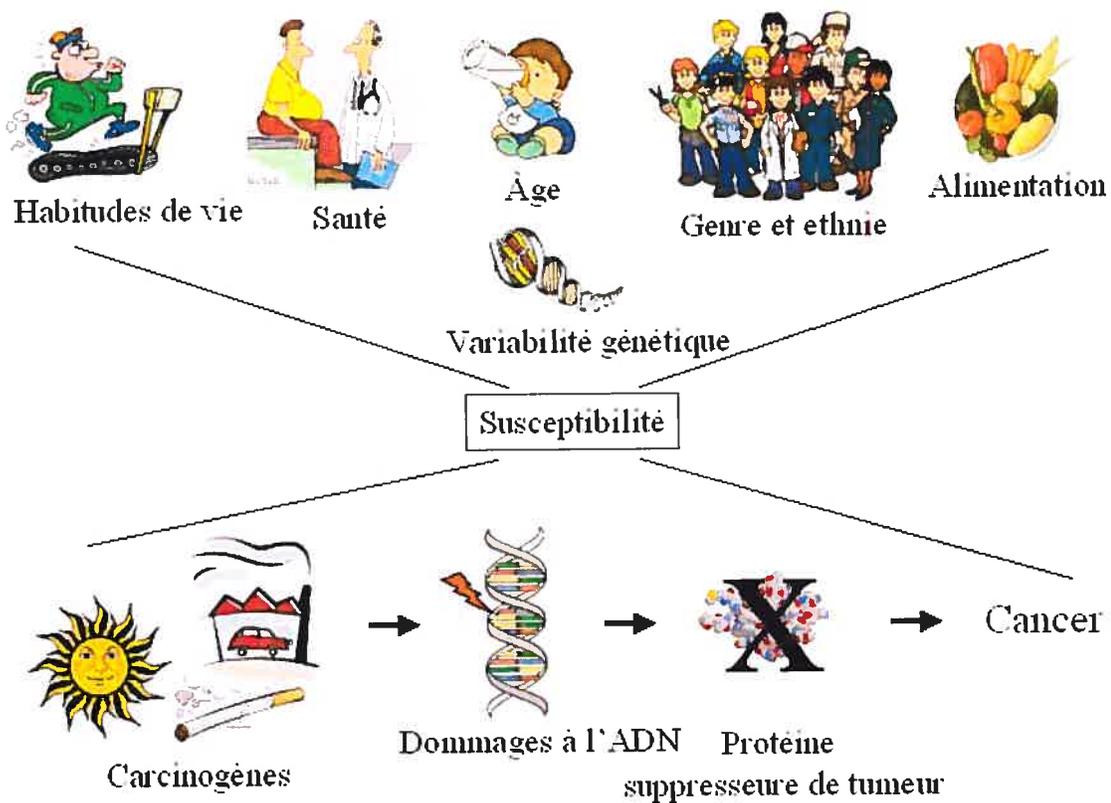


Figure 1 : Carcinogénèse environnementale et susceptibilité de l'hôte au développement du cancer. Les caractéristiques inter-individuelles ainsi que l'exposition à des agents carcinogènes environnementaux influence la susceptibilité des individus à développer un cancer.

### 1.2.1 Environnement et cancer

Des éléments environnementaux peuvent influencer notre risque de développer un cancer, soit en l'augmentant ou encore en le diminuant. Les agents carcinogènes chimiques (la cigarette, les pesticides, la pollution), les radiations (les UV, les rayons-X), les hormones et les virus peuvent augmenter les chances de développer un cancer. Plusieurs études ont démontré que l'exposition trop intense aux rayons UV du soleil, particulièrement pendant l'enfance, peut mener à l'apparition d'un mélanome. (Oliveria, Saraiya et al. 2005). Aussi, la fumée de cigarette qui est constituée de plusieurs agents chimiques est associée au cancer du poumon (Biesalski, Bueno de Mesquita et al. 1998). Les infections par des virus présents dans notre environnement comme le EBV (Epstein-Barr virus), le HIV (human immunodeficiency virus), le HTLV-I (human T-lymphotropic virus type I) peuvent aussi mener au développement de cancers, notamment de leucémies (Greaves 1993; Pollock, Jenson et al. 2003; Proietti, Carneiro-Proietti et al. 2005). Tous ces agents ont un effet direct ou indirect sur le matériel génétique de la cellule, favorisant l'apparition de mutations. Par contre, d'autres éléments environnementaux comme les aliments riches en anti-oxydants peuvent diminuer notre risque de développer un cancer en stimulant le système immunitaire, en modulant l'activité de certains gènes comme le gène suppresseur de tumeur p53 et en diminuant l'angiogenèse (Shklar 1998).

### 1.2.2 Génétique du cancer

La tumorigenèse est un processus multi-étape qui implique habituellement l'altération de proto-oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (figure 2). Les proto-oncogènes sont des gènes impliqués dans la croissance cellulaire. Leur activation peut donc mener à une croissance excessive et une transformation cellulaire. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont plutôt impliqués dans la régulation de l'apoptose et dans l'inhibition de la croissance et de la différenciation. Une inactivation de ces gènes peut donc entraîner une diminution de la susceptibilité des cellules à l'apoptose (Bishop 1991). Certaines mutations affectant des gènes responsables de la réparation de l'ADN

peuvent aussi entraîner une augmentation du taux général de mutations dans la cellule et ainsi favoriser l'apparition de mutations menant à la dysfonction de la prolifération ou de l'apoptose. Ces altérations de gènes peuvent être dues à différents mécanismes notamment la présence de mutations ponctuelles qui consistent en une substitution, une délétion ou une insertion de base. Aussi, l'amplification ou la délétion génique peuvent affecter l'expression de ces gènes en changeant leur nombre de copies. Finalement, les réarrangements chromosomiques peuvent aussi affecter l'expression des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur. Ces réarrangements peuvent être des translocations, des inversions et des hyper ou hypodiploidies. Les réarrangements chromosomiques sont particulièrement présents dans les leucémies (Look 1997).

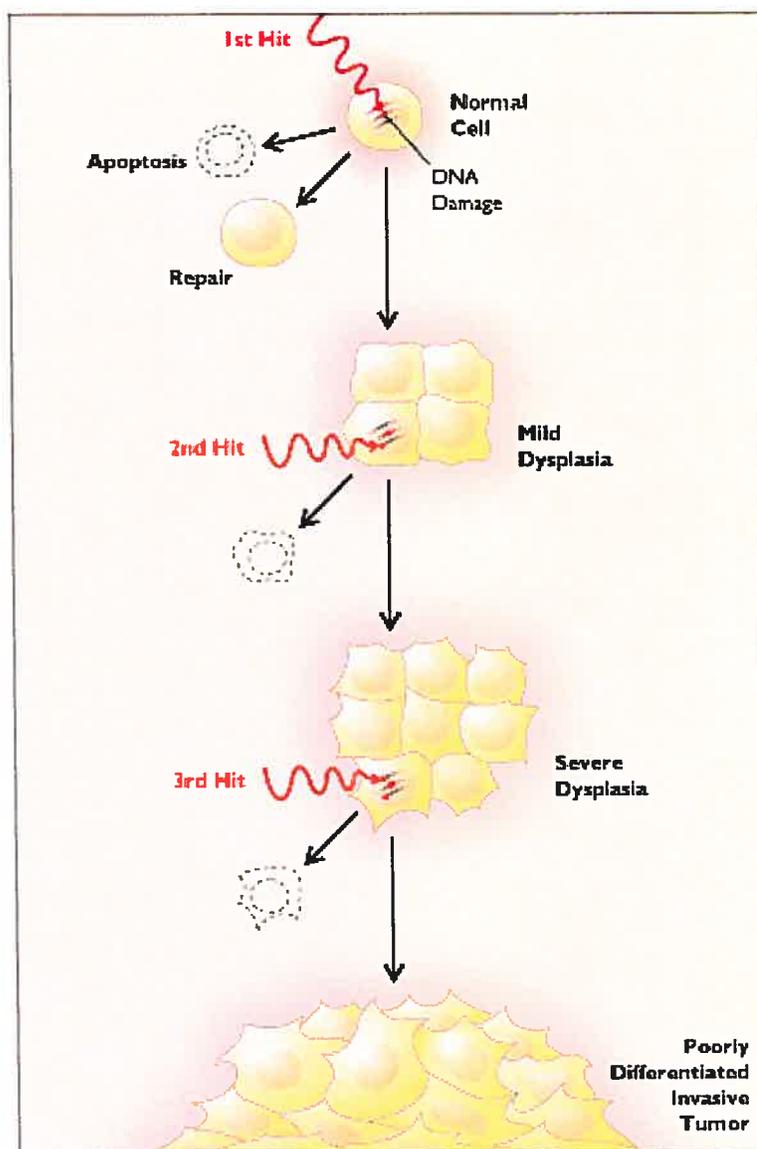


Figure 2: Processus multi-étapes pour le développement d'un cancer. Suite à un premier dommage à l'ADN, la cellule peut mourir, être réparée ou encore survivre. Si la cellule survie, elle transmettra le dommage à ces descendantes et celles-ci pourront subir d'autres dommages par exemple dans des proto-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur qui peuvent faire en sorte que la cellule a un avantage de croissance ou de survie. Au cours des événements, la cellule peut présenter une combinaison d'avantages qui feront en sorte qu'il y aura formation d'une tumeur.

## 1.3 Leucémie

La leucémie est à l'origine de 26 % des nouveaux cas et de 30 % des décès dus au cancer chez les enfants, constituant ainsi le cancer le plus répandu et le plus meurtrier chez les enfants (Statistiques canadiennes sur le cancer, 2005). Une leucémie se produit lorsqu'il y a une prolifération incontrôlée et une accumulation de cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse, le sang périphérique et d'autres organes. Les leucémies peuvent être divisées en deux types majeurs basés sur la morphologie des cellules impliquées. La leucémie lymphoblastique, implique des lymphocytes, alors que pour la leucémie myéloblastique ce sont des cellules myéloïdes. De plus, une leucémie peut être aiguë ou chronique. Les leucémies aiguës sont caractérisées par une évolution clinique rapide où les cellules impliquées sont bloquées à un stade précoce de leur différenciation et sont donc immatures. Au contraire, les leucémies chroniques sont caractérisées par une évolution clinique généralement longue (plusieurs années) et la prolifération ou l'accumulation de cellules originaires de la moelle osseuse mais à un stade avancé, voire mature. Les leucémies chroniques sont par contre beaucoup plus rares chez les enfants et dépassent rarement 4% des cas de leucémies diagnostiquées (Lightfoot and Roman 2004).

### 1.3.1 Leucémie lymphoblastique aiguë (LLA)

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est le cancer de l'enfant le plus fréquent et représente environ 80% des cas de leucémies diagnostiquées chaque année (Sawinska and Ladon 2004). Elle se produit lorsqu'une cellule B ou T immature devient génétiquement modifiée et prolifère de façon dérégulée. Ceci produit une expansion clonale de cellules bloquées à un niveau indifférencié et donne lieu à une population uniforme de blastes leucémiques. La moelle osseuse ne produit donc plus suffisamment de globules rouges, de leucocytes et de plaquettes, ce qui crée une anémie et une susceptibilité accrue aux infections sévères. Heureusement, cette leucémie montre un taux de guérison élevé, puisque environ 80% des enfants et des adolescents atteints de

leucémie lymphoblastique aiguë vivent encore cinq ans après le diagnostic (Carroll, Bhojwani et al. 2003; Pui, Schrappe et al. 2004).

Comme dans la plupart des cancers, l'apparition de la leucémie est due à une combinaison de l'interaction gène-environnement. Par contre, dans le cas des leucémies pédiatriques, le temps d'exposition à l'environnement extérieur est très court puisque la plus grande incidence a lieu au cours de la période de 2-5 ans. L'aspect génétique est donc important. Les sous-types de leucémies sont d'ailleurs souvent caractérisés par des altérations génétiques telles des mutations ponctuelles, des délétions et des altérations chromosomiques, notamment des translocations et des hyper ou hypodiploïdies (Look 1997) (tableau I). Certains de ces événements génétiques retrouvés dans les leucémies de l'enfant apparaissent *in utero*. L'environnement de l'enfant à ce moment est la mère et l'environnement de la mère peut aussi affecter l'enfant. Par exemple, les réarrangements du gène MLL qui sont retrouvés chez 80% des enfants atteints de ALL ou AML ont été rapportés comme étant influencés par l'exposition de la mère pendant sa grossesse à des agents chimiques qui inhibent la topoisomérase II tels que les bioflavonoïdes ou certains agents chimiothérapeutiques (Strick, Strissel et al. 2000; Alexander, Patheal et al. 2001). Cette inhibition de la topoisomérase II favoriserait des coupures dans le gène MLL et permettrait l'apparition de réarrangements impliquant ce gène comme des translocations qui sont très fréquentes dans les leucémies infantiles.

Tableau I : Les sous-types biologiques majeurs de la leucémie pédiatrique et les changements chromosomiques associés.

Subtype	Cell type involved	Chromosome abnormality	Molecular lesion	Frequency (%)	Functional product
Acute lymphoblastic leukaemia (ALL)	B-cell progenitor-monocytic <sup>a</sup> (infants)	11q23 translocations	<i>MLL-AF4</i> , <i>MLL-ENL</i> , and other fusions	approximately 85 (of infant ALL) approximately 5 (of total ALL)	modified transcription factor <sup>b</sup>
		hyperdiploidy	increased gene dosage	approximately 35 (of B-cell precursor ALL)	unknown
	B-cell precursor	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i> fusion	approximately 20 (of B-cell precursor ALL)	chimeric transcription factor <sup>c</sup>
		t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1</i> fusion	approximately 5 (of B-cell precursor ALL)	chimeric transcription factor
Acute myeloid leukaemia (AML)	T-cell precursor	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL</i> fusion	approximately 5 (of B-cell precursor ALL)	activated kinase
		1q deletion; t(1;14)(p32;q11)	<i>SIL-SCL</i> fusion	approximately 25 (of T-cell precursor ALL)	dysregulated transcription factor ( <i>SCL/TLL1</i> )
	In infants	11q23 translocations	<i>MLL-AF6</i> , <i>-AF9</i> , <i>-AF10</i> , or other fusions	approximately 50 (of infant AML)	modified transcription factor <sup>b</sup>
		t(8;21)(q22;q22)	<i>AML-ETO</i> fusion	approximately 15 (of total AML)	chimeric transcription factor <sup>c</sup>

Adapted from Graves and Wiemels (2003).

<sup>a</sup> This subtype has phenotypic features of both early B-lineage progenitors and monocytes.

<sup>b</sup> MLL may modify chromatin structure and control the expression of key developmental genes (such as *HOX*).

<sup>c</sup> AML-1, which is an important positive transcriptional factor, may be switched to a transcriptional repressor in these fusions (Tenen, 2003; Speck and Gilliland, 2002).

Importé de (Lightfoot and Roman 2004).

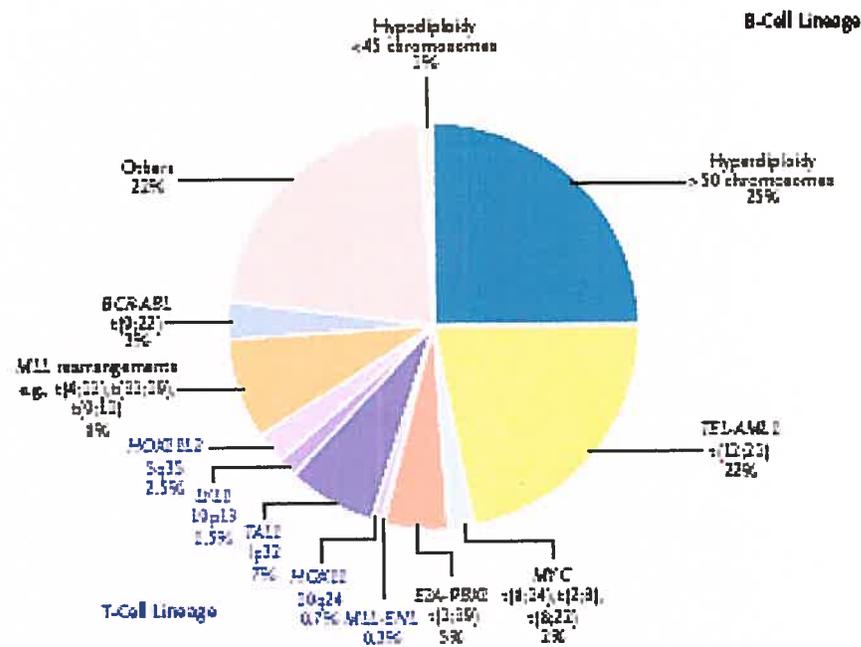
## 2. Translocations

### 2.1 Translocations et pronostique

Des translocations sont souvent retrouvées dans les leucémies et impliquent près de 200 gènes dont les principaux apparaissent à la figure 3 (Pui, Relling et al. 2004). Ces translocations se produisent lorsqu'il y a un bris dans les deux brins d'ADN sur un chromosome et un attachement du segment coupé sur un chromosome différent. La translocation peut causer une malignité selon deux mécanismes principaux : 1) en produisant une activation ou une inactivation transcriptionnelle constitutive d'un gène via une modification de la région régulatrice de celui-ci ou encore 2) en entraînant la production d'une protéine chimérique résultant de la fusion de deux gènes. Cette protéine chimérique peut alors posséder des caractéristiques oncogéniques par rapport aux protéines normales. Par exemple, lorsque les deux gènes impliqués sont des facteurs de transcription, il y a production d'un facteur de transcription chimérique qui peut aller affecter une voie de signalisation d'une manière totalement différente. Les protéines chimériques peuvent avoir une activité constitutive, comme pour BCR-ABL ou une activité dominante négative, comme les anomalies impliquant les gènes du CBF (Nguyen Khac and Bernard 2003).

Dans certains cas, il est possible d'évaluer le pronostic d'un patient grâce à la présence d'une translocation. Par exemple, la présence de la translocation  $t(4;11)(q21;q23)$  est associée avec une survie plus courte (Pui, Gaynon et al. 2002), tandis que la translocation  $t(12;21)(p13;q22)$  est plutôt associé à un bon pronostic (Shurtleff, Buijs et al. 1995). Donc, la présence de translocations peut influencer le choix du traitement utilisé (Biondi, Cimino et al. 2000).

## Children



## Adults

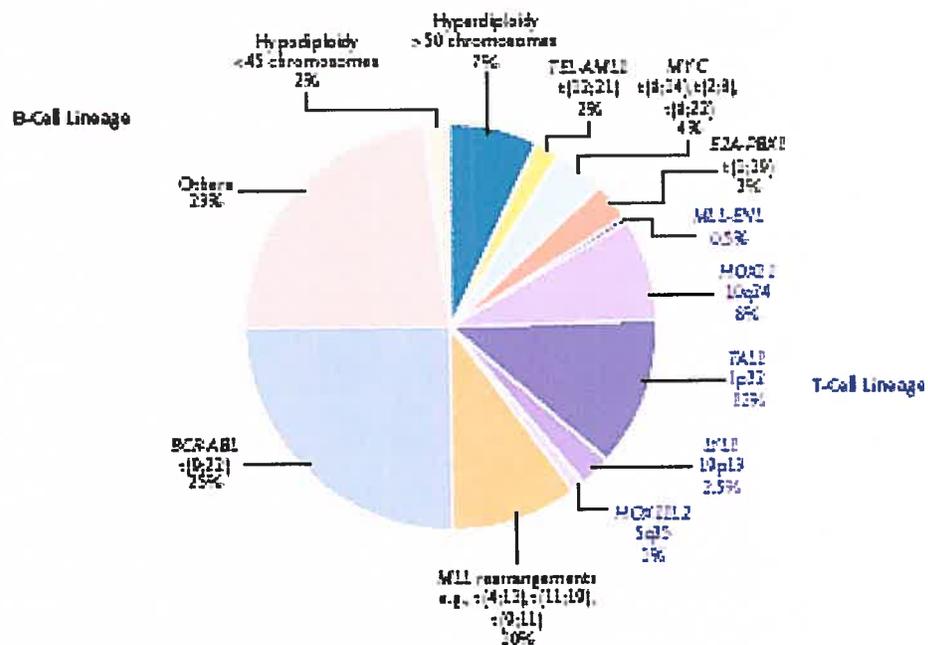


Figure 3: Fréquence des altérations génétiques retrouvées dans la LLA des enfants et des adultes. Les lésions génétiques en mauve sont retrouvées dans les leucémies affectant les cellules T et les lésions en noir dans celles affectant les cellules B.

Importé de (Pui, Relling et al. 2004)

## 2.2 La translocation t(12;21)(p13;q22)

La translocation t(12;21)(p13;q22) est retrouvée presque uniquement dans les cas d'enfants atteints de la leucémie lymphoblastique aiguë de type pré-B avec une fréquence pouvant atteindre jusqu'à 26% des cas, alors qu'elle ne représente que 3% des cas adultes (Wiemels and Greaves 1999). Les enfants qui ont la t(12;21)(p13;q22) présentent habituellement un pronostic favorable, illustré par une meilleure réponse au traitement, particulièrement à la L-asparaginase (Frost, Forestier et al. 2004) et un taux de survie-sans-événement de 89 à 100% (Sawinska and Ladon 2004). Des rechutes peuvent quand même avoir lieu chez ces patients, mais plus tard et avec un plus haut taux de guérison (Rubnitz, Pui et al. 1999).

Une caractéristique intéressante de la t(12;21)(p13;q22) est sa présence *in utero*, où elle peut être détectée à l'aide d'un test direct de 'Blood-Spot' disponible pour identifier la translocation à partir du sang de cordon des enfants (Gale, Ford et al. 1997). Des études chez les jumeaux identiques montrent que si l'un des jumeaux possède la translocation, l'autre la possède aussi et avec exactement la même séquence et le même site de fusion. Donc, la translocation proviendrait d'un clone unique probablement apparu dans un des jumeaux et qui se serait propagé dans l'autre jumeau par anastomose vasculaire à la manière d'une 'métastase' (Ford, Bennett et al. 1998). Par contre, ce ne sont pas tous les enfants porteurs de la translocation qui développent la leucémie. En effet, chez les jumeaux identiques possédant la t(12;21)(p13;q22), la leucémie se développe chez les deux enfants avec une concordance d'environ 10%. Aussi, l'âge de l'apparition de la maladie peut être variable entre les deux jumeaux pouvant aller jusqu'à 10 ans de différence. Cette observation porte donc à croire qu'un événement secondaire à la translocation est requis pour qu'il y ait développement de la leucémie (Greaves and Wiemels 2003). Une autre évidence qui appuie cette possibilité est que la translocation est retrouvée chez environ 1% des enfants à la naissance, ce qui correspond à une fréquence 100 fois plus élevée que l'incidence de leucémie (Mori, Colman et al. 2002). Le développement de la leucémie se fait probablement en plusieurs étapes et la translocation est possiblement un événement précoce dans la leucémogénèse qui fait en

sorte que les cellules sont à un stade préleucémique et nécessitent des modifications supplémentaires pour qu'il y ait développement de leucémie (Knudson 1992; Greaves and Wiemels 2003) (figure 4). La translocation  $t(12;21)(p13;q22)$  permet la production de la protéine chimérique ETV6-AML1. Les deux gènes impliqués, ETV6 et AML1 jouent des rôles importants dans l'hématopoïèse. Un des événements secondaires menant au développement de la leucémie semble être la délétion de l'allèle ETV6 non-transloqué qui se produit dans la grande majorité des cas de patients avec la translocation  $t(12;21)$  (Montpetit, Larose et al. 2004).

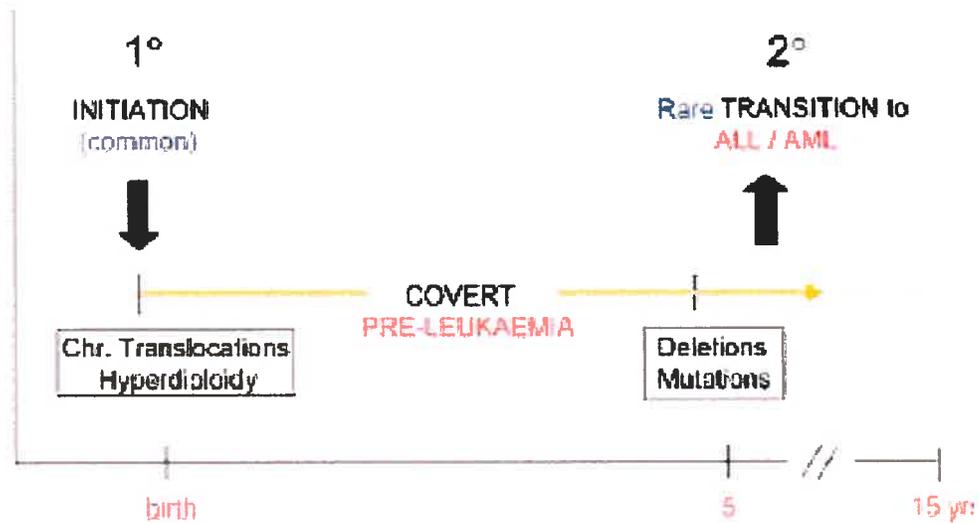


Figure 4 : Modèle à deux étapes pour le développement de la leucémie pédiatrique aiguë. Le développement de la leucémie infantile se ferait en deux étapes : un premier événement comme une translocation à lieu avant la naissance et produit un état pré-leucémique et par la suite un second événement plus rare se produit et donne lieu à la leucémie. Importé de (Zelent, Greaves et al. 2004).

### 2.2.1 Le facteur de transcription AML1

AML1 (Acute Myeloid Leukemia 1 gene), aussi appelé CBF $\alpha$ , est un facteur de transcription qui agit principalement comme activateur de transcription en se liant aux coactivateurs p300 et CBP, mais peut aussi agir comme répresseur dépendant du contexte cellulaire en se liant au corépresseur mSin3A (Kurokawa and Hirai 2003) (figure 5). AML1 se lie à la sous-unité CBF $\beta$  pour former le complexe CBF. Cette liaison au cofacteur CBF $\beta$  permet une plus grande affinité de AML1 avec l'ADN (Meyers, Downing et al. 1993). Le gène AML1 est localisé sur la bande q22 du chromosome 21. La protéine AML1 contient un domaine de 128 amino acides très conservés au cours de l'évolution, appelé domaine runt, qui permet à la fois la liaison à l'ADN et l'hétérodimérisation avec la sous-unité CBF $\beta$  (Kurokawa and Hirai 2003) (figure 6). AML1 est exprimé dans toutes les lignées hématopoïétiques et agit en régulant l'expression de plusieurs gènes spécifiques à l'hématopoïèse tel le macrophage colony-stimulating factor receptor (M-CSFR), l'interleukine-3 (IL3), myeloperoxydase (MPO) et T-cell receptor- $\beta$  (TCR- $\beta$ ) (Tanaka, Tanaka et al. 1995; Uchida, Zhang et al. 1997; Roumier, Fenaux et al. 2003)

Il a été démontré que AML1 n'est pas nécessaire pour l'hématopoïèse primitive qui a lieu dans le sac vitellin et qui produit les érythrocytes nucléés, mais est essentiel pour l'établissement de l'hématopoïèse définitive pendant laquelle il y aura production des cellules hématopoïétiques des différentes lignées lymphoïdes, myéloïdes et érythroïdes (Ito 1999). Cette implication est visible dans les souris déficientes pour AML1 qui procèdent à la phase primitive de l'hématopoïèse sans problème, mais présentent un blocage total de l'hématopoïèse définitive. Il y a chez ces souris une absence complète de cellules érythroïdes, myéloïdes ou lymphoïdes définitives dans le foie foetal (Lacaud, Gore et al. 2002).

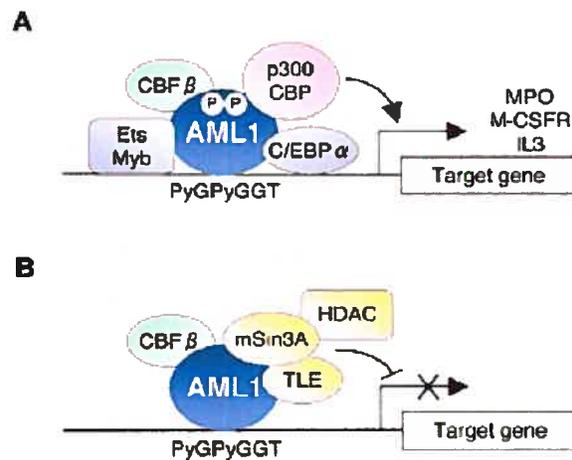
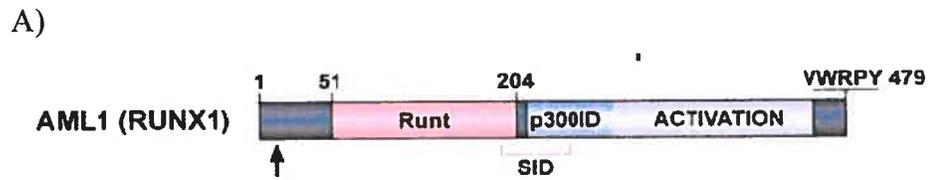


Figure 5 : Formation de complexes transcriptionnels par AML1. A) AML1 produit une activation transcriptionnelle en recrutant des facteurs liant l'ADN et des coactivateurs. B) AML1 agit en tant que répresseur en recrutant les corépresseurs mSin3A et TLE. Importé de (Kurokawa and Hirai 2003).



B)

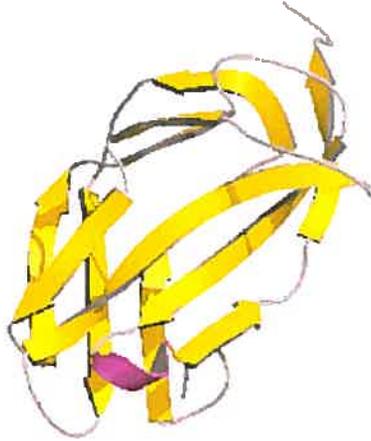


Figure 6: Représentation de la protéine AML1. A) Représentation linéaire de la protéine AML1 montrant les différents domaines; Runt : domaine de liaison à l'ADN; SID: domaine de liaison pour les co-facteurs mSin3A et p300. B) Représentation de AML1 en trois dimensions.

AML1 est remanié par plusieurs translocations observées dans des proliférations hématopoïétiques malignes variées (tableau II). Par exemple : t(12;21), t(8;21), la t(16;21) et la t(3;21). La plupart de ces translocations conduisent à l'expression de protéines de fusion, qui toutes comprennent le domaine de liaison à l'ADN de AML1 (Nguyen Khac and Bernard 2003). Ces protéines chimériques pourraient donc influencer l'expression des cibles de AML1. D'autres types d'altérations génétiques impliquant AML1 sont retrouvés dans les cancers hématologiques. C'est le cas entre autre des mutations bialleliques qui affectent les deux allèles de AML1 et qui sont retrouvées dans le sous-type M0 de la leucémie myéloïde aiguë. Ces mutants agissent comme des dominants négatifs puisqu'ils sont en mesure de lier la protéine CBF $\beta$ , mais sont incapables de lier l'ADN (Osato et al.). Certains types de leucémies sont plutôt associés à une amplification du gène AML1. Les enfants atteints de la trisomie 21 par exemple ont jusqu'à 20 fois plus de chances de développer une leucémie lymphoblastique aiguë que les personnes normales (Berger 1997).

Tableau II: Différentes translocations impliquant le gène AML1.

Translocation	Partenaire	Maladies associées	Références
t(1;21)(p32;q22)	-	AML-M4	Cherry et al. ([2001])
t(1;21)(p36;q22)	<i>PRDM16</i>	t-AML	Roulston et al. ([1998]); Hromas et al. ([2000]); Sakai et al. ([2005])
t(2;21)(p11.2;q22)	-	AML-M1	Richkind et al. ([2000])
t(3;21)(q26;q22)	<i>EAP, MDS1, EVI1</i>	CML-BC/t-MDS	Nucifora et al. ([1994])
t(4;21)(q28;q22)	<i>FGA7</i>	T-cell ALL	Mikhail et al. ([2002b]); Mikhail et al. ([2004])
t(5;21)(q13;q22)	-	AML-M4/CMML	Roulston et al. ([1998]); Liu et al. ([2004])
t(8;21)(q22;q22)	<i>ETO (MTG8)</i>	AML-M2	Miyoshi et al. ([1993])
t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL (ETV6)</i>	B-lineage ALL	Golub et al. ([1995]); Romana et al. ([1995])
t(12;21)(q12;q22)	<i>Copine VIII</i>	AML-M2	Ramsey et al. ([2003])
t(12;21)(q24;q22)	-	AML	Roulston et al. ([1998])
t(14;21)(q22;q22)	-	t-AML	Roulston et al. ([1998])
t(15;21)(q22;q22)	-	t-MDS	Roulston et al. ([1998])
t(16;21)(q24;q22)	<i>MTG16</i>	MDS/AML	Gamou et al. ([1998])
t(17;21)(q11.2;q22)	-	t-AML	Roulston et al. ([1998])
t(18;21)(q21;q22)	-	MDS	Hromas et al. ([2000])
t(19;21)(q13.4;q22)	<i>AMP19</i>	AML	Hromas et al. ([2000])
t(20;21)(q13.1;q22)	-	AML	Richkind et al. ([2000])
t(X;21)(p22;q22)	<i>PRDX4</i>	AML-M2	Zhang et al. ([2004])
t(X;21)(p22.3;q22)	<i>FOG2</i>	MDS	Chan et al. ([2005])

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; BC, blast crisis; CML, chronic myeloid leukemia; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; t, therapy related; -, unidentified partner gene. (Mikhail, Sinha et al. 2005)

### 2.2.2 Le facteur de transcription ETV6

ETV6 (ETS-variant gene 6), aussi appelé TEL, est un membre de la famille des ETS qui agit en tant que répresseur de transcription en se liant aux corépresseurs mSin3A et N-CoR. Les protéines de la famille des ETS contiennent un domaine de liaison à l'ADN ETS qui lie une séquence EBS qui est retrouvée chez plusieurs gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation et la tumorigenèse (Mavrothalassitis and Ghysdael 2000). Malgré tout, peu de gènes appartenant à la famille ETS sont associés avec des maladies humaines. Parmi les gènes montrant une association avec une maladie, ETV6 est le seul qui agit en tant que répresseur de transcription. Très peu de cibles de ETV6 sont connues, parmi celles-ci on retrouve MMP3 (Fenrick, Wang et al. 2000) et BCL-X<sub>L</sub> (Irvin, Wood et al. 2003). ETV6, qui est situé sur la bande 12p13, a d'abord été identifié à cause de son implication dans la translocation t(5;12) et depuis a été retrouvé dans plusieurs autres translocations présentes dans une variété de leucémies (tableau III) et dans certaines tumeurs solides (Rubnitz, Pui et al. 1999). En plus du domaine ETS, ETV6 contient un domaine d'oligomérisation (PNT domain) qui lui permet de former des oligomères nécessaires à son activité de répression (Lopez, Carron et al. 1999) (figure 7). ETV6 est exprimé de façon ubiquitaire et joue un rôle important dans l'hématopoïèse. Il n'est pas nécessaire à l'hématopoïèse dans le foie fœtal, mais est essentiel à l'établissement de l'hématopoïèse dans la moëlle osseuse. Comme les souris déficientes pour ETV6 meurent à l'état embryonnaire, des études ont été faites avec des cellules souches embryonnaires ETV6 <sup>-/-</sup> injectées dans des blastocytes et montrent un défaut dans la transition de l'hématopoïèse du foie foetal vers la moëlle osseuse. Ceci peut être dû à un problème dans la migration des cellules vers la moëlle osseuse ou encore à un problème pour ces cellules à répondre correctement aux signaux et à survivre dans la moëlle osseuse (Wang, Swat et al. 1998).

Certaines évidences portent à croire que ETV6 est un gène suppresseur de tumeur. En effet, dans des cellules NIH3T3 transformées avec Ras, ETV6 ralentit la croissance et augmente l'apoptose (Fenrick, Wang et al. 2000; Irvin, Wood et al. 2003). ETV6 réduit aussi la croissance de tumeur greffée aux souris (Rompaey, Potter et al. 2000). Dans les cellules de leucémie myéloïde K562, la transfection de ETV6 ralentit la

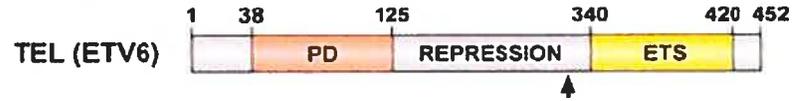
croissance des cellules (Sakurai, Yamada et al. 2003). De plus, ETV6 est délété dans la majorité des cas de LLA ayant la translocation t(12;21) et est le seul gène de la région délétée à être normalement exprimé dans ce type de cellules et à être inactivé sur les deux allèles dans le cas de la leucémie (Montpetit, Larose et al. 2004).

Tableau III : Différentes translocations impliquant le gène ETV6.

<b>Fusion partner</b>	<b>Translocation</b>	<b>Disease</b>	<b>Frequency</b>
PDGFRB	t(5;12)(q31;p13)	CMMoL	Rare
ABL1	t(9;12)(q34;p13)	AML, ALL	Rare [10], [11] and [22]
ABL2	t(1;12)(q25;p13)	AML-M3, -M4, T-ALL	Three cases [12], [13] and [25]
JAK2	t(9;12)(p24;p13)	Pre-B cell ALL, T-ALL	Rare [14] and [15]
NTRK3	t(12;15)(p13;q25)	Congenital fibrosarcoma, mesoblastic nephroma, secretory breast carcinoma, AML	Common in certain rare malignancies and found in some AMLs [16], [30], [31], [32] and [33]
FGFR3	t(4;12)(p16;p13)	Peripheral T-cell lymphoma	One case [17]
SYK	t(9;12)(q22;p12)	MDS	One case [18]
RUNX1	t(12;21)(p13;q22)	ALL	Frequent in childhood ALL
MN1	t(12;22)(p13;q11)	AML and MDS	Three cases [53] and [55]
ARNT	t(1;12)(q21;p13)	AML-M2	One case [57]
MDS1/EV11	t(3;12)(q26;p13)	MDS, CML	Three cases [59]
BTL	t(4;12)(q11-q12;p13)	AML-M0	Several cases [67]
CDX2	t(12;13)(p13;q12)	AML	One case [69]
PAX5	t(9;12)(q11;p13)	ALL	Three cases [71] and [72]
HLXB9	t(7;12)(q36;p13)	AML	Two cases analyzed, up to 20% of childhood AML [74]
MDS2	t(1;12)(p36.1;p13)	MDS	One case [75]
STL	t(6;12)(p13;q23)	B-ALL	One case [77]
ACS2	t(5;12)(q31;p13)	MDS-RAEB AML, AEL	Three cases [79]
TTL	t(12;13)(p13;q14)	ALL	One case [80]
PER1 anti-sense	t(12;17)(p13;p13)	AML	One case [58]

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; BC, blast crisis; CML, chronic myeloid leukemia; CMMoL, chronic myelomonocytic leukemia; Pre-B, precursor B cell; MDS, myelodysplastic syndrome  
Addapté de (Bohlander 2005).

A)



B)



Figure 7: Représentation de la protéine ETV6. A) Représentation linéaire de la protéine ETV6 montrant les différents domaines; PD : domaine d'oligomérisation; REPRESSION : domaine de liaison pour les co-répresseurs; ETS : domaine de liaison à l'ADN. B) Représentation de ETV6 en trois dimensions.

### 2.2.3 Protéine chimérique ETV6-AML1

La translocation t(12;21)(p13;q22) implique les gènes ETV6 et AML1 puisqu'elle résulte d'une coupure sur le chromosome 12 entre l'exon 5 et 6 de ETV6 et d'une coupure sur le chromosome 21 entre l'exon 1 et 2 de AML1. La partie 5' de ETV6 est liée à la presque totalité du gène AML1 et la protéine chimérique est produite à partir du promoteur de ETV6. La protéine ETV6-AML1 est donc constituée d'une région contenant les domaines de répression et d'oligomérisation de ETV6 et des domaines de liaison à l'ADN et de transactivation de AML1 (Sawinska and Ladon 2004) (figure 8).

L'implication de la protéine chimérique ETV6-AML1 dans le développement de la leucémie n'est pas encore connue, ni son effet sur l'hématopoïèse. Par contre, deux hypothèses principales ont été proposées quant à l'impact de cette protéine sur la régulation des gènes dans la cellule. D'abord, elle pourrait être en mesure de lier la séquence d'ADN habituellement reconnue par AML1 et au lieu d'agir comme activateur agirait plutôt comme répresseur de transcription en recrutant mSin3A et N-CoR. Elle pourrait donc avoir un effet sur les gènes normalement activés par AML1. Il a d'ailleurs été démontré dans le cas de MDR1 et IL3 que ETV6-AML1 se lie directement sur le site de liaison pour AML1 et qu'elle est en mesure de réprimer l'expression de ces gènes (Uchida, Downing et al. 1999; Asakura, Uchida et al. 2004). Aussi, elle pourrait empêcher le bon fonctionnement de ETV6 en formant un hétérodimère via sa liaison avec le domaine d'oligomérisation (Sawinska and Ladon 2004). Puisque l'allèle non-transloqué de ETV6 est délété dans la majorité des cas de LLA avec t(12;21), cette dernière hypothèse s'applique moins bien à ETV6 spécifiquement. Par contre, elle pourrait peut-être expliquer la perte de ETV6 qui pourrait justement être due à cette oligomérisation qui inactiverait ETV6 et le rendrait inutile. Aussi, cette hypothèse de dominant négatif par oligomérisation peut s'appliquer à d'autres membres de la famille ETS qui possèdent le domaine PNT.

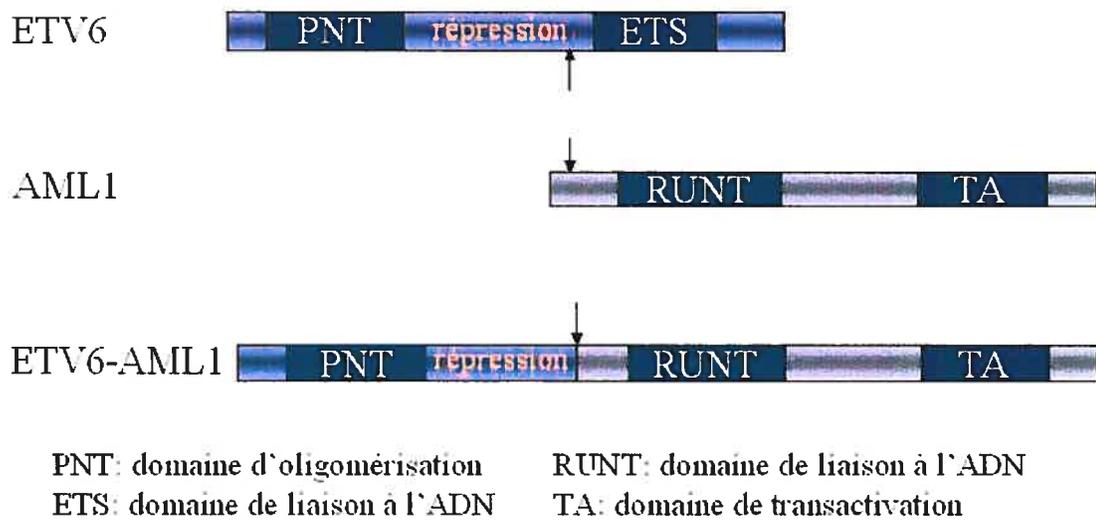


Figure 8 : Représentation des protéines ETV6, AML1 et de la protéine chimérique ETV6-AML1 produite suite à la translocation t(12;21). La protéine chimérique ETV6-AML1 est constituée de la partie N-terminale de ETV6 et la partie C-terminale de AML1. Elle contient le domaine d'oligomérisation de ETV6 ainsi que son domaine de répression, mais le domaine de liaison à l'ADN de AML1 ainsi que son domaine de transactivation. Les flèches représentent le site de fusion entre les deux gènes.

Des études chez la souris ont été faites pour tenter de comprendre l'impact de ETV6-AML1 dans les cellules. Il a été démontré que les souris transgéniques exprimant ETV6-AML1 ne développent pas de leucémie (Tsuzuki, Seto et al. 2004). Cette observation peut être due au niveau de protéine qui n'était peut-être pas représentative du niveau d'expression chez les patients ou encore à l'absence de mutations ou d'événements secondaires. D'autres études se sont plutôt penchées sur la participation de ETV6-AML1 dans une étape pré-leucémique en introduisant ETV6-AML1 par transduction dans des cellules hématopoïétiques progénitrices de foie foetal de souris et en regardant leur différenciation (Morrow, Horton et al. 2004). Ils ont présenté la première évidence que ETV6-AML1 amène une altération dans l'hématopoïèse normale et ce dans les cellules B sans affecter les cellules myéloïdes. Les cellules pré-B obtenues semblent être prédisposées au développement de la leucémie puisqu'elles se multiplient et montrent une croissance à long terme en présence de facteurs de croissance. Fischer et al ont aussi démontré une perturbation dans la maturation des cellules B et un nombre très bas de cellules B matures exprimant ETV6-AML1 due à un problème de prolifération de ces cellules (Fischer, Schwieger et al. 2005).

### **3. Détection de gènes ciblés par un facteur de transcription**

La régulation de l'expression génique se fait entre autre par la liaison de séquences spécifiques au niveau de la région promotrice des gènes. Ces sites de liaison sont liés par des facteurs de transcription qui vont influencer la régulation de l'expression du gène. L'expression peut être mesurée en quantifiant les niveaux d'ARNm ou de la protéine correspondante. Plusieurs méthodes sont utilisées pour étudier cette régulation d'expression des gènes (tableau IV). Des études *in silico* permettent de prédire la liaison de certains facteurs de transcription en identifiant des sites consensus dans la région promotrice des gènes. La présence d'un site putatif de liaison pour un facteur de transcription donné permet de suggérer un rôle pour ce dernier dans la régulation du gène étudié. L'interaction protéine-ADN peut aussi être étudiée à l'aide d'analyses *in vitro* comme le retard sur gel, les études d'empreinte à la DNase ou encore les essais fonctionnels à l'aide d'un gène rapporteur. Le retard sur gel consiste à mettre en contact

un fragment d'ADN avec un extrait protéique et à les faire migrer sur un gel d'acrylamide non-dénaturant. La liaison de la protéine avec l'ADN va engendrer un retard de la migration du complexe par rapport à la migration de l'ADN seul. Cette technique permet aussi de voir si des protéines différentes lient le fragment, car les complexes différents vont migrer à des hauteurs différentes. La technique d'empreinte à la DNase consiste elle aussi à mettre en contact une protéine d'intérêt avec un fragment d'ADN, mais dans ce cas, la détection de l'interaction ADN-protéine se fait à l'aide d'une digestion à la DNaseI. En effet, l'enzyme n'aura pas accès à la région liée par la protéine et le site de liaison sera visible lors de la migration des fragments sur un gel d'agarose. Pour ce qui est des essais fonctionnels à l'aide d'un gène rapporteur, il s'agit de co-transfecter un vecteur contenant le gène codant pour la protéine d'intérêt et un deuxième vecteur contenant la région promotrice d'un gène cible en amont d'un gène rapporteur comme la luciférase. Il sera alors possible de voir une modulation dans l'expression de la luciférase en présence ou absence de la protéine à l'étude. Des analyses *in vivo* sont aussi possibles comme les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Ces expériences permettent d'étudier l'interaction protéine-ADN dans un contexte *in vivo* puisque la fixation de l'interaction se fait *in vivo* et par la suite il y a élution des fragments d'ADN qui étaient en contact avec la protéine d'intérêt. Il est aussi possible d'hybrider le produit d'une immunoprécipitation sur une puce contenant des séquences de région promotrices et donc de voir les interactions à grande échelle (ChIP on Chip). Il existe aussi depuis quelques années des méthodes permettant de faire des études de l'expression de gènes en regardant le profil transcriptionnel global d'une cellule. Les micropuces par exemple comprennent plusieurs gènes sur une même puce et permettent d'étudier simultanément l'expression de milliers de gènes. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, nous avons privilégié la stratégie de l'expérience globale.

Tableau IV : Différentes méthodes permettant la détection d'un gène ciblé par un facteur de transcription

	<b>Approche ciblée</b>	<b>Approche globale</b>
<b><i>In silico</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prédiction des sites de liaisons pour des facteurs de transcription</li> </ul>	
<b><i>In vitro</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retard sur gel</li> <li>• Super shift</li> <li>• Empreinte à la DNase</li> <li>• Essais fonctionnels à l'aide d'un gène rapporteur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Micropuces</li> </ul>
<b><i>In vivo</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chromatine immunoprécipitation (ChIP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ChIP on Chip</li> </ul>

Les méthodes *in silico* correspondent à des prédictions informatiques, celles *in vitro* se produisent dans un contexte 'artificiel' et les méthodes *in vivo* ont lieu dans le contexte original de la cellule. Une approche ciblée permet l'étude d'un nombre restreint de gènes, tandis qu'une approche globale permet l'étude de milliers de gènes simultanément.

### 3.1 Micropuces

Le séquençage du génome humain catalyse le développement de nouveaux outils afin de tirer profit de cette information et pour générer de nouvelles connaissances. C'est le cas entre autre des micropuces à ADN qui peuvent être utilisées à plusieurs fins comme par exemple pour comparer le profil d'expression de deux types de cellules (tumeur maligne versus tissus normaux), pour tester l'effet sur le profil transcriptionnel global de l'induction d'une protéine ou du traitement avec un agent pharmaceutique ou encore pour étudier le comportement d'une voie de signalisation complexe et pour trouver des nouvelles cibles pouvant servir à développer de nouveaux agents thérapeutiques. Cette technique est particulièrement utilisée dans le cadre de la leucémie, du cancer du sein, des ovaires, du colon, du poumon et de la prostate (Clarke, et Poele et al. 2001). Les micropuces peuvent être faites au laboratoire en fixant sur un support des oligonucléotides ou de l'ADNc ou encore être accessibles commercialement (Affymetrix Santa Clara, CA, USA) (figure 9). Les micropuces commerciales sont constituées de milliers d'oligonucléotides synthétisés directement sur un support et représentent des milliers de gènes différents. Ceci permet l'hybridation d'un échantillon avec une très grande quantité de gènes à la fois. Les micropuces sont avant tout un outil de criblage et donnent une vision globale du profil transcriptionnel d'un type cellulaire ou d'une condition particulière. Elles peuvent permettre aux chercheurs de découvrir des voies de signalisation qui n'étaient pas soupçonnées d'être impliquées dans le processus ou encore d'étudier une voie de signalisation d'intérêt et de voir la régulation de tous ces gènes simultanément.

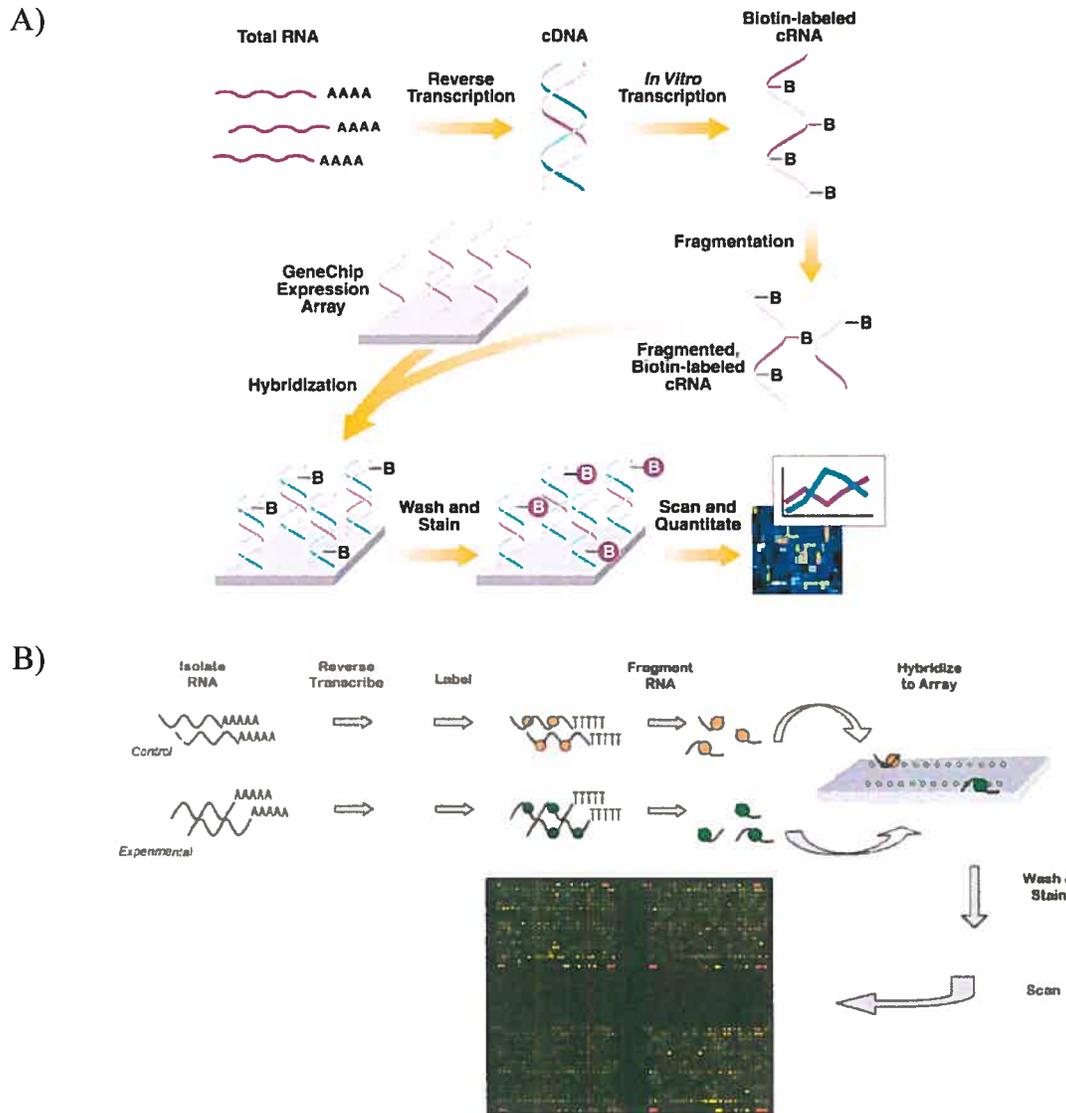


Figure 9: Principe de l'hybridation aux micropuces. A) Hybridation à une micropuce commerciale de type Affymetrix. L'ARN messager est reverse-transcrit et marqué à la biotine. L'ADNc est alors fragmenté et hybridé à la micropuce. Chaque expérience doit être hybridée à une micropuce distincte. La micropuce contient au préalable des milliers d'oligonucléotides synthétisés directement sur le support solide. L'intensité du signal est scannée et quantifiée. B) Dans le cas des micropuces faites au laboratoire, l'approche est similaire, mais les échantillons peuvent être marqués avec deux fluorochromes différents, le cy3 et le cy5. Il est donc possible de d'analyser deux échantillons sur une même puce. Aussi, avec ce type de puces, les oligonucléotides sont hybridés au support solide et non-pas synthétisés directement sur celui-ci.

Les études avec micropuces sont sujettes à diverses sources de variabilité autant d'ordre biologique (ex : variabilité génétique), d'échantillonnage (ex : contamination par des tissus adjacents) que technique (ex : temps et conditions d'hybridation) (Novak, Sladek et al. 2002). Il est donc important de diminuer autant que possible les sources de variabilité en choisissant bien le type d'échantillon utilisé et en contrôlant soigneusement les conditions d'expérimentation. La réplication des expériences est aussi très importante pour diminuer l'impact de la variabilité sur les résultats.

Un autre défi dans l'utilisation des micropuces est le traitement statistique d'une matrice générant un grand nombre de données, mais un faible nombre d'explication. Il faut donc bien travailler les données pour en faire ressortir les informations importantes. Une telle stratégie requiert un triage des données basé sur des outils statistiques rigoureux afin de diminuer l'impact du bruit de fond sur les données. Plusieurs outils permettent de diminuer cet impact, comme par exemple l'utilisation de réplicas pour vérifier la variabilité de l'expression d'un même gène, avoir recours à la normalisation des données pour pouvoir comparer les résultats entre eux, utiliser un test statistique comme un ANOVA pour estimer le changement dans l'expression d'un gène et se fixer un seuil minimal pour qu'une modulation soit acceptée (Nimgaonkar, Sanoudou et al. 2003). Malgré toutes ces précautions, il faut valider expérimentalement les données par des méthodes plus classiques comme le RT-PCR quantitatif en temps réel ou l'hybridation Northern.

#### 4. Hypothèses

La translocation t(12;21), menant à la protéine chimérique ETV6-AML1, est retrouvée principalement dans la leucémie lymphoblastique aiguë de type pré-B à une fréquence allant jusqu'à 26% des cas. Ces patients présentent habituellement un pronostic favorable. Le chimère ETV6-AML1 est un facteur de transcription qui est capable de lier la région promotrice et de moduler l'expression de certaines cibles de AML1 (Uchida, Downing et al. 1999; Asakura, Uchida et al. 2004). L'impact de cette protéine dans le développement de la leucémie est encore inconnu, mais certaines études suggèrent que cette translocation est un événement précoce dans la leucémogénèse (Morrow, Horton et al. 2004). Nous proposons que l'impact de ce facteur de transcription chimérique dans la leucémogénèse se ferait via la dérégulation de l'expression génique des gènes normalement activés par AML1. Il en résulterait une altération de la régulation normale de l'hématopoïèse. Il est donc important de vérifier l'effet de ETV6-AML1 sur le profil transcriptionnel global pour identifier des cibles et mieux comprendre son rôle dans le développement de la leucémie et la réponse aux traitements.

## 5. Objectifs du projet

L'objectif général du projet est :

1. Identifier et caractériser des gènes ciblés par le chimère ETV6-AML1 afin de reconstruire le réseau de régulation de ce dernier.

Les objectifs spécifiques du projet sont :

1. Évaluer l'impact de l'expression de ETV6-AML1 sur le profil transcriptionnel global à l'aide du modèle cellulaire inductible HeLa TetON et de l'hybridation aux micropuces.
2. Identifier et valider des gènes ciblés par le facteur de transcription chimérique ETV6-AML1.

Ceci aura comme retombée l'identification des voies de signalisation importantes modulées suite à l'expression de ETV6-AML1.

## **Chapitre II**

### **- Matériel et méthodes -**

## 1. Approche expérimentale

L'approche expérimentale est présentée sous forme de schéma à la figure 10. Brièvement, des clones stables inductibles pour ETV6-AML1 ont été mis au point.; l'ARN a été recueilli après différents temps d'induction et hybridé à des micropuces de gènes humains; suite à l'analyse des données, des gènes candidats ont été sélectionnés, validés et étudiés chez des patients LLA; les gènes intéressants ont été soumis à des études fonctionnelles à l'aide de la luciférase.

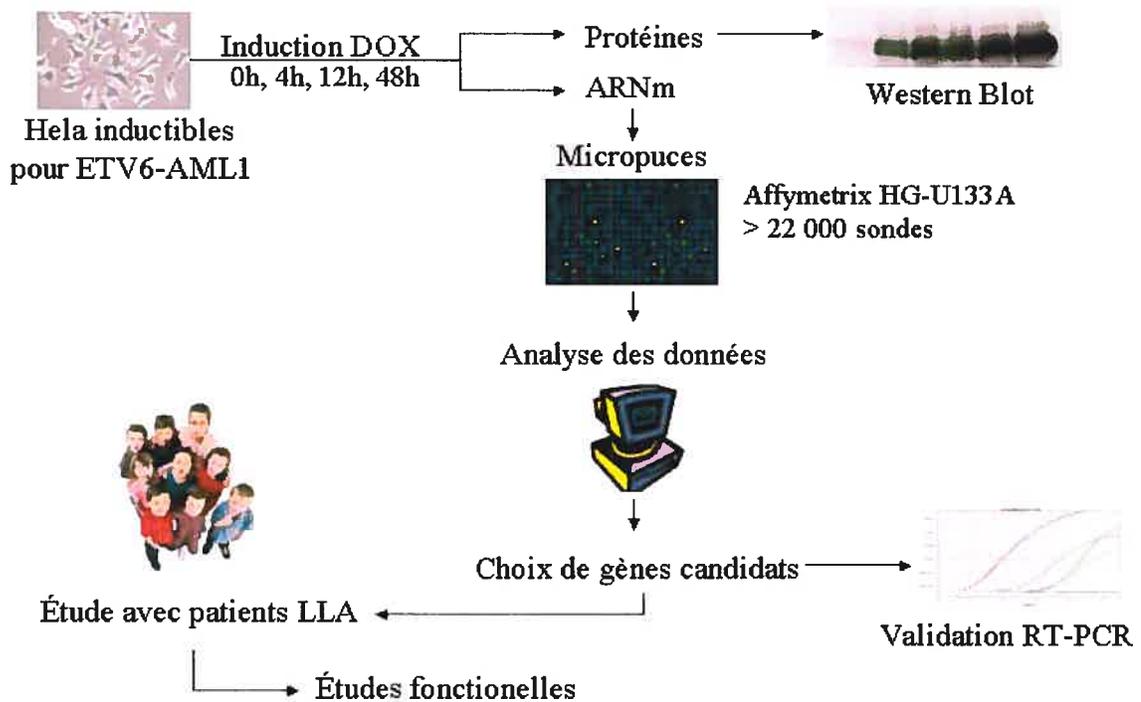


Figure 10: Approche expérimentale

## 2. Clones stables inductibles pour ETV6-AML1

### 2.1 Établissement des clones

#### 2.1.1 HeLa Tet-On

Les cellules HeLa Tet-On (Clontech, Palo Alto, CA, USA) ont été utilisées pour mettre au point les clones stables inductibles pour ETV6-AML1. Ces cellules sont maintenues dans un milieu DMEM avec 10% de sérum de fœtus de bovin (FBS) et 0.1 µg/ml de généticine (G418) jusqu'à l'établissement de clones stables inductibles. Ces cellules ont la particularité d'avoir le système pTet-On déjà intégré dans leur génome. Ce système permet la production de la protéine rTA qui lorsque mise en présence de doxycycline change de conformation et va activer l'élément TRE présent dans le promoteur d'un second vecteur PTRE2hyg qui contiendra le gène d'intérêt (figure 11). Ce gène sera donc induit lors de l'ajout de doxycycline dans le milieu.

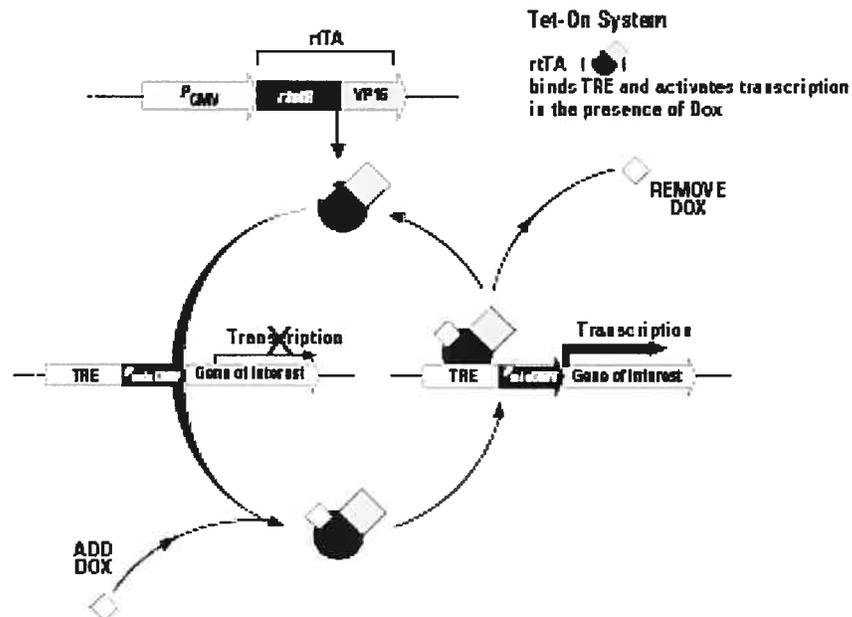


Figure 11 : Principe du système Tet-On. La protéine rTA est produite à partir du vecteur intégré pTet-ON. En présence de doxycycline, la protéine va changer de conformation et être en mesure d'activer le promoteur d'un second vecteur (PTRE2hyg) en se liant à l'élément TRE. Le gène d'intérêt contenu dans le vecteur PTRE2hyg pourra alors être exprimé.

### 2.1.2 Construction

La construction pTRE2hyg/ETV6-AML1 fut obtenu par le sous-clonage, à l'aide de l'enzyme de restriction NotI, de la séquence codante de ETV6-AML1 à partir du vecteur pGEM (généreusement donné par A. Zelent) dans le vecteur PTRE2hyg qui contient le gène de résistance à l'hygromycine (figure 12). L'insertion a été séquencée dans les deux sens pour s'assurer de l'intégrité de la séquence codante.

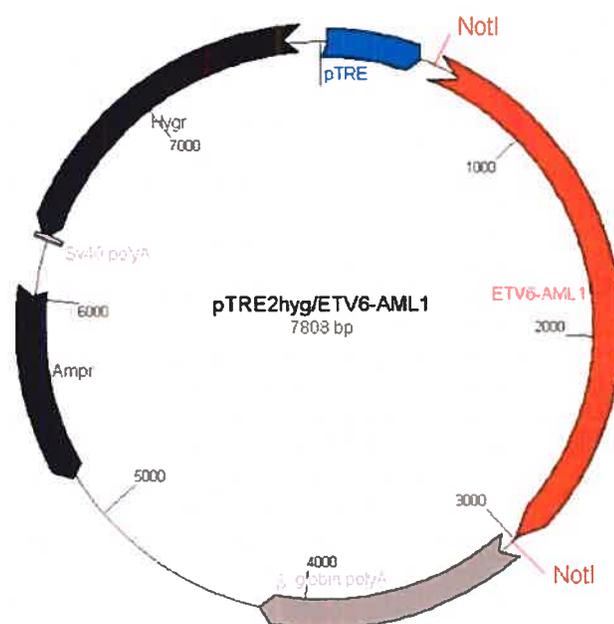


Figure 12 : Vecteur pTRE2hyg/ETV6-AML1. Le vecteur pTRE2hyg/ETV6-AML1 contient les gènes de résistance à l'ampicilline (Ampr) et à l'hygromycine (Hygr). Le gène ETV6-AML1 est sous le contrôle du promoteur pTRE. Construction dessinée à partir programme GENTle version 2.

### 2.1.3 Transfection

Les clones stables ont été générés en transfectant les cellules HeLa Tet-On avec le vecteur PTRE2hyg/ETV6-AML1 par électroporation avec l'appareil Cloning Gun (Tritech Research, Los Angeles, CA, USA). Dix  $\mu\text{g}$  d'ADN a été mis en contact avec  $8 \times 10^5$  cellules en suspension dans 30  $\mu\text{l}$  de DMEM pour une minute à température pièce. Cette suspension a ensuite été aspirée par le pipetrode (Tritech Research, Los Angeles, CA, USA) et soumise à un 'zap' puis déposée dans un puits de plaque de culture 6 puits contenant 3ml de DMEM plus 10% FBS. Deux jours plus tard, la sélection des clones est commencée en transférant les cellules dans un pétri 100mm contenant du DMEM plus 10% FBS, 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de G418 et 0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'hygromycine. Le milieu a été changé chaque 2-3 jours jusqu'à ce que des colonies soient obtenues. Les clones ont ensuite été testés pour l'induction de ETV6-AML1 dans le but de sélectionner ceux qui montrent un meilleur taux d'induction jumelé à un faible bruit de fond. Les mêmes étapes ont été faites avec le vecteur PTRE2hyg vide, c'est-à-dire sans l'insertion ETV6-AML1 comme contrôle négatif (vecteur seul).

### 2.2 Induction des clones stables

L'induction des clones est réalisée en ajoutant 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de doxycycline au milieu de culture pour différents temps d'induction : 0 (non-induit), 4, 12 et 48 heures. Cette expérience a été exécutée en triplicata, soit trois expériences indépendantes pour chacun des temps d'induction. La journée avant l'induction, les cellules sontensemencées à une densité permettant d'avoir une confluence de 70-85% au terme de l'induction. Les cellules seront trypsinisées et divisées en deux, une moitié servant à l'extraction de protéines et l'autre à l'extraction d'ARN.

### **3 Préparation des échantillons pour les micropuces**

#### **3.1 Isolement des protéines**

Les protéines ont été isolées pour vérifier la bonne induction de ETV6-AML1 avant d'utiliser les ARN pour l'hybridation aux micropuces. Pour ce faire, le culot de cellules a été dissout dans le tampon SDN (100mM Tris pH8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% SDS, 0.5% Nonidet P40) contenant des inhibiteurs de protéases (100µg/ml PMSF, 10µg/ml aprotinine et 10µg/ml leupeptine). Ensuite, la solution a été soniquée 4 fois pendant 15 secondes sur glace et centrifugée 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et sera utilisé pour l'expérience d'immunoblots.

#### **3.2 Immunoblots**

Pour vérifier la présence de ETV6-AML1, 200 µg de protéines ont été dilués dans une tampon de charge (1X : 60mM TRIS, 1.7% SDS, 6% glycérol, 100 mM DTT et du bleu de bromophénol), dénaturées à 99°C et migrées sur un gel de polyacrylamide (37.5 :1) de 12,5% SDS et transféré sur une membrane de PVDF. La détection de ETV6-AML1 a été faite en utilisant un anticorps contre la partie N-terminale de ETV6 (généreusement donné par O. Bernard) dilué 1 :2000 dans une solution de TBS 1X, 5% de lait et 0.05% de Tween-20. La révélation a été faite à l'aide du système d'analyse d'immunoblots ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

### **4 Hybridation avec les micropuces**

Les ARN des clones ont été isolées à l'aide du RNeasy Mini Kit (Quiagen, Mississauga, ON, Canada). Les ARN pour les temps d'induction 0 (non-induit), 4, 12 et 48 heures dans le clone ETV6-AML1-13 et pour le vecteur seul ont été hybridés avec des micropuces au Genome Quebec Innovation Center, Université McGill. La procédure complète se retrouve sur le site: <https://genomequebec.mcgill.ca/mpf/info/Old%20labeling%20protocol-last%20version.pdf>.

Pour cette expérience, les puces utilisées contiennent plus de 22 000 gènes humains (HG-U133A, Affymetrix) et possèdent le même numéro de lot afin de diminuer la variabilité d'expression globale. Vingt  $\mu\text{g}$  d'ARN a été reverse-transcrit en cDNA en utilisant une amorce d'oligo-dT contenant le promoteur T7 pour ensuite être transcrit *in vitro* en cRNA avec des ribonucléotides biotinisés. Quinze  $\mu\text{g}$  ont été utilisés pour l'hybridation à la micropuce et celle-ci a été lue avec le scanner Affymetrix GeneChip 3000 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Cette expérience a été faite avec les triplicatas d'ARN pour chacun des temps d'induction.

## **5 Traitement des données de micropuces**

### **5.1 Normalisation**

La normalisation permet de pouvoir comparer les différentes puces entre elles. Les données ont été sujettes à une analyse MAS5 qui permet une normalisation basée sur la moyenne du signal. Ainsi, l'intensité moyenne du signal de chaque puce est normalisé en égalisant cette intensité moyenne à 1000. Il est ensuite possible de comparer la valeur d'une sonde, d'une puce à l'autre.

### **5.2 Analyse ANOVA**

Pour identifier les gènes montrant une modulation d'expression au cours du temps en fonction de la présence de ETV6-AML1, nous avons utilisé le test statistique ANOVA qui permet de comparer des groupes et d'identifier si un des groupes est différent des autres. Dans notre cas, les groupes sont les temps d'induction et nous regardons pour un gène donné s'il y a une différence dans son expression au cours des différents temps. L'ANOVA nous permet d'identifier les gènes montrant une différence d'expression dans au moins un des temps d'induction. Les gènes ayant une valeur de  $p \leq 0.01$  ont été conservés pour la suite de l'analyse.

### **5.3 Niveau de modulation**

Pour les gènes sélectionnés suite à l'ANOVA, nous avons regardé la valeur de leur modulation d'expression. Pour chaque gène nous avons pris la valeur d'expression la plus forte et la plus faible et l'avons comparé à la valeur d'expression du gène après 0 heure d'induction (non-induit). Les gènes montrant une modulation d'expression d'au moins deux fois par rapport à 0 heure ont été conservés pour la suite de l'analyse.

### **5.4 Test t de Student**

Chaque gène sélectionné a été soumis à un test t de Student pour chaque temps d'induction entre l'expression du gène dans le clone ETV6-AML1 par rapport à son expression dans le vecteur seul. Le test t permet de comparer deux groupes (dans notre cas ETV6-AML1 et le vecteur seul) et de déterminer si les groupes sont statistiquement différents. Cette étape est faite pour s'assurer que la modulation observée n'est pas simplement due à l'ajout de doxycycline dans le milieu lors de l'induction. Les gènes montrant une valeur de  $p \leq 0.05$  pour au moins un des temps d'induction représentent donc des cibles potentiellement modulées par ETV6-AML1.

## **6 Sélection des gènes candidats**

### **6.1 Regroupement des gènes**

Les gènes ayant été conservés suite au filtrage statistique ont été soumis à différents regroupements pour vérifier si les gènes ayant un profil d'expression semblable montrent une fonction semblable ou encore des séquences promotrices similaires.

#### **6.1.1 Regroupement selon le profil d'expression**

Les gènes ont été regroupés selon leur profil d'expression à partir des données de micropuces en fonction de leur comportement aux différents temps d'induction de ETV6-AML1. Ils ont été regroupés de manière hiérarchique selon une corrélation de

distance Pearson. Les gènes sont ainsi classés selon la direction de la modulation d'expression et non pas selon la force de la modulation. Plus les gènes sont rapprochés dans l'arbre hiérarchique, plus ils ont un profil d'expression semblable. Les groupes de gènes sont représentés par une couleur spécifique et sont définis selon les points de séparation des différentes branches de l'arbre de regroupement hiérarchique. Le regroupement a été fait avec la suite de programmes GeneLinker Gold version 4.0 (Improved Outcomes Software, Inverary, ON, Canada).

### **6.1.2 Regroupement selon les termes 'Gene Ontology'**

Les gènes ont été regroupés selon les termes de 'Gene Ontology' (GO) compris dans trois champs : la fonction moléculaire, les processus biologiques et les composants cellulaires. Une matrice binaire a été construite, la première composante étant les gènes et la seconde les termes GO, attribuant les codes '1' lorsque le terme correspond au gène et '0' dans le cas contraire. Cette matrice a été utilisée pour créer un regroupement hiérarchique de distance Pearson dans le programme GeneLinker Gold version 4.0 (Improved Outcomes Software, Inverary, ON, Canada). Les gènes partageant plusieurs termes GO sont plus près dans l'arbre hiérarchique.

### **6.1.3 Regroupement selon les sites de liaison prédits pour des facteurs de transcription**

Un arbre hiérarchique avec distance de Pearson a été réalisé à partir d'une matrice binaire construite selon les sites de liaison prédits pour des facteurs de transcription présents dans une région de 1kb en amont du site d'initiation de la transcription. Les sites utilisés sont ceux conservés entre l'homme et la souris, selon la base de donnée TRANSFAC qui permet l'alignement des éléments régulateurs agissant en *cis* et des facteurs de transcription agissant en *trans* des eukaryotes, de la levure à l'homme. Donc, plus les gènes partagent de séquences de liaison pour des facteurs de transcription, plus ils sont près dans l'arbre hiérarchique. Ce dernier a été construit avec le programme GeneLinker Gold version 4.0 (Improved Outcomes Software, Inverary, ON, Canada).

#### **6.1.4 Regroupement selon la similarité de promoteur**

Un dernier regroupement a été fait pour rassembler les gènes selon la similarité de leur séquence promotrice. Pour ce faire, la séquence de 1 kb en amont de l'exon 1 a été soumise au programme Dialign (Morgenstern, Frech et al. 1998) qui permet de faire un alignement de séquences. L'arbre a été construit à l'aide du programme Philip disponible sur le site : <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.

#### **6.1.5 Combinaison des approches et choix des gènes candidats**

Les groupes formés selon le profil d'expression ont une couleur attitrée et sont comparés aux autres regroupements pour déterminer si les gènes d'un même groupe d'expression se retrouvent ensemble selon d'autres critères. Ces gènes partageraient alors plusieurs caractéristiques communes justifiant ainsi une validation de leur expression par une méthode plus classique (RT-PCR quantitatif en temps réel).

### **7 Validation des gènes candidats dans les lignées cellulaires et dans les patients**

#### **7.1 ARN et patients**

La validation du profil d'expression des candidats est vérifiée par la méthode de RT-PCR quantitatif en temps réel. L'ARN utilisé pour la validation est le même que celui utilisé pour l'hybridation avec les micropuces. Par contre, la validation n'est pas fait en triplicata, puisque seulement les ARNs correspondants au répliqua 1 des inductions 0, 4, 12 et 48 heures ont été utilisés pour la validation. L'expression des gènes candidats sera ensuite vérifiée dans l'ARN total de 17 patients ayant eu un diagnostic de LLA de type pré-B par immunophénotypage dans la division d'Hématologie-oncologie de l'Hôpital Sainte-Justine (Montréal, Canada). Les patients ont été sélectionnés pour l'étude en fonction de la présence ou non de la translocation t(12;21). Une corrélation sera faite entre l'expression des gènes cibles et le statut de translocation t(12;21) des patients, ainsi que d'autres critères cliniques.

## 7.2 RT-PCR quantitatif en temps réel

Le PCR quantitatif en temps réel permet de détecter l'ADN amplifié cycle par cycle grâce à la détection d'un fluorochrome; dans notre cas le SYBR Green qui permet la détection des ADN double brins générés lors du PCR. Cela permet une plus grande flexibilité, car il n'est pas nécessaire d'avoir une sonde spécifique au gène comme dans le cas du TaqMan. Par contre, les amorces de PCR doivent être très spécifiques car les produits non-spécifiques vont aussi générer un signal. Il est possible de voir la spécificité de l'amplification grâce à une courbe de dissociation.

### 7.2.1 Transcription inverse

Les ARN ont été soumis à une transcription inverse à 37°C pour 50 minutes dans une réaction de 20µl contenant 500ng d'ARN total, 0.5 mM de chaque dNTPs, 500ng d'oligo dT (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc, Canada), 10mM de DTT, 50mM de TRIS-HCl pH8.3, 75mM de KCl, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 40U de RNase Inhibiteur (Roche, Laval, Qc, Canada) et 200U de transcriptase inverse MMLV (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). La réaction est arrêtée à 70°C suite à une incubation de 15 minutes. L'ADNc produit sera utilisé pour l'amplification sur le PCR quantitatif en temps réel.

### 7.2.2 Choix des d'amorces

Les amorces sont choisies de manière à amplifier uniquement l'ADNc sans amplifier l'ADN génomique qui pourrait être présent dans l'échantillon. Ceci est possible en choisissant des amorces qui chevauchent la jonction entre deux exons ou encore en choisissant des amorces dans deux exons consécutifs mais qui sont séparés par un très grand intron (>2kb). Les fragments ont tous entre 92 et 150 paires de bases. Les amorces sont présentées dans le tableau V.

Tableau V : Amorces utilisées pour le PCR quantitatif en temps réel.

Symbole	Amorce sens <sup>1</sup>	Amorce inverse <sup>1</sup>
BHLHB2	GAGTGGTTTACAAGCTGGTGAG	GCTTGGCCAGATACTGAAGC
CTGF	CCTGGAAGAGAACATTAAGAAGG	CCGTCGGTACATACTCCACA
DUSP1	GGCATTGACTTCATAGACTCC	CTCGTCCAGCTTGACTCGAT
DUSP4	CCTGTGGGACCCACTACAC	GACATTCAACAGAGCCGTGAT
EGFR	GTCTTCCTGATGGGACAGC	ACTCCCCTCCTGAGCTCTCT
F3	CACACCTTACCTGGAGACAAAC	AAAACATCCCGGAGGCTTAG
GADD45B	CTCGGATTTTGAATTTCTCC	GTCACCGTCTGCATCTTCTG
IL11	CGGACAGGGAAGGGTTAAAG	CAGGCGGCAAACACAGTTC
IL8	CGCCAACACAGAAATTATTGTAA	TGAATTCTCAGCCCTCTTCAA
JAG1	ATCGTGCTGCCTTTCAGTTT	GATCATGCCCGAGTGAGAAG
JUN	CTGGGAAGTGAGTTCGCCT	TAATTAAGATGCCTCCCGCA
KLF4	CCCACACAGGTGAGAAACCT	CCCCGTGTGTTTACGGTAGT
PPP1R15A	CCATCTATGTACCTGGAGAGAAGC	CGGAGAAGCGCACCTTTC
PTGS2	TGTCTTGACATCCAGATCACATT	GCTGCTTTTTACCTTTGACAC
SPHK1	TGAACCATTATGCTGGCTATG	GTGCAGAGACAGCAGGTTCA
GAPD	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

<sup>1</sup> : la température d'hybridation utilisée est 62°C pour toutes les amorces.

### **7.2.3 Amplification par PCR quantitatif en temps réel**

L'amplification de l'ADNc a été détectée à l'aide de l'appareil de détection ABI PRISM 7000 (PE Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) dans une réaction de 25 µl contenant 0.25 µl de l'ADNc, 1X PCR master mix SYBR Green (PE Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, Canada) et 0.2 mM de chaque amorces. Les paramètres du PCR sont : 1 cycle à 95°C 10 minutes, suivi de 40 cycles à 95°C 15 secondes et à 62 °C 1 minute. Le gène de référence utilisé est GAPD : les valeurs d'expression des gènes sont rapportées à l'expression de GAPD selon la formule  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Applied Biosystems User Bulletin No.2, P/N 4303859)(Livak and Schmittgen 2001). Chaque PCR a été fait en duplicata.

### **7.3 Expression des gènes cibles par rapport aux données cliniques des patients**

L'expression des gènes cibles dans le matériel de patients est comparée aux données cliniques des patients obtenues par la division d'Hématologie-oncologie de l'Hôpital Sainte-Justine (Montréal, Canada). Le test statistique exécuté est le test U de Mann-Whitney qui permet de vérifier si deux échantillons d'une population ont une position équivalente. Les observations des deux groupes sont combinées et ordonnées, et il leur est attribué un rang. Le nombre de fois où un résultat du groupe 1 précède un résultat du groupe 2 et le nombre de fois où un résultat du groupe 2 précède un résultat du groupe 1 sont calculés et permettent de définir si les groupes sont différents. Le calcul est fait à l'aide du programme SPSS.

## **8 Études fonctionnelles à l'aide du gène rapporteur luciférase**

### **8.1 Constructions**

La région régulatrice d'environ 3kb en amont du site d'initiation de la transcription des gènes cibles a été amplifiée par PCR (tableau VI) et clonée dans le vecteur rapporteur firefly luciférase pGL3-basic (Promega, Madison, WI, USA) qui ne contient pas de promoteur proximal (figure 13). Pour chaque gène, deux clones différents seront utilisés pour la transfection. Aussi, la région de 5 à -175 pb du gène IL3 contenant le site de liaison pour AML1 à la position -138 à -133 a été amplifié par PCR et clonée dans le vecteur rapporteur pour servir à titre de contrôle positif puisqu'il a été démontré comme étant réprimé par ETV6-AML1 (Uchida, Downing et al. 1999). Le vecteur pGL3basic seul a été utilisé comme contrôle négatif. Comme nous comparons la régulation des gènes par rapport à la présence ou l'absence de ETV6-AML1, les vecteurs pcDNA3.1 vide et pcDNA3.1/ETV6-AML1 (exprimant le gène ETV6-AML1) seront aussi utilisés.

Tableau VI : Amorces utilisées lors de l'amplification des régions régulatrices de F3, Jun et IL3 pour les constructions dans le vecteur firefly luciférase pGL3-basic.

Gène	Amorce sens	Position <sup>1</sup>	Amorce inverse	Position <sup>1</sup>	Longueur du fragment (pb)
F3	CAGTGGAAAGGGCTGAAACAT	-2724	GCAGGGGTCTCCATGTCTAC	137	2861
JUN	TAGGAATCGGAACTCTCCTGA	-2601	GCCCGAGCTCAACACTTATC	57	2658
IL3	CCTCCTTGACAAGATGAAGTGA	-234	TCTGAAGAGTTGGCAACAGC	4	238

<sup>1</sup> position par rapport au site d'initiation de la transcription. Les sites négatifs sont situés en amont et les sites positifs en aval. La température d'hybridation utilisée pour les amorces est de 62°C.

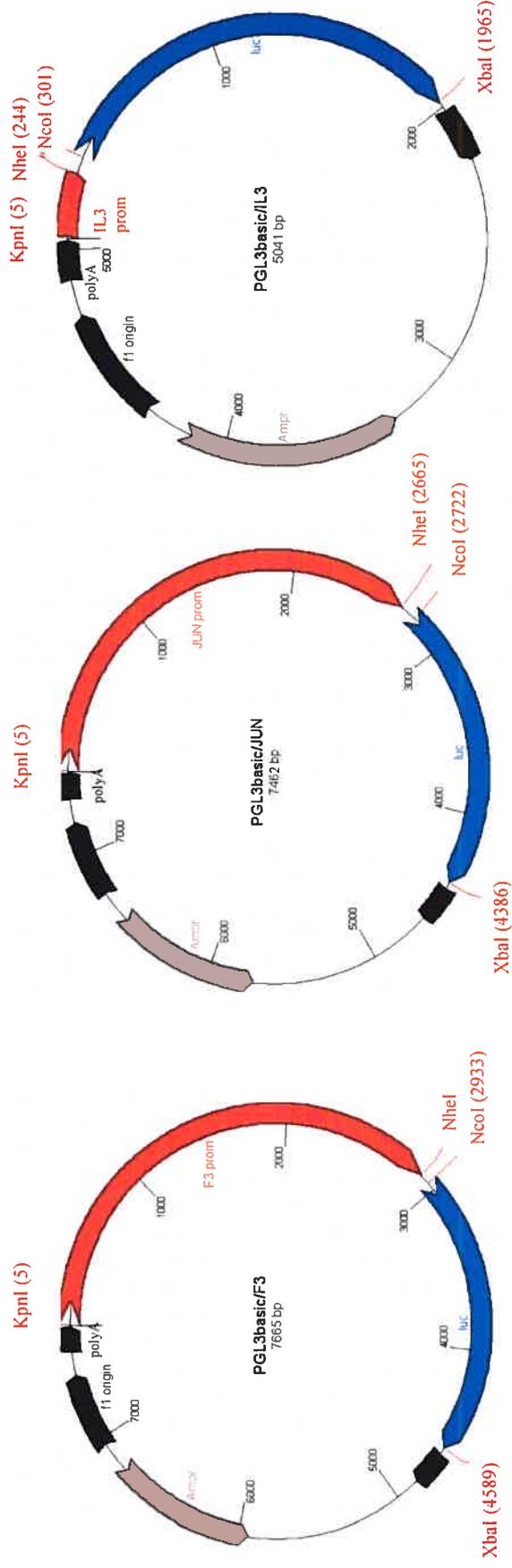


Figure 13 : Constructions utilisées pour l'étude des régions promotrices de F3, Jun et IL3 à l'aide du gène rapporteur luciférase.

Toutes les constructions ont été faites dans le vecteur PGL3 basic contenant le gène rapporteur luciférase (bleu). La région régulatrice des gènes F3, Jun et IL3 (rouge) et a été introduite dans le vecteur à l'aide des enzymes de restrictions KpnI et NheI. Constructions dessinées à partir programme GENTle version 2.

## 8.2 Transfection et détection de la luciférase

Trois lignées cellulaires ont été utilisées pour l'étude avec la luciférase. Les cellules HeLa Tet-ON qui sont des cellules épithéliales provenant d'un carcinome utérin et contenant le vecteur pTet-On, les JEG3 qui sont des cellules de placenta et les cellules HepG2 qui sont des cellules de foie. Idéalement, des lignées cellulaires leucémiques auraient été utilisées pour faire l'étude d'expression pour avoir un contexte cellulaire représentatif de la leucémie. Malheureusement les lignées leucémiques en général ne montrent pas une très grande efficacité de transfection et il n'était donc pas possible de les utiliser pour cette expérience. Les cellules JEG3 et HepG2 ont donc été sélectionnées pour leur grande efficacité de transfection. La transfection a été faite dans les trois lignées cellulaires et a été exécutée dans une plaque de 96 puits. La journée de la transfection, environ 60 000 cellules ont été mises dans chaque puits dans le cas des HeLa et des JEG3 et 80 000 cellules dans le cas des HepG2. La transfection a été faite avec la lipofectamine 2000 selon le protocole du fournisseur (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Dans chaque cas, les cellules ont été co-transfectées avec 100ng des clones pGL3basic/insert d'intérêt, 100ng de la construction pcDNA3.1/ETV6-AML1 ou pcDNA3.1 seul selon le cas et 0.5 ng de pRL-SV40 (rapport 200 :1 avec le vecteur luciférase) pour contrôler l'efficacité de transfection. L'activité de la luciférase est lue après 24 heures et 48 heures avec le système 'Dual-Luciferase Reporter Assay' (Promega, Madison, WI, USA) dans l'appareil Spectra Max 190 luminometer (Molecular Devices). Les valeurs de luciférase ont été divisées par les valeurs de *renilla* pour normaliser les données. La moyenne a ensuite été faite avec les 4 répliques d'une même transfection et l'écart type a été calculé. Pour voir l'impact de ETV6-AML1 sur l'expression de la luciférase, un test t de Student a été exécuté entre les expériences impliquant le vecteur seul (pcDNA3.1) et celles avec pcDNA3.1/ETV6-AML1.

## **Chapitre III**

**- Résultats -**

## 1. Clones stables inductibles pour ETV6-AML1

Afin de mieux comprendre la fonction du facteur de transcription chimérique ETV6-AML1, nous avons opté pour une étude à grande échelle nous permettant de trouver des gènes dont l'expression est modulée par ETV6-AML1 à l'aide de la méthode des micropuces à ADN. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser une lignée cellulaire dans laquelle il est possible d'induire l'expression de la protéine chimérique. Cette lignée possède l'avantage d'offrir la possibilité d'ajuster la quantité de protéine produite en faisant varier la quantité de doxycycline utilisée lors de l'induction. L'utilisation d'une lignée cellulaire permet aussi de diminuer l'hétérogénéité qui aurait été présente si des patients avaient été utilisés pour cette étude. En effet, comme nous utilisons des clones stables, les clones induit et non-induit partagent le même bagage génétique. Le matériel de patients est très précieux et plus rare, il sera utilisé seulement pour valider des cibles potentielles qui semblent intéressantes. La lignée cellulaire HeLa Tet-ON contenant déjà le vecteur pTet-On a été transfectée avec un second vecteur PTRE2hyg/ETV6-AML1 pour induire la protéine chimérique. Suite à la sélection à l'hygromycine, environ 1 clone sur 5 montrait une induction de ETV6-AML1. Le clone HeLaTetON/ETV6-AML1-13 a été sélectionné pour la suite des expériences car il présentait une bonne induction de ETV6-AML1 et un faible taux d'expression lorsque non-induit (Figure 14).

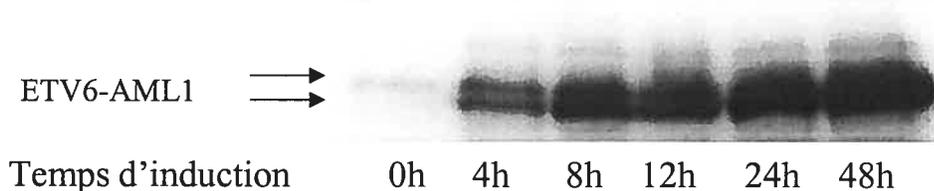


Figure 14 : Immunoblot montrant l'induction de la protéine ETV6-AML1 dans le clone HeLaTetON/ETV6-AML1-13. Immunoblot pour la détection de ETV6-AML1 fait avec des extraits totaux récoltés après 0 – 4 – 8 – 12 – 24 et 48 heures d'induction et un anticorps anti-ETV6. Deux isoformes de ETV6-AML1 sont visibles.

## 2. Traitement des données de micropuces

Le clone ETV6-AML1-13 (EA-13) et le clone contenant le vecteur seul (V1) ont été induits avec de la doxycycline en triplicata pour chacun des temps d'induction (0, 4, 12 et 48 heures). Les protéines et les ARNs ont été extraits. Après une vérification par immunoblot de l'induction de la protéine ETV6-AML1 dans le clone EA-13 et de son absence dans le clone vecteur seul, les ARN ont été utilisés pour préparer les cRNA biotinylisés. L'hybridation a ensuite été faite avec la puce HG-U133A de Affymetrix qui contient au-dessus de 22 000 sondes. Pour s'assurer de la reproductibilité des expériences, les réplicatas ont été comparés les uns aux autres sur un graphique présentant en ordonnée un réplica et en abscisse un autre (figure 15 et 16). Pour faire un triage dans la très grande quantité de résultats obtenus suite à l'hybridation, 4 étapes de sélection ont été exécutées pour identifier les sondes qui ont une modulation d'expression suite à l'induction de ETV6-AML1 (Figure 17).

- 1) Les sondes présentant une expression détectée dans au moins un des triplicatas et au moins un des temps d'induction ont été conservées.
- 2) Un ANOVA a ensuite été exécuté pour voir les sondes qui montraient une différence dans au moins un des temps d'induction, donc qui montrent une modulation d'expression. Les sondes avec une valeur de  $p \leq 0.01$  sont passées à l'étape suivante (tableau XI).
- 3) Par la suite, seulement les sondes montrant une modulation d'expression d'au moins 2 fois par rapport à 0 heure ont été conservées afin de diminuer les chances de faux positifs.
- 4) Finalement, le test t de Student a été fait entre le vecteur seul et ETV6-AML1-13 pour s'assurer que la modulation d'expression des sondes n'était pas due à l'ajout de doxycycline dans le milieu lors de l'induction. Les sondes montrant une valeur de  $p \leq 0.05$  ont été conservées. À la toute fin, 71 sondes correspondaient à ces critères et démontraient une modulation d'expression suite à l'induction de ETV6-AML1. Ces sondes représentent 65 gènes distincts qui font parti de plusieurs activités biologiques différentes (Figure 18) (Tableau VII). Quarante-cinq de ces gènes montrent une augmentation d'expression et 25 une diminution d'expression suite à l'induction de ETV6-AML1. Parmi les catégories représentées par les gènes modulés, certaines sont souvent associées aux cancers, comme par exemple l'apoptose, l'angiogenèse, la croissance cellulaire et la prolifération.

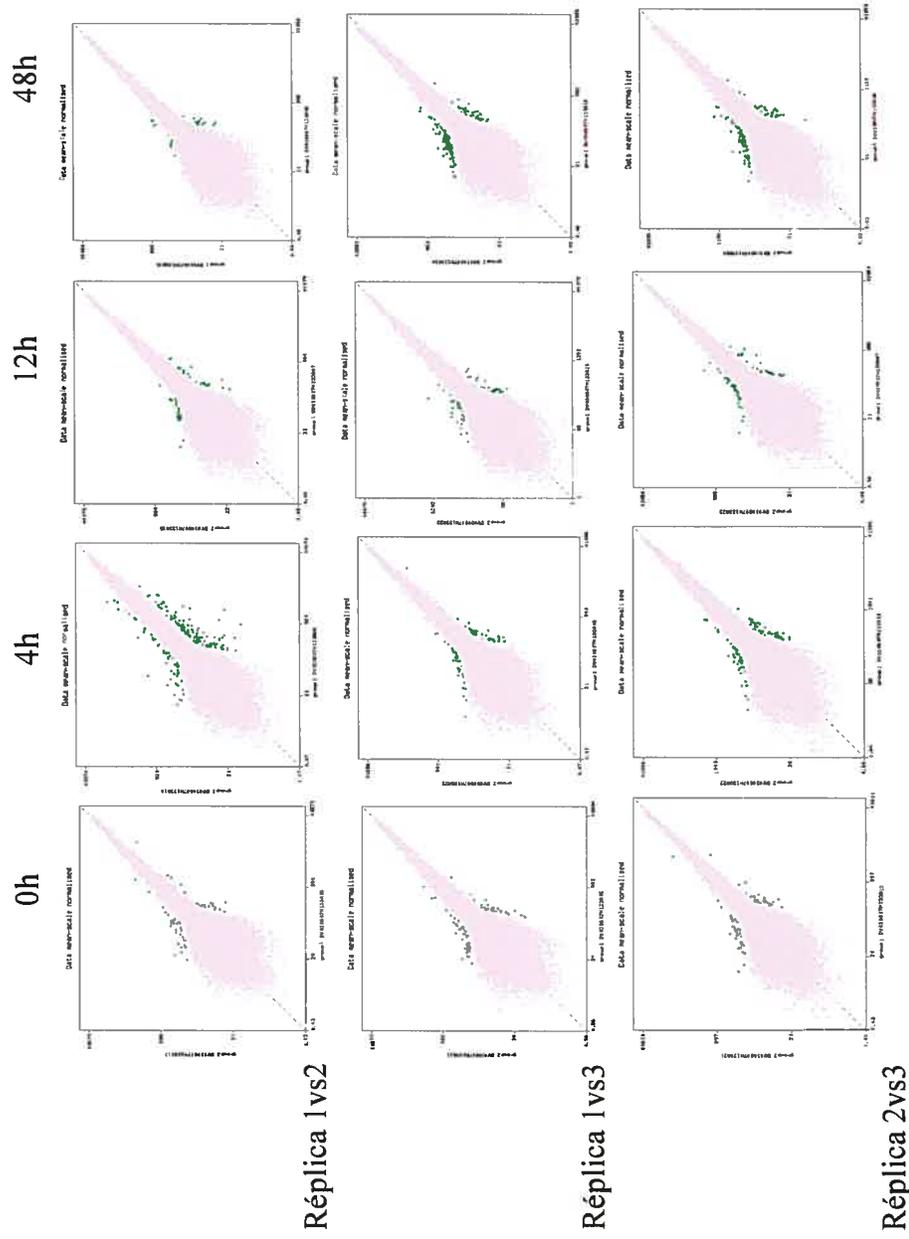


Figure 15: Reproductibilité des données de micropuces entre les réplicas pour les expériences dans le clone ETV6-AML1-13 (EA-13). Les données de micropuces pour un même temps d'induction de ETV6-AML1 ont été comparées les unes aux autres afin de vérifier la reproductibilité des réplicas. Les points verts sont des points qui sortent de la norme.

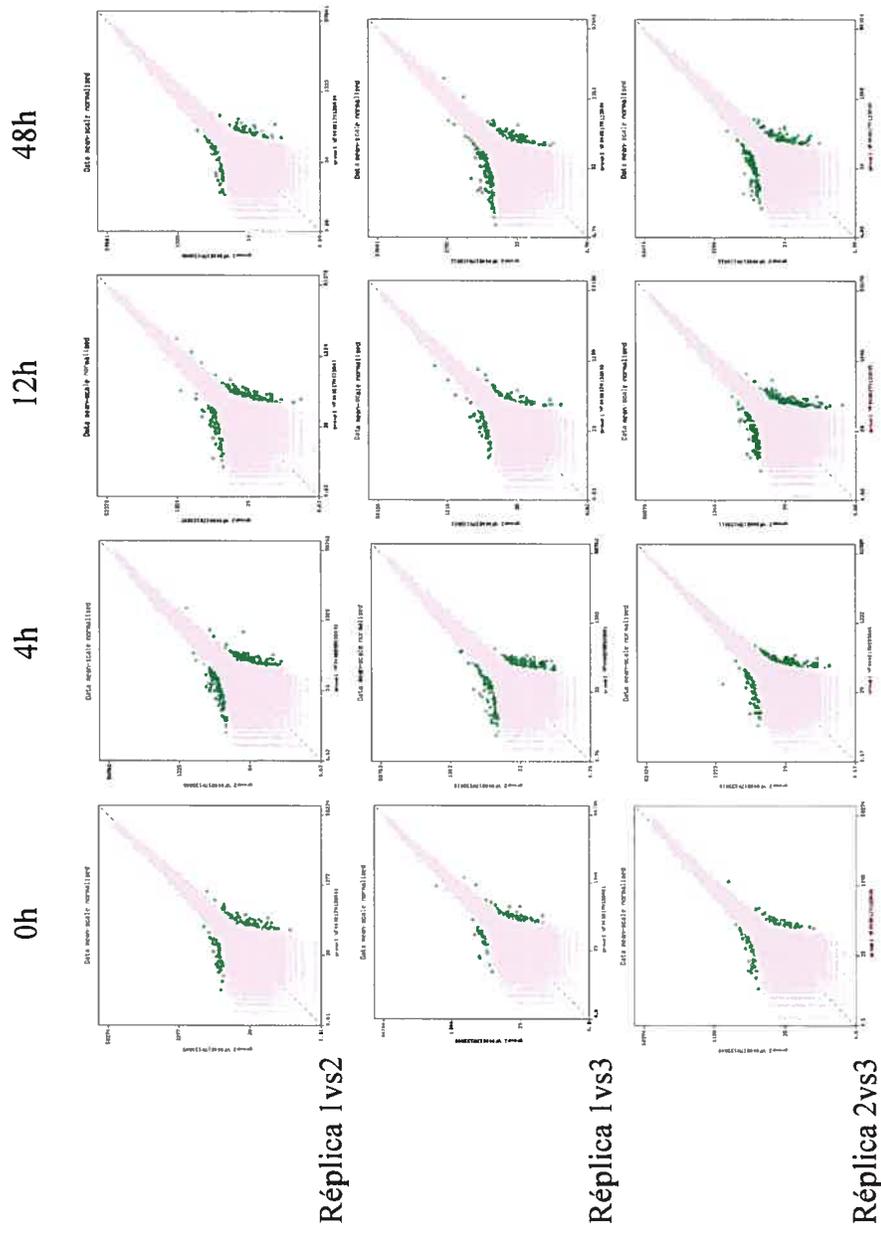


Figure 16 : Reproductibilité des données de micropuces entre les répliques pour les expériences dans le clone vecteur seul (V1).

Les données de micropuces pour un même temps d'induction de ETV6-AML1 ont été comparées les unes aux autres afin de vérifier la reproductibilité des répliques. Les points verts sont des points qui sortent de la norme.

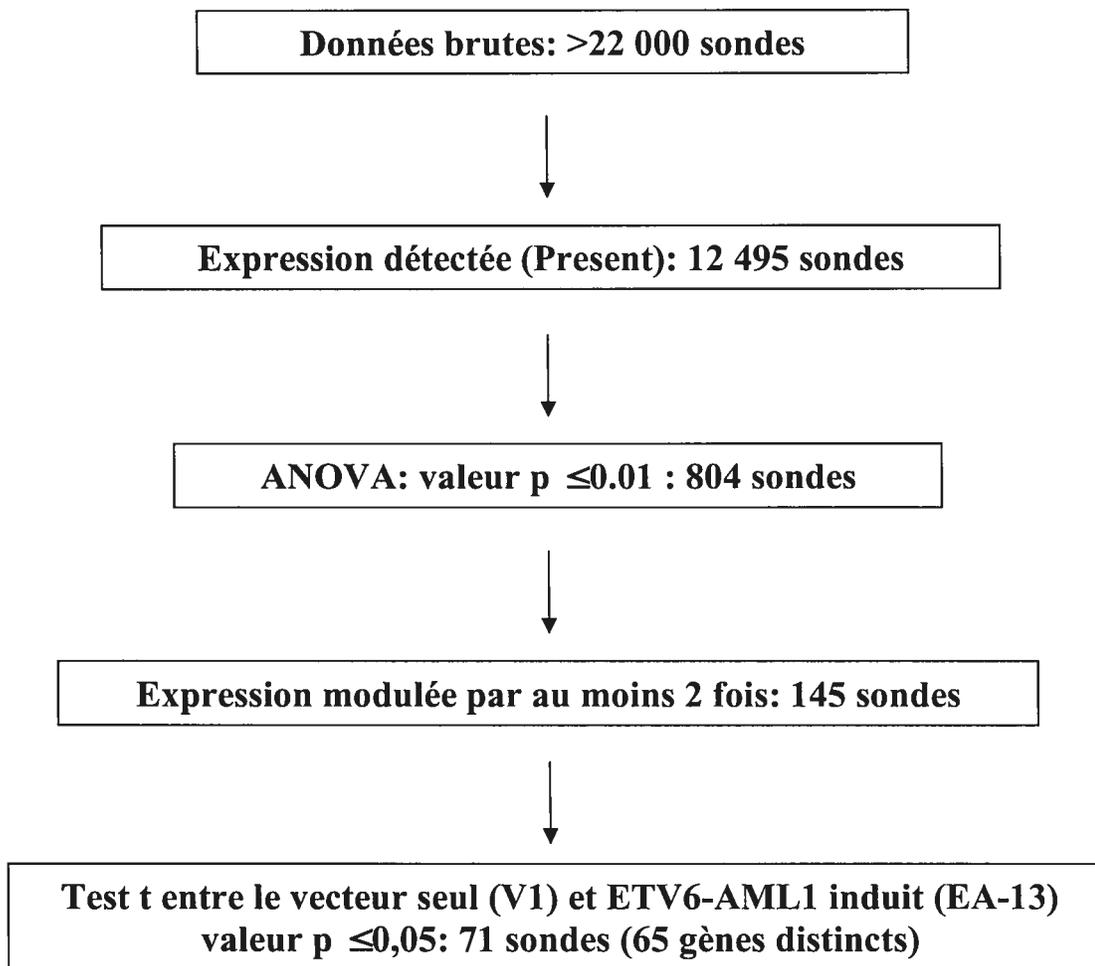


Figure 17 : Traitement des données de micropuces en 4 étapes. La première étape est de conserver les sondes qui ont une expression détectée. Ensuite un ANOVA est effectuée pour conserver les sondes qui ont une modulation d'expression. Cette modulation doit être d'au moins 2 fois. Finalement, l'expression des sondes doit être statistiquement différente de celle dans le vecteur seul.

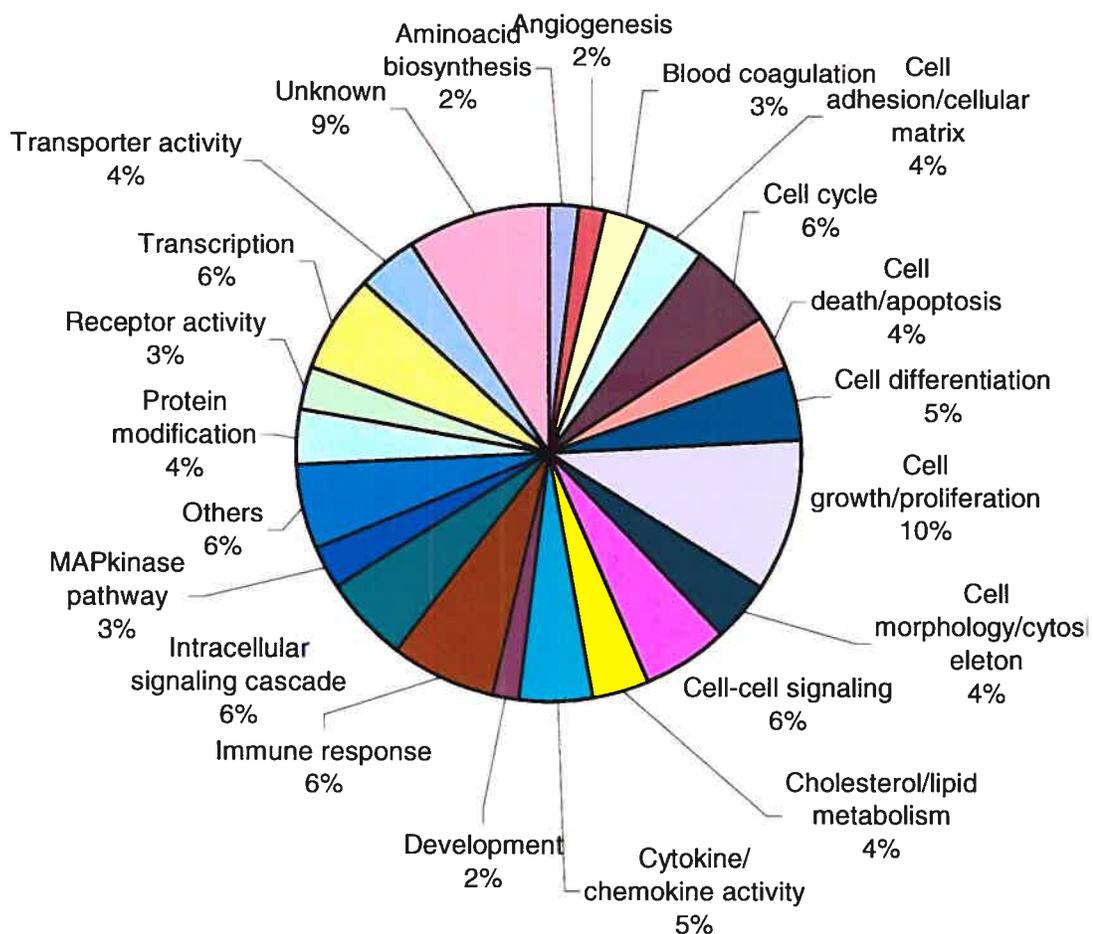


Figure 18 : Distribution par catégories des 65 gènes modulés en fonction des termes de 'Gene Ontology'. La catégorie 'others' contient les termes : Activin inhibitor activity, AMPc-specific phosphodiesterase activity, polysaccharide biosynthesis, prostaglandin pathway, translation elongation factor activity et ubiquitination pathway.

Un gène peut être présent dans plus qu'une catégorie.

Tableau VII : Gènes modulés par ETV6-AML1 classés par catégories

Classes	Gene symbol	Sondes Affy.	ANOVA	<sup>1</sup> Modulation
Activin inhibitor activity	FST	207345_at	1,02E-04	2,104
Aminoacid biosynthesis	CTH	217127_at	3,86E-04	2,492
	EEF1D	216715_at	6,06E-03	2,187
Angiogenesis	VEGF	210512_s_at	8,13E-03	3,251
	SPHK1	219257_s_at	1,63E-04	4,121
Blood coagulation	F2RL1	213506_at	2,94E-04	2,037
	F3	204363_at	8,07E-03	2,355
	SERPINE1	202628_s_at	3,81E-04	5,679
cAMP-specific phosphodiesterase activity	PDE4A	211447_s_at	6,98E-03	3,852
Cell adhesion/cellular matrix	CTGF	209101_at	6,88E-04	2,999
	IL8	202859_x_at	2,24E-04	6,567
	IL8	211506_s_at	4,80E-03	5,236
	KRT17	205157_s_at	7,05E-05	5,188
	KRT17	212236_x_at	1,27E-04	3,375
	PCDH17	205656_at	2,08E-06	2,251
Cell cycle	DUSP1	201041_s_at	1,11E-06	2,034
	DUSP4	204015_s_at	9,28E-04	2,283
	EGFR	201983_s_at	2,13E-04	2,102
	EGFR	201984_s_at	1,94E-05	2,523
	IL8	202859_x_at	2,24E-04	6,567
	IL8	211506_s_at	4,80E-03	5,236
	PPP1R15A	37028_at	2,97E-04	2,118
Cell death/apoptosis	VEGF	210512_s_at	8,13E-03	3,251
	GADD45B	209304_x_at	8,85E-03	2,875
	PPP1R15A	37028_at	2,97E-04	2,118
	SPHK1	219257_s_at	1,63E-04	4,121
Cell differentiation	VEGF	210512_s_at	8,13E-03	3,251
	BHLHB2	201169_s_at	3,51E-05	2,227
	EFNB2	202669_s_at	2,99E-04	2,105
	GADD45B	209304_x_at	8,85E-03	2,875
	IL11	206924_at	2,73E-04	4,199
	JAG1	209098_s_at	1,40E-03	2,329
Cell growth/proliferation	JAG1	209099_x_at	8,25E-04	2,307
	AKAP12	210517_s_at	1,75E-03	2,453
	CTGF	209101_at	6,88E-04	2,999
	DKK1	204602_at	1,12E-05	4,366
	EMP1	201324_at	3,21E-04	2,831
	IL11	206924_at	2,73E-04	4,199
	IL8	202859_x_at	2,24E-04	6,567
	IL8	211506_s_at	4,80E-03	5,236
	JAG1	209098_s_at	1,40E-03	2,329
	JAG1	209099_x_at	8,25E-04	2,307
	KLF4	221841_s_at	3,87E-05	2,281
	SLC29A2	204717_s_at	2,92E-03	3,393
	SPHK1	219257_s_at	1,63E-04	4,121
VEGF	210512_s_at	8,13E-03	3,251	
Cell morphology/cytoskeleton	COL4A1	211981_at	1,56E-04	2,108

Tableau VII (suite)

	KIAA0666	216060_s_at	4,49E-03	2,089
	SNTB1	215431_at	2,69E-04	2,946
	VAV3	218806_s_at	2,66E-03	2,825
Cell-cell signaling	EFNB2	202669_s_at	2,99E-04	2,105
	GJA4	40687_at	8,48E-03	2,998
	IL11	206924_at	2,73E-04	4,199
	IL8	202859_x_at	2,24E-04	6,567
	IL8	211506_s_at	4,80E-03	5,236
	SCYA18	32128_at	9,80E-03	4,417
	SCYA4	204103_at	8,60E-03	4,488
Cholesterol/lipid metabolism	ABCA1	203505_at	1,44E-04	2,450
	FACVL1	205769_at	7,80E-03	2,284
	HMGCS1	221750_at	2,86E-04	2,203
	SC4MOL	209146_at	3,98E-05	2,093
Cytokine/chemokine activity	GRO2	209774_x_at	1,40E-03	2,907
	IL11	206924_at	2,73E-04	4,199
	IL8	202859_x_at	2,24E-04	6,567
	IL8	211506_s_at	4,80E-03	5,236
	SCYA18	32128_at	9,80E-03	4,417
	SCYA4	204103_at	8,60E-03	4,488
Development	PITX2	207558_s_at	7,19E-03	3,086
	RUNX1	210805_x_at	7,27E-03	18,341
	RUNX1	211182_x_at	2,20E-03	18,837
	RUNX1	211181_x_at	4,10E-03	8,979
Immune response	F3	204363_at	8,07E-03	2,355
	GRO2	209774_x_at	1,40E-03	2,907
	IFIT1	203153_at	2,93E-03	3,578
	PTGS2	204748_at	3,47E-03	2,658
	SCYA18	32128_at	9,80E-03	4,417
	SCYA4	204103_at	8,60E-03	4,488
	ULBP2	221291_at	5,32E-03	2,119
Intracellular signaling cascade	ASB1	212819_at	3,39E-03	2,181
	DKK1	204602_at	1,12E-05	4,366
	IL8	202859_x_at	2,24E-04	6,567
	IL8	211506_s_at	4,80E-03	5,236
	MGC5363	218764_at	1,99E-03	2,149
	SPHK1	219257_s_at	1,63E-04	4,121
	VAV3	218806_s_at	2,66E-03	2,825
MAPkinase pathway	DUSP1	201041_s_at	1,11E-06	2,034
	DUSP4	204015_s_at	9,28E-04	2,283
	GADD45B	209304_x_at	8,85E-03	2,875
Polysaccharide biosynthesis	PRO0082	218871_x_at	1,77E-03	2,019
Prostaglandin pathway	PTGS2	204748_at	3,47E-03	2,658
Protein modification	DUSP4	204015_s_at	9,28E-04	2,283
	EGFR	201983_s_at	2,13E-04	2,102
	EGFR	201984_s_at	1,94E-05	2,523
	HSPA1A	200800_s_at	2,20E-03	2,184
	ULK1	209333_at	8,13E-03	2,104
Receptor activity	EGFR	201983_s_at	2,13E-04	2,102

Tableau VII (suite)

	EGFR	201984_s_at	1,94E-05	2,523
	F2RL1	213506_at	2,94E-04	2,037
	F3	204363_at	8,07E-03	2,355
Transcription	BHLHB2	201169_s_at	3,51E-05	2,227
	JUN	201464_x_at	6,43E-06	2,813
	KLF4	221841_s_at	3,87E-05	2,281
	MAFF	36711_at	2,06E-07	4,312
	PITX2	207558_s_at	7,19E-03	3,086
	PRDM13	221168_at	1,03E-03	2,022
	RUNX1	210805_x_at	7,27E-03	18,341
	RUNX1	211182_x_at	2,20E-03	18,837
	RUNX1	211181_x_at	4,10E-03	8,979
Translation elongation factor activity	EEF1D	216715_at	6,06E-03	2,187
Transporter activity	ABCA1	203505_at	1,44E-04	2,450
	AKAP12	210517_s_at	1,75E-03	2,453
	SLC16A6	207038_at	3,14E-04	2,162
	SLC29A2	204717_s_at	2,92E-03	3,393
Ubiquitination pathway	KIAA0675	207231_at	3,85E-03	3,675
Unknown	DKFZP564L0	205673_s_at	1,86E-03	2,041
	EST1316	216108_at	3,00E-03	5,723
	EST1543	216630_at	1,25E-03	2,476
	EST318	212444_at	3,16E-03	2,179
	EST877	215194_at	2,18E-03	6,933
	FLJ23024	220473_s_at	7,93E-03	2,499
	LOC51333	219780_at	2,34E-04	7,107
	MGC4504	219270_at	2,62E-04	7,921
	RIS1	213338_at	4,26E-03	2,293
	ZXDA	216014_s_at	3,47E-03	2,575

Les gènes peuvent être classés dans plus d'une catégorie

<sup>1</sup> rouge : répression ; bleu : activation

### 3. Choix des gènes candidats

Soixante-cinq gènes sont modulés suite à l'induction de ETV6-AML1. Ces gènes appartiennent à plusieurs catégories différentes (Figure 18, tableau VII). Pour la suite de l'étude, un nombre plus restreint de gènes seront sélectionnés pour une validation et une étude plus poussée de l'impact de ETV6-AML1 sur leur expression. Pour choisir ces gènes candidats, les 65 gènes ont été soumis à plusieurs regroupements hiérarchiques. Ce type de regroupement a été choisi puisqu'il permet de faire des groupements exacts, c'est-à-dire que le même arbre va être formé si les données sont soumises au classement à plusieurs reprises. Nous avons d'abord regroupé les gènes selon leur profil d'expression à partir des données de micropuces aux différents temps d'induction (Figure 19). Les gènes qui sont près dans l'arbre hiérarchique ont un profil d'expression semblable, c'est-à-dire que leur expression va dans la même direction selon les temps d'induction (exemples de profils d'expression figure 20). Ces gènes ont donc de fortes chances d'être co-modulés par ETV6-AML1. Nous avons défini 9 groupes de gènes selon leur proximité dans l'arbre hiérarchique et leur avons attribué un code de couleur (Figure 19). Mais, en plus d'être co-modulés, ces gènes peuvent-ils être regroupés ensemble selon d'autres critères? Pour répondre à cette question, nous avons fait des regroupements selon les caractéristiques biologiques de ces gènes et selon leur région promotrice et avons comparé les arbres obtenus aux groupes formés selon le profil d'expression.

D'abord, nous avons évalué la possibilité que les gènes montrant un profil d'expression semblable partageraient des caractéristiques biologiques. Pour voir ceci, nous avons fait un regroupement hiérarchique des 65 gènes par rapport aux termes de 'Gene Ontology' qui leur sont associés (Figure 21). Les groupes d'expression en couleur, alignés avec les gènes, ne montrent pas de corrélation entre les branches de l'arbre hiérarchique et les groupes d'expression. Les gènes co-modulés ne semblent donc pas partager des caractéristiques biologiques.

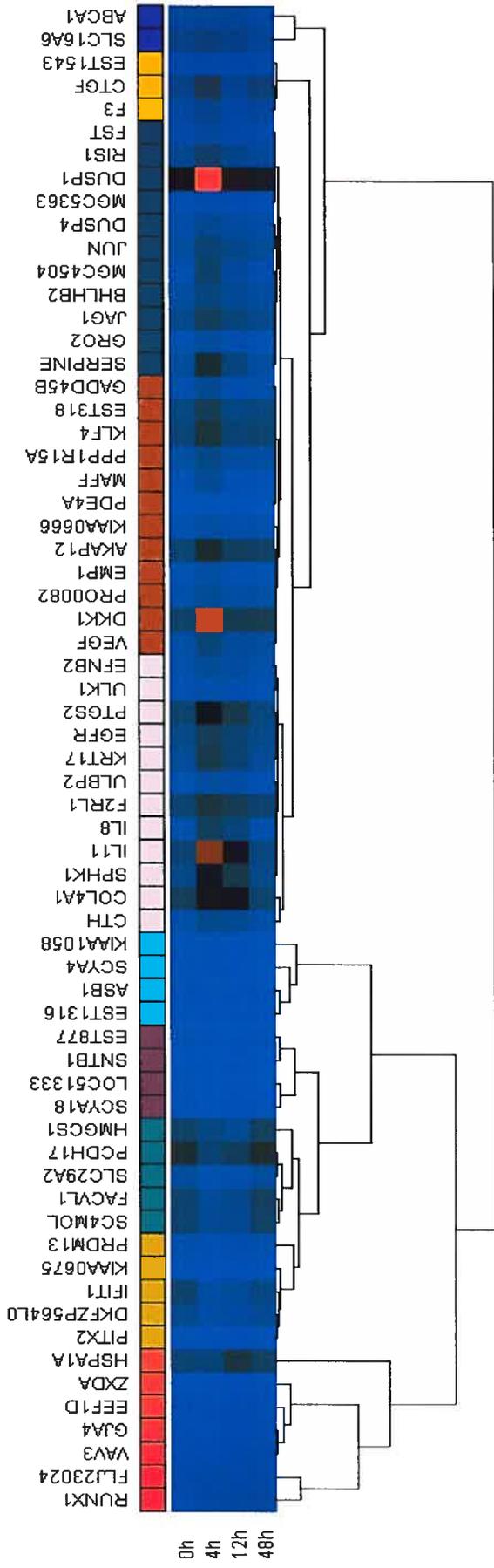


Figure 19: Représentation hiérarchique selon sur le profil d'expression des 65 gènes modulés par ETV6-AML1. Le regroupement hiérarchique des 65 gènes modulés est basé sur les valeurs d'expression des gènes à chaque temps d'induction de ETV6-AML1 (0 – 4 – 12 et 48 heures). Les gènes appartenant à une même branche ont un profil d'expression semblable. Les couleurs représentent les différents groupes de gènes formés par rapport à leur similitude d'expression.

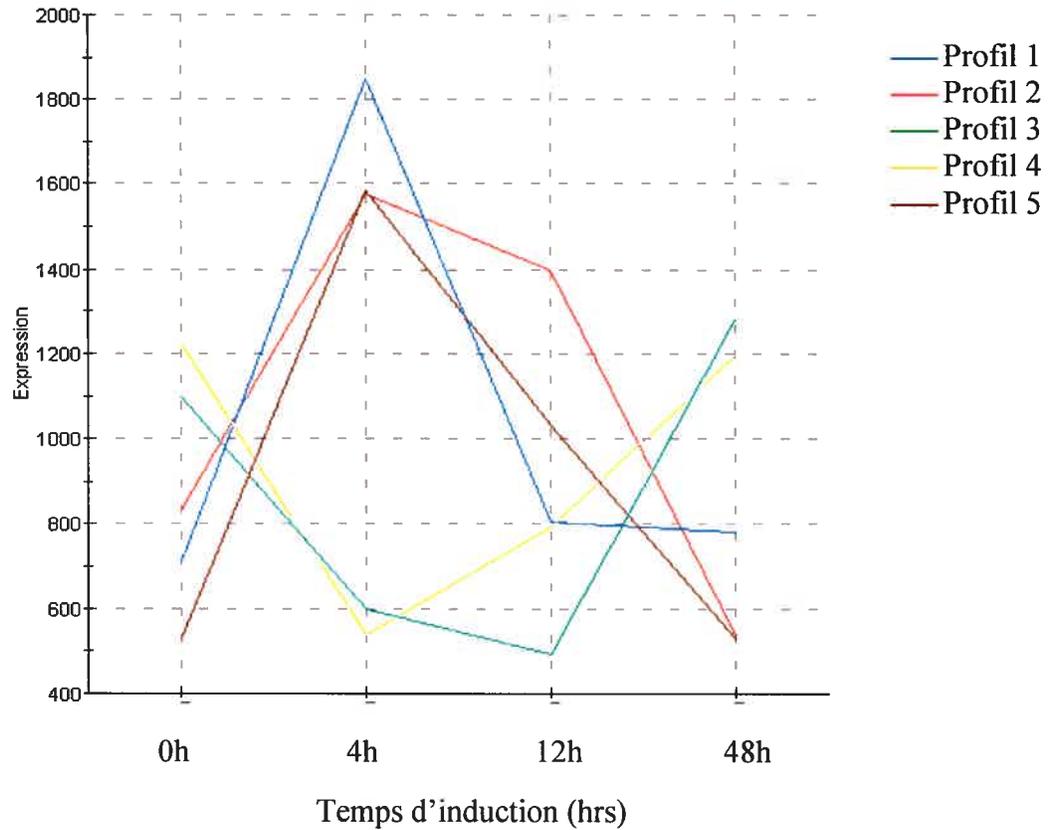


Figure 20 : Exemple de profils d'expression. Exemples de différents profils d'expression retrouvés dans nos données de micropuces. L'expression d'un gène peut varier différemment au cours des temps d'induction de ETV6-AML1, c'est ce qui définit son profil d'expression. Le profil 1 par exemple montre une augmentation d'expression à 4h et un retour à la normale par la suite, tandis que le profil 2 montre aussi une augmentation d'expression à 4h, mais cette augmentation est aussi visible à 12h d'induction

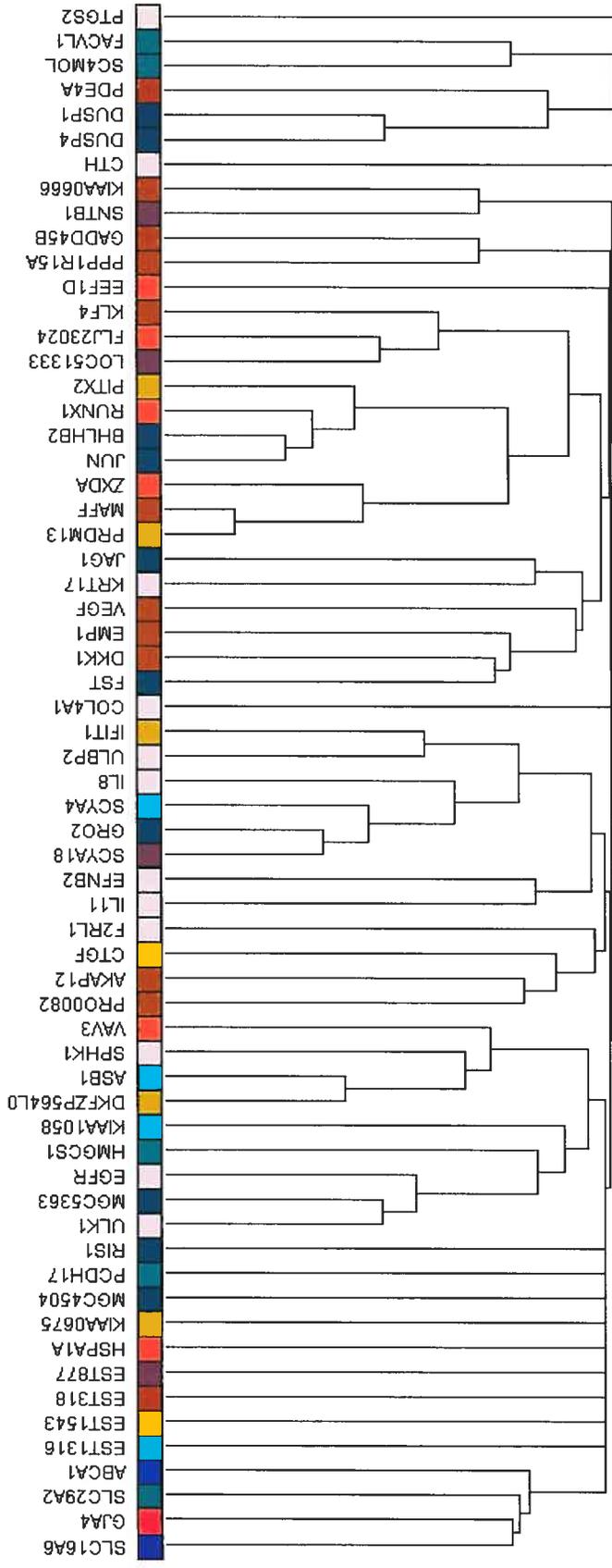


Figure 21 : Regroupement hiérarchique selon les termes de 'Gene Ontology' des 65 gènes modulés par ETV6-AML1. Le regroupement hiérarchique des 65 gènes modulés est basé sur leur attribution à différents termes de 'Gene Ontology'. Les gènes appartenant à une même branche partagent plus de termes de 'Gene Ontology'. Les couleurs représentent les différents groupes de gènes formés par rapport à leur similitude d'expression (voir figure 19).

Par la suite, notre intérêt s'est tourné vers la région régulatrice des 65 gènes pour vérifier si les gènes co-modulés possèderaient des séquences régulatrices partageant des éléments communs. Nous avons d'abord regardé si la région de 1kb en amont du site d'initiation de la transcription contenait des sites de liaison pour des facteurs de transcription qui seraient conservés entre l'homme et la souris. Un arbre hiérarchique a été construit selon les sites retrouvés et les groupes d'expression ont été alignés avec les gènes (Figure 22). Les gènes co-modulés ne semblent pas contenir de sites de liaison pour des facteurs de transcription qui les distinguent des gènes présents dans d'autres groupes, puisque les groupes d'expression identifiés par les couleurs sont distribués uniformément au long de l'arbre et non-pas dans une branche en particulier. Les facteurs de transcription obtenus sont présentés dans le tableau XII en annexe. Nous avons ensuite regardé uniquement la séquence de la région régulatrice et comparer si des gènes dans un même groupe avaient des séquences semblables. Un arbre a été construit à l'aide du programme Philip et encore une fois comparé avec les groupes d'expression (Figure 23). Quoique le groupe de gène correspondant au profil d'expression bleu foncé se retrouve particulièrement dans la branche supérieure de l'arbre, cette branche contient aussi plusieurs autres gènes qui sont dans des groupes différents. Donc, la région promotrice des gènes d'un même groupe ne se distingue pas des autres.

Nous devons sélectionner un groupe de gènes candidats pour la validation et pour des expérimentations plus poussées de l'impact de ETV6-AML1 sur l'expression des gènes modulés. Comme aucune des approches de regroupement n'a donné d'évidences que des gènes appartenant à un même groupe d'expression partagent aussi des mêmes caractéristiques biologiques ou encore des similarités de promoteur, nous avons sélectionné les gènes candidats par rapport à leur implication connue dans différents types de cancers ou à leur présence dans des voies de signalisation associées au cancer suite à une recherche sur NCBI et PubMed. Quinze gènes ont été sélectionnés et sont présentés dans le tableau VIII.

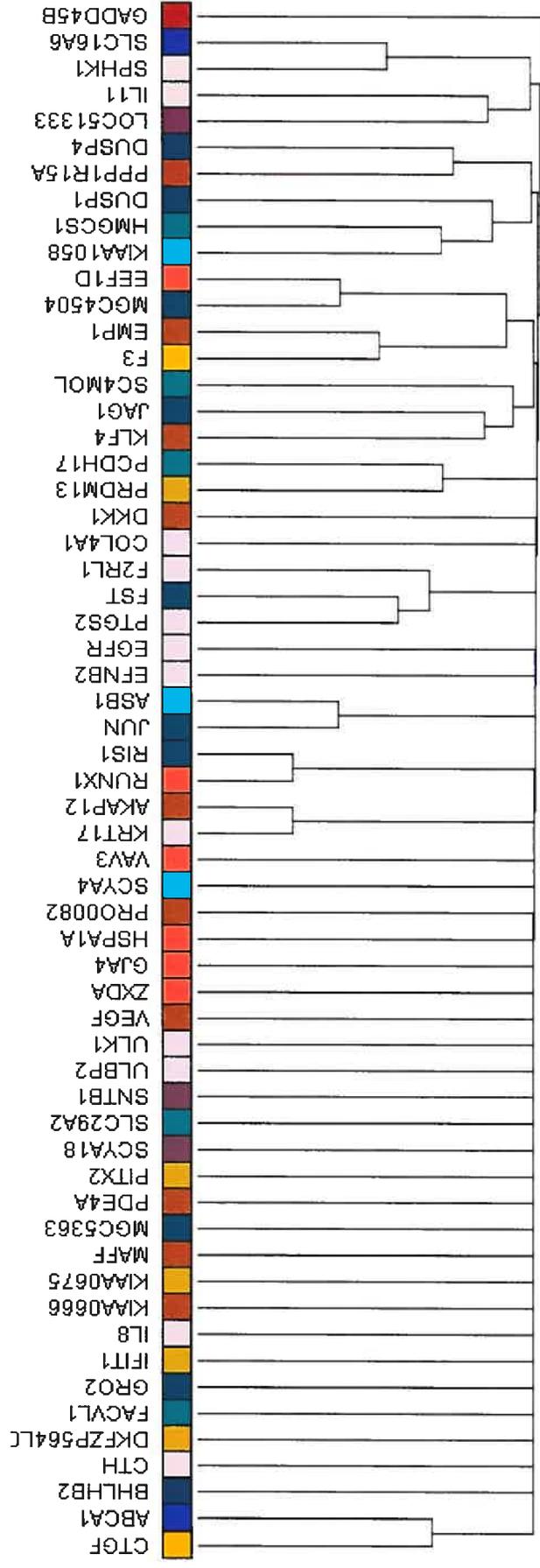


Figure 22 : Représentation hiérarchique selon les sites de liaison pour des facteurs de transcription conservés entre l'homme et la souris présent dans la région 1 kb en amont de l'exon 1 des 65 gènes modulés par ETV6-AML1. Le regroupement hiérarchique des 65 gènes modulés est basé sur la présence de sites de liaison pour des facteurs de transcription prédits et conservés entre l'homme et la souris dans leur région régulatrice arbitrairement définie comme 1kb en amont du site d'initiation de la transcription. Les gènes appartenant à une même branche partagent des sites de liaison et pourraient possiblement être co-modulés. Les couleurs représentent les différents groupes de gènes formés par rapport à leur similitude d'expression (voir figure 19).

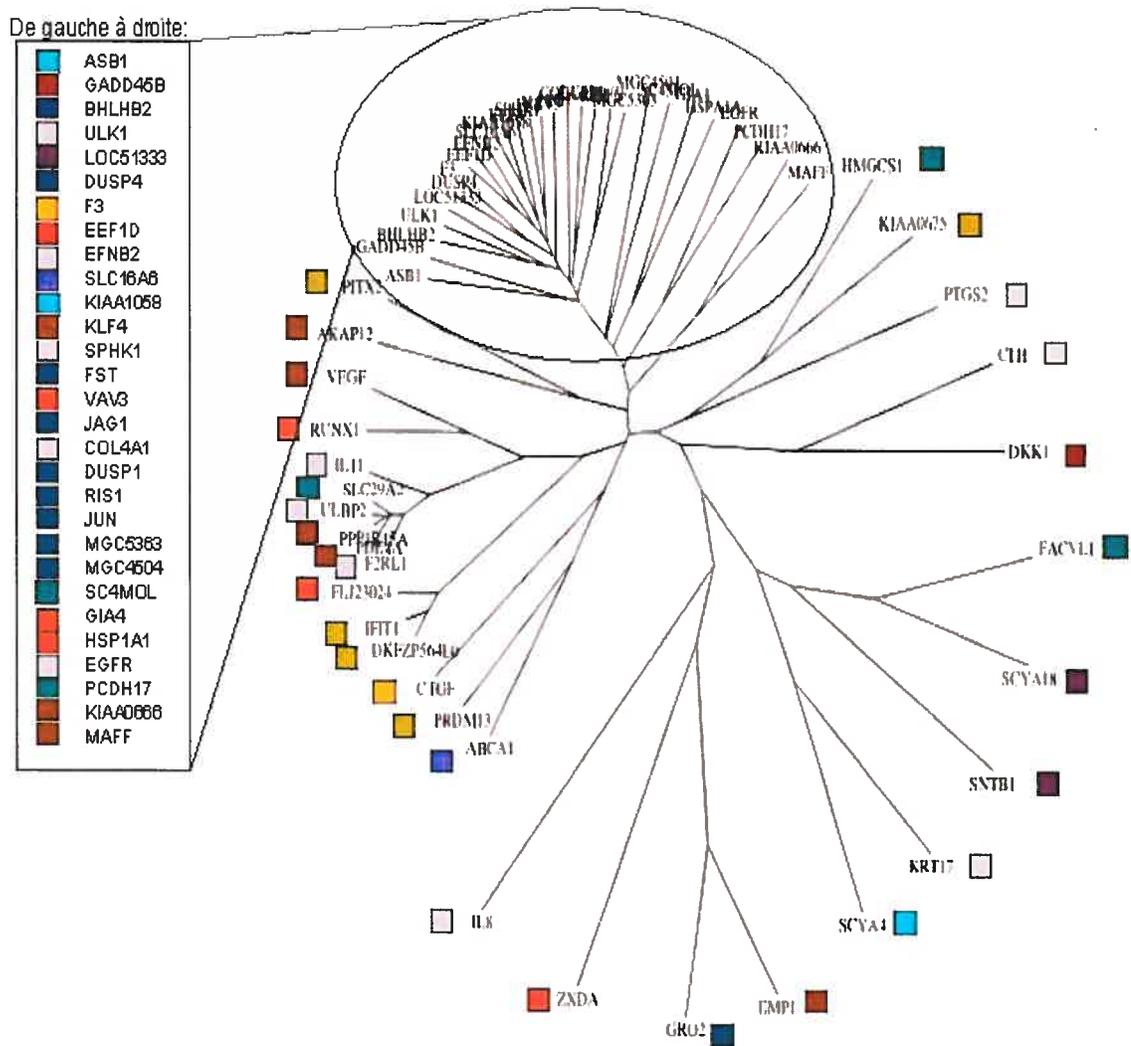


Figure 23: Regroupement des 65 gènes modulés par ETV6-AML1 selon leur similarité de promoteur. Le regroupement des gènes a été fait avec les programmes Dialign et Philip à partir de la séquence de 1 kb en amont du site d'initiation de la transcription de chaque gène. Les gènes faisant partie d'une même branche présentent des similarités de séquence. Les couleurs représentent les différents groupes de gènes formés par rapport à leur similitude d'expression (voir figure 19).

Tableau VIII : Gènes modulés par ETV6-AML1 et sélectionnés pour la validation par RT-PCR quantitatif en temps réel.

Symbole	Gène	Fonction	Modulation RT-PCR quantitatif en temps réel			
			micropuces (fois)	test T valeur p Validation <sup>1</sup>		
BHLHB2	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	Suppressors of cytokine signalling. Involved in the control of cell differentiation.	2,23	1,791	0,006	V
CTGF	Connective tissue growth factor	Implicated in cell growth and maintenance	3,00	3,401	0,129	NV
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	Inactivates mitogen-activated protein (MAP) kinase and may play an important role negative regulation of cellular proliferation.	2,03	2,220	0,003	V
DUSP4	Dual specificity phosphatase 4	This gene product inactivates ERK1, ERK2 and JNK, which are associated with cellular proliferation and differentiation.	2,28	3,977	0,030	V
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Participates in negative regulation of cell cycle	2,31	2,271	0,025	V
F3	Coagulation factor III	This factor enables cells to initiate the blood coagulation cascades, and it functions as the high-affinity receptor for the coagulation factor VII	2,35	2,454	0,004	V
GADD45B	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	Upstream activator of both p38 and JNK MAPKs in response to stressful growth arrest.	2,87	2,103	0,104	NV
IL11	Interleukin 11	This cytokine is shown to stimulate the T-cell-dependent development of immunoglobulin-producing B cells.	4,20	3,319	0,003	V
IL8	Interleukin 8	This chemokine is one of the major mediators of the inflammatory response.	5,9	12,276	0,007	V
JAG1	Jagged 1 (Alagille syndrome)	Implicated in the Alagille syndrome. Jagged 1 signalling through notch 1 has also been shown to play a role in hematopoiesis.	2,32	1,957	0,534	NV
JUN	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog	Regulates gene expression and plays a role in cell growth and/or maintenance.	2,81	3,507	0,034	V
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	Transcription factor involved in cell cycle checkpoint.	2,28	2,715	0,205	NV
PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	Transcript levels increased following stressful growth arrest conditions and protein response correlated with apoptosis following ionizing radiation.	3,29	2,522	0,166	NV
PTGS2	Prostaglandin Synthase 2	Key enzyme in prostaglandin biosynthesis, and acts both as a dioxygenase and as a peroxidase.	2,66	3,459	0,001	V
SPHK1	Pphingosine kinase 1	Catalyses the phosphorylation of sphingosine to sphingosine-1-phosphate (SP1). Involved in cellular growth, migration and apoptosis.	4,12	4,931	0,010	V

<sup>1</sup> V : Validé; NV : Non-Validé

#### 4. Validation par RT-PCR quantitatif en temps réel

Suite à l'utilisation de micropuces, il est important de valider l'expression des gènes qui sont sélectionnés afin d'éviter les faux positifs (Tan, Downey et al. 2003). Nous avons utilisé la technique du RT-PCR quantitatif en temps réel (RT-PCR-Q) qui est une méthode très sensible qui permet de mesurer l'expression d'un gène à partir de l'ARN qui a été transformé en ADNc et ensuite amplifié et détecté grâce à un fluorochrome, dans notre cas le SYBR Green. Le gène GAPD a été utilisé comme gène de référence puisqu'il a été démontré comme étant exprimé à un niveau constant dans les cellules B lymphocytaires (Garcia-Vallejo, Van Het Hof et al. 2004). Aussi, son niveau d'expression dans notre expérience de micropuces ne varie pas en fonction du temps d'induction de ETV6-AML1.

Parmi les 15 gènes ayant été amplifié par RT-PCR quantitatif en temps réel, 10 gènes ont été validés et 5 non-validés (Tableau VIII). Dans la majorité des cas, le profil d'expression des gènes est semblable à celui obtenu avec les données de micropuces, mais montrent une différence dans l'amplitude (Figure 24). Tous les cas de gènes non-validés sont dus à un test t de Student non significatif entre les PCR fait à partir l'ARN de ETV6-AML1-13 et celui du vecteur seul. En effet, lorsque la valeur de p est supérieure à 0.05, la validation n'est pas acceptée et le gène ne peut être considéré comme étant modulé par ETV6-AML1. Donc, 10 gènes sur 15 ont été validés, ce qui représente 67 % de validation. Si ce résultat est extrapolé au groupe de 65 gènes obtenus suite à l'analyse des micropuces, 43 gènes sur 65 seraient véritablement modulés par ETV6-AML1.

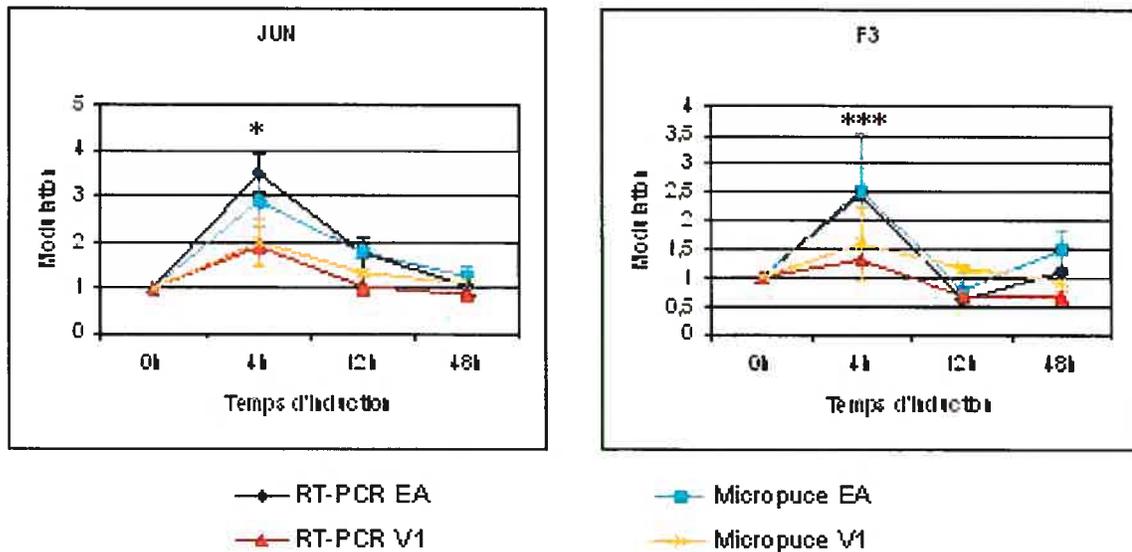


Figure 24 : Exemple de validation par RT-PCR quantitatif en temps réel montrant les gènes JUN et F3. Les données d'expression provenant des micropuces et de la validation par RT-PCR quantitatif en temps réel sont présentées sous forme de graphique pour les gènes Jun et F3 dans le clone vecteur seul et dans le clone ETV6-AML1. Les valeurs sont rapportées par rapport aux données à 0h d'induction afin de voir la valeur de la modulation d'expression. Un test t de Student a été exécuté entre les valeurs de RT-PCR quantitatif en temps réel dans le clone ETV6-AML1 (EA) (bleu foncé) et dans le clone vecteur seul (V1) (rouge).

\* : valeur de  $p \leq 0.05$

\*\*\* : valeur de  $p \leq 0.005$

## 5. Étude d'expression chez les patients leucémiques

Afin de vérifier la pertinence dans la leucémie des 10 cibles validées dans les HeLa, l'expression de ces gènes a été quantifiée à l'aide du RT-PCR-Q chez des patients pédiatriques ayant la LLA de type pré-B. Le matériel de 17 patients a été utilisé représentant 9 patients ayant la translocation t(12;21) et 8 patients ne l'ayant pas. Le tableau IX présente les résultats d'expression des gènes pour chaque patient ainsi que les caractéristiques cliniques du patient. Les gènes IL11, DUSP4 et EGFR ne sont pas ou peu exprimés dans le matériel de patient, donc ne peuvent pas être inclus dans les analyses et ne sont pas présentés dans les tableaux IX et X. Les résultats d'expression ont été normalisés par rapport à la médiane de chaque gène rapporté à 100. Tel qu'attendu, l'expression de ETV6-AML1 se retrouve uniquement chez les patients ayant la translocation t(12;21) (Tableau IX). Des études d'associations ont été faites entre les données d'expression et les données cliniques des patients (Tableau X). Les gènes JUN et F3 sont les deux seuls qui montrent une corrélation avec le statut de translocation des patients (Tableau X et Figure 25). Il est à noter que le gène JUN montre une expression plus faible chez les patients ayant la translocation, donc exprimant ETV6-AML1 (Figure 25). Ce résultat est contraire à ce qui a été trouvé dans les HeLa TetON, puisque son expression était augmentée en réponse à l'induction de ETV6-AML1. Ceci peut s'expliquer par la différence de type de cellules impliquées, donc du contexte cellulaire qui est différent. JUN et F3 montrent aussi une corrélation avec la perte d'hétérozygotie (LOH) de ETV6. Ceci n'est pas surprenant car le LOH est présent dans la majorité des cas de patients qui ont la translocation t(12;21) (Montpetit, Larose et al. 2004). Par contre, SPHK1 montre une corrélation seulement avec le LOH et non-pas avec la translocation (Tableau X). Ce même gène, tout comme PTGS2 montre aussi une corrélation avec le risque de la maladie (Tableau X). Finalement, le gène F3 en plus de montrer une corrélation avec la translocation et le LOH semble aussi lié au grade de la maladie (Tableau X).

Tableau IX : Données cliniques des patients ayant la LLA pré-B et expression des gènes modulés par ETV6-AML1 chez ces patients.

Patient <sup>1</sup>	Données cliniques				Expression des gènes candidats									
	Genre	Grade	Risque	Wbc	LOH	Trans	ETV6	AML1	BHLHB2	DUSP1	F3	IL8	JUN	PTGS2
34	M	III	Élevé	<50	+	-	0	103,215	85,334	157,647	20,070	115,634	17,079	100,000
83	M	IV	Standard	<50	-	-	0	35,044	100,000	83,283	94,928	100,000	880,135	89,262
375	F	III	Élevé	>50	+	+	109,803	107,520	118,403	322,895	310,866	137,040	45,610	36,066
381	F	IV	Élevé	<50	-	-	0	na	121,391	57,321	na	103,984	64,896	56,037
384	M	III	Standard	<50	-	-	0	121,669	394,891	85,135	100	192,070	116,569	140,659
387	F	IV	Élevé	<50	-	-	0	311,420	88,697	17,763	30,981	67,828	24,650	103,368
388	M	III	Standard	<50	-	-	0	110,141	73,287	72,771	74,767	326,159	59,779	129,200
389	M	IV	Élevé	>50	-	-	0	684,156	58,049	13,261	18,064	307,462	191,745	74,842
392	M	III	Standard	<50	+	+	346,346	96,785	77,892	714,027	na	58,391	19,647	44,764
397	F	IV	Standard	<50	-	-	0	13,231	264,910	12,197	2086,531	925,071	1784,877	346,925
400	M	III	Élevé	>50	+	+	135,014	82,076	90,410	514,975	182,777	80,862	61,901	70,711
401	M	III	Standard	<50	+	+	259,647	47,360	124,370	88,526	396,502	41,575	1067,465	102,771
410	F	III	Élevé	>50	+	+	129,490	43,925	110,246	824,421	34,996	43,317	100,000	31,026
411	F	III	Standard	<50	-	+	294,430	118,048	351,094	733,275	727,693	223,016	4906,355	347,939
413	F	IV	Standard	<50	-	+	100,000	114,403	92,297	319,921	100,455	36,162	367,712	111,410
416	M	III	Élevé	<50	+	+	149,930	55,582	74,855	100,000	47,066	36,673	168,379	65,973
420	M	III	Élevé	>50	+	+	300,574	81,681	115,950	268,073	116,192	24,314	34,163	118,203

<sup>1</sup> Un numéro est attribué aux patients pour fin de confidentialité.

Wbc : white blood count; LOH : lost of heterozygosity of ETV6; trans : translocation t(12;21); M: masculin; F: féminin; na: pas de valeur disponible.

Un risque élevé est défini par la présence d'une hyperleucocytose, d'un CSF positif ou encore d'un diagnostique à un âge < 1 an ou > 10 ans. Le LOH et la présence de la translocation t(12;21) ont été détectés par la méthode de RT-PCR. Les valeurs d'expression sont présentées par rapport à la médiane égale à 100.

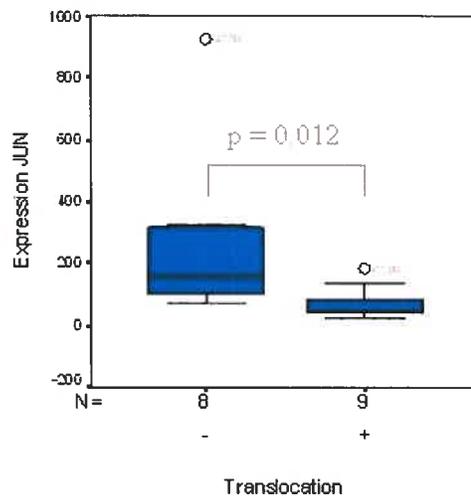
Tableau X : Étude d'association de l'expression de cibles de ETV6-AML1 avec les données cliniques des patients atteints de LLA pré-B

Paramètre	ETV6-AML1	Gènes candidats						
		BHLHB2	DUSP1	F3	IL8	JUN	PTGS2	SPHK1
Genre	0,643	0,745	0,097	0,77	0,289	0,696	0,435	1
Grade	0,17	0,692	0,841	<b>0,009</b>	0,54	0,546	0,228	0,688
Risque	0,919	0,753	0,211	0,847	0,064	0,386	<b>0,043</b>	<b>0,027</b>
WBC	0,344	0,955	0,673	0,206	0,806	0,673	0,399	0,092
LOH	<b>0,01</b>	0,093	0,564	<b>0,016</b>	0,908	<b>0,034</b>	0,083	<b>0,027</b>
t(12;21)	<b>0</b>	0,368	0,7	<b>0,001</b>	0,105	<b>0,012</b>	0,847	0,248

WBC : white blood cell count

Un test U de Mann-Withney a été exécuté à partir des valeurs d'expression des gènes candidats par rapport aux différents paramètres cliniques des patients. Les données présentées sont des valeurs de p.

JUN



F3

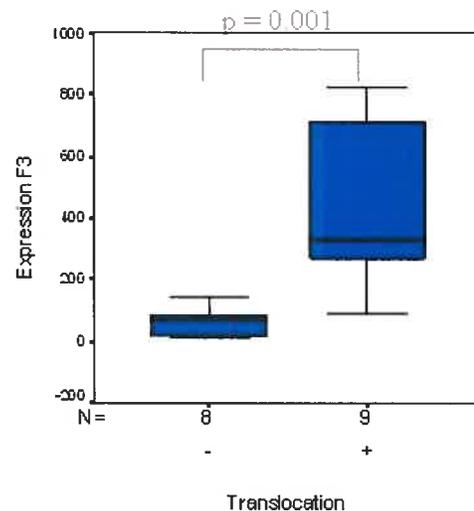


Figure 25 : Représentation graphique de la corrélation de JUN et F3 avec le statut de translocation des patients LLA pré-B. Comparaison de l'expression des gènes Jun et F3 dans deux groupes de patients; - : patients n'ayant pas la translocation t(12;21); + : patients présentant la translocation t(12;21). La valeur de p a été calculée avec le test U de Mann-Withney.

## 6. Études fonctionnelles à l'aide du gène rapporteur luciférase

Les gènes JUN et F3 ont montré une corrélation significative avec le statut de translocation des patients. Ce sont donc des gènes susceptibles d'avoir un rôle à jouer dans la leucémie en rapport avec la présence de la protéine chimérique ETV6-AML1. La région régulatrice de ces gènes, définie arbitrairement comme la région de 3kb en amont du site d'initiation de la transcription, contient des sites de liaison pour les facteurs de transcription faisant partie de la famille AML (Figure 26). Comme la protéine ETV6-AML1 comprend le site de liaison à l'ADN de AML1, elle est susceptible de lier les séquences AML et d'influencer l'expression de ces deux gènes. La région de 3kb de JUN et de F3 a donc été clonée dans le vecteur pGL3basic qui ne contient pas de promoteur. Suite à la transfection des lignées cellulaires HepG2, HeLa TetON et JEG3, l'activité du promoteur a été évaluée en fonction de la quantité de luciférase produite. Les données sont normalisées en faisant le ratio entre la luciférase et la *renilla*. Pour qu'un promoteur soit considéré actif, le ratio devait être 10 fois plus élevé que dans l'expérience faite avec le vecteur pGL3basic seul (sans promoteur). Aussi, pour qu'une modulation d'expression soit prise en considération, la différence entre la valeur dans l'expérience où les cellules sont transfectées avec ETV6-AML1 et celle sans ETV6-AML1 doit être d'au moins 2 fois et avoir une valeur de  $p \leq 0.05$  suite à un test t de Student. Les expériences ont été lues après 24 et 48 heures de transfection. Le contrôle positif IL3 montre bel et bien une répression d'expression en présence de ETV6-AML1 dans les HeLa TetON (figure 27). Surprenamment, dans ce même type de cellules les gènes JUN et F3 ne présentent pas de modulation. Nous nous serions attendus à une augmentation d'expression en présence de ETV6-AML1, puisque ce sont les mêmes cellules qui ont été utilisées pour l'étude de micropuces dans lesquelles leur expression est augmentée en réponse à l'induction de ETV6-AML1. Dans les cellules JEG3 par contre, l'augmentation d'expression de JUN est retrouvée en présence de ETV6-AML1. Pour les cellules HepG2, aucune modulation d'expression n'est observée. Le contrôle positif IL3 est seulement modulé dans les HeLa TetON et ceci est probablement dû au contexte cellulaire qui est différents dans les autres lignées et qui ne permet pas la modulation d'expression.

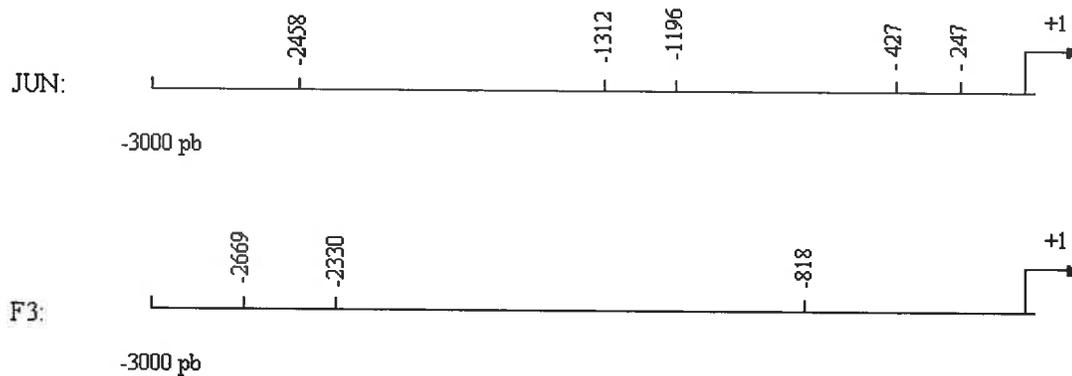


Figure 26 : Sites de liaison pour des facteurs AML dans la région régulatrice des gènes JUN et F3. Représentation des sites de liaison prédits pour les facteur de transcription AML (TGTGGT) dans la région régulatrice de 3kb en amont du site d'initiation de la transcription des gènes Jun et F3 (CONSITE). Les sites en bleu sont des sites conservés entre l'homme et la souris (TRANSFAC).

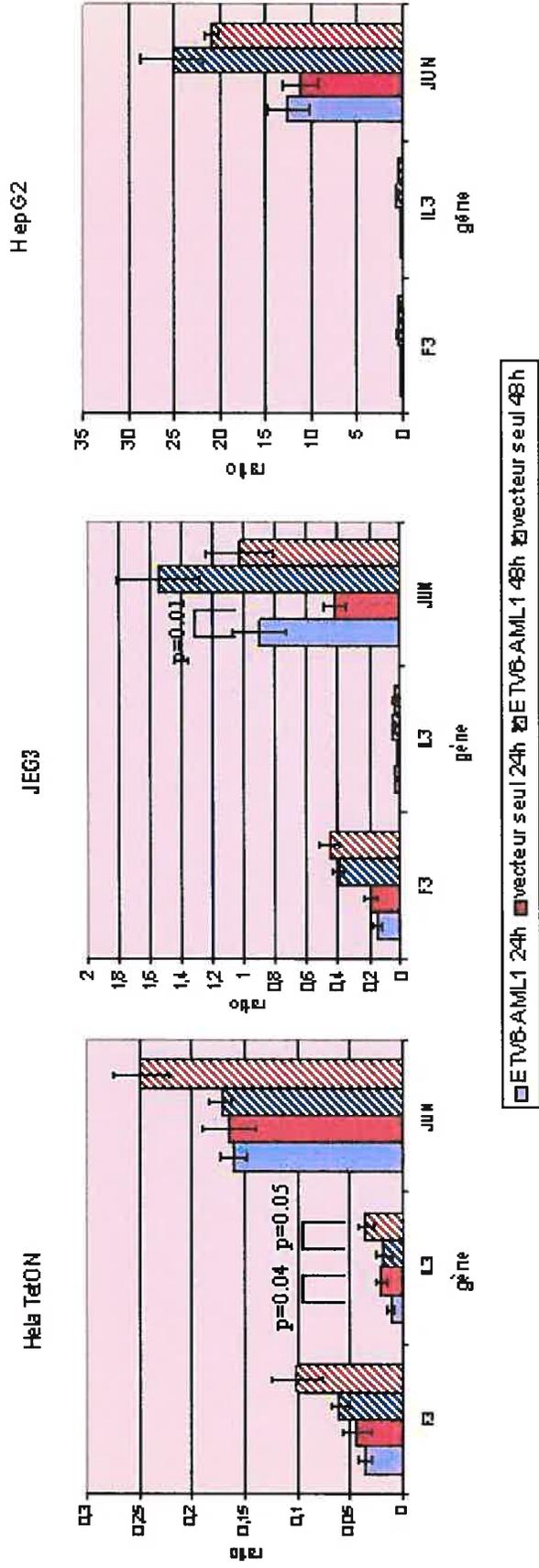


Figure 27 : Évaluation de l'impact fonctionnel de ETV6-AML1 sur les gènes JUN et F3 à l'aide du gène rapporteur luciférase. La lecture de la luciférase est faite après 24 et 48 heures de transfection. L'expression est présentée à l'aide du ratio entre la luciférase et la *renilla*. La valeur de p est calculée à l'aide du test t de Student.

## **Chapitre IV**

**- Discussion et conclusion -**

La translocation t(12;21) est rencontrée uniquement dans la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) de type pré-B avec une fréquence pouvant atteindre jusqu'à 26% des cas (Greaves and Wiemels 2003). Une telle fréquence porte à croire que le facteur de transcription chimérique résultant, ETV6-AML1, aurait un rôle à jouer dans la leucémogénèse. Cette protéine qui contient le domaine de liaison à l'ADN de AML1 et le domaine de répression de ETV6 réprime l'expression de certaines cibles de AML1 (Uchida, Zhang et al. 1997; Uchida, Downing et al. 1999; Asakura, Uchida et al. 2004). Certaines études ont tenté d'élucider son rôle en utilisant le modèle de souris, mais ces dernières exprimant ETV6-AML1 ne développent pas de leucémie (Tsuzuki, Seto et al. 2004; Fischer, Schwieger et al. 2005). Donc, la présence de la translocation n'est pas suffisante pour qu'il y ait apparition de la leucémie. Par contre, les cellules pré-B exprimant cette translocation présentent des caractéristiques différentes qui pourraient correspondre à un stade pré-leucémique (Morrow, Horton et al. 2004; Fischer, Schwieger et al. 2005). Un événement secondaire semble requis. Malgré tout, le rôle de ETV6-AML1 dans la leucémogénèse est encore inconnu. Ceci a motivé notre étude qui consiste à étudier l'impact de ETV6-AML1 sur le profil transcriptionnel global d'une cellule pour découvrir des voies cellulaires et de nouvelles cibles transcriptionnelles qui pourraient être influencées par la présence de ETV6-AML1. Ceci permettra de mieux comprendre son rôle dans la leucémogénèse et pourrait à long terme conduire au développement d'un traitement spécifiquement pour ce sous-groupe de patients ou encore à l'ajustement des doses afin de diminuer les effets secondaires. Pour faire cette étude, nous avons pris avantage d'un système cellulaire inductible pour ETV6-AML1 et de la technologie des micropuces afin d'identifier des voies biologiques et de nouveaux gènes modulés suite à l'expression de ETV6-AML1.

L'utilisation de micropuces à ADN est une technique qui génère une très grande quantité d'information et qui permet d'observer l'effet d'un événement sur le profil transcriptionnel global d'une cellule dans diverses conditions. Le profil d'expression d'une cellule détermine son phénotype, sa fonction et sa réponse à l'environnement. Donc, le profil transcriptionnel global peut donner des indications sur les mécanismes de régulation, les voies biologiques et la fonction d'une cellule (Clarke, te Poele et al.

2001). Par contre, les micropuces sont très sensibles à plusieurs sources de variabilité qui peuvent mener à la présence de faux positifs et de faux négatifs (Novak, Sladek et al. 2002). Pour s'assurer de diminuer le plus possible la variabilité des résultats nous avons utilisé un système inductible pour ETV6-AML1 dans le modèle cellulaire HeLa. Ce dernier n'est pas d'origine hématopoïétique, mais a l'avantage de posséder le système TetON qui permet de comparer le profil d'expression des gènes d'un même clone suite à l'expression d'une protéine d'intérêt. Le clone induit et non induit possède donc exactement le même bagage génétique et permet de diminuer la variabilité entre les échantillons. Aussi, l'utilisation d'une lignée cellulaire diminue la variabilité d'échantillonnage qui peut avoir lieu avec l'utilisation de matériel provenant de patients. Les échantillons de patients contiennent une très grande quantité de blastes leucémiques (au dessus de 80%), mais ne sont pas complètement homogènes et contiennent aussi du matériel provenant de d'autres cellules présentes dans le sang. Ce système inductible permet aussi d'exprimer la protéine à un niveau désiré en variant la quantité de doxycycline ajoutée lors de l'induction. Dans notre cas, la protéine ETV6-AML1 est exprimée à un niveau comparable à son expression dans la lignée leucémique Reh qui contient la translocation t(12;21). De plus, comme nous utilisons une lignée cellulaire, il nous a été possible de faire nos expériences en triplicata et d'avoir un meilleur pouvoir statistique lors de l'analyse des données. Bien sûr, comme notre modèle n'est pas un modèle de cellules leucémiques, il est important pour nous d'aller étudier l'expression des cibles identifiées dans le matériel de patients pour vérifier la pertinence de ces cibles dans le contexte de la leucémie. D'autres modèles auraient pu être utilisés pour vérifier l'impact de ETV6-AML1 sur l'expression de gènes cibles *in vivo*, comme les souris transgéniques exprimant ETV6-AML1 ou encore des cellules de moelle osseuse transduites avec ETV6-AML1. Par contre, les patients sont un meilleur modèle à utiliser dans notre cas, car ils représentent le vrai contexte de la maladie et permettent d'étudier l'expression des gènes dans le contexte de la leucémie de l'enfant.

L'expérience d'hybridation aux micropuces a généré une quantité importante de données et un triage a été fait en utilisant plusieurs outils pour arriver à identifier un groupe de 65 gènes co-modulés suite à l'induction de ETV6-AML1. Quarante-cinq

gènes montrent une augmentation d'expression tandis que 20 gènes présentent une diminution. Ce résultat peut sembler surprenant, puisque ETV6-AML1 semble agir comme un répresseur de transcription (Uchida, Downing et al. 1999; Asakura, Uchida et al. 2004). Jusqu'à maintenant aucun gène n'a été rapporté comme étant activé par la protéine chimérique. Par contre, comme nous avons fait l'étude dans des cellules HeLa qui ne sont pas des cellules hématopoïétiques, le gène AML1 n'est pas exprimé dans ce type de cellules (Su, Wiltshire et al. 2004) et il est possible que certains gènes normalement activés par AML1 ne soient pas exprimés dans cette lignée et donc leur répression par ETV6-AML1 ne serait pas détectable. Ceci explique aussi pourquoi nous ne retrouvons pas de cibles connues de AML1 dans les gènes co-modulés. De plus, les 65 gènes ne sont probablement pas tous des cibles directes de ETV6-AML1, mais leur expression peut être modulée par une protéine elle-même directement affectée par ETV6-AML1 à la manière d'une cascade. En d'autres termes, une partie des gènes modulés peuvent être des cibles indirectes. Aussi, certains de ces gènes sont probablement des cibles de ETV6 qui pourraient être affectées par la présence de la protéine chimérique puisqu'il a été démontré que ETV6-AML1 peut agir comme dominant négatif sur ETV6 en s'oligomérisant avec celui-ci (Gunji, Waga et al. 2004). Comme ETV6 est un répresseur de transcription, son inactivation via l'oligomérisation avec ETV6-AML1 permettrait aux cibles normalement réprimées d'être exprimées.

Pour vérifier si certains des gènes modulés dans les HeLa le sont aussi dans les patients, nous avons comparé les 65 gènes avec des résultats provenant d'une étude réalisée au St. Jude Children's Research Hospital dans laquelle la même micropuce (HG-U133A de Affymetrix) a été utilisée pour définir des gènes permettant de différencier certains types de leucémies. Dans cette étude, 14 patients atteints de LLA de type pré-B et exprimant la protéine ETV6-AML1 ont été comparés à plusieurs différents sous-types de leucémies (T-ALL, MLL, BCR-ABL, E2A-PBX1, Hyperdiploïde ...) (Ross, Zhou et al. 2003). Les données disponibles nous ont permis de comparer nos résultats avec le top 100 des gènes différenciant la LLA comprenant ETV6-AML1 des autres leucémies. Malheureusement, aucun de nos 65 gènes ne se retrouve dans cette liste de gènes. Par contre, nous avons eu accès seulement au top 100 et dans l'article il est question de 805

sondes qui permettent de différencier cette leucémie des autres avec une valeur de  $p \leq 0.001$  suite à un test de chi-carré. Il existe donc une très grande différence dans le profil transcriptionnel des leucémies comportant des anomalies chromosomiques distinctes et certains de nos gènes sont peut-être retrouvés dans ces 805 sondes. Ce type d'étude de classification est d'ailleurs sujet à une grande variabilité dans les résultats entre différents laboratoires. Dans ce cas, environ 60% des gènes du top 100 sont des nouveaux gènes discriminant les sous-types de leucémies et n'avaient pas été trouvés dans d'autres études. Il existe donc une faible concordance entre les études. Ce principe est aussi visible dans d'autres types de cancers comme dans les études de prédictions pour le cancer du sein (Modlich, Prisack et al. 2005). Cette discordance peut s'expliquer par plusieurs facteurs comme l'utilisation de technologies de micropuces différentes ou encore l'utilisation de patients de différentes origines. Aussi, des petites différences dans les techniques d'analyse des données peuvent expliquer ces écarts puisqu'il n'y a pas de méthodes standardisées pour l'analyse des données lorsque la population est petite et qu'il y a une très grande quantité de données pour chaque patient.

Pour déterminer si les gènes modulés sont impliqués dans une voie biologique particulière, nous avons étudié la distribution des 65 gènes dans des catégories basées sur les termes de 'Gene Ontology'. ETV6-AML1 semble avoir une activité pléiotropique, puisque les gènes modulés font partie de plusieurs catégories biologiques différentes (Figure 18 et Tableau VII). Par contre, plusieurs de ces catégories sont importantes dans le développement ou le traitement du cancer. La catégorie 'prolifération et croissance cellulaire' qui est celle qui contient le plus de gènes modulés suite à l'induction de ETV6-AML1 est intéressante dans le cas des cancers, puisqu'une dérégulation dans cette voie pourrait entraîner une prolifération plus importante des cellules et amener à la production de blastes leucémiques. Il a d'ailleurs été démontré que les cellules hématopoïétiques progénitrices de type pré-B qui possèdent la translocation t(12;21) ont une croissance cellulaire à long terme en présence de facteurs de croissance (Morrow, Horton et al. 2004). Certains gènes participant à la différenciation cellulaire sont aussi présents parmi les 65 gènes modulés, ce qui est en accord avec les études démontrant l'impact de ETV6-AML1 sur la différenciation des

cellules lymphoïdes (Morrow, Horton et al. 2004; Fischer, Schwieger et al. 2005). Aussi, comme AML1 est impliqué dans la différenciation et la prolifération des cellules hématopoïétiques (Coffman 2003) et que ETV6-AML1 agit sur certaines de ses cibles, il est logique de penser que des gènes modulés par ETV6-AML1 peuvent appartenir à ces deux catégories.

La mort cellulaire par apoptose est un autre exemple de voie biologique intéressante qui ressort dans notre analyse. L'apoptose est impliquée dans le développement du cancer, car elle permet d'empêcher les cellules néoplasiques de survivre et d'engendrer un cancer (Carroll, Bhojwani et al. 2003). Un dérèglement dans cette voie pourrait permettre la survie de cellules génétiquement instables et créer une opportunité pour la sélection de clones (Evan and Littlewood 1998). Une modulation des gènes participant à l'apoptose peut aussi influencer l'efficacité des traitements de chimiothérapie, puisque ceux-ci activent souvent les voies d'apoptose pour éliminer les cellules cancéreuses (Debatin, Stahnke et al. 2003). Cela pourrait donc engendrer le besoin d'utiliser une plus grande dose d'agent pour avoir un effet semblable, ce qui aurait comme conséquence plus d'effets secondaires (Makin and Dive 2001). Par contre, si on considère que les patients avec la translocation t(12;21) répondent habituellement mieux aux traitements, particulièrement à l'asparaginase (Frost, Forestier et al. 2004), cette modulation de gènes reliés à l'apoptose suite à la présence de ETV6-AML1 représente peut-être un avantage plutôt qu'un inconvénient dans la réponse aux traitements des patients ayant la translocation par rapport à ceux qui ne la possèdent pas. Cette observation reste cependant à être validée.

L'angiogenèse est aussi intéressante lorsqu'il est question de cancer. En effet, le pouvoir de croissance, d'invasion et de métastase d'un cancer est dépendant de l'angiogenèse (Ribatti, Vacca et al. 1999). Par contre, son implication dans les maladies hématopoïétiques a été démontrée seulement vers les années 1994 (Ribatti, Scavelli et al. 2004). Kerbel et ses collègues ont d'ailleurs démontré dans un modèle de leucémie chez la souris que l'emploi d'une très faible dose d'agent antiangiogénique diminue la résistance aux traitements et élimine la maladie plus efficacement que le traitement normal (Kerbel, Vitoria-Petit et al. 2000). Donc, une modulation dans la voie

d'angiogenèse influencerait la réponse aux traitements des patients ayant la t(12;21), expliquant ainsi leur meilleure réponse. Aussi, ETV6 joue un rôle dans l'angiogenèse, puisque les souris double mutantes pour ETV6 montrent un problème dans l'angiogenèse du sac vitellin (Wang, Kuo et al. 1997). Comme ETV6-AML1 peut agir comme dominant négatif sur ETV6 (Gunji, Waga et al. 2004), certains des gènes présents dans cette catégorie sont peut-être en fait des cibles de ETV6 mais qui sont modulés à cause de la présence de ETV6-AML1 qui oligomériserait avec ETV6. D'ailleurs, les deux gènes de cette catégorie ont été étudiés dans notre laboratoire dans le cadre d'une étude semblable sur ETV6 et l'expression de SPHK1 montre une corrélation avec la perte de ETV6 chez les patients (Boily, G. et al, 2005). Bien sûr, parmi les différentes catégories représentées par les 65 gènes modulés, certaines montrent des liens moins évidents dans le cadre du cancer et ne seront pas discutés.

Les 65 gènes modulés montrent différents profils d'expression en fonction des temps d'induction de ETV6-AML1. Les gènes montrant un profil semblable ont plus de chances d'être co-modulés. Un événement surprenant ressort dans les profils d'expression des 65 gènes modulés. Ces gènes montrent une bonne modulation d'expression après 4h d'induction de ETV6-AML1, mais dans tous les cas, leur expression retourne à la normale après 48 heures d'induction. Nous assistons donc à une modulation transitoire des gènes. Cet effet transitoire ne peut pas s'expliquer par une diminution d'induction de la protéine chimérique au fil du temps, puisque la présence de ETV6-AML1 a été vérifiée par immunoblot et une augmentation dans la quantité de protéine est visible même après 48 heures d'induction. L'analyse des micropuces nous a aussi permis de constater que le niveau d'ARNm d'AML1 est en constante augmentation au cours du temps. Une hypothèse possible pour expliquer ce phénomène impliquerait des modifications post-traductionnelles qui pourraient rendre ETV6-AML1 moins actif. Il a été démontré que SUMO-1, une protéine 'ubiquitin-like', est en mesure de se lier à une lysine présente dans le domaine PNT de ETV6-AML1. Contrairement aux protéines d'ubiquitination, les 'ubiquitin-like' ne mènent pas à la dégradation de la protéine, mais permettent plutôt d'entraîner celle-ci dans une localisation subnucléaire différente (Chakrabarti, Sood et al. 2000). Cette nouvelle localisation rendrait alors

ETV6-AML1 moins accessible pour agir sur l'expression des gènes. Une autre hypothèse serait que ETV6-AML1 soit phosphorylé et que cette phosphorylation l'empêche de réguler l'expression de ses cibles. Il est possible que cette phosphorylation ait lieu dans le domaine de répression de ETV6-AML1 puisqu'il a été démontré que la protéine ERK est en mesure de phosphoryler les Ser213 et 257 présents dans le domaine de répression de ETV6. Cette phosphorylation fait en sorte que ETV6 n'est plus en mesure de réprimer l'expression de sa cible MMP3 (Maki, Arai et al. 2004). La phosphorylation empêche probablement le recrutement des cofacteurs nécessaires à sa fonction de répression. Puisque ETV6-AML1 contient ces deux sites de phosphorylation, celle-ci pourrait avoir le même effet sur ETV6-AML1. Une autre possibilité serait que ETV6-AML1 présent en grande quantité au fil du temps pourrait être sujet à une oligomérisation multiple via le domaine PNT formant des complexes qui ne pourraient pas aller agir sur la région régulatrice des gènes cibles.

Plusieurs méthodes de classification de gènes ont été utilisées pour faire ressortir des similarités entre les gènes co-modulés. Il est possible d'observer certaines tendances, particulièrement dans le regroupement selon la séquence de la région promotrice (figure 23), mais aucune évidence n'est visible. Parmi ces gènes, 15 candidats ont été sélectionnés pour leur implication dans différents cancers ou voies biologiques importantes. La modulation de l'expression de 10 de ces gènes a été validée par la méthode du RT-PCR quantitatif en temps réel, ce qui représente 67% de validation. Ce résultat est similaire au taux de validation retrouvé dans la littérature (Abruzzo, Wang et al. 2005; Beckers, Herrmann et al. 2005). Si l'on extrapole ce résultat, à l'ensemble des gènes modulés, alors 43 de ceux-ci représentent des cibles d'intérêt.

Les cellules HeLa sont des cellules épithéliales dérivées d'un cancer du col. Elles sont donc différentes des cellules hématopoïétiques. Pour vérifier la pertinence des 10 gènes validés dans la leucémie, nous avons quantifié leur expression dans le matériel de 17 patients dont 9 possédant la t(12;21). Les gènes IL11, DUSP4 et EGFR ne sont pas exprimés chez les patients. Aucune corrélation n'a été observée entre les gènes BHLHB2, DUSP1 ou IL8 et la présence de la translocation t(12;21) ou avec tout autre

paramètre clinique. Par contre, PTGS2 et SPHK1 ne montrent pas de corrélation avec ETV6-AML1, mais montrent un lien significatif avec le pronostic car leur expression est plus élevée chez les patients qui ont un risque standard. La définition du risque est basée sur plusieurs facteurs importants comme l'âge de l'apparition de la maladie, le sexe du patient, le compte des globules blancs, la présence d'anomalie génétique. Les patients avec un risque standard ont moins de chances de développer une rechute suite au traitement que les patients avec un risque élevé. Comme l'expression de SPHK1 et PTGS2 est plus élevée chez les patients avec le risque le plus faible, ces deux gènes aident peut-être dans la réponse aux traitements et dans la mort des cellules cancéreuses.

Les gènes Jun et F3 montrent une corrélation significative avec le statut de translocation des patients et avec la perte d'hétérozygotie des ETV6. Puisque la majorité des patients ayant la translocation t(12;21) ont aussi une délétion de l'allèle non-transloqué de ETV6, cette corrélation double n'est pas surprenante. Pour ce qui est de Jun, la modulation d'expression suite à la présence de ETV6-AML1 est aussi visible dans l'expérience de luciférase dans la lignée cellulaire JEG3. La modulation dans les JEG3 va dans le même sens que ce qui a été observé dans les micropuces faites à partir de notre système inductible, c'est-à-dire une augmentation d'expression de Jun en présence de ETV6-AML1. Par contre, dans le matériel de patient, contrairement à l'augmentation détectée dans les HeLa, le gène JUN montre une expression plus faible chez les patients ayant la translocation t(12;21). Le contexte cellulaire différent entre les cellules lymphocytaires et les cellules épithéliales peut expliquer cette différence dans la modulation de Jun, puisque des cofacteurs différents peuvent être présents et peuvent influencer la transcription. Donc, ETV6-AML1 semble avoir un effet de répression sur Jun dans la leucémie.

c-Jun (cellular jun) est un proto-oncogène de la famille des leucine-zipper qui est l'homologue d'un oncogène viral v-jun provenant d'un virus aviaire. Pour affecter la transcription des gènes, Jun doit être sous forme de dimère. Il peut créer des homodimères en se liant à lui-même ou encore former des hétérodimères avec d'autres membres de la famille leucine-zipper tels que Fos, Maf et ATF. L'ensemble de ces

dimères forme le complexe activateur de protéine AP1 qui peut donc être formé de partenaires différents selon le contexte cellulaire et le stimuli. Ces dimères peuvent reconnaître des séquences consensus différentes, avec une affinité variée et peuvent se comporter comme répresseur ou activateur de transcription dépendant du contexte cellulaire (figure 28a). AP1 est donc un complexe qui régule l'expression d'une multitude de gènes impliqués dans des processus très différents. AP1 est activé par une multitude de stimuli extracellulaires incluant les mitogènes, les hormones, la matrice extracellulaire et des agents génotoxiques (Ameyar, Wisniewska et al. 2003). Jun reste par contre la composante centrale du complexe AP1 et son partenaire principal est Fos. L'activité de Jun est régulée à plusieurs niveaux (figure 28b). Premièrement, au niveau transcriptionnel où Jun peut s'auto-réguler en homodimérisant et en agissant sur son propre promoteur. Aussi, des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation des sérines 63 et 73 par JNK vont entraîner une activation de Jun. Cette activation est notamment visible pendant le passage de la phase M à la phase G1 du cycle cellulaire (Ryseck, Hirai et al. 1988; Lallemand, Spyrou et al. 1997). Finalement, les partenaires de Jun pour former le complexe AP1 vont aussi influencer son action en faisant varier la séquence de liaison à un promoteur ou encore son affinité pour cette séquence.

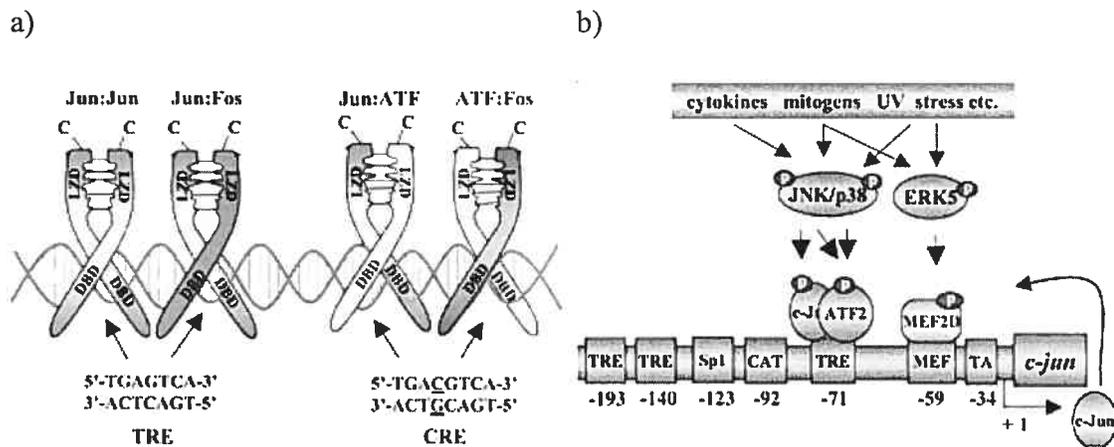


Figure 28 : Formation du complexe AP1 par la dimérisation de deux protéines leucine-zipper et régulation de la protéine Jun. a) Interaction de deux protéines leucine-zipper pour la formation du complexe AP-1. La variabilité des partenaires fait varier la séquence de reconnaissance du complexe. b) L'activité de Jun peut être régulé à deux niveaux ; au niveau transcriptionnel où Jun peut s'auto-réguler en agissant sur son propre promoteur et au niveau post-traductionnel en étant phosphorylé par la protéine JNK suite à son activation par différents stimuli. Figure adapté de (Reddy and Mossman 2002)

Pour mieux comprendre l'impact d'une diminution d'expression de Jun dans les patients avec la t(12;21), il est important avant tout de connaître le rôle de Jun dans la cellule. Jun participe à plusieurs processus cellulaires et est activé en réponse à plusieurs stimuli, comme les facteurs de croissance, les cytokines et les irradiations aux UV (Ameyar, Wisniewska et al. 2003). Une grande question persiste au sujet de Jun : Est-ce que Jun (ou AP1) est impliqué dans la prolifération cellulaire ou plutôt dans l'apoptose? Plusieurs études se sont penchées sur la question et il existe maintenant plusieurs évidences suggérant que Jun est impliqué dans ces deux processus et promouvoie la prolifération ou l'apoptose selon le type de cellules impliquées et la nature du stimuli (Shaulian and Karin 2002). Des études avec des souris doubles mutantes pour Jun ont démontré que ce gène possède un rôle important puisque les souris meurent à l'état embryonnaire. Jun est particulièrement impliqué dans le développement cardiaque et le développement hépatique (Hilberg, Aguzzi et al. 1993; Eferl, Sibilica et al. 1999). Ceci explique la forte activité du promoteur observée lors de l'expérience de luciférase dans la lignée cellulaire HepG2, qui est dérivée de cellules du foie. Les souris doubles mutantes montrent des artères tronquées et des hémorragies et des oedèmes dans le foie. Il y a aussi un taux élevé d'apoptose dans les hépatoblastes et les cellules hématopoïétiques. Ces études chez la souris semblent donc impliquer Jun dans la prolifération cellulaire plutôt que dans la promotion de l'apoptose.

Jun a aussi une fonction dans le cycle cellulaire et serait important pour permettre l'entrée dans la phase S. Ceci a été observé dans des fibroblastes déficients pour Jun où les cellules montrent une croissance plus lente et une sénescence prématurée *in vitro* (Johnson, van Lingen et al. 1993). Moléculairement, la perte de Jun entraîne une expression plus élevée du gène suppresseur de tumeur p53 et donc de sa cible p21. Cette élévation de p21 permet d'inhiber plusieurs kinases cyclines-dépendantes et bloque donc le cycle cellulaire (Schreiber, Kolbus et al. 1999). Jun est aussi en mesure d'activer le promoteur de la cycline D1 (Bakiri, Lallemand et al. 2000). Donc, Jun a un effet sur la prolifération en permettant le passage de la phase G1 à la phase S et ce en élevant le niveau de cycline D1 et en diminuant le niveau de p53 et de p21. Dans ce contexte, Jun agirait comme oncogène et sa surexpression pourrait entraîner une

prolifération excessive des cellules. Ceci est notamment visible lorsque Jun est surexprimé dans les cellules humaines de cancer du sein (MCF7). Ces cellules présentent alors une mobilité plus grande, une perte de réponse aux hormones, une croissance dans un faible niveau de sérum et une augmentation de la formation de tumeur chez les souris nues (Doucas, Spyrou et al. 1991). Cette tumorigénicité est perdue lorsque le site de liaison à l'ADN de Jun est muté.

En considérant l'ensemble de ces observations suggérant le rôle de Jun dans la prolifération cellulaire, une diminution d'expression de Jun chez les patients exprimant ETV6-AML1 ne pourrait pas expliquer l'implication de ETV6-AML1 dans la prolifération excessive des cellules pour former la leucémie. Comme Jun est sous-exprimé chez les patients qui expriment ETV6-AML1, ces cellules devraient plutôt proliférer plus lentement. Par contre, la diminution d'expression de Jun pourrait contribuer au fait que les patients avec la t(12;21) montrent un meilleur pronostic et une meilleure réponse aux traitements. En effet, il a été démontré dans les cellules leucémiques HL60 que l'inhibition de l'activité de AP1 entraînait une apoptose par la voie de p53 et c-myc (Park, Hahm et al. 2004). Dans cette étude, deux inhibiteurs différents sont utilisés, le premier empêche la synthèse d'ARNm de Jun et le second inhibe la phosphorylation de Jun par JNK et empêche son activation. Dans les deux cas la prolifération est inhibée puisque Jun est inactif et l'apoptose est induite par la voie p53 et c-myc. Comme plusieurs agents chimiothérapeutiques utilisés pour le traitement de la leucémie agissent en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses, les patients montrant une diminution d'expression de Jun auraient peut-être une prédisposition à l'apoptose par la voie p53 et c-myc et répondraient peut-être plus facilement aux traitements de chimiothérapie. De plus, l'agent thérapeutique L-asparaginase, pour lequel les patients LLA avec la t(12;21) montre une très bonne réponse, hydrolyse l'acide aminé asparagine en acide aspartique et en ammoniac. Les cellules normales sont en mesure de synthétiser quand même une quantité suffisante d'asparagine, mais les cellules qui répondent au traitement ne le sont pas et elles meurent (Muller and Boos 1998). La mort cellulaire s'ensuit à cause d'une impossibilité à bien synthétiser l'ADN et l'ARN. Une étude faite dans des cellules leucémiques murines montre que le

traitement à la L-asparaginase entraîne un arrêt dans le cycle cellulaire à la phase G1 et ensuite une mort cellulaire visible par une fragmentation de l'ADN (Ueno, Ohtawa et al. 1997). Comme Jun est important dans le passage de la phase G1 à la phase S, sa plus faible expression chez les patients exprimant ETV6-AML1 pourrait favoriser cet arrêt du cycle cellulaire et améliorer les chances de réponse au traitement.

Jun possède aussi une fonction dans la promotion de l'apoptose dans certains types de cellules et en réponse à certains stimuli. Son implication dans l'apoptose a d'abord été suggérée suite à l'observation que Jun est activé en réponse à une situation de stress comme par exemple les irradiations aux UV ou la privation de facteurs de croissance. En effet, le niveau d'ARNm de Jun et de Fos est augmenté très rapidement suite à une privation en facteurs de croissance dans les cellules lymphoïdes cytokines-dépendantes (Colotta, Polentarutti et al. 1992). Depuis, l'implication de Jun dans la promotion de l'apoptose a été démontrée dans plusieurs autres types cellulaires notamment dans les cellules endothéliales, fibroblastiques ou neuronales. Dans les cellules endothéliales la réaction d'apoptose produite suite à la surexpression de Jun est annulée par l'ajout d'un dominant négatif de Jun (Wang, Verna et al. 1999). De plus, dans les fibroblastes, Jun semble réguler l'expression du gène pro-apoptotique Fas ligand (Kolbus, Herr et al. 2000). La promotion de l'apoptose observée dans les cellules lymphoïdes suite à un stress porterait donc à croire qu'une diminution de Jun en présence de la protéine ETV6-AML1 pourrait diminuer l'apoptose et expliquer une partie de l'implication de ETV6-AML1 dans le développement de la leucémie.

Puisque Jun peut participer autant dans le processus de la prolifération cellulaire que dans celui de l'apoptose, il est difficile de prédire l'impact de sa répression dans les patients exprimant ETV6-AML1. Comme l'activité de ce gène varie en fonction des stimuli, il est possible qu'en étant moins exprimé chez les patients avec la t(12;21) il participe à la leucémogénèse en diminuant l'apoptose par la voie Fas/Fas ligand, mais que suite au traitement avec des agents chimiothérapeutiques il soit plutôt impliqué dans la meilleure réponse au traitement en permettant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et en priorisant la voie d'apoptose de p53 et c-myc.

Le gène F3 montre aussi une corrélation significative avec le statut de translocation des patients. Ce gène, aussi appelé coagulation factor III ou tissue factor, montre une expression plus élevée dans les patients exprimant ETV6-AML1. Ceci est conforme à ce qui a été retrouvé dans les HeLa. Par contre, aucun effet significatif n'a été visible dans les expériences de luciférase. F3 est une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la super famille des récepteurs de cytokines. Lors d'une blessure vasculaire, ce récepteur est lié par FVII, ce qui initie la cascade de coagulation et entraîne le clivage du fibrinogène en fibrine. Des études chez la souris montrent que 90% des souris déficientes pour F3 meurent à l'état embryonnaire. Il y a chez ces embryons un problème hémostatique qui est visible par une hémorragie fatale. Aussi, il y a une désorganisation de la vascularité du sac vitellin. En plus de son rôle dans la coagulation, F3 semble impliqué dans l'inflammation, l'angiogenèse, les métastases et la migration cellulaire (Mackman 2004).

F3 est exprimée dans la plupart des tissus, mais parmi les cellules qui circulent dans le sang, seuls les monocytes produisent F3. Cette expression n'est pas constitutive, mais est induite en réponse à une variété de stimuli comme les LPS, les cytokines, l'acide arachidonique et certains complexes du système immunitaire. Par contre, certaines évidences montrent que les plaquettes sont en mesure de l'exprimer (Muller, Klocke et al. 2003) et qu'il existe aussi des microparticules dérivées de cellules qui expriment F3 dans le sang (Nieuwland, Berckmans et al. 1997; Muller, Klocke et al. 2003). Donc, comme les lymphocytes n'expriment pas F3, nous ne nous serions pas attendus à voir une expression dans le matériel de patient, puisque les échantillons contiennent au moins 80% de lymphoblastes leucémiques. Nous pourrions donc penser que l'expression observée est due à une contamination présente dans les 20% de cellules qui ne sont pas des cellules leucémiques, soit par la présence de monocytes et de plaquettes ou encore de microparticules. Dans ce cas, F3 ne serait pas une cible directe de ETV6-AML1 mais serait plutôt induit chez les monocytes par la sécrétion de signaux comme les cytokines par les cellules lymphocytaires. Par contre, une étude récente a démontré que certaines sous-populations de lymphocytes B sont en mesure d'exprimer F3 en réponse au phorbol myristate acetate (PMA) (Mechiche, Cornillet-Lefebvre et al. 2005). Dans cette étude, la

protéine et l'ARNm de F3 ont été retrouvés à la surface de ces cellules; donc les lymphocytes B sont une source potentielle de production de tissue factor chez l'humain dans certaines conditions. Une autre étude a démontré que les blastes leucémiques dans la LLA sont en mesure d'exprimer à leur surface le récepteur F3 et ce à un niveau plus élevé que chez les cellules mononuclées d'un donneur normal (Tanaka and Yamanishi 1993). Dans notre étude, nous avons aussi évalué l'expression de F3 dans la lignée cellulaire leucémique Reh qui est une lignée de LLA pré-B qui exprime ETV6-AML1. Le gène F3 est exprimé dans ces cellules. Comme la lignée cellulaire est constituée d'un seul type de cellules et est considérée comme étant pure, la présence de F3 peut seulement être due au fait que les cellules lymphoblastiques de type pré-B expriment ce gène et non pas à la présence de contaminant provenant d'un autre type de cellule du sang. Donc, des facteurs spéciaux font probablement en sorte que F3 est exprimé dans les lymphoblastes par rapport aux lymphocytes normaux. La présence de F3 dans nos échantillons est probablement vraiment due à son expression à la surface des blastes leucémiques.

Une corrélation a été observée entre l'expression de F3 et la présence de la translocation t(12;21) chez nos patients. Les patients exprimant ETV6-AML1 montrent un niveau de F3 plus élevé. Cette modification d'expression pourrait entraîner des complications thrombotiques. Des problèmes thrombotiques sont en effet rencontrés particulièrement chez les patients traités avec la L-asparaginase à une fréquence pouvant aller jusqu'à 36% des cas (Mitchell, Andrew et al. 2003). Il a été démontré que les patients qui présentent des thromboembolies ont habituellement un niveau de fibrinogène plus bas que les autres (Beinart and Damon 2004). Comme F3 initie la cascade de coagulation qui résulte en le clivage du fibrinogène en fibrine, une expression plus élevée de F3 pourrait faire diminuer la quantité de fibrinogène et donc augmenter les chances d'événement thrombotiques. Par contre, aucune étude n'a été faite pour comparer la fréquence des problèmes hémostatiques entre les patients atteints de la LLA et avec ou sans la translocation t(12;21). Il nous est donc impossible de dire si les patients avec la translocation et montrant une expression plus élevée de F3 ont une plus forte incidence de problèmes thrombotiques au cours du traitement.

## Conclusion

ETV6-AML1 est une protéine chimérique retrouvée dans 25% des cas de LLA pré-B. Son implication dans le développement de la leucémie ou dans la réponse aux traitements est encore inconnue. Grâce à l'utilisation d'un modèle cellulaire inductible et de la technologie des micropuces, nous avons identifié 65 gènes modulés suite à l'induction de ETV6-AML1. Ces gènes sont impliqués dans plusieurs voies biologiques différentes. Certaines de ces voies sont très importantes pour le contrôle des cellules et pourraient participer au développement d'un cancer ou moduler la réponse au traitement si elles sont altérées. Une étude d'immunoprécipitation de la chromatine serait une stratégie intéressante permettant de vérifier si certains des 65 gènes modulés sont des cibles directes de ETV6-AML1. Cette méthode permettrait de détecter les interactions directes entre la protéine chimérique ETV6-AML1 et la région promotrice des gènes et ce dans un contexte *in vivo*.

Jusqu'à maintenant, le profil d'expression de 10 gènes a été validé par la méthode du RT-PCR quantitatif en temps réel. La validation des gènes se poursuivra au cours des prochains mois. Parmi ces 10 gènes validés, Jun et F3 ont montré une corrélation significative avec le statut de translocation de patients atteints de LLA pré-B. Jun est moins exprimé dans le matériel de patients exprimant ETV6-AML1. Puisque Jun peut participer autant dans le processus de la prolifération cellulaire que dans celui de l'apoptose, il est difficile de prédire l'impact de sa sous expression chez ces patients. Il est possible qu'en étant moins exprimé, il participe à la leucémogénèse en diminuant l'apoptose par la voie Fas/Fas ligand. Par contre, le fait que Jun est exprimé plus faiblement chez les patients avec t(12;21) pourrait aussi participer à la meilleure réponse au traitement qui caractérise ce sous-groupe de patients. Dans ce cas, le faible niveau de Jun permettrait l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et pourrait aussi prioriser la voie d'apoptose de p53 et c-myc. Un traitement ciblant cette voie d'apoptose serait donc probablement plus efficace pour éliminer les blastes leucémiques qui expriment ETV6-AML1. Jun a aussi démontré une modulation d'expression par ETV6-AML1 dans une étude d'expression à l'aide du gène rapporteur luciférase. Une étude de mutagenèse

dirigée serait donc intéressante à faire pour vérifier si Jun est une cible directe de ETV6-AML1 et pour voir quel site de liaison est le plus important. En effet, comme la région régulatrice de Jun comporte 5 sites potentiels de liaison pour des facteurs AML, il serait possible de muter spécifiquement un ou plusieurs de ces sites. Si l'augmentation d'expression de Jun observée dans les cellules JEG3 est annulée suite à la mutation d'un ou de plusieurs sites de liaison AML, cela signifierait que ETV6-AML1 se lie à ces sites pour exercer son action sur la transcription de Jun. Une autre alternative serait une étude d'immunoprécipitation de la chromatine, car elle permettrait d'identifier les séquences d'ADN qui agissent directement avec la protéine chimérique et permettrait de vérifier si ETV6-AML1 interagit avec la région promotrice de Jun .

Pour ce qui est du gène F3, ce gène n'est habituellement pas exprimé dans les lymphocytes B. Par contre, son expression est retrouvée chez les blastes leucémiques. Une corrélation significative avec le statut de translocation des patients est observée dans notre étude. Comme F3 est impliqué dans la cascade de coagulation, une expression plus élevée chez les patients avec la translocation t(12;21) pourrait peut-être entraîner une plus forte chance de complications thrombotiques. Dans ce cas, l'utilisation d'anticoagulant au cours du traitement serait très importante. Par contre, aucune étude jusqu'à présent n'a étudié la différence dans la fréquence des événements hémostatiques chez les patients LLA avec la t(12;21) versus ceux qui ne l'ont pas.

Donc, cette étude nous a permis d'identifier plusieurs gènes modulés suite à l'induction de ETV6-AML1 et plus particulièrement les gènes Jun et F3 qui montrent une modulation d'expression chez les patients en corrélation avec leur statut de translocation. En continuant à valider des cibles et en étudiant si ces cibles sont directement affectées par ETV6-AML1, nous comprendrons mieux l'effet de la protéine chimérique sur l'expression des gènes et ceci pourra permettre à long terme de cibler des gènes, lors du développement de nouveaux traitements, qui seront spécialement efficaces pour ce sous-groupe de patients. Les traitements pourront alors être plus spécialisés et individualisés ce qui permettra de diminuer la dose nécessaire à la guérison

ou encore d'éviter l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques inappropriés et par le fait même diminuera les effets secondaires.

## Bibliographie

- Abruzzo, L. V., J. Wang, et al. (2005). "Biological validation of differentially expressed genes in chronic lymphocytic leukemia identified by applying multiple statistical methods to oligonucleotide microarrays." J Mol Diagn 7(3): 337-45.
- Alexander, F. E., S. L. Patheal, et al. (2001). "Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion." Cancer Res 61(6): 2542-6.
- Ameyar, M., M. Wisniewska, et al. (2003). "A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against." Biochimie 85(8): 747-52.
- Asakura, K., H. Uchida, et al. (2004). "TEL/AML1 overcomes drug resistance through transcriptional repression of multidrug resistance-1 gene expression." Mol Cancer Res 2(6): 339-47.
- Bakiri, L., D. Lallemand, et al. (2000). "Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression." Embo J 19(9): 2056-68.
- Beckers, J., F. Herrmann, et al. (2005). "Identification and validation of novel ERBB2 (HER2, NEU) targets including genes involved in angiogenesis." Int J Cancer 114(4): 590-7.
- Beinart, G. and L. Damon (2004). "Thrombosis associated with L-asparaginase therapy and low fibrinogen levels in adult acute lymphoblastic leukemia." Am J Hematol 77(4): 331-5.
- Berger, R. (1997). "Acute lymphoblastic leukemia and chromosome 21." Cancer Genet Cytogenet 94(1): 8-12.
- Biesalski, H. K., B. Bueno de Mesquita, et al. (1998). "European Consensus Statement on Lung Cancer: risk factors and prevention. Lung Cancer Panel." CA Cancer J Clin 48(3): 167-76; discussion 164-6.
- Biondi, A., G. Cimino, et al. (2000). "Biological and therapeutic aspects of infant leukemia." Blood 96(1): 24-33.
- Bishop, J. M. (1991). "Molecular themes in oncogenesis." Cell 64(2): 235-48.
- Bohlander, S. K. (2005). "ETV6: a versatile player in leukemogenesis." Semin Cancer Biol 15(3): 162-74.
- Boily G., Larose, J., Langlois S., Sinnett, D., (2005) Identification of transcripts modulated by ETV6, a putative tumour suppressor gene associated to childhood leukemia (soumis).
- Carroll, W. L., D. Bhojwani, et al. (2003). "Pediatric acute lymphoblastic leukemia." Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 102-31.
- Chakrabarti, S. R., R. Sood, et al. (2000). "Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies." Proc Natl Acad Sci U S A 97(24): 13281-5.
- Clarke, P. A., R. te Poele, et al. (2001). "Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential." Biochem Pharmacol 62(10): 1311-36.
- Coffman, J. A. (2003). "Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation." Cell Biol Int 27(4): 315-24.

- Colotta, F., N. Polentarutti, et al. (1992). "Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines." J Biol Chem **267**(26): 18278-83.
- Debatin, K. M., K. Stahnke, et al. (2003). "Apoptosis in hematological disorders." Semin Cancer Biol **13**(2): 149-58.
- Doucas, V., G. Spyrou, et al. (1991). "Unregulated expression of c-Jun or c-Fos proteins but not Jun D inhibits oestrogen receptor activity in human breast cancer derived cells." Embo J **10**(8): 2237-45.
- Eferl, R., M. Sibilica, et al. (1999). "Functions of c-Jun in liver and heart development." J Cell Biol **145**(5): 1049-61.
- Evan, G. and T. Littlewood (1998). "A matter of life and cell death." Science **281**(5381): 1317-22.
- Fenrick, R., L. Wang, et al. (2000). "TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1." Mol Cell Biol **20**(16): 5828-39.
- Fischer, M., M. Schwieger, et al. (2005). "Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model." Oncogene.
- Ford, A. M., C. A. Bennett, et al. (1998). "Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4584-8.
- Frost, B. M., E. Forestier, et al. (2004). "Translocation t(12;21) is related to in vitro cellular drug sensitivity to doxorubicin and etoposide in childhood acute lymphoblastic leukemia." Blood **104**(8): 2452-7.
- Gale, K. B., A. M. Ford, et al. (1997). "Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13950-4.
- Garcia-Vallejo, J. J., B. Van Het Hof, et al. (2004). "Approach for defining endogenous reference genes in gene expression experiments." Anal Biochem **329**(2): 293-9.
- Greaves, M. (1993). "A natural history for pediatric acute leukemia." Blood **82**(4): 1043-51.
- Greaves, M. F. and J. Wiemels (2003). "Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia." Nat Rev Cancer **3**(9): 639-49.
- Gunji, H., K. Waga, et al. (2004). "TEL/AML1 shows dominant-negative effects over TEL as well as AML1." Biochem Biophys Res Commun **322**(2): 623-30.
- Hilberg, F., A. Aguzzi, et al. (1993). "c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis." Nature **365**(6442): 179-81.
- Irvin, B. J., L. D. Wood, et al. (2003). "TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL." J Biol Chem **278**(47): 46378-86.
- Ito, Y. (1999). "Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF." Genes Cells **4**(12): 685-96.
- Johnson, R. S., B. van Lingen, et al. (1993). "A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture." Genes Dev **7**(7B): 1309-17.
- Kerbel, R. S., A. Vilorio-Petit, et al. (2000). "'Accidental' anti-angiogenic drugs. anti-oncogene directed signal transduction inhibitors and conventional chemotherapeutic agents as examples." Eur J Cancer **36**(10): 1248-57.

- Knudson, A. G. (1992). "Stem cell regulation, tissue ontogeny, and oncogenic events." Semin Cancer Biol 3(3): 99-106.
- Kolbus, A., I. Herr, et al. (2000). "c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents." Mol Cell Biol 20(2): 575-82.
- Kurokawa, M. and H. Hirai (2003). "Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies." Cancer Sci 94(10): 841-6.
- Lacaud, G., L. Gore, et al. (2002). "Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro." Blood 100(2): 458-66.
- Lallemand, D., G. Spyrou, et al. (1997). "Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts." Oncogene 14(7): 819-30.
- Lightfoot, T. J. and E. Roman (2004). "Causes of childhood leukaemia and lymphoma." Toxicol Appl Pharmacol 199(2): 104-17.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25(4): 402-8.
- Look, A. T. (1997). "Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias." Science 278(5340): 1059-64.
- Lopez, R. G., C. Carron, et al. (1999). "TEL is a sequence-specific transcriptional repressor." J Biol Chem 274(42): 30132-8.
- Mackman, N. (2004). "Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(6): 1015-22.
- Maki, K., H. Arai, et al. (2004). "Leukemia-related transcription factor TEL is negatively regulated through extracellular signal-regulated kinase-induced phosphorylation." Mol Cell Biol 24(8): 3227-37.
- Makin, G. and C. Dive (2001). "Apoptosis and cancer chemotherapy." Trends Cell Biol 11(11): S22-6.
- Mavrothalassitis, G. and J. Ghysdael (2000). "Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity." Oncogene 19(55): 6524-32.
- Mechiche, H., P. Cornillet-Lefebvre, et al. (2005). "A subpopulation of human B lymphocytes can express a functional Tissue Factor in response to phorbol myristate acetate." Thromb Haemost 94(1): 146-54.
- Meyers, S., J. R. Downing, et al. (1993). "Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions." Mol Cell Biol 13(10): 6336-45.
- Mikhail, F. M., K. K. Sinha, et al. (2005). "Normal and transforming functions of RUNX1: A perspective." J Cell Physiol.
- Miller, R. W., J. L. Young, Jr., et al. (1995). "Childhood cancer." Cancer 75(1 Suppl): 395-405.
- Mitchell, L. G., M. Andrew, et al. (2003). "A prospective cohort study determining the prevalence of thrombotic events in children with acute lymphoblastic leukemia and a central venous line who are treated with L-asparaginase: results of the Prophylactic Antithrombin Replacement in Kids with Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with Asparaginase (PARKAA) Study." Cancer 97(2): 508-16.

- Modlich, O., H. B. Prissack, et al. (2005). "Predictors of primary breast cancers responsiveness to preoperative epirubicin/cyclophosphamide-based chemotherapy: translation of microarray data into clinically useful predictive signatures." J Transl Med 3: 32.
- Montpetit, A., J. Larose, et al. (2004). "Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia." Leukemia 18(9): 1499-504.
- Morgenstern, B., K. Frech, et al. (1998). "DIALIGN: finding local similarities by multiple sequence alignment." Bioinformatics 14(3): 290-4.
- Mori, H., S. M. Colman, et al. (2002). "Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development." Proc Natl Acad Sci U S A 99(12): 8242-7.
- Morrow, M., S. Horton, et al. (2004). "TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity." Blood 103(10): 3890-6.
- Muller, H. J. and J. Boos (1998). "Use of L-asparaginase in childhood ALL." Crit Rev Oncol Hematol 28(2): 97-113.
- Muller, I., A. Klocke, et al. (2003). "Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets." Faseb J 17(3): 476-8.
- Nguyen Khac, F. and O. A. Bernard (2003). "[Chromosomal translocations in human malignant hematopoiesis. Structural and functional consequences]." Pathol Biol (Paris) 51(6): 382-9.
- Nieuwland, R., R. J. Berckmans, et al. (1997). "Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant." Circulation 96(10): 3534-41.
- Nimgaonkar, A., D. Sanoudou, et al. (2003). "Reproducibility of gene expression across generations of Affymetrix microarrays." BMC Bioinformatics 4: 27.
- Novak, J. P., R. Sladek, et al. (2002). "Characterization of variability in large-scale gene expression data: implications for study design." Genomics 79(1): 104-13.
- Oliveria, S. A., M. Saraiya, et al. (2005). "Sun exposure and risk of melanoma." Arch Dis Child.
- Park, S., E. R. Hahm, et al. (2004). "Inhibition of AP-1 transcription activator induces myc-dependent apoptosis in HL60 cells." J Cell Biochem 91(5): 973-86.
- Pollock, B. H., H. B. Jenson, et al. (2003). "Risk factors for pediatric human immunodeficiency virus-related malignancy." Jama 289(18): 2393-9.
- Proietti, F. A., A. B. Carneiro-Proietti, et al. (2005). "Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases." Oncogene 24(39): 6058-68.
- Pui, C. H., P. S. Gaynon, et al. (2002). "Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region." Lancet 359(9321): 1909-15.
- Pui, C. H., M. V. Relling, et al. (2004). "Acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med 350(15): 1535-48.
- Pui, C. H., M. Schrappe, et al. (2004). "Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia." Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 118-45.
- Reddy, S. P. and B. T. Mossman (2002). "Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283(6): L1161-78.

- Ribatti, D., C. Scavelli, et al. (2004). "Hematopoietic cancer and angiogenesis." Stem Cells Dev **13**(5): 484-95.
- Ribatti, D., A. Vacca, et al. (1999). "The role of the vascular phase in solid tumor growth: a historical review." Neoplasia **1**(4): 293-302.
- Rompaey, L. V., M. Potter, et al. (2000). "Tel induces a G1 arrest and suppresses Ras-induced transformation." Oncogene **19**(46): 5244-50.
- Ross, M. E., X. Zhou, et al. (2003). "Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling." Blood **102**(8): 2951-9.
- Roumier, C., P. Fenaux, et al. (2003). "New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies." Leukemia **17**(1): 9-16.
- Rubnitz, J. E., C. H. Pui, et al. (1999). "The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias." Leukemia **13**(1): 6-13.
- Ryseck, R. P., S. I. Hirai, et al. (1988). "Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts." Nature **334**(6182): 535-7.
- Sakurai, T., T. Yamada, et al. (2003). "Effects of overexpression of the Ets family transcription factor TEL on cell growth and differentiation of K562 cells." Int J Oncol **22**(6): 1327-33.
- Sawinska, M. and D. Ladon (2004). "Mechanism, detection and clinical significance of the reciprocal translocation t(12;21)(p12;q22) in the children suffering from acute lymphoblastic leukaemia." Leuk Res **28**(1): 35-42.
- Schreiber, M., A. Kolbus, et al. (1999). "Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent." Genes Dev **13**(5): 607-19.
- Shaulian, E. and M. Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." Nat Cell Biol **4**(5): E131-6.
- Shklar, G. (1998). "Mechanisms of cancer inhibition by anti-oxidant nutrients." Oral Oncol **34**(1): 24-9.
- Shurtleff, S. A., A. Buijs, et al. (1995). "TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis." Leukemia **9**(12): 1985-9.
- Strick, R., P. L. Strissel, et al. (2000). "Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4790-5.
- Su, A. I., T. Wiltshire, et al. (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6062-7.
- Tan, P. K., T. J. Downey, et al. (2003). "Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms." Nucleic Acids Res **31**(19): 5676-84.
- Tanaka, M. and H. Yamanishi (1993). "The expression of tissue factor antigen and activity on the surface of leukemic cells." Leuk Res **17**(2): 103-11.
- Tanaka, T., K. Tanaka, et al. (1995). "An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms." Embo J **14**(2): 341-50.
- Tsuzuki, S., M. Seto, et al. (2004). "Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(22): 8443-8.
- Uchida, H., J. R. Downing, et al. (1999). "Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 promoter." Oncogene **18**(4): 1015-22.

- Uchida, H., J. Zhang, et al. (1997). "AML1A and AML1B can transactivate the human IL-3 promoter." J Immunol **158**(5): 2251-8.
- Ueno, T., K. Ohtawa, et al. (1997). "Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase." Leukemia **11**(11): 1858-61.
- Wang, L. C., F. Kuo, et al. (1997). "Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL." Embo J **16**(14): 4374-83.
- Wang, L. C., W. Swat, et al. (1998). "The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow." Genes Dev **12**(15): 2392-402.
- Wang, N., L. Verna, et al. (1999). "c-Jun triggers apoptosis in human vascular endothelial cells." Circ Res **85**(5): 387-93.
- Wiemels, J. L. and M. Greaves (1999). "Structure and possible mechanisms of TEL-AML1 gene fusions in childhood acute lymphoblastic leukemia." Cancer Res **59**(16): 4075-82.
- Zelent, A., M. Greaves, et al. (2004). "Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia." Oncogene **23**(24): 4275-83.

## ANNEXE I

Tableau XI : Valeur d'expression des 804 sondes ayant une valeur de  $p \leq 0,05$  suite à un test ANOVA pour chaque temps d'induction de ETV6-AML1 suite à l'hybridation aux micropuces (HU-133A).

Sonde	0h	4h	12h	48h	Valeur p
200013_at	19727.7	21431.2	20392.7	19234.7	2.8E-03
200027_at	5704.9	5617.5	6435.3	5652.2	6.0E-03
200067_x_at	4416.3	3149.2	4311.8	4395.1	5.5E-03
200097_s_at	4722.4	4776.7	3905.7	4788.9	3.9E-03
200637_s_at	566.7	784.4	685.4	516.1	1.7E-03
200655_s_at	7384.4	6205.6	6338.5	7557.9	1.1E-03
200661_at	1699.5	2015.2	2426.0	1793.2	1.6E-04
200663_at	12378.3	13712.7	14417.0	11747.0	4.8E-03
200664_s_at	1881.1	1941.5	2969.6	2174.9	4.2E-04
200666_s_at	2850.0	2747.6	4121.4	3168.6	4.9E-03
200670_at	1522.3	2774.4	1850.5	1666.7	8.0E-04
200676_s_at	602.1	452.2	496.8	593.8	9.1E-03
200696_s_at	534.5	547.1	637.3	798.1	5.8E-03
200711_s_at	4946.2	4043.8	3994.7	4600.0	8.8E-04
200779_at	5854.8	9581.7	6983.1	6394.2	8.6E-04
200788_s_at	1282.1	2009.1	1496.3	1485.3	1.3E-04
200790_at	10543.8	12404.6	12188.6	9789.2	7.6E-03
200796_s_at	341.1	601.3	423.1	347.9	4.6E-03
200797_s_at	2392.6	4142.3	2999.0	2301.1	2.5E-03
200798_x_at	2248.3	3716.1	2373.1	2039.9	8.1E-04
200799_at	4597.9	3965.1	7612.7	5950.2	7.0E-03
200800_s_at	1127.9	1041.1	2462.9	1505.1	2.2E-03
200810_s_at	700.8	1037.4	829.6	728.4	8.1E-03
200811_at	1341.4	1720.6	1301.4	1250.7	2.3E-03
200831_s_at	1662.1	1359.9	1192.3	1694.9	1.2E-03
200832_s_at	2463.9	1623.9	1565.6	2649.7	2.2E-05
200863_s_at	4543.5	3880.1	4296.2	4437.5	8.0E-05
200872_at	9998.3	14633.7	13768.0	9690.6	9.9E-05
200916_at	7515.5	9054.3	8532.8	6833.3	2.3E-05
200920_s_at	1358.9	2581.1	1714.2	1336.2	1.3E-05
200921_s_at	1154.7	2149.6	1273.3	1183.3	2.9E-04
200924_s_at	3749.6	5223.8	5068.1	4172.1	9.7E-04
200931_s_at	4916.3	5865.2	4684.9	4380.6	6.8E-03
200983_x_at	7984.3	12216.8	11802.9	8143.7	6.6E-03
200984_s_at	4439.3	6746.1	5992.9	4408.3	7.3E-03
200985_s_at	3563.7	6043.7	5426.0	3755.3	4.7E-03
200989_at	6677.2	8293.3	6437.5	6006.4	5.8E-04
200995_at	2818.5	2871.3	2331.3	2767.4	7.2E-03
201007_at	1899.2	1595.4	1820.9	2025.4	4.0E-03
201025_at	667.8	676.0	516.9	676.3	6.7E-03
201034_at	1411.3	920.8	1093.6	1316.2	1.4E-03

## Tableau XI (suite)

201041_s_at	3438.5	6993.6	3746.6	3072.3	1.1E-06
201051_at	4854.7	4100.8	4682.9	4945.8	5.2E-03
201064_s_at	6549.5	5882.2	5893.4	6525.4	2.7E-03
201074_at	2417.5	1958.4	2205.6	2514.3	1.7E-03
201108_s_at	507.4	977.3	478.3	584.9	7.4E-05
201109_s_at	440.6	1023.9	323.1	525.0	9.5E-05
201110_s_at	539.6	1159.4	389.0	604.7	2.5E-04
201111_at	4230.4	4017.7	3828.8	4379.3	4.4E-03
201125_s_at	1571.2	1984.6	1824.2	1563.2	4.2E-03
201137_s_at	83.2	43.0	128.0	144.5	5.5E-03
201169_s_at	429.8	957.2	605.1	441.6	3.5E-05
201170_s_at	1819.6	3095.7	2075.6	1606.0	1.3E-03
201172_x_at	6367.3	5475.3	6010.3	6494.6	2.1E-04
201189_s_at	996.5	1520.8	1491.9	970.1	2.7E-04
201198_s_at	2546.8	2057.1	2208.4	2424.1	3.5E-03
201221_s_at	3100.1	2320.3	2566.4	3449.9	1.8E-04
201237_at	1791.6	1671.0	1443.3	1705.4	5.8E-03
201255_x_at	2498.8	2240.5	2390.2	2783.8	8.5E-04
201276_at	977.1	764.7	1023.1	1042.4	3.6E-04
201324_at	131.5	372.3	184.8	165.4	3.2E-04
201325_s_at	104.8	301.5	102.8	102.7	5.4E-03
201339_s_at	1665.4	1475.7	1681.4	1826.0	8.1E-03
201340_s_at	263.2	458.1	302.7	234.6	9.4E-04
201341_at	677.9	1079.9	825.1	610.4	5.8E-03
201349_at	1244.3	995.7	1023.0	1319.4	4.5E-03
201362_at	647.3	497.1	418.1	673.7	1.1E-04
201378_s_at	3372.6	3107.8	3630.5	3832.4	6.0E-03
201389_at	692.7	913.0	934.0	634.8	1.8E-03
201416_at	398.4	641.2	515.4	360.3	2.7E-03
201417_at	2881.7	4018.6	3634.2	2948.8	4.1E-03
201426_s_at	23197.0	26265.4	26991.6	21521.8	6.6E-03
201432_at	3500.2	2348.2	3000.8	3125.0	2.3E-03
201464_x_at	425.3	1196.6	741.4	514.1	6.4E-06
201468_s_at	4717.9	3406.4	3540.1	4833.3	8.0E-03
201475_x_at	3138.9	2997.9	4579.3	3619.7	1.0E-03
201508_at	1011.4	1415.9	1354.5	781.9	7.6E-04
201528_at	2904.0	2494.0	2461.0	2982.6	5.5E-03
201535_at	716.0	524.2	524.2	806.3	1.3E-03
201540_at	1969.9	1264.7	1237.2	1638.1	3.1E-03
201563_at	2496.8	2045.0	2151.1	2704.5	2.1E-03
201595_s_at	3214.5	3436.1	3020.1	3446.1	5.7E-03
201616_s_at	1473.2	1048.1	1086.1	1531.0	1.7E-04
201631_s_at	3686.4	5447.9	3734.2	3210.3	4.1E-04
201645_at	152.2	290.9	295.4	94.2	4.5E-03
201661_s_at	731.8	601.9	560.1	719.0	4.3E-03
201666_at	5657.9	7484.7	8395.7	5037.5	2.6E-05

## Tableau XI (suite)

201673_s_at	953.7	795.0	901.0	932.8	5.3E-03
201709_s_at	1556.8	1357.7	1450.0	1844.7	4.0E-03
201738_at	1761.5	1915.0	1471.8	1548.3	3.5E-03
201746_at	701.8	421.3	434.8	637.3	1.2E-03
201752_s_at	907.9	617.3	756.7	877.6	2.2E-03
201761_at	4332.5	6429.9	5426.2	4722.6	2.3E-03
201791_s_at	1479.3	832.4	909.6	1537.0	5.1E-03
201811_x_at	1653.7	1258.1	1423.6	1874.9	6.7E-03
201819_at	1793.0	1437.2	1474.5	1831.6	5.0E-04
201847_at	2492.2	1918.7	2200.4	2753.7	3.5E-03
201896_s_at	1173.1	831.7	1122.5	1147.9	9.0E-03
201903_at	6377.7	7036.3	7496.0	6205.1	4.0E-03
201914_s_at	520.7	728.6	767.8	492.4	4.8E-03
201926_s_at	4782.4	6519.3	6604.7	5285.8	4.5E-03
201927_s_at	367.0	281.5	405.1	444.0	2.5E-04
201929_s_at	435.3	342.6	355.9	549.2	1.0E-04
201939_at	763.4	1074.2	606.0	1017.7	8.0E-04
201952_at	1385.9	1602.7	1648.2	1430.4	2.4E-03
201976_s_at	3043.7	4614.3	3678.1	2702.4	5.5E-04
201983_s_at	1179.9	2479.7	1662.6	1119.9	2.1E-04
201984_s_at	420.9	1062.0	792.9	440.6	1.9E-05
201986_at	516.9	587.6	500.6	631.6	7.3E-03
201995_at	743.7	1190.7	888.6	656.7	8.6E-04
201997_s_at	707.8	942.7	780.5	687.8	2.3E-03
202014_at	113.6	506.4	171.9	127.4	3.1E-05
202021_x_at	11196.5	15676.7	11328.8	10701.3	7.1E-03
202068_s_at	1863.8	1364.9	1387.7	1656.2	3.3E-03
202071_at	947.4	1189.2	799.6	839.1	6.6E-04
202076_at	1291.8	2257.6	1640.1	1277.6	7.5E-03
202097_at	2171.6	2284.7	2080.2	2432.3	1.6E-04
202122_s_at	1158.3	1563.0	1449.5	1190.6	1.4E-05
202123_s_at	1561.7	2176.7	1850.8	1650.1	7.3E-03
202146_at	1251.4	1949.2	1691.5	1444.7	4.7E-03
202147_s_at	1093.2	1712.7	1288.6	1184.5	7.6E-03
202148_s_at	1190.5	920.3	1341.6	1224.9	2.7E-03
202149_at	227.4	330.8	130.1	273.4	3.7E-05
202172_at	436.5	540.5	429.0	394.9	7.0E-03
202226_s_at	913.1	1000.4	1206.0	969.4	5.6E-03
202252_at	3165.3	3456.4	4055.7	2847.0	1.5E-03
202256_at	338.5	210.0	268.6	245.0	1.0E-03
202302_s_at	1678.5	2139.6	1707.4	1657.9	3.5E-05
202326_at	534.2	353.6	451.4	533.7	8.4E-03
202363_at	1800.0	2618.2	3071.9	1672.0	7.5E-04
202388_at	847.4	1360.4	1167.6	1012.5	4.4E-03
202391_at	21383.7	19570.3	19877.1	22018.7	5.1E-03
202393_s_at	1607.2	2590.6	1966.4	1785.8	3.5E-03

## Tableau XI (suite)

202402_s_at	525.9	711.8	798.5	594.9	5.9E-03
202466_at	2179.0	2527.8	2302.0	1995.9	6.2E-03
202495_at	688.8	868.9	878.8	782.2	9.7E-03
202502_at	2152.8	1884.6	1702.0	2469.0	1.0E-02
202512_s_at	223.0	179.7	188.5	275.9	6.9E-03
202557_at	597.5	918.6	703.5	701.2	1.3E-03
202598_at	3179.0	4011.6	4278.1	2980.8	7.9E-06
202627_s_at	1620.2	3762.0	2255.7	1623.1	2.8E-03
202628_s_at	480.1	2726.2	969.6	422.1	3.8E-04
202655_at	2187.0	3091.6	2785.2	2323.7	2.8E-03
202669_s_at	267.0	561.9	424.8	317.8	3.0E-04
202670_at	1216.1	1511.5	1329.7	1215.7	9.5E-03
202672_s_at	577.8	1072.8	414.0	600.0	5.1E-05
202675_at	2899.1	2494.2	2576.4	2772.9	5.7E-03
202686_s_at	2263.0	3351.3	3111.0	2163.4	4.3E-04
202704_at	2709.9	1511.8	2058.0	2670.5	1.9E-04
202719_s_at	1471.9	1804.5	1579.2	1500.1	1.1E-04
202728_s_at	146.0	394.4	357.4	190.2	3.2E-03
202729_s_at	496.6	830.7	835.7	606.5	7.8E-03
202743_at	928.5	647.8	762.4	1093.8	2.8E-03
202760_s_at	657.5	1095.0	722.7	669.4	2.7E-04
202815_s_at	365.8	246.6	245.1	293.7	1.4E-03
202836_s_at	4305.3	3952.2	3887.6	4053.6	1.6E-03
202842_s_at	782.0	1108.7	1009.9	736.4	7.9E-03
202847_at	342.6	373.6	577.8	387.8	1.8E-03
202859_x_at	376.4	2471.6	1445.0	467.7	2.2E-04
202879_s_at	266.4	460.9	263.9	191.5	1.1E-03
202880_s_at	488.5	1049.4	521.8	426.6	2.8E-05
202883_s_at	2330.0	1741.5	1679.3	2141.8	3.0E-03
202887_s_at	4449.2	6768.4	4582.7	3827.4	2.0E-04
202902_s_at	532.2	894.0	867.1	530.4	7.3E-03
202915_s_at	1140.4	1140.6	1006.6	1174.7	9.9E-03
202933_s_at	1383.8	1150.1	1039.4	1405.9	2.1E-03
202941_at	4116.3	3871.0	3803.2	4330.1	5.5E-04
202946_s_at	3822.2	2656.4	2441.9	3791.8	3.9E-04
202948_at	164.1	259.3	205.3	104.2	3.2E-04
202951_at	1304.2	958.1	1240.3	1380.5	7.4E-03
202952_s_at	720.0	1243.0	1055.4	650.8	3.2E-04
202963_at	1585.5	1207.3	1203.1	1553.3	2.9E-04
202969_at	301.5	463.1	350.4	328.9	5.3E-03
202973_x_at	1308.2	1028.7	1212.2	1218.8	1.5E-03
202998_s_at	1126.8	1298.8	1281.4	1024.1	6.2E-04
203002_at	1065.8	1896.5	896.3	1231.2	8.6E-03
203009_at	26.8	40.0	25.2	50.4	4.5E-03
203038_at	1910.2	2878.2	2604.4	1938.1	1.4E-03
203068_at	574.0	887.8	838.5	536.1	1.4E-03

## Tableau XI (suite)

203108_at	2309.2	4093.3	2500.1	2417.8	8.0E-04
203115_at	234.3	195.0	188.1	285.9	2.5E-03
203124_s_at	1019.4	839.0	919.6	1242.8	7.2E-04
203126_at	3406.2	1842.4	2039.1	3258.0	6.8E-03
203153_at	1309.4	366.0	493.9	871.5	2.9E-03
203226_s_at	690.8	492.5	663.8	643.1	2.5E-03
203228_at	1154.5	869.8	931.3	1117.4	4.3E-04
203234_at	449.7	608.5	406.9	277.1	8.4E-04
203253_s_at	1090.1	937.4	790.0	1000.9	6.5E-03
203274_at	1810.7	2160.9	1872.2	1760.1	5.2E-03
203313_s_at	735.4	1031.2	793.4	726.0	2.0E-03
203323_at	1890.1	1346.6	1171.8	1968.9	3.4E-04
203355_s_at	152.3	192.6	118.4	103.1	7.8E-03
203362_s_at	3867.3	3103.9	3436.6	4308.7	1.5E-03
203379_at	515.3	357.9	434.6	624.5	7.5E-05
203380_x_at	1898.5	1997.8	1145.0	1945.7	7.0E-03
203394_s_at	424.2	652.3	445.4	399.9	1.7E-05
203402_at	416.7	261.8	306.9	457.3	2.0E-03
203409_at	1634.4	1190.5	1115.6	1503.9	6.5E-03
203427_at	1438.6	1080.6	1132.5	1518.1	6.8E-06
203428_s_at	1808.4	1530.2	1847.0	1873.0	8.5E-03
203438_at	189.2	716.8	284.6	253.5	2.6E-04
203449_s_at	491.7	420.8	462.0	598.6	1.2E-03
203458_at	1907.2	1557.7	1875.3	1890.0	2.7E-03
203476_at	1873.4	3695.8	2867.2	1677.3	3.9E-04
203499_at	778.0	1558.7	881.4	697.8	1.3E-03
203505_at	207.7	283.9	292.1	84.8	1.4E-04
203524_s_at	1293.0	963.1	1165.2	1350.8	8.0E-03
203537_at	999.4	773.1	860.7	985.1	2.6E-03
203554_x_at	12489.4	11083.9	10744.8	11842.8	9.3E-03
203566_s_at	716.4	598.2	519.8	702.8	5.0E-03
203725_at	1033.4	1918.2	981.3	1048.2	1.6E-03
203736_s_at	142.8	217.2	197.0	197.6	9.2E-03
203752_s_at	4025.2	3074.5	2808.6	3904.4	1.9E-03
203755_at	2320.4	1710.7	2117.0	2306.1	7.4E-03
203759_at	408.6	269.2	389.2	387.5	1.0E-03
203819_s_at	1657.6	2922.5	2420.7	1811.7	2.6E-03
203820_s_at	2360.2	3349.0	3206.4	2515.2	2.5E-04
203821_at	242.5	439.9	158.1	135.6	7.3E-03
203874_s_at	915.3	704.4	754.1	974.4	2.5E-03
203910_at	1030.2	1054.9	818.9	769.4	1.9E-03
203928_x_at	280.6	175.7	267.9	227.0	2.2E-03
203939_at	451.2	1184.8	970.3	452.8	3.1E-03
203942_s_at	29.1	12.7	12.7	14.7	3.0E-03
203968_s_at	1554.7	2015.0	1420.3	1596.0	3.9E-03
203972_s_at	1244.6	1053.7	1095.2	1342.8	4.8E-03

## Tableau XI (suite)

204015_s_at	284.0	648.5	420.9	334.4	9.3E-04
204018_x_at	141.3	296.7	171.1	102.4	5.4E-03
204030_s_at	1181.6	1488.6	1025.2	1134.7	5.8E-03
204032_at	716.0	1040.8	762.4	588.2	4.1E-03
204058_at	2640.9	1698.4	1823.4	2666.0	6.2E-03
204091_at	408.9	350.0	359.0	421.7	8.2E-03
204103_at	104.7	90.2	23.3	42.9	8.6E-03
204114_at	1600.6	2179.2	1826.3	1578.3	8.1E-03
204134_at	2718.6	3629.8	3424.2	2465.2	6.2E-04
204136_at	1294.1	1715.9	1762.4	1127.5	5.6E-03
204151_x_at	2530.5	1148.7	1758.9	2505.5	3.6E-04
204159_at	1786.3	960.5	1358.5	2070.6	3.8E-03
204203_at	406.2	603.5	505.9	363.2	3.5E-03
204256_at	1629.8	1031.7	1534.6	1980.0	1.6E-03
204268_at	12262.9	17454.7	17222.7	10905.5	3.0E-03
204285_s_at	1557.3	3037.1	1506.7	1398.9	2.1E-05
204286_s_at	425.7	738.8	382.3	427.0	2.1E-04
204348_s_at	1694.0	1521.2	1407.2	1038.3	8.6E-03
204363_at	257.4	606.2	211.4	375.1	8.1E-03
204364_s_at	522.5	336.7	435.0	523.9	6.4E-04
204420_at	575.7	1464.2	828.2	627.6	9.0E-05
204421_s_at	646.1	1245.5	529.5	661.5	1.6E-04
204422_s_at	507.3	1000.5	372.5	656.4	3.1E-03
204444_at	1299.7	1130.3	1154.7	1409.4	1.0E-02
204479_at	345.8	278.5	299.7	253.4	7.3E-03
204489_s_at	3860.2	5654.5	5226.3	3640.4	7.4E-05
204490_s_at	3150.9	5028.2	4277.3	2768.3	2.2E-04
204493_at	820.1	663.6	608.3	783.7	7.1E-03
204540_at	2211.4	1487.6	1688.3	2430.8	5.3E-03
204602_at	1326.2	5790.4	1937.4	2005.3	1.1E-05
204610_s_at	3822.5	2681.4	3245.9	3774.9	1.3E-03
204613_at	261.2	151.0	245.5	302.2	7.7E-03
204615_x_at	3020.0	1977.0	1544.7	3182.9	1.4E-03
204630_s_at	1640.2	2052.3	1689.9	1672.3	2.4E-03
204637_at	5325.9	9407.4	8026.3	5178.0	1.2E-03
204656_at	282.7	543.4	291.6	257.6	4.2E-04
204681_s_at	25.7	19.7	68.1	27.0	5.0E-03
204717_s_at	477.3	140.7	233.1	463.6	2.9E-03
204747_at	727.8	477.6	389.2	560.9	3.8E-03
204748_at	1278.6	3398.8	2132.8	967.0	3.5E-03
204781_s_at	446.4	278.7	399.0	440.3	9.6E-03
204791_at	350.4	285.7	398.3	376.4	2.2E-03
204820_s_at	1170.3	913.1	1254.1	1261.8	1.8E-03
204823_at	163.4	444.2	304.3	155.4	2.1E-03
204833_at	837.7	1096.4	892.4	809.0	4.5E-03
204835_at	944.0	775.7	790.9	1085.9	1.3E-03

Tableau XI (suite)

204860_s_at	19.9	10.8	15.5	13.3	1.7E-04
204897_at	1069.4	610.7	640.2	990.8	3.0E-04
204913_s_at	43.9	73.9	24.9	14.9	9.8E-03
204948_s_at	443.8	1050.1	619.5	425.0	3.6E-06
204992_s_at	6645.7	5084.1	5780.3	6442.6	4.0E-04
205032_at	301.9	400.1	430.7	258.0	7.7E-04
205047_s_at	2321.4	2054.2	4036.1	3048.6	9.0E-03
205126_at	1214.3	1474.4	1517.4	1193.4	4.1E-03
205140_at	315.5	293.2	324.4	403.0	1.4E-03
205157_s_at	367.1	1904.5	846.2	414.2	7.1E-05
205173_x_at	1473.1	1878.4	2026.8	1423.3	2.3E-03
205181_at	182.6	208.5	210.6	117.6	1.5E-03
205185_at	654.6	279.1	247.4	883.9	1.0E-03
205194_at	500.9	703.5	837.8	642.8	3.7E-03
205207_at	861.6	1735.3	607.1	749.4	6.7E-04
205286_at	290.0	333.0	217.0	222.1	6.3E-03
205321_at	6086.4	4855.4	5561.7	6463.4	4.1E-03
205361_s_at	2747.6	2764.9	2477.3	2952.4	8.9E-04
205380_at	64.2	107.3	36.7	21.1	1.9E-03
205415_s_at	186.0	121.4	214.2	181.8	8.5E-03
205417_s_at	1821.1	1409.2	1517.8	1826.9	8.3E-05
205430_at	319.9	237.3	195.4	593.7	1.4E-05
205431_s_at	1356.2	1001.1	947.1	1789.8	3.4E-04
205433_at	1287.1	726.6	985.1	1338.1	1.0E-03
205449_at	1761.7	1208.0	1480.5	1849.2	2.6E-03
205450_at	299.8	214.4	375.1	315.7	8.6E-04
205483_s_at	3680.9	5706.0	4045.1	2870.8	2.3E-03
205534_at	2107.3	1753.4	1515.4	2708.3	6.1E-04
205573_s_at	2813.4	2156.3	2254.7	2388.3	1.8E-03
205576_at	64.4	17.9	25.6	27.1	9.3E-03
205579_at	232.8	344.8	276.6	208.3	6.2E-03
205596_s_at	810.2	1184.9	819.1	801.2	1.5E-03
205627_at	574.0	699.3	672.5	492.9	6.4E-03
205656_at	2705.2	1201.7	1663.7	2737.4	2.1E-06
205673_s_at	670.7	328.7	396.1	568.4	1.9E-03
205677_s_at	1299.0	996.4	1244.3	1269.1	6.5E-03
205698_s_at	565.2	395.3	378.8	527.9	3.1E-03
205729_at	481.9	796.6	538.2	365.0	7.7E-04
205730_s_at	748.0	916.1	946.4	622.6	1.4E-03
205768_s_at	836.9	518.2	517.7	1034.8	9.2E-04
205769_at	1287.1	563.4	719.0	1550.5	7.8E-03
205807_s_at	957.0	1796.5	817.7	1092.5	4.2E-03
205836_s_at	599.2	368.0	413.4	470.5	8.1E-03
205875_s_at	533.9	303.9	349.5	465.9	1.1E-03
205882_x_at	960.8	676.3	733.0	962.4	3.9E-03
205961_s_at	1547.3	1095.3	1343.1	1634.3	3.5E-04

## Tableau XI (suite)

206034_at	187.5	278.3	268.4	171.3	4.2E-03
206104_at	317.0	251.4	270.1	340.2	2.5E-03
206243_at	440.4	332.2	425.5	477.1	6.4E-03
206302_s_at	948.1	1212.7	1131.9	963.4	3.0E-03
206375_s_at	680.8	377.9	397.9	667.1	2.6E-03
206382_s_at	899.3	1500.5	959.0	1164.3	5.7E-03
206385_s_at	131.6	45.3	84.8	170.7	1.0E-03
206561_s_at	331.4	170.5	214.2	343.2	5.1E-03
206587_at	310.8	246.1	217.2	285.6	3.1E-03
206632_s_at	812.3	1133.2	808.8	835.5	5.2E-03
206805_at	304.3	462.3	351.1	323.1	9.9E-03
206924_at	1173.4	4927.8	3310.4	946.1	2.7E-04
206999_at	30.4	26.4	66.6	15.9	7.3E-03
207038_at	581.6	837.3	570.8	269.0	3.1E-04
207043_s_at	150.1	185.3	317.9	121.4	4.7E-03
207163_s_at	1163.4	973.9	1068.8	1195.3	5.3E-03
207165_at	1607.4	1183.5	1733.3	1816.0	6.2E-05
207231_at	82.4	22.4	43.9	58.3	3.9E-03
207243_s_at	20328.2	21824.0	21061.4	19685.1	5.2E-03
207275_s_at	450.5	355.3	288.2	396.5	2.8E-03
207305_s_at	1326.9	1157.7	1197.8	1401.9	1.4E-03
207332_s_at	10570.1	10316.0	9090.4	10628.1	2.6E-03
207345_at	178.9	376.5	207.1	139.8	1.0E-04
207558_s_at	87.8	28.5	36.1	69.5	7.2E-03
207574_s_at	486.2	920.2	424.3	560.8	5.0E-03
207735_at	35.5	74.6	100.4	106.4	5.4E-03
207746_at	202.7	152.2	121.0	133.3	7.6E-04
207761_s_at	1152.5	439.2	722.8	1064.9	2.2E-04
207843_x_at	1918.1	1466.7	1463.7	1895.2	1.1E-03
208025_s_at	675.2	919.5	770.5	850.9	9.1E-03
208063_s_at	32.2	21.6	47.7	23.3	4.1E-03
208093_s_at	710.1	951.0	776.4	685.6	1.6E-03
208103_s_at	1558.4	1433.0	1365.4	1570.2	4.8E-03
208113_x_at	10405.4	8517.6	9813.3	10728.5	3.7E-03
208148_at	12.6	9.4	7.4	37.4	7.1E-03
208178_x_at	1240.6	1960.3	1375.4	1204.6	2.9E-03
208396_s_at	688.4	412.8	412.3	705.2	4.6E-05
208424_s_at	622.9	540.6	522.3	652.1	3.0E-03
208523_x_at	282.0	403.9	325.9	226.1	1.5E-03
208527_x_at	488.3	575.7	503.2	450.4	3.8E-03
208571_at	12.7	51.7	38.3	26.1	6.4E-04
208579_x_at	1421.3	2303.7	1756.2	1219.7	7.2E-03
208611_s_at	2442.2	2038.4	2151.7	2681.6	3.0E-03
208633_s_at	557.4	657.2	686.0	605.1	4.6E-03
208644_at	2230.7	1905.7	1873.1	2171.9	8.2E-03
208647_at	3175.5	2140.8	1687.2	3178.2	1.0E-03

## Tableau XI (suite)

208683_at	8746.8	12547.6	11820.9	8606.9	1.8E-05
208719_s_at	1331.7	1183.1	1151.4	1375.5	9.0E-03
208727_s_at	1516.9	1588.3	1289.6	1138.0	8.5E-03
208739_x_at	10709.3	9137.0	9576.2	11359.9	8.6E-03
208752_x_at	11405.3	10251.8	10856.3	11990.7	4.7E-03
208754_s_at	3867.3	3337.1	2941.9	3603.9	6.2E-03
208771_s_at	3928.2	2861.1	3265.7	3638.4	4.3E-06
208796_s_at	4357.8	2525.9	2580.7	4258.5	1.1E-03
208804_s_at	3736.1	3917.5	2756.2	3747.3	3.1E-04
208812_x_at	9487.9	11676.2	11642.2	10238.4	2.0E-03
208854_s_at	2038.7	2753.8	2601.5	2039.9	2.2E-03
208881_x_at	3601.2	2144.6	1875.3	3527.2	1.8E-03
208891_at	88.1	175.6	101.6	76.0	2.1E-03
208911_s_at	1867.3	1514.2	1457.8	1693.1	3.3E-03
208916_at	1950.3	2230.2	2820.1	2165.5	7.3E-03
208944_at	884.7	1252.5	1061.8	911.2	2.7E-03
208949_s_at	5936.3	8424.8	8464.4	6536.3	1.9E-03
208962_s_at	2125.0	1844.9	1760.1	2182.0	2.2E-03
208966_x_at	1292.2	1326.9	1549.1	1142.3	5.1E-05
208980_s_at	15790.5	14097.0	17435.2	15619.9	1.3E-05
209003_at	2085.3	1723.4	1973.4	2204.1	2.0E-03
209012_at	587.2	922.2	680.1	631.1	8.9E-05
209098_s_at	235.4	548.3	351.2	344.4	1.4E-03
209099_x_at	1215.9	2805.2	1635.3	1116.4	8.3E-04
209101_at	613.3	1839.3	475.1	930.6	6.9E-04
209102_s_at	689.6	805.7	813.2	522.6	1.7E-03
209104_s_at	7848.3	7034.1	7419.0	7576.5	4.0E-03
209130_at	1284.2	1122.6	1385.7	1462.9	3.8E-03
209146_at	1251.0	606.2	597.6	1413.1	4.0E-05
209160_at	5902.1	3297.4	4502.0	5958.6	7.3E-03
209184_s_at	535.0	730.6	529.0	581.2	9.1E-03
209185_s_at	1302.7	2058.4	1380.0	1519.7	5.9E-03
209209_s_at	1058.1	1213.2	1040.7	1292.7	8.1E-03
209211_at	310.2	709.6	275.0	377.8	4.9E-03
209212_s_at	602.0	696.6	477.7	472.8	4.1E-03
209213_at	1486.2	1256.2	1306.7	1561.6	3.7E-03
209218_at	2019.8	1371.4	1148.6	2079.2	1.3E-03
209279_s_at	685.0	587.5	516.1	682.7	5.4E-03
209283_at	139.3	101.9	73.2	190.6	7.6E-03
209286_at	183.5	254.9	117.8	174.9	3.8E-04
209302_at	4257.9	3528.4	3665.3	4093.1	7.7E-03
209304_x_at	223.5	642.7	206.4	243.8	8.9E-03
209310_s_at	296.1	419.4	406.1	308.6	9.3E-03
209333_at	135.4	284.9	223.0	154.6	8.1E-03
209339_at	472.3	770.5	471.9	546.8	8.1E-03
209355_s_at	238.7	436.7	322.4	233.6	1.7E-03

## Tableau XI (suite)

209358_at	751.4	602.6	566.4	855.5	9.3E-03
209366_x_at	1702.7	1149.5	1374.1	1680.2	1.2E-03
209380_s_at	1170.2	805.6	912.9	1274.4	7.6E-03
209386_at	4829.0	8049.8	5162.8	5158.4	3.9E-03
209387_s_at	2618.5	4521.7	2768.0	2801.5	1.1E-03
209409_at	846.7	1182.7	1167.9	791.1	3.8E-03
209505_at	691.1	458.7	456.9	765.2	5.3E-03
209545_s_at	1164.7	1439.3	1162.7	1142.3	8.9E-04
209587_at	358.3	256.2	238.2	349.6	4.8E-03
209589_s_at	659.9	848.3	701.0	508.1	5.0E-03
209608_s_at	2260.2	1721.8	1580.3	2096.6	9.8E-04
209612_s_at	107.3	85.9	30.0	25.2	6.3E-03
209621_s_at	470.7	291.3	360.3	413.0	9.6E-03
209625_at	274.3	185.6	304.9	290.9	5.7E-03
209665_at	849.3	778.6	869.8	1128.9	4.6E-03
209671_x_at	89.4	46.6	74.8	159.9	2.0E-03
209678_s_at	5002.0	4162.1	4267.0	4961.3	3.9E-04
209679_s_at	668.5	969.2	961.0	676.2	1.2E-03
209681_at	570.2	907.7	656.0	602.1	2.4E-03
209684_at	810.9	1241.0	788.3	867.3	8.4E-04
209699_x_at	1255.5	610.5	995.7	1292.4	3.3E-03
209706_at	586.6	671.9	610.3	469.0	3.4E-03
209709_s_at	1298.5	1083.8	1189.6	1413.7	1.0E-02
209760_at	605.8	472.3	571.9	709.7	4.5E-03
209774_x_at	165.1	480.0	237.1	134.9	1.4E-03
209780_at	1705.7	1603.6	1342.9	1831.4	1.5E-04
209790_s_at	954.0	763.9	904.4	1027.7	7.7E-03
209821_at	206.1	610.2	325.2	172.0	5.3E-04
209987_s_at	10.0	17.1	9.2	10.7	6.3E-03
210002_at	221.6	425.7	284.4	266.6	9.2E-05
210026_s_at	537.7	557.2	378.2	371.8	7.0E-03
210039_s_at	313.1	413.9	272.5	336.5	1.5E-03
210098_s_at	269.8	228.0	267.2	221.3	5.9E-03
210136_at	252.3	343.5	239.7	151.1	2.8E-03
210166_at	159.3	131.7	63.7	180.0	4.6E-03
210175_at	692.8	676.0	657.0	934.6	5.8E-03
210246_s_at	19.1	18.7	17.2	32.4	3.6E-03
210298_x_at	523.8	289.9	344.9	527.2	4.0E-03
210337_s_at	5636.6	4367.8	4486.9	5667.3	5.5E-05
210356_x_at	118.8	162.3	45.1	131.8	8.8E-03
210428_s_at	2336.8	2958.9	2952.5	2471.4	6.9E-03
210464_at	31.0	19.7	22.3	12.0	7.9E-03
210512_s_at	336.0	1092.5	473.2	461.3	8.1E-03
210517_s_at	1129.8	2771.3	1553.0	1438.2	1.7E-03
210544_s_at	782.8	633.4	793.4	890.2	1.7E-03
210567_s_at	1731.3	1309.8	1360.1	1692.4	6.7E-03

Tableau XI (suite)

210580_x_at	582.1	471.3	616.1	576.9	2.0E-04
210592_s_at	1054.1	2021.6	1854.9	1125.5	3.4E-04
210619_s_at	277.2	150.2	185.0	242.8	7.7E-03
210657_s_at	18.6	15.3	19.0	70.2	3.7E-04
210662_at	98.9	140.1	106.6	86.2	1.0E-02
210664_s_at	1196.9	1913.7	1666.0	1427.2	2.0E-03
210674_s_at	62.2	13.8	82.9	34.0	3.4E-03
210749_x_at	1021.2	778.5	967.0	1188.2	3.2E-03
210797_s_at	1683.8	1272.0	1013.6	1240.0	8.7E-03
210805_x_at	9.7	82.2	131.8	178.5	7.3E-03
210845_s_at	1428.9	2138.0	1688.1	1538.6	9.5E-04
210859_x_at	657.7	477.7	527.7	585.3	1.5E-03
210869_s_at	1726.3	1294.6	1372.3	1697.0	2.9E-03
210916_s_at	2028.9	3533.0	2717.3	1990.8	2.3E-03
210924_at	183.5	194.2	271.4	314.5	3.0E-03
210950_s_at	3176.1	2346.4	1760.5	3063.0	2.9E-03
210976_s_at	5004.9	4090.4	4185.4	4797.3	5.1E-03
210984_x_at	156.5	564.2	436.5	206.7	5.1E-03
211100_x_at	106.0	157.5	61.8	176.3	3.4E-03
211121_s_at	298.2	207.0	331.5	277.5	7.8E-03
211152_s_at	971.5	917.8	1009.4	1107.5	7.0E-03
211181_x_at	41.0	277.5	301.7	368.0	4.1E-03
211182_x_at	13.1	193.3	204.7	247.6	2.2E-03
211340_s_at	1309.2	1023.6	1117.4	1440.4	3.7E-03
211421_s_at	40.3	31.2	35.3	91.2	5.0E-03
211423_s_at	3015.3	2422.6	2285.0	3225.4	9.5E-03
211447_s_at	14.1	54.5	14.5	13.2	7.0E-03
211464_x_at	515.4	388.5	441.2	509.1	3.7E-03
211474_s_at	1719.4	1990.9	2251.4	1839.8	3.1E-03
211491_at	16.6	12.6	42.0	10.9	2.5E-03
211506_s_at	132.3	692.8	511.1	101.8	4.8E-03
211538_s_at	346.8	187.7	241.7	340.0	3.8E-05
211603_s_at	75.8	232.2	240.1	87.5	4.0E-03
211607_x_at	177.6	427.0	206.6	163.4	1.0E-02
211620_x_at	50.2	404.1	386.7	426.7	3.6E-03
211653_x_at	1603.5	831.8	1151.8	1687.1	2.5E-05
211671_s_at	2124.9	3023.6	2320.6	2348.7	2.6E-03
211713_x_at	1473.3	1215.7	1282.8	1569.1	9.1E-03
211729_x_at	2092.2	1547.0	1713.6	2323.4	1.6E-03
211744_s_at	852.5	1166.2	1124.2	888.9	8.7E-03
211754_s_at	796.4	662.8	501.7	805.9	6.6E-03
211822_s_at	251.6	292.3	185.2	324.1	9.4E-03
211911_x_at	7144.6	8475.9	8878.3	7272.3	7.2E-03
211924_s_at	856.1	1218.2	1092.3	748.6	5.9E-03
211926_s_at	2456.8	3068.9	2978.1	2503.6	1.3E-03
211933_s_at	3574.1	2979.0	3003.3	3520.7	5.5E-04

Tableau XI (suite)

211936_at	7908.8	10990.9	9938.8	8633.4	1.9E-03
211962_s_at	405.4	730.3	484.3	426.1	2.1E-03
211964_at	3914.9	5811.9	5756.1	3536.8	1.4E-05
211966_at	1820.4	2953.6	3086.9	1607.5	1.8E-04
211980_at	5131.2	8749.8	7951.0	4750.2	1.0E-05
211981_at	1734.7	3656.4	3375.9	1277.6	1.6E-04
212014_x_at	4988.2	8824.4	7477.3	4782.5	7.1E-04
212017_at	1092.0	1517.4	1149.1	983.9	4.5E-03
212048_s_at	5190.3	4614.8	6070.7	5602.3	1.4E-05
212049_at	407.4	486.6	362.8	441.4	3.1E-03
212061_at	451.1	524.4	330.9	428.1	1.0E-02
212063_at	6202.3	8980.1	7459.4	5939.8	2.2E-03
212070_at	1179.1	1425.0	1477.7	973.1	5.7E-03
212077_at	6060.3	4421.9	4576.4	6029.7	8.4E-05
212092_at	1422.4	1034.7	963.9	1398.6	2.1E-04
212097_at	3383.8	2790.9	2827.0	3474.4	7.5E-03
212110_at	2582.0	3051.7	3004.5	2690.5	7.3E-03
212130_x_at	11711.2	16271.9	11817.5	11592.4	1.1E-03
212171_x_at	580.6	944.4	713.5	635.8	2.4E-03
212185_x_at	7243.9	7828.8	10198.4	7437.6	8.6E-03
212195_at	2155.4	2859.3	2701.0	1867.6	3.2E-03
212197_x_at	3717.6	4530.6	4657.1	3772.5	3.8E-03
212218_s_at	2761.5	2085.6	1893.5	2914.8	1.9E-04
212226_s_at	623.7	974.3	769.2	646.7	9.4E-03
212227_x_at	11715.5	15699.0	11490.5	12121.1	6.7E-03
212236_x_at	742.3	2505.2	1557.3	682.3	1.3E-04
212266_s_at	2195.9	2461.2	1612.7	2345.5	2.4E-03
212279_at	8543.3	7031.7	7615.7	8700.8	2.2E-03
212378_at	1636.7	1279.9	1519.8	1708.8	5.8E-03
212444_at	879.0	1915.6	860.1	985.3	3.2E-03
212463_at	640.1	877.1	756.1	604.5	8.1E-03
212473_s_at	1668.5	2543.6	2077.8	1543.5	4.3E-03
212494_at	378.6	208.3	396.3	302.1	2.4E-03
212501_at	6088.0	8157.5	6187.0	5330.3	1.6E-04
212506_at	2178.8	2889.7	2239.5	2014.6	2.7E-03
212527_at	1461.1	1214.0	1326.0	1558.5	8.1E-03
212584_at	1042.7	969.1	1003.4	1210.6	7.8E-04
212614_at	1183.1	827.3	792.9	1126.2	1.0E-05
212660_at	2496.4	1325.2	1478.6	2354.1	1.4E-05
212673_at	2747.0	2291.5	2451.3	2746.8	6.7E-03
212724_at	2308.2	3699.9	1929.5	2181.9	5.9E-03
212730_at	1411.6	1028.8	1199.1	1473.7	5.1E-03
212739_s_at	541.2	350.9	519.5	456.5	5.4E-03
212761_at	1555.5	1809.8	1423.2	1474.0	5.6E-04
212819_at	117.0	103.6	53.7	87.2	3.4E-03
212822_at	517.4	303.5	359.6	482.3	5.3E-06

## Tableau XI (suite)

212824_at	902.1	872.0	798.5	1001.5	6.1E-03
212830_at	1272.3	885.0	1268.3	1802.1	3.6E-05
212845_at	96.3	255.0	135.8	114.0	1.4E-03
212848_s_at	1555.0	1323.1	1333.4	1418.5	9.1E-03
212859_x_at	3415.3	1975.2	3612.5	3855.5	4.4E-04
212865_s_at	38.2	10.1	16.3	14.5	8.0E-03
212867_at	404.5	273.3	414.6	460.9	9.1E-03
212912_at	785.4	637.0	678.3	828.4	3.2E-03
212923_s_at	679.5	1014.7	712.8	661.5	2.4E-03
212948_at	519.5	1095.1	795.0	498.0	2.1E-04
212967_x_at	10653.2	9548.6	10097.4	11847.8	1.3E-03
212971_at	3282.1	4479.1	5279.3	3657.3	3.0E-03
212982_at	301.0	366.3	427.5	593.6	2.1E-04
212989_at	520.5	601.0	510.4	448.0	3.2E-03
213029_at	678.3	469.8	524.7	648.3	2.2E-03
213039_at	1802.4	3248.8	2268.5	1607.9	2.5E-05
213065_at	941.1	929.2	798.0	1017.9	2.3E-03
213086_s_at	3625.9	4442.3	4139.6	3785.1	4.9E-03
213093_at	1141.2	1415.5	1397.2	1037.7	7.4E-03
213103_at	123.1	186.3	143.6	62.8	2.5E-03
213150_at	488.4	385.6	501.5	633.8	7.7E-03
213271_s_at	274.3	341.1	295.7	319.3	9.8E-03
213293_s_at	70.7	74.4	19.0	46.0	2.7E-03
213310_at	781.5	1074.5	765.1	973.2	7.9E-04
213338_at	586.4	1344.5	676.1	473.1	4.3E-03
213342_at	777.1	1085.3	870.0	788.1	6.5E-03
213352_at	101.1	207.9	113.2	122.0	9.3E-03
213374_x_at	811.3	696.4	634.6	898.1	1.7E-03
213391_at	475.8	303.5	466.4	404.1	1.1E-04
213434_at	421.9	361.6	424.3	538.3	2.2E-03
213506_at	1233.8	2513.2	1891.8	1226.6	2.9E-04
213562_s_at	343.6	248.5	252.2	346.7	8.1E-03
213570_at	351.6	295.8	228.2	326.7	5.4E-03
213574_s_at	4098.6	3372.9	3231.4	3803.1	3.4E-03
213577_at	998.7	674.5	716.9	937.9	4.6E-04
213581_at	990.4	708.2	794.0	966.0	8.7E-05
213599_at	1616.4	1166.0	1315.4	1547.2	1.1E-03
213689_x_at	591.3	416.1	531.9	592.7	9.1E-03
213711_at	10357.9	8706.0	10331.1	8573.2	3.3E-03
213712_at	19.7	22.8	13.7	61.6	9.3E-03
213790_at	338.0	656.2	539.6	352.5	3.8E-03
213794_s_at	1227.0	1456.1	1384.4	1287.7	2.7E-04
213880_at	114.4	102.8	71.8	159.8	1.9E-04
213906_at	468.5	580.9	443.9	431.4	3.9E-03
213932_x_at	14722.8	16649.0	16977.4	14563.1	7.0E-03
213992_at	1329.6	1682.6	1721.2	1323.0	1.5E-03

## Tableau XI (suite)

214101_s_at	386.6	279.1	304.9	390.2	3.9E-03
214290_s_at	2723.1	5391.0	4125.7	2241.1	5.2E-06
214331_at	246.2	134.9	140.2	254.0	4.6E-03
214332_s_at	207.7	155.9	113.9	188.4	1.9E-03
214443_at	304.8	498.1	372.3	392.8	5.9E-03
214469_at	166.6	292.0	236.0	135.6	4.7E-03
214582_at	856.4	469.3	525.5	743.1	7.3E-03
214691_x_at	110.6	107.6	146.9	190.5	3.6E-03
214696_at	787.7	1003.2	745.7	866.5	8.8E-04
214702_at	8.1	47.9	8.8	14.9	4.5E-03
214819_at	63.4	44.0	86.8	23.1	3.8E-03
214830_at	370.7	274.5	312.1	470.9	2.7E-03
214882_s_at	7688.0	7272.5	6301.7	7727.9	5.8E-03
214909_s_at	667.8	449.2	553.7	647.9	3.1E-03
214911_s_at	1673.3	1840.6	1658.6	1507.2	3.9E-03
214954_at	1136.7	956.8	1013.1	1284.5	9.1E-03
215000_s_at	1997.4	2818.9	2427.6	2093.8	2.2E-05
215034_s_at	2225.6	4310.1	2745.5	2298.7	1.9E-03
215042_at	92.0	29.8	24.1	22.7	4.0E-03
215091_s_at	3477.1	2812.0	3091.2	3329.7	2.6E-03
215093_at	434.2	280.6	249.8	368.3	6.3E-03
215111_s_at	3980.3	6650.0	4664.6	3277.2	2.1E-03
215194_at	153.0	62.9	22.1	97.2	2.2E-03
215223_s_at	468.9	684.1	653.9	565.8	2.2E-03
215235_at	2077.3	1575.8	1640.0	2223.3	8.8E-04
215238_s_at	85.1	105.4	25.4	63.9	2.8E-03
215260_s_at	442.2	343.2	314.6	319.7	3.6E-03
215431_at	24.7	11.5	8.4	14.7	2.7E-04
215498_s_at	1846.2	2407.6	1676.8	1872.6	3.0E-04
215535_s_at	1548.1	1153.8	1406.7	1418.5	8.9E-03
215945_s_at	261.5	242.3	292.2	396.8	2.7E-03
216014_s_at	20.1	21.7	21.6	51.7	3.5E-03
216044_x_at	527.7	317.6	450.7	618.3	1.1E-04
216060_s_at	185.1	386.6	256.9	245.0	4.5E-03
216108_at	66.3	47.7	11.6	46.9	3.0E-03
216234_s_at	275.7	272.2	183.9	288.0	9.0E-04
216242_x_at	1911.8	1568.3	1759.9	1869.9	7.5E-03
216268_s_at	754.5	1844.6	990.6	675.6	3.3E-05
216321_s_at	1722.9	2312.4	1779.7	1890.1	7.7E-03
216442_x_at	1440.6	1943.0	2134.7	1209.7	1.7E-03
216493_s_at	294.7	558.7	474.7	327.0	2.3E-03
216495_x_at	161.7	281.2	244.0	279.9	1.0E-02
216511_s_at	607.4	760.5	574.4	582.9	5.2E-03
216607_s_at	3753.5	2965.3	2797.1	3639.4	1.2E-03
216630_at	9.7	24.0	8.2	16.5	1.2E-03
216715_at	53.0	57.2	87.9	116.0	6.1E-03

## Tableau XI (suite)

216804_s_at	361.7	592.7	513.3	482.5	1.7E-03
216879_at	228.1	48.5	140.1	128.3	7.7E-03
216942_s_at	780.9	1006.0	1083.6	709.3	6.0E-03
216958_s_at	346.5	414.1	417.5	342.5	9.4E-03
216978_x_at	17.2	20.5	12.7	63.1	2.7E-03
217086_at	7.6	14.8	4.9	30.4	5.1E-03
217127_at	279.0	695.2	593.2	310.9	3.9E-04
217140_s_at	7699.8	6652.1	6899.6	6976.2	3.0E-03
217168_s_at	791.7	1521.7	879.9	850.6	3.6E-04
217245_at	174.2	94.8	126.9	145.6	5.6E-03
217364_x_at	252.5	168.2	247.8	323.1	1.2E-03
217370_x_at	1398.1	2205.5	1634.8	1438.6	3.1E-03
217547_x_at	64.6	43.3	65.3	40.3	4.2E-03
217559_at	125.1	237.6	115.2	165.4	9.5E-03
217581_at	47.3	19.9	21.1	18.8	6.9E-03
217728_at	20841.8	22310.0	23303.5	19756.3	2.1E-03
217742_s_at	2358.4	2892.5	2493.8	2390.1	5.9E-03
217748_at	2141.7	1734.4	1899.5	2197.2	1.0E-03
217792_at	799.5	779.2	608.9	792.8	8.0E-03
217809_at	8027.7	6800.6	6705.6	7770.8	2.2E-04
217833_at	1590.3	1620.6	1262.2	1658.4	4.3E-03
217846_at	3697.9	2952.2	2894.5	3495.2	4.6E-04
217873_at	1578.8	2052.7	1793.5	1431.5	1.4E-03
217875_s_at	566.4	1175.7	889.9	501.0	5.1E-03
217967_s_at	695.8	689.0	1171.9	811.0	3.0E-03
217977_at	689.7	497.1	879.1	710.8	8.2E-05
218025_s_at	1669.0	1340.5	1478.6	1685.0	6.3E-03
218041_x_at	7859.5	11464.2	7957.4	9173.3	1.7E-04
218045_x_at	569.7	442.2	412.6	580.2	2.8E-03
218047_at	2977.6	2530.8	2684.8	3239.8	2.2E-03
218097_s_at	1986.2	1712.0	1978.7	1960.7	7.0E-03
218106_s_at	1006.5	1211.2	1067.0	1011.5	1.7E-03
218130_at	276.7	154.4	242.8	263.1	9.6E-03
218140_x_at	4641.4	5211.7	4927.2	4172.0	5.1E-04
218150_at	2620.1	2024.0	2169.5	2373.8	3.7E-04
218160_at	3585.2	3062.3	3370.4	3415.4	3.5E-03
218247_s_at	339.5	527.3	372.3	390.0	3.0E-03
218251_at	1022.1	1002.0	972.3	1269.3	6.8E-03
218275_at	941.9	614.1	723.8	882.7	2.4E-04
218280_x_at	940.7	1723.7	1215.9	791.4	6.1E-05
218283_at	1770.9	1145.6	1413.8	1666.2	3.7E-04
218309_at	265.6	307.0	302.7	197.6	7.3E-04
218344_s_at	191.1	286.4	166.9	189.3	5.3E-03
218360_at	975.9	1350.3	1115.9	900.6	5.2E-03
218368_s_at	4135.6	6730.0	5723.6	4580.5	7.0E-03
218387_s_at	1174.0	947.9	1197.5	1091.4	2.4E-03

## Tableau XI (suite)

218397_at	874.9	759.2	726.6	931.0	8.4E-03
218401_s_at	337.4	455.9	325.7	287.8	2.7E-03
218415_at	296.5	395.9	423.0	321.9	8.1E-03
218436_at	565.6	500.5	670.9	526.4	4.0E-03
218472_s_at	1652.8	1844.7	1648.8	1590.0	2.7E-03
218478_s_at	882.6	1530.8	1076.6	954.4	2.6E-03
218495_at	5200.8	5955.2	5611.5	5165.3	7.9E-03
218559_s_at	132.9	181.3	172.3	73.4	7.0E-03
218597_s_at	5070.1	3761.2	4166.4	5048.6	7.0E-03
218627_at	748.5	1132.0	1015.2	781.7	9.4E-04
218636_s_at	579.3	553.9	703.6	534.6	7.8E-03
218644_at	1201.3	1683.8	1631.6	1377.9	1.5E-03
218653_at	758.2	637.9	649.2	784.2	2.6E-03
218656_s_at	13.5	18.8	52.3	11.3	6.6E-03
218687_s_at	510.7	354.4	314.8	594.3	2.3E-03
218709_s_at	752.3	655.9	629.7	765.1	8.0E-03
218721_s_at	600.1	1058.7	1133.0	726.5	2.6E-04
218764_at	95.3	204.8	94.3	74.9	2.0E-03
218806_s_at	70.0	38.7	94.3	197.8	2.7E-03
218837_s_at	940.4	678.2	932.9	844.9	4.7E-03
218871_x_at	291.2	588.0	354.8	354.7	1.8E-03
218970_s_at	1134.3	845.2	868.1	1197.9	2.8E-03
218971_s_at	265.6	288.4	405.5	290.8	9.5E-03
218980_at	350.0	370.8	402.2	233.6	1.5E-03
218995_s_at	67.9	213.3	91.1	49.6	1.2E-03
219029_at	660.5	1092.2	729.0	784.6	9.1E-03
219032_x_at	753.8	455.0	564.3	801.6	2.7E-03
219041_s_at	849.2	610.6	667.9	845.0	9.5E-03
219093_at	353.6	554.8	451.7	401.6	3.9E-04
219257_s_at	780.5	3216.2	2284.9	770.0	1.6E-04
219270_at	171.0	1354.5	459.2	248.3	2.6E-04
219295_s_at	1130.5	817.5	881.2	1139.4	2.0E-04
219296_at	498.9	377.4	420.0	476.5	4.7E-03
219397_at	2006.9	2438.0	1981.3	1949.0	2.6E-03
219427_at	177.2	210.9	150.0	151.4	2.6E-03
219474_at	260.4	383.1	280.7	325.4	1.7E-03
219483_s_at	692.1	852.3	794.3	547.6	4.5E-03
219489_s_at	2298.4	1812.4	1515.0	1697.2	1.1E-03
219492_at	479.6	852.3	500.0	549.9	3.5E-03
219529_at	533.7	245.7	256.4	457.8	6.9E-03
219554_at	13.7	12.4	11.9	8.4	9.7E-03
219577_s_at	240.2	164.9	235.5	214.3	6.8E-03
219780_at	77.4	12.5	10.9	18.4	2.3E-04
219820_at	107.6	52.4	17.7	25.0	2.5E-03
219874_at	337.3	126.1	233.9	294.7	4.0E-03
219882_at	231.9	204.6	268.2	323.1	1.4E-03

## Tableau XI (suite)

220153_at	192.8	367.0	269.7	286.2	7.2E-03
220266_s_at	173.3	440.0	184.4	257.1	2.0E-03
220348_at	172.8	46.8	51.4	63.1	9.8E-03
220369_at	26.2	76.3	22.2	28.7	4.3E-03
220473_s_at	60.7	151.7	116.4	134.4	7.9E-03
220484_at	102.5	139.1	145.2	54.5	4.5E-03
220603_s_at	943.3	663.7	567.8	788.5	2.4E-04
220690_s_at	462.2	591.4	520.3	475.4	2.0E-03
220702_at	104.3	31.4	56.5	101.2	3.9E-03
220708_at	238.4	312.0	210.6	282.3	1.8E-03
220755_s_at	3739.1	4359.5	4462.0	3727.4	2.2E-03
220892_s_at	3439.6	3517.8	5971.8	4137.7	2.8E-03
220924_s_at	6560.8	10233.1	5968.4	6821.2	5.4E-05
220952_s_at	1467.0	1239.3	1321.9	1529.1	6.2E-03
221050_s_at	399.7	605.6	525.4	396.0	1.9E-04
221157_s_at	47.9	17.1	18.5	18.7	5.9E-04
221168_at	221.9	109.7	179.6	205.8	1.0E-03
221194_s_at	432.6	370.8	468.2	384.9	7.7E-03
221200_at	36.6	10.8	9.5	15.1	4.3E-03
221222_s_at	216.8	203.5	162.0	241.9	9.2E-03
221227_x_at	744.9	601.1	591.2	666.4	7.0E-03
221290_s_at	209.4	173.3	265.9	273.0	4.5E-03
221291_at	211.0	447.1	360.5	182.5	5.3E-03
221423_s_at	2974.1	4384.4	3954.1	3107.1	1.5E-03
221518_s_at	935.9	1088.8	995.6	975.9	8.1E-03
221522_at	1114.4	935.1	1013.7	1087.7	8.7E-04
221539_at	2449.5	2058.8	3056.8	2654.3	1.1E-03
221556_at	614.3	517.3	498.4	709.6	8.4E-03
221569_at	724.2	551.1	578.8	807.8	6.8E-03
221622_s_at	6074.6	5115.5	5343.4	6123.9	2.8E-03
221727_at	2752.5	2250.2	1989.4	2540.3	8.1E-03
221750_at	1425.5	928.8	646.9	1583.6	2.9E-04
221766_s_at	1137.4	798.7	1078.0	1253.3	3.8E-03
221778_at	106.9	303.4	193.9	151.9	8.9E-03
221811_at	39.1	71.1	128.6	113.9	9.0E-03
221827_at	1425.2	1048.9	1433.7	1505.7	2.9E-04
221830_at	3636.1	2790.6	2790.1	3359.8	1.3E-04
221841_s_at	1110.8	2534.0	1145.9	1260.0	3.9E-05
221865_at	297.2	407.1	294.7	286.5	5.9E-03
221918_at	1009.7	1591.7	1520.9	1067.9	8.7E-04
221931_s_at	3701.9	3053.6	2946.0	3854.2	5.9E-03
222016_s_at	228.7	138.7	164.2	231.1	3.3E-03
222042_x_at	72.2	69.8	24.3	63.1	9.1E-03
222052_at	233.9	359.8	306.0	304.3	7.5E-03
222108_at	4493.6	8478.6	4814.3	4098.4	8.5E-04
222111_at	162.9	266.5	221.3	134.8	9.5E-03

Tableau XI (suite)

222118_at	296.4	428.8	302.8	295.7	7.4E-03
222203_s_at	322.0	412.9	332.8	483.7	8.6E-03
222209_s_at	696.1	658.6	629.7	765.5	3.0E-03
222235_s_at	212.1	402.4	399.6	335.5	3.8E-03
222276_at	175.4	92.5	187.6	171.7	3.8E-03
222360_at	188.2	136.9	174.4	224.1	4.2E-04
31637_s_at	762.4	1345.2	830.6	830.3	6.9E-04
31874_at	2766.5	2274.7	2439.7	2922.6	8.0E-04
32128_at	79.8	18.1	32.4	28.7	9.8E-03
32137_at	773.2	573.3	801.1	896.6	5.7E-05
33304_at	213.5	404.2	273.6	176.1	1.1E-05
336_at	1042.2	612.8	674.4	932.2	4.0E-03
34868_at	412.4	530.1	366.5	391.1	8.9E-04
36711_at	133.5	575.8	115.4	111.2	2.1E-07
37028_at	374.7	793.7	390.7	395.8	3.0E-04
37831_at	418.3	263.2	323.0	306.7	6.0E-03
38037_at	87.6	139.0	72.8	39.3	7.3E-03
38398_at	612.4	616.5	522.8	605.7	1.0E-02
38521_at	334.9	277.9	175.6	272.7	9.5E-04
39817_s_at	1656.3	1570.8	1622.1	1813.0	4.6E-03
39966_at	155.6	124.5	163.9	191.5	6.6E-03
40687_at	29.2	18.8	45.5	87.7	8.5E-03
44065_at	386.5	242.9	284.9	390.8	6.5E-04
46323_at	1001.4	917.5	1131.0	1016.5	4.8E-03
50314_i_at	1071.4	793.3	860.5	1029.2	3.7E-03
52164_at	1734.7	1613.4	1871.8	1799.6	9.1E-04
59625_at	283.1	273.6	386.7	286.0	1.7E-04

Les sondes sont des oligonucléotides fait par Affymetrix et correspondant à des gènes spécifiques. Les valeurs d'expression sont normalisées par rapport à la moyenne du signal de la puce égale à 1000 unités. Les valeurs aux différents temps d'induction correspondent à la moyenne des trois répliques de micropuces.

## ANNEXE II

Tableau XII : Facteurs de transcription dont la séquence consensus, conservés entre l'homme et la souris, est retrouvée dans la région régulatrice des 65 gènes modulés et le nombre de gènes associés à chacun.

Facteur de transcription	Nombre de gène
AP1_01	4
CDPCR1_01	3
OCT_C	3
E4F1_Q6	3
ATF4_Q2	3
SRF_01	2
GABP_B	2
ISRE_01	2
ICSBP_Q6	2
SREBP1_02	2
FXR_Q3	2
HNF6_Q6	2
CREBATF_Q6	2
ATF_B	2
CREBP1_01	2
CREBP1CJUN_01	2
PAX4_01	2
E2F1DP1RB_01	2
E2F4DP1_01	2
E2F_02	2
E2F_Q3	2
TATA_C	2
DR4_Q2	2
CREBP1_Q2	2
CREB_Q4	2
TAXCREB_01	2
CREB_Q2	2
SP3_Q3	2
TEF_Q6	1
HOX13_01	1
LEF1TCF1_Q4	1
CDP_01	1
MEF2_01	1
PAX4_04	1
FAC1_01	1
FREAC4_01	1
P300_01	1
OCT1_04	1
OCT_Q6	1
OCT1_B	1

## Tableau XII (suite)

HTF_01	1
HOXA4_Q2	1
NFKB_C	1
CREL_01	1
STAT1_01	1
STAT3_01	1
HIF1_Q5	1
DEC_Q1	1
CHX10_01	1
HSF_Q6	1
AP1_Q4	1
NFE2_01	1
NFY_01	1
TST1_01	1
NKX25_01	1
CREB_01	1
AHR_Q5	1
MRF2_01	1
IRF7_01	1
ELK1_02	1
RFX1_02	1
HOXA3_01	1
HNF3_Q6_01	1
E2F1DP1_01	1
E2F1DP2_01	1
E2F1_Q6	1
E2F4DP2_01	1
CDX_Q5	1
LXR_DR4_Q3	1
FREAC7_01	1
EGR1_01	1
EGR2_01	1
EGR3_01	1
ARP1_01	1
ARNT_02	1
ATF3_Q6	1
ATF_01	1
CREB_Q2_01	1
CREB_02	1
SOX_Q6	1
CDP_02	1
GRE_C	1
GATA1_03	1
NRSF_01	1
IRF_Q6	1

Tableau XII (suite)

MIF1_01	1
RFX1_01	1
EFC_Q6	1
FOXP3_Q4	1
BACH1_01	1
BACH2_01	1
ZIC1_01	1
ZIC2_01	1
TFIIA_Q6	1
TFIII_Q6	1
TAXCREB_02	1
CEBPDELTA_Q6	1
PAX3_01	1
YY1_02	1
FREAC3_01	1
FOX_Q2	1
FOXD3_01	1
NFKAPPAB50_01	1
COREBINDINGFACTOR_Q6	1
NRF2_Q4	1
MAF_Q6_01	1
AREB6_03	1
NRF1_Q6	1

Ces facteurs de transcription lient des séquences de liaison conservées entre l'homme et la souris (CONSITE) et présentes dans la région de 1kb en amont du site d'initiation de la transcription des 65 gènes modulés.

### ANNEXE III

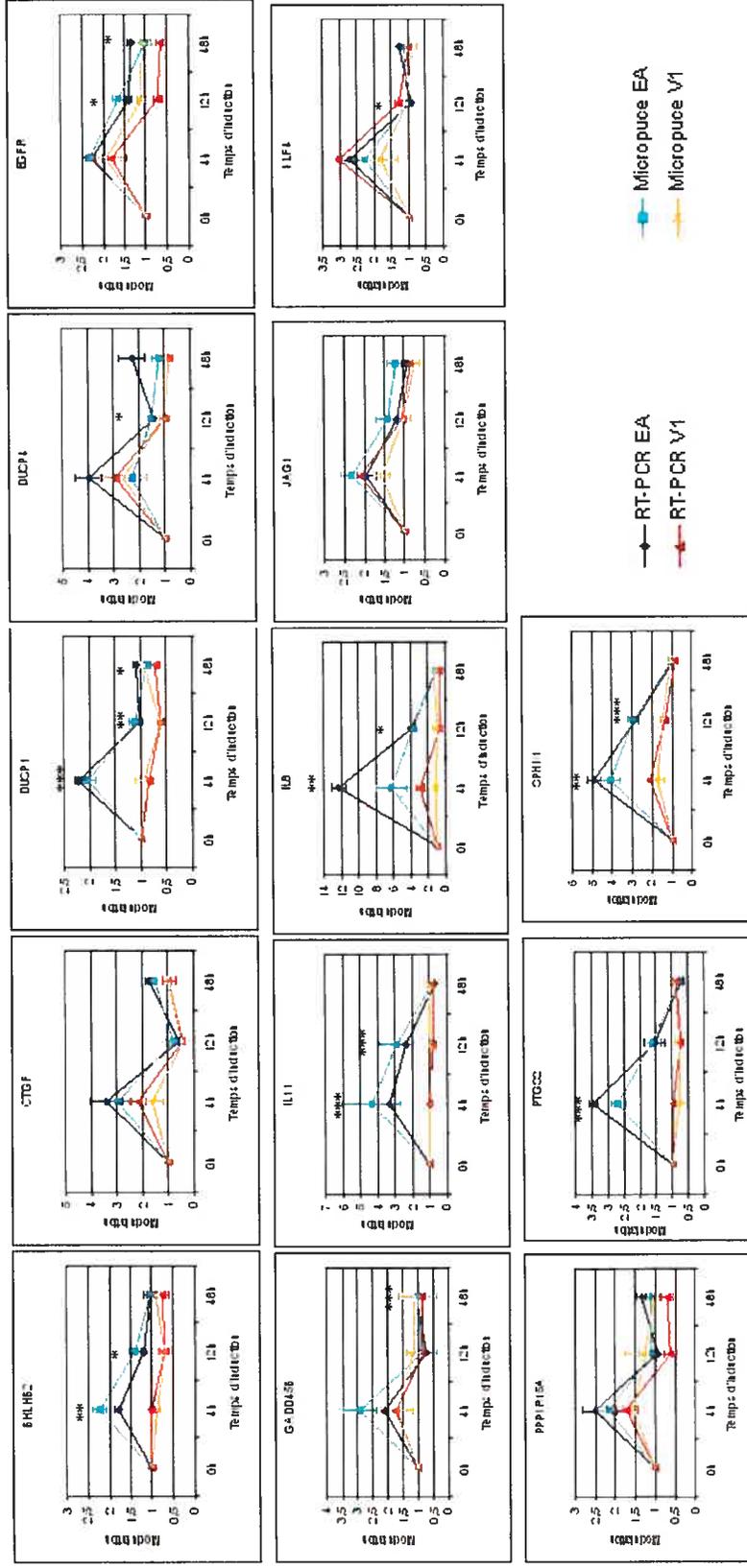


Figure 29: Validation par RT-PCR quantitatif en temps réel des gènes candidats modulés suite à l'induction de ETV6-AML1. Les données d'expression provenant des micropuces et de la validation par RT-PCR quantitatif en temps réel dans le vecteur seul (V1) et dans le clone ETV6-AML1 (EA) sont présentées sous forme de graphique. Les données sont rapportées par rapport aux données à 0h d'induction afin de voir la valeur de la modulation d'expression. Un test t de Student a été exécuté entre les valeurs de RT-PCR dans le clone ETV6-AML1 (bleu foncé) et dans le vecteur seul (rouge).  
 \* : valeur de  $p \leq 0,05$ ; \*\* : valeur de  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* : valeur de  $p \leq 0,005$

## Curriculum Vitae :

Sylvie Langlois  
labo : (514) 345-4931 poste 6142  
[REDACTED]

### Formation académique

- 2004 à aujourd'hui **M.Sc. Biologie moléculaire.** Université de Montréal. Directeur de recherche : Daniel Sinnett. Titre : Identification de gènes ciblés par ETV6-AML1, un facteur de transcription chimérique retrouvé dans la leucémie de l'enfant.
- 1999-2002 **B.Sc. Sciences biologiques:** orientation microbiologie et immunologie, Université de Montréal

### Expériences professionnelles

- Mai 2002-jan2004 **Assistante de recherche.** Hôpital Ste-Justine (Projet Génome Québec). Détection de polymorphismes : desing d'amorces, PCR, dHPLC, génotypage, analyses.
- Mai 2001-aout 2001 **Dépisteure agricole.** PRISME, Sherrington. Dépistage, échantillonnage et évaluation des ravageurs des champs agricoles, exécution d'un rapport, discussion avec l'agriculteur.
- Mai 2000-aout 2000 **Technicienne de laboratoire.** MAPEI, Laval.
- Mai 1999-aout 1999 Élaboration d'adhésifs, test d'efficacité et de rendement.

### Qualifications supplémentaires

- Cours introduction à la transcriptomique exploratoire: Bioneq réseau québécois de bio-informatique (octobre 2004)
- Cours d'entraînement sur le dHPLC : Transgenomic Wave® System and WAVEMAKER™ Software (23 juillet 2002)

### Publications :

- Langlois, S., Boily, G., Larose, J., Sinnett, D., (2005) Identification of transcripts modulated by ETV6-AML1, a chimeric transcription factor associated to childhood leukemia (en préparation).
- Boily G., Larose, J., Langlois S., Sinnett, D., (2005) Identification of transcripts modulated by ETV6, a putative tumour suppressor gene associated to childhood leukemia (soumis).

- Labuda, D., Labbé, C., Langlois, S., Lefebvre, J-F., Freytag, V., Moreau, C., Sawicki, J., Beaulieu, P., Pastinen, T., Hudson TJ., Sinnett, D. (2005) Landscapes of diversity in DNA segments upstream of the transcription start sites. Evidence for natural selection (soumis)
- Sinnett, D., Théberge, M-C., Bélanger, H., Langlois, S., Drouin, S., Beaulieu, P., Ghel, D., Zotti, C., Lefebvre, J-F., Labuda, D., (2005) Detection and characterization of regulatory single nucleotide polymorphisms in hundreds of human diseases candidate genes. (soumis).
- Montpetit, A., Larose, J., Boily, G., Langlois, S., Trudel, N., Sinnett, D., Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, 2004 Sep; 18(9): 1499-504.

### Communications

- Langlois, S., Boily, G., Larose, J., Sinnett, D. Identification of Genes Targeted by ETV6-AML1, a Chimeric Transcription Factor. Oncogenomics, San Diego, février 2005 (affiche).
- Labuda, D., Lefebvre, J-F., Moreau, C., Labbé, C., Langlois, S., Beaulieu, P., Theberge, M-C., Bélanger, H., Sinnett, D., and Genome-Quebec Regulatory Genetics Consortium. Contribution of gene conversion to the genetic diversity of DNA segments. European Human Genetics Conference, Praue, mai 2005 (affiche).
- Langlois, S., Boily, G., Larose, J., Sinnett, D. Identification of genes targeted by ETV6-AML1 chimeric transcription factor. The American Society of Human Genetics, Toronto, octobre 2004 (affiche).
- Labuda D, Langlois S, Gehl D, Beaulieu P, Lefebvre JF, Vasquez H, Moreau C, Labbé C, Theberge MC, Bourgoïn S, Zotti C, Pastinen T, Lepage P, Hudson T, Dewar K, Sinnett D. HGVS, Berlin, avril 2005 (oral) .
- Beaulieu, P., Theberge, M-C., Bélanger, H., Langlois, S., Larivière, M., Lefebvre, J-F., Ghel, D., Labuda, D., Sinnett, D. In-silico assessment of the impact of single nucleotide polymorphisms in the regulatory regions of human genes. The American Society of Human Genetics, Toronto, octobre 2004 (affiche).
- Bélanger, H., Beaulieu, P., Larivière, M., Moreau, C., Langlois, S., Labuda, D. Functional polymorphism in the regulatory region of genes implicated in the G1/S checkpoint. The American Society of Human Genetics, Toronto, octobre 2004 (affiche).
- Theberge, M-C., Bourgoïn, S., Beaulieu, P., Langlois, S., Bélanger, H., Ghel, D., Labuda, D., Sinnett, D. High-throughput detection of polymorphisms in regulatory region of candidate genes relevant to common diseases. The American Society of Human Genetics, Toronto, octobre 2004 (affiche).
- Labuda, D., Moreau, C., Langlois, S., Ghel, D., Beaulieu, P., Lefebvre, J-F., Vasquez, H., Labbé, C., Theberge, M-C., Bélanger, H., Zotti, C., Sinnett, D. and Genome-Quebec Regulatory Genetics Consortium. Population genetic of *bona fides* regulatory regions. The American Society of Human Genetics, Toronto, octobre 2004 (affiche).
- Langlois, S., Boily, G., Larose, J., Sinnett, D. Identification of genes targeted by ETV6-AML1 chimeric transcription factor. Oncogenomics, Montréal, octobre 2004.

- Bélanger, H., Beaulieu, P., Larivière, M., Moreau, C., Langlois, S., Labuda, D. Functional polymorphism in the regulatory region of genes implicated in the G1/S checkpoint. Oncogenetics, Montréal, octobre 2004.
- Langlois, S., Boily, G., Larose, J., Sinnett, D. Identification de gènes ciblés par ETV6-AML1 retrouvée dans la leucémie lymphoblastique aigue, Xe journée scientifique de Biomol, mai 2004 (oral)
- Bélanger, H., Theberge, M-C., Langlois, S., Bourgoïn, S., Beaulieu, P., Ghel, D., Zotti, C., Labuda, D., Sinnett, D. High-throughput detection of polymorphisms in regulatory region of candidate genes related to common genetic diseases. American association for cancer research, Washington DC juillet 2003 (oral).

