

Université de Montréal

**Identification de nouvelles cibles transcriptionnelles d'ETV6, un
facteur de transcription fréquemment altéré dans la leucémie aiguë
lymphoblastique**

Par

Karine Lagacé

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue
de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en Biochimie

Décembre 2014

© Karine Lagacé, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Identification de nouvelles cibles transcriptionnelles d'ETV6, un
facteur de transcription fréquemment altéré dans la leucémie aiguë
lymphoblastique**

Présenté par : Karine Lagacé

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre. Sylvie Mader, président-rapporteur

Dr. Daniel Sinnett, directeur de recherche

Dr. Éric Milot, membre du jury

Résumé

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est le cancer pédiatrique le plus fréquent. Plusieurs réarrangements chromosomiques ont été associés à cette maladie, dont la translocation t(12;21), qui est observée dans 25% des cas de LAL de type pré-B. Cette translocation engendre l'expression de la protéine de fusion ETV6-AML1. Toutefois, celle-ci n'est pas suffisante pour initier seule une leucémie, ce qui suggère que des mutations additionnelles sont nécessaires à la transformation oncogénique. Or, on observe que l'allèle non-réarrangé d'*ETV6* est perdu dans 75% des cas de t(12;21). Cette délétion entraîne l'inactivation complète du facteur de transcription ETV6 et l'abolition de sa fonction biologique. Puisqu'*ETV6* semble jouer un rôle de suppresseur de tumeurs, nous croyons que son inactivation favoriserait le développement de la leucémie via la dérégulation de ses gènes cibles. Ce projet visait donc à identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles d'*ETV6*, afin d'élucider son implication dans la leucémie. Une expérience de RNA-Seq a permis d'identifier plus de 200 gènes dont l'expression est corrélée avec celle d'*ETV6* dans des cellules souches hématopoïétiques CD34+. Parmi ceux-ci, plusieurs gènes sont impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire, la migration cellulaire, l'homéostasie ionique et la signalisation intracellulaire. Nous avons également mis en place une approche d'immunoprécipitation de la chromatine afin d'identifier les régions auxquelles le facteur de transcription ETV6 peut se lier. À l'aide de cette méthode, nous avons démontré une interaction entre ETV6 et *SLCO2B1*, un gène dont l'expression est également co-régulée avec ETV6. Finalement, notre étude suggère qu'*ETV6* contribuerait à la leucémogénèse en dérégulant l'expression de certains gènes ayant des propriétés oncogéniques.

Mots-clés : cancer pédiatrique, leucémie aiguë lymphoblastique, facteur de transcription ETV6, régulation transcriptionnelle, RNA-Seq, ChIP-Seq

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer. Many chromosomal rearrangements have been identified in leukemia, including the translocation t(12;21), which is observed in approximately 25% of children diagnosed with pre-B ALL. This translocation results in the expression of the ETV6-AML1 chimera. However, the fusion protein ETV6-AML1 is not sufficient to initiate leukemia by itself, suggesting that additional mutations are required to promote oncogenic transformation. Accordingly, the expression of the non-rearranged *ETV6* allele is lost in 75% of the t(12;21) cases. This deletion leads to the complete inactivation of ETV6 transcription factor and the abolition of its biological function. Because ETV6 seems to be a tumor suppressor, we believe that its inactivation could promote the development of leukemia through the deregulation of its downstream target genes. This project aimed to identify new transcriptional targets of ETV6, in order to elucidate its role in leukemogenesis. A RNA-Seq experiment has led to the identification of more than 200 genes whose expression is correlated with ETV6 mRNA levels in CD34 + hematopoietic stem cells. Among these, several genes are involved in immune and inflammatory responses, cell migration, ion homeostasis and intracellular signaling. We also implemented a chromatin immunoprecipitation approach to identify the binding sites of ETV6. This approach confirmed an interaction between ETV6 and *SLCO2B1* gene, whose expression is also co-regulated with ETV6. This study suggests that ETV6 may contribute to leukemogenesis by deregulating the expression levels of several oncogenes.

Keywords: pediatric cancer, acute lymphoblastic leukemia, ETV6 transcription factor, transcriptional regulation, RNA-Seq, ChIP-Seq

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1. Introduction	1
1.1. Les cancers pédiatriques.....	2
1.2. La leucémie.....	3
1.2.1. Leucémie aiguë lymphoblastique de type pré-B.....	4
1.2.1.1. Développement.....	4
1.2.1.2. Traitement.....	5
1.2.1.3. Taux de survie et conséquences à long terme.....	7
1.2.1.4. Étiologie.....	8
1.3. Les translocations chromosomiques.....	9
1.3.1. Translocation t(12;21)(p13;q22).....	11
1.3.1.1. Origine prénatale de la t(12;21).....	12
1.3.1.2. Rôle de la t(12;21) dans la pathogénèse de la LAL pré-B.....	14
1.4. Délétion de l'allèle résiduel d'ETV6 associée à la translocation t(12;21).....	16
1.5. Le facteur de transcription ETV6.....	17
1.5.1. Structure et domaines fonctionnels.....	18
1.5.2. Localisation cellulaire et modifications post-traductionnelles.....	20
1.5.3. Fonction biologique.....	21
1.5.4. Cibles transcriptionnelles.....	22
1.6. Étude de la régulation génique.....	24
1.6.1. RNA-Seq.....	25
1.6.2. CHIP-Seq.....	25
1.7. Hypothèse de recherche.....	27
1.8. But principal du projet.....	27
1.9. Objectifs spécifiques du projet.....	28
Chapitre 2. Matériel et méthodes	29
2.1. Culture de lignée cellulaire.....	30

2.2. Purification de cellules souches hématopoïétiques CD34+ à partir de sang de cordon.....	30
2.3. Modulation de l'expression d'ETV6 dans les cellules CD34+	31
2.3.1. Constructions	31
2.3.2. Production de lentivirus	31
2.3.3. Transduction lentivirale.....	34
2.3.4. Extraction d'ARN et transcription inverse	34
2.3.5. Design des amorces.....	34
2.3.6. PCR en temps réel.....	36
2.4. RNA-Seq	36
2.4.1. Extraction d'ARN.....	36
2.4.2. Préparation des bibliothèques pour le séquençage du transcriptome.....	37
2.4.3. Séquençage des échantillons d'ARN.....	37
2.4.4. Contrôle de qualité et analyse des données de RNA-Seq	37
2.5. Enrichissement de processus biologiques	38
2.6. Enrichissement de motifs consensus de liaison.....	38
2.7. ChIP-Seq.....	39
2.7.1. Immunoprécipitation de la chromatine	39
2.7.2. Préparation des bibliothèques pour ChIP-Seq.....	42
2.7.3. Séquençage des échantillons de ChIP	42
2.7.4. Analyse des données de ChIP-Seq	43
2.8. ChIP-qPCR.....	43
2.8.1. Immunoprécipitation de la chromatine	43
2.8.2. Design des amorces.....	43
2.8.3. PCR en temps réel.....	45
2.9. Immunobuvardage de type Western.....	45
2.10. Essais de gène rapporteur	46
Chapitre 3. Résultats	48
3.1. Mise en contexte.....	49
3.2. Identification des gènes co-modulés avec l'expression d'ETV6 par RNA-Seq.....	51
3.2.1. Purification de cellules souches hématopoïétiques CD34+ à partir de sang de cordon	51
3.2.2. Modulation de l'expression d'ETV6 dans les cellules CD34+	52
3.2.3. Préparation des bibliothèques et séquençage du transcriptome	55
3.2.4. Identification des gènes co-modulés avec l'expression d'ETV6.....	56
3.2.4.1. Validation des gènes fortement co-modulés avec ETV6.....	59
3.2.4.2. Enrichissement de processus biologiques	61

3.2.4.3.	Enrichissement de motifs.....	62
3.3.	Identification des sites de liaison du facteur de transcription ETV6	64
3.3.1.	Mise en place du protocole de ChIP	64
3.3.1.1.	Optimisation de la fragmentation de la chromatine.....	64
3.3.1.1.1.	Influence des paramètres des ultrasons sur la fragmentation de l'ADN	65
3.3.1.1.2.	Influence de la durée de fixation au formaldéhyde sur la fragmentation de l'ADN	68
3.3.1.1.3.	Influence de la nature du milieu de fixation sur la fragmentation de l'ADN	72
3.3.1.2.	Optimisation de l'éluion des complexes ADN-protéines.....	73
3.3.1.2.1.	Éluion basique.....	73
3.3.1.2.2.	Éluion acide	75
3.3.1.2.3.	Éluion par compétition	77
3.3.2.	Évaluation de l'efficacité du protocole de ChIP	78
3.3.3.	ChIP-Seq sur le facteur de transcription ETV6.....	80
3.3.3.1.	Immunoprécipitation de la chromatine associée au facteur de transcription ETV6	80
3.3.3.2.	Préparation des bibliothèques et séquençage des échantillons de ChIP	81
3.3.3.3.	Identification des régions génomiques enrichies par ChIP.....	82
3.3.3.4.	Évaluation de l'enrichissement par ChIP des gènes co-modulés avec ETV6	85
	Chapitre 4. Discussion	86
4.1.	ETV6 régule l'expression d'un grand nombre de gènes de façon directe ou indirecte	87
4.2.	Les cibles potentielles d'ETV6 ne présentent pas d'enrichissement de motifs de liaison	88
4.3.	ETV6 régule l'expression de plusieurs cibles transcriptionnelles des facteurs Ets	89
4.4.	ETV6 peut lier le promoteur du gène <i>SLCO2B1</i> et réprimer son expression	91
4.5.	La délétion d'ETV6 contribuerait à la leucémogénèse	92
4.5.1.	<i>SPHK1</i>	92
4.5.2.	<i>MMP-9</i>	94
4.5.3.	<i>C1QA/C1QB/C1QC</i>	96
4.5.4.	<i>MAF/MAFB</i>	97
4.5.5.	L'implication d'ETV6 dans la leucémogénèse.....	99
4.6.	Travaux futurs.....	100
	Chapitre 5. Conclusion et perspectives	101
	Chapitre 6. Bibliographie	103
	Chapitre 7. Annexes	xv
	Annexe A	xvi
	Annexe B	xxii
	Annexe C	xxiv

Annexe D lxi
Annexe E lxvi
Annexe F..... lxvii
Annexe G..... lxviii

Liste des tableaux

Tableau I. Facteurs pronostiques de la leucémie aiguë lymphoblastique pédiatrique.....	6
Tableau II. Fréquence et pronostic des anomalies génétiques observées dans la LAL pré-B pédiatrique	9
Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour le PCR en temps réel.....	35
Tableau IV. Séquences des adaptateurs pour la préparation des bibliothèques de CHIP	42
Tableau V. Séquences des amorces utilisées pour le PCR en temps réel (CHIP).....	44
Tableau VI. Quantité d'ADN transfectée pour les essais de gène rapporteur.....	47
Tableau VII. Efficacité des différentes méthodes et constructions testées pour le transfert d'ADN exogène (surexpression) dans des cellules CD34+	53
Tableau VIII. Efficacité des différentes méthodes et constructions testées pour le transfert d'ADN exogène (répression) dans des cellules CD34+.....	53
Tableau IX. Statistiques sur les données de séquençage du transcriptome.....	55
Tableau X. Liste de 50 gènes co-modulés de façon significative avec l'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules CD34+.....	58
Tableau XI. Processus biologiques enrichis dans le sous-groupe de gènes co-modulés avec l'expression d'ETV6.....	62
Tableau XII. Profil de l'ADN fragmenté par sonication à l'aide du Covaris S2 en variant les paramètres des ultrasons	68
Tableau XIII. Statistiques sur les données de séquençage de CHIP	82
Tableau XIV. Régions génomiques enrichies par CHIP dans des cellules CD34+ ETV6-HA en ciblant l'étiquette HA.....	84
Tableau XV. Liste des gènes pouvant être régulés par ETV6 et par d'autres facteurs Ets	90
Tableau XVI. Séquences des siRNA testés pour réprimer l'expression d'ETV6.....	xxi
Tableau XVII. Liste de tous les gènes co-modulés de façon significative avec l'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules CD34+	lxi

Liste des figures

Figure 1. Distribution des cas de cancer chez les enfants de 0-14 au Canada (2006 à 2010).	2
Figure 2. Schéma de l'hématopoïèse.....	3
Figure 3. Modèle multi-étapes du développement de la leucémie aiguë lymphoblastique pédiatrique. ...	5
Figure 4. Structure de la protéine de fusion ETV6-AML1 et de la protéine sauvage ETV6.	12
Figure 5. Séquences d'ADN consensus liées par le facteur de transcription ETV6, caractérisées par la méthode SELEX.....	19
Figure 6. Partenaires de fusion connus du gène <i>ETV6</i> et cartographie des points de cassure correspondants.....	22
Figure 7. Schéma des vecteurs lentiviraux utilisés pour moduler l'expression d' <i>ETV6</i>	32
Figure 8. Schéma des plasmides d'empaquetage de 3 ^e génération utilisés pour produire des lentivirus.	33
Figure 9. Schéma d'une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine.	41
Figure 10. Pureté des cellules CD34+ isolées à partir de sang de cordon ombilical.	52
Figure 11. Niveau d'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules CD34+.	54
Figure 12. Gènes différenciellement exprimés suite à la modulation de l'expression d' <i>ETV6</i> dans des cellules CD34+.	57
Figure 13. Validation du niveau d'expression d' <i>ETV6</i> et de 7 gènes fortement co-modulés avec l'expression d' <i>ETV6</i> dans des cellules CD34+.....	60
Figure 14. Enrichissement du motif consensus de liaison d' <i>ETV6</i> dans les séquences promotrices des gènes cibles potentiels.....	63
Figure 15. Influence des différents paramètres d'ultrasons sur la fragmentation de l'ADN	67
Figure 16. Influence du temps de fixation des cellules au formaldéhyde sur la fragmentation de l'ADN par sonication	69
Figure 17. Influence du temps de fixation sur une immunoprécipitation de la chromatine.....	71
Figure 18. Influence de la nature du milieu de fixation au formaldéhyde sur la fragmentation de l'ADN par sonication.	72
Figure 19. Efficacité et spécificité d'une élution basique.....	74

Figure 20. Efficacité et spécificité d'une élution acide.....	76
Figure 21. Efficacité et spécificité d'une élution par compétition	78
Figure 22. Immunoprécipitation de la chromatine dans des cellules CD34+ ciblant la protéine RNAPolII et les histones H3K4me3 et H3K27me3.	80
Figure 23. Régions génomiques enrichies par ChIP dans des cellules CD34+ ETV6-HA et CD34+ WT en ciblant l'étiquette HA.	84
Figure 24. Immunoprécipitation de la chromatine dans des cellules CD34+ ETV6-HA en ciblant l'étiquette HA	85
Figure 25. Mécanisme de mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans la circulation induite par la métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9).	95
Figure 26. Modèle décrivant le rôle d'ETV6 dans l'initiation de la leucémogénèse pédiatrique.....	99
Figure 27. Schéma du vecteur lentiviral pCCL.hPGK.ETV6-HA-IRES-GFP	xvi
Figure 28. Schéma du vecteur lentiviral pLenti.CMV-ETV6-HA.hPGK-GFP	xvii
Figure 29. Schéma du vecteur lentiviral pCCL.hPGK-ETV6	xviii
Figure 30. Schéma du vecteur lentiviral pSMPUW.EF-1 α -ETV6-HA.....	xix
Figure 31. Schéma du vecteur pMAX.CMV-ETV6-HA.....	xx
Figure 32. Schéma du vecteur lentiviral pLKO.1.GFP.shRNA-ETV6.....	xxi
Figure 33. Influence de la présence d'une étiquette HA à l'extrémité C-terminale de la protéine ETV6 sur la répression transcriptionnelle du promoteur EBS3tk.....	xxii
Figure 34. Schéma des vecteurs pRL-SV40, pcDNA3.1 et pGL3-Basic utilisés pour les expériences de gène rapporteur	xxiii
Figure 35. Différence d'expression des facteurs Ets dans les populations P1 et P2 suite à la modulation d'ETV6	lxvi
Figure 36. Niveau d'expression du gène <i>SPHK1</i> dans les populations P1 et P2.....	lxvii
Figure 37. Niveau d'expression des gènes <i>MAF</i> et <i>MAFB</i> dans les populations P1 et P2.....	lxviii

Liste des abréviations

ABL1 : Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AF4 : ALL-1 fused gene on chromosome 4
AKT : Ak transforming
AML1 : acute myeloid leukemia 1
ARN : acide ribonucléique
ARNr : acide ribonucléique ribosomal
Bcl-X_L : B-cell lymphoma-extra large
BCR : breakpoint cluster region
BCV : biological coefficient of variation
C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein alpha
C1QA : complement component 1, q subcomponent, A chain
C1QB : complement component 1, q subcomponent, B chain
C1QC : complement component 1, q subcomponent, C chain
C3 : complement component 3
C5AR1 : complement component 5a receptor 1
CCND2 : cyclin D2
CD19 : cluster of differentiation 19
CD34 : cluster of differentiation 34
CD38 : cluster of differentiation 38
CD4 : cluster of differentiation 4
ChIP : chromatin immunoprecipitation
ChIP-qPCR : immunoprécipitation de la chromatine couplée au PCR quantitatif
ChIP-Seq : immunoprécipitation de la chromatine couplée au séquençage
CHU : centre hospitalier universitaire
CMV : cytomégalovirus
CNS : central nervous system
CPM : count per million
CRLF2 : cytokine receptor-like factor 2
CSF1R : colony stimulating factor 1 receptor
CSH : cellules souches hématopoïétiques
Ct : cycle threshold
CTSL : cathepsin L
CXCR4 : chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DC : duty cycle
DCDC2 : doublecortin domain containing 2
dNTPs: désoxyribonucléotides
E2A : transcription factor E2-alpha
EF-1a : elongation factor 1 alpha

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
ELK-1 : ETS domain-containing protein 1
ETO : eight-twenty one protein
Ets (famille) : E26 transformation-specific
ETS1 : v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
ETS2 : v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
ETV4 : ets variant 4
ETV6 : ets variant 6
ETV7 : ets variant 7
FAB : french american british
FBS: fetal bovine serum
FC : fold change
FDR : false discovery rate
FISH : fluorescence in situ hybridation
FLI-1 : friend leukemia virus integration 1
FSC : forward scatter
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
G-CSF : granulocyte colony stimulating factor
GFP : green fluorescent protein
GO : gene ontology
GPIB α : glycoprotein Ib alpha
GPIX : glycoprotein IX
GWAS : genome-wide association study
H3K27me3 : histone H3 lysine 27 triméthylée
H3K4me3 : histone H3 lysine 4 triméthylée
HA : hémagglutinine A
HAT : histone acetyltransferase
HDAC3 : histone deacetylase 3
HDAC9 : histone deacetylase 9
HEK 293T : human embryonic kidney 293 transformed with T antigen
HLH : helix-loop-helix
hPGK : human phosphoglycerate kinase 1
HRP : horseradish peroxidase
HTH : helix-turn-helix
IgG : immunoglobuline de type G
IgH : immunoglobulin heavy chain
IL-4 : interleukine-4
IL-6 : interleukine-6
IL-8 : interleukine-8
IP : immunoprécipitation
IRES : internal ribosome entry site
Kb : kilobases

KitL : kit ligand
L(3)MBTL : lethal (3) malignant brain tumor like
LAL pré-B : leucémie aiguë lymphoblastique de type pré-B
LGMN : legumain
LUM : lumican
MAF : v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MAFB : v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
MCSFR : macrophage colony-stimulating factor receptor
miR : micro RNA
MLL : mixed-lineage leukemia
mM : millimolaires
MMP-3 : matrix metallopeptidase 3
MMP-9: matrix metallopeptidase 9
Sin3A : SIN3 homolog A
mTOR : mechanistic target of rapamycin
MYC : v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene
MYT1 : myelin transcription factor 1
N-CoR : nuclear receptor co-repressor
ng : nanogrammes
NIH 3T3 : national institute of health 3-day transfer inoculum 3×10^5 cells
nM : nanomolaires
NTRK3 : neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3
p16^{INK4a}p19^{ARF} : cyclin-dependent kinase inhibitor 2
p38 : protein 38
p53 : protein 53
PAX5 : paired box 5
pb : paire de bases
PBX1 : pre-B-cell leukemia transcription factor 1
PCR : polymerase chain reaction
PDGFR β : platelet-derived growth factor receptor beta
PE : phycoérythrine
PEI : polyéthylènimine
PI3K : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIAS3 : protein inhibitor of activated STAT 3
PML : promyelocytic leukemia
PNT : pointed
PTGER4 : prostaglandin E receptor 4
Puro : puromycine
PVDF : polyvinylidene fluoride
qRT-PCR : quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RAR α : retinoic acid receptor alpha
READ1 : regulatory element associated with dyslexia 1

RIN : RNA integrity number
RNAi : ARN interférent
RNAPolIII : ribonucleic acid polymerase II
RPMI : roswell park memorial institute
RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction
RUNX1 : runt-related transcription factor 1
S1P : sphingosine-1-phosphate
SCF : stem cell factor
SDF-1 : stromal cell-derived factor 1
SELEX : systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SFEM : serum-free expansion medium
shRNA : short hairpin RNA
SILAC : stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SLCO2B1 : solute carrier organic anion transporter family member 2B1
SMRT : silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SNC : système nerveux central
SPHK1 : sphingosine kinase 1
SPI1 : spleen focus forming virus proviral integration oncogene 1
SR100 : single read 100 bases
SSC : side scatter
STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3
STR : short tandem repeat
SUMO-1 : small ubiquitin-like modifier 1
TA : transactivation
TEL : translocation ets leukemia
TIP60 : Tat interacting protein 60 kDa
TM : trademark
TP53 : tumor protein 53
TPO : thrombopoïétine
TSS : transcription start site
TTC34 : tetratricopeptide repeat domain 34
U : unités
UBC9 : ubiquitin-conjugating enzyme E2I
uL : microlitres
WBC : white blood cells
WT : wild type

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr. Daniel Sinnett, qui m'a fait confiance en m'accueillant dans son équipe et m'a confié un projet stimulant et rempli de défis.

Je remercie Dre. Sylvie Mader et Dr. Éric Milot d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Merci également aux membres du laboratoire qui ont contribué de près ou de loin à ce projet : Sylvie, merci pour tes conseils et ton attitude toujours zen, Chantal, merci pour tes idées innovatrices et ton sourire contagieux, Mathieu, même si parfois les esprits se sont échauffés, merci beaucoup pour ta collaboration dans ce projet.

Pauline et Jean-François, vous avez été des collègues extraordinaires et vous êtes devenus également de bons amis. Je vous remercie pour les longues discussions, pas toujours scientifiques, qui retardaient souvent l'heure du souper.

Je remercie également tous les autres membres de l'équipe : Manon, Jasmine, Pamela, Thomas, Romain, Nicolas, Alexandre, Simon, Claire, Pascal et Patrick. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous.

Je tiens à remercier le Dr. Arnaud Droit pour sa précieuse collaboration et toute l'équipe de la banque de sang de cordon du CHU Ste-Justine.

Merci à ma famille et mes amis qui m'offrent un soutien inconditionnel.

J'aimerais finalement remercier Benjamin, mon collègue, mon ami et mon amour. Ta présence à mes côtés a été précieuse dans les bons moments et les moins bons. Je te remercie pour tes conseils, ton regard critique face à mon travail, ta confiance et surtout, merci de rendre mes journées plus lumineuses.

Chapitre 1. Introduction

1.1. Les cancers pédiatriques

Au Canada, environ 850 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués chaque année chez les enfants. Parmi ceux-ci, environ un enfant sur cinq décèdera de cette maladie, ce qui fait du cancer la principale cause de mortalité par maladies chez les enfants de 0-14 ans [1, 2]. Contrairement aux cancers adultes, les cas pédiatriques présentent une plus grande proportion de tumeurs hématopoïétiques (hématologiques et lymphatiques), surtout des cas de leucémie. En effet, la leucémie est le cancer le plus souvent diagnostiqué chez les enfants (32%), suivie des cancers du système nerveux central (19%) et des lymphomes (11%) (fig. 1). La majorité des enfants atteints de leucémie ont ~80% de chance de survie, mais la plupart des survivants auront d'importantes séquelles dues aux traitements ou à la maladie elle-même.

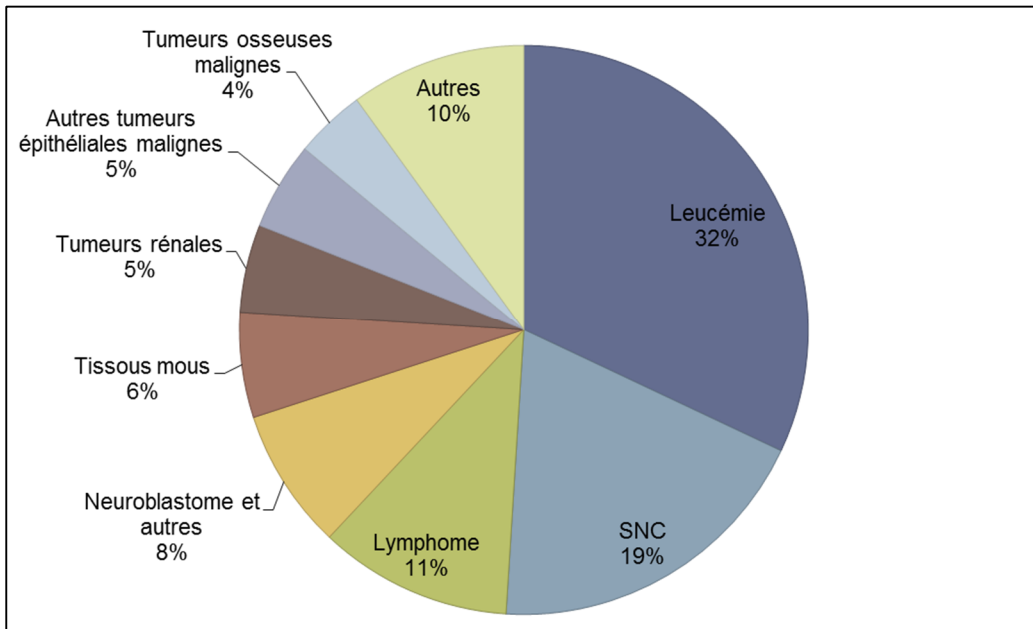


Figure 1. Distribution des cas de cancer chez les enfants de 0-14 au Canada (2006 à 2010). La leucémie est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué dans cette tranche d'âge. SNC : Système nerveux central. Données tirées de Statistiques canadiennes sur le cancer 2014 [3].

1.2. La leucémie

La leucémie est un cancer hématologique qui affecte les cellules souches de la moelle osseuse. Au cours de l'hématopoïèse normale, les cellules souches vont se différencier soit en cellules myéloïdes ou en cellules lymphoïdes. Les cellules myéloïdes se différencieront ensuite en globules rouges, en plaquettes, en macrophages et en granulocytes. Les cellules lymphoïdes se différencieront quant à elles en lymphocytes de type B ou T (fig. 2).

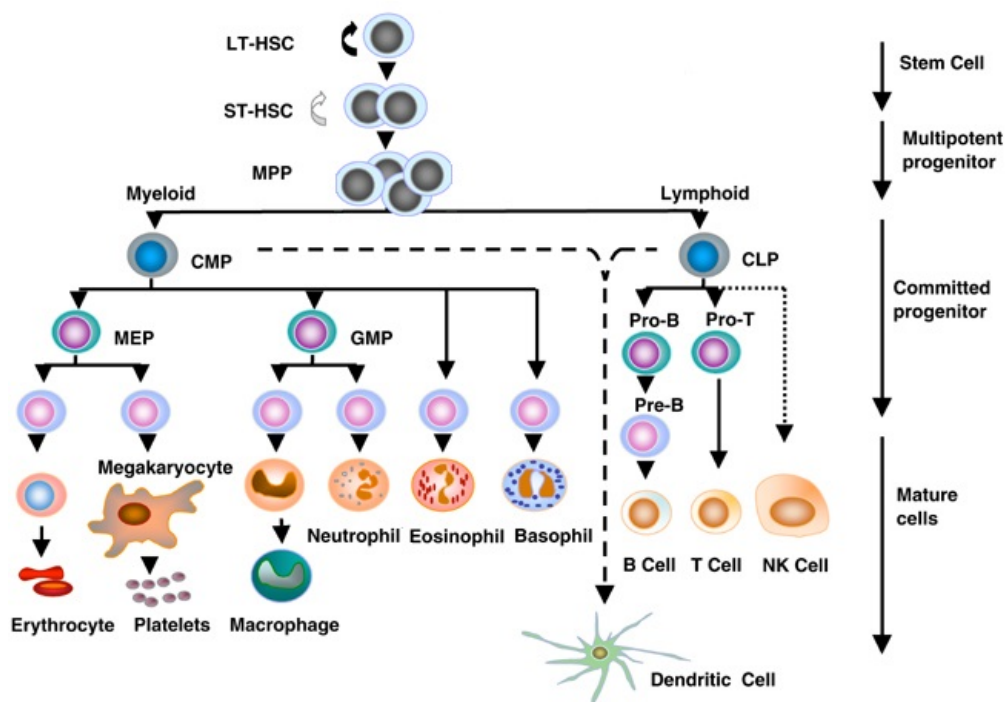


Figure 2. Schéma de l'hématopoïèse. Au cours de l'hématopoïèse, les cellules progénitrices multipotentes vont se différencier en cellules myéloïdes ou en cellules lymphoïdes. Ultimement, la lignée myéloïde donnera naissance aux globules rouges, aux plaquettes, aux macrophages et aux granulocytes, tandis que la lignée lymphoïde est à l'origine des lymphocytes de type B ou T. LT : long-term, ST : short-term, HSC : hematopoietic stem cells, MPP : multipotent progenitor, CMP : common myeloid progenitor, CLP : common lymphoid progenitor, MEP : megakaryocyte-erythroid progenitor, GMP : granulocyte-macrophage progenitor. Adaptée de Larsson *et al.* 2005 [4].

Une leucémie se développe lorsque les cellules souches immatures perdent leur capacité à se différencier et prolifèrent anormalement. Ces cellules leucémiques se multiplient de façon excessive et deviennent plus nombreuses que les cellules normales. Elles envahissent alors la moelle osseuse, le sang périphérique et plusieurs autres organes (foie, rate, système nerveux central, ganglions lymphatique, etc.). À ce stade, l'enfant présente généralement des symptômes caractéristiques, comme des saignements fréquents, de l'anémie, un gonflement de l'abdomen et une faiblesse généralisée.

On classifie les différents types de leucémies selon la lignée cellulaire affectée (lymphoïde ou myéloïde) et selon la rapidité à laquelle la maladie se développe (aiguë ou chronique). La leucémie aiguë débute de manière soudaine, évolue très rapidement (en quelques jours ou quelques semaines) et nécessite un traitement urgent. La leucémie chronique se développe plutôt lentement (en quelques mois) et peut demeurer longtemps asymptomatique (période de latence). Chez l'enfant, le type le plus courant est la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), qui représente environ 75% des leucémies pédiatriques. Cette maladie présente une incidence particulièrement élevée entre 2 et 5 ans. La LAL peut se développer suite à un blocage de la différenciation de la lignée T, mais la lignée B est affectée dans 85% des cas.

1.2.1. Leucémie aiguë lymphoblastique de type pré-B

1.2.1.1. Développement

Comme tous les cancers, la LAL résulte d'interactions entre la susceptibilité génétique et certains facteurs exogènes et endogènes (infection, inflammation, stress oxydatif, etc.) [5]. Par ailleurs, plusieurs évidences suggèrent que le développement de la leucémie est un processus multi-étapes débutant au stade embryonnaire. Tout d'abord, la présence de réarrangements chromosomiques favorise la formation d'un clone pré-leucémique *in utero*

lors de l'hématopoïèse foetale. Ce clone peut rester en latence pendant plusieurs mois, voire même des années. Dans environ 1% des cas, des mutations additionnelles s'accumuleraient pour provoquer l'éclosion d'un clone leucémique. C'est à ce moment que la maladie se déclare (fig. 3).

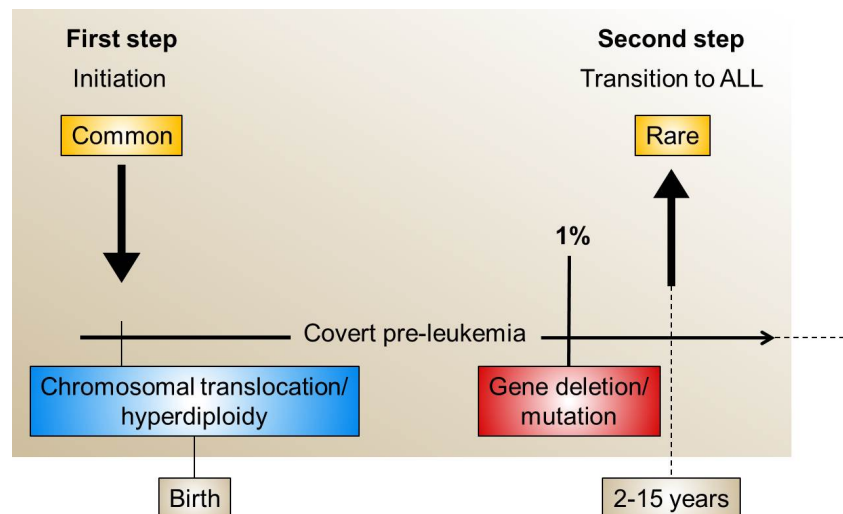


Figure 3. Modèle multi-étapes du développement de la leucémie aiguë lymphoblastique pédiatrique. Un premier évènement survient avant la naissance (réarrangement chromosomique, aneuploïdie, etc.) et confère à la cellule un état pré-leucémique. Dans environ 1% des cas, un deuxième évènement se produit (mutation, délétion, etc.), ce qui mène à la transformation oncogénique. La latence entre le premier et le deuxième évènement peut varier entre 2 et 15 ans. Adaptée de Greaves M. 2006 [6].

1.2.1.2. Traitement

Le traitement de la LAL est ajusté en fonction de la catégorie de risque associée à chaque cas, basée sur certains facteurs pronostiques. Cette classification permet aux enfants ayant un bon pronostic de recevoir un traitement moins agressif et à ceux ayant un mauvais pronostic de recevoir un traitement plus intensif pour accroître leurs chances de survie. Parmi les facteurs ayant un impact sur le niveau de risque, on retrouve l'âge du patient, le nombre

de globules blancs au diagnostic, l'évidence d'une atteinte du système nerveux central ainsi que la présence et le type d'anomalies chromosomiques (tableau I).

Tableau I. Facteurs pronostiques de la leucémie aiguë lymphoblastique pédiatrique

Risk factor	Outcome	
	Favorable	Unfavorable
Age	1-9 years	<1 and >9 years
Gender	Female	Male
Race	Caucasian, Asian	African-American
Node, liver and spleen enlargement	Absent	Massive
WBC at diagnosis	<50x10 ⁹ /L	>50x10 ⁹ /L
FAB morphologic type	L1	L2
DNA index	>1.16	<1.16
Response to induction therapy on day 28	No peripheral blasts	Peripheral blasts
CNS status	CNS 1	CNS 2 or 3
Cytogenetics	Hyperdipl., Trisomies 4 and 10	Hypodiapl., t(9;22), t(4;11)
Molecular genetics	ETV6-AML1	MLL gene rearrangements
Immunophenotype	Precursor B-cell	T-cell, mature B-cell

WBC : White blood cells, FAB : French American British, CNS : Central nervous system. Adapté de Khalid *et al.* 2010 [7].

Le traitement de la LAL consiste en plusieurs phases de chimiothérapie, dont l'intensité varie. L'induction est la première phase du traitement et vise à détruire toutes les cellules cancéreuses présentes dans le sang, la moelle osseuse et le liquide céphalo-rachidien, afin de parvenir à la rémission du patient. La deuxième phase du traitement, appelée consolidation ou intensification, permet d'éliminer les cellules leucémiques résiduelles pouvant provoquer une rechute. L'entretien est la dernière phase du traitement et vise à maintenir la rémission et prévenir une rechute. Cette phase nécessite l'administration de doses moins élevées de médicaments mais sur une période beaucoup plus longue. Lors d'une rechute, les patients ayant un mauvais pronostic peuvent recevoir une transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

Généralement, la chimiothérapie administrée combine plusieurs molécules différentes. Les agents chimiothérapeutiques les plus employés sont la vincristine, la daunorubicine, le cyclophosphamide, le méthotrexate et l'asparaginase. Ces molécules tuent les cellules qui se divisent trop rapidement en interférant avec différents processus cellulaires essentiels. En effet, la vincristine empêche la polymérisation des microtubules lors de la mitose, la daunorubicine bloque l'action de la topoisomérase II, nécessaire pour la réplication de l'ADN, le cyclophosphamide ajoute des groupements alkyles sur l'ADN, ce qui empêche également la réplication, et le méthotrexate inhibe la dihydrofolate réductase, une enzyme essentielle au métabolisme de l'acide folique (vitamine B₉). L'asparaginase a quant à elle une action plus ciblée. En effet, puisque les cellules leucémiques sont incapables de synthétiser leur propre asparagine, elles deviennent complètement dépendantes de l'asparagine libre en circulation [8]. Lorsqu'elle est administrée, l'asparaginase convertit l'asparagine libre en dérivés qui sont inutilisables pour la synthèse protéique, ce qui provoque la mort des cellules cancéreuses.

Des corticostéroïdes comme la prednisone ou la dexaméthasone peuvent également être associés à la chimiothérapie en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives.

1.2.1.3. Taux de survie et conséquences à long terme

Le taux de survie moyen sur 5 ans est d'environ 80%, comparativement à 10 % il y a 50 ans [9, 10]. Ce taux peut atteindre 90% pour certains cas de LAL de type pré-B. Cette hausse est attribuable à l'utilisation de meilleures techniques diagnostiques, à l'amélioration des traitements de chimiothérapie et au perfectionnement de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

Toutefois, malgré d'importants progrès dans le traitement de la maladie, environ 70% des survivants auront des complications à long terme. Certaines séquelles peuvent être détectées assez tôt et corrigées, alors que d'autres se manifestent des années plus tard et peuvent avoir un impact sur l'évolution d'autres maladies liées au vieillissement. Entre autres, on observe parmi les survivants une incidence particulièrement élevée de syndrome métabolique, de stérilité et d'ostéonécrose [11, 12]. Des atteintes au niveau des fonctions cognitives et cardiaques sont également fréquentes [13-15]. Les survivants de la leucémie sont aussi plus à risque de développer un second cancer [16, 17]. De façon générale, on observe davantage d'effets secondaires chez les patients ayant reçu de la radiothérapie crânienne.

Notre équipe travaille d'ailleurs en collaboration avec plusieurs chercheurs et médecins afin de caractériser les effets chroniques liés à la thérapie pour la LAL pédiatrique, dans le but de formuler des recommandations pour le traitement et le suivi des patients. Cette étude permettra ainsi d'améliorer la qualité de vie à long terme des survivants.

1.2.1.4. Étiologie

Les causes de la LAL sont encore peu connues. On soupçonne que des facteurs environnementaux comme certains agents chimiques, infectieux et les radiations ionisantes influenceraient le développement de la leucémie [6, 18-21], mais de plus en plus d'études démontrent une contribution génétique importante. En effet, des études d'association pangénomiques (GWAS) et des expériences de gènes candidats ont révélé l'implication de facteurs génétiques dans le développement de la maladie, notamment le type pré-B [22-24]. Par ailleurs, l'existence de cas familiaux ainsi que plusieurs études menées sur des jumeaux monozygotiques mettent en évidence le rôle joué par la susceptibilité génétique et les

altérations chromosomiques dans la LAL pré-B [25, 26]. De plus, on observe une plus forte incidence de leucémie chez les personnes atteintes d'une maladie génétique comme la trisomie 21, l'anémie de Fanconi ou le syndrome de Bloom [27].

1.3. Les translocations chromosomiques

La présence de translocations chromosomiques est caractéristique de la leucémie. Environ 80% des cas de LAL pré-B pédiatrique présentent un caryotype anormal [28]. Plusieurs approches génomiques et cytogénétiques comme le RT-PCR et l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ont permis d'identifier des réarrangements récurrents dans les leucémies [29-31]. Les anomalies génétiques les plus fréquentes sont présentées dans le tableau II.

Tableau II. Fréquence et pronostic des anomalies génétiques observées dans la LAL pré-B pédiatrique

Anomalies génétiques	Protéine de fusion	Fréquence	Pronostic
t(12;21)(p13;q22)	ETV6-AML1	25%	favorable
Hyperdiploïdie (> 50)	N/A	20-30%	favorable
Surexpression de CRLF2	N/A	6-7%	défavorable
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	2-6%	favorable
Amplification intra-chromosomique du chr21	N/A	2-3%	défavorable
t(9;22)(q34;q11.2)	BCR-ABL1	2-4%	défavorable
t(8;14)(q23;q32.3)	MYC-IgH	2%	favorable
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	1-2%	défavorable
Hypodiploïdie (< 44)	N/A	1-2%	défavorable

N/A : non-applicable. Données tirées de Pui *et al.* 2011 [32] et Lo Nigro L. 2013 [33].

Les translocations chromosomiques résultent d'une recombinaison illégitime ou d'une juxtaposition de gènes normalement localisés sur des chromosomes différents. Certaines translocations résultent en un transcrit non-codant, mais plusieurs d'entre elles génèrent un produit de fusion ayant des propriétés modifiées ou même une nouvelle fonction. Par exemple, la translocation t(8;14) provoque la dérégulation de l'expression du proto-oncogène MYC via son association avec la région *enhancer* de la chaîne longue de l'immunoglobuline (IgH), qui est un élément régulateur très fort et constitutif [34]. Également, de nombreux réarrangements impliquant des facteurs de transcription et des protéines tyrosine kinase provoquent une dérégulation de l'expression des gènes cibles en aval et la modulation de voies de signalisation essentielles au métabolisme [35, 36]. On observe d'ailleurs que les gènes essentiels au développement et à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques sont souvent la cible de réarrangements dans les leucémies [37, 38]. Par exemple, les gènes *AML1*, *RAR α* , *MLL* et *ETV6* sont impliqués dans plusieurs translocations chromosomiques et ce, dans différents désordres hématologiques.

L'implication des translocations dans la leucémogénèse est encore peu connue, mais plusieurs études démontrent que celles-ci pourraient contribuer à bloquer la différenciation hématopoïétique et/ou transformer la cellule de façon à acquérir des propriétés cancéreuses. De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle des différentes chimères. Plusieurs études supposent que l'expression de certaines protéines de fusion bloquerait la différenciation et l'apoptose en interférant avec la fonction normale des protéines sauvages impliquées dans le réarrangement. Par exemple, la protéine PML-RAR α , issue de la t(15;17), agit comme un dominant négatif sur les protéines PML et RAR α , réprimant ainsi l'expression de gènes nécessaires à la différenciation myéloïde et à la mort cellulaire [39, 40]. Dans d'autres cas, le produit chimérique acquiert lui-même une fonction oncogénique, comme la translocation t(9;22), qui provoque l'activation constitutive de la

protéine tyrosine kinase ABL1. L'augmentation de l'activité kinase de ABL1 engendre la phosphorylation de nombreux substrats et résulte en une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de la dépendance aux facteurs de croissance [41]. Il a également été démontré que la chimère BCR-ABL1 inhibe la cascade signalétique du récepteur membranaire pré-B, ce qui permet aux cellules de contourner les signaux pro-apoptotiques et ainsi favoriser leur survie [42, 43].

Les translocations chromosomiques impliquant les gènes *AML1* ou *ETV6* sont les plus fréquemment observées dans les leucémies lymphoïdes et myéloïdes [36, 44]. *AML1* a été découvert initialement dans un réarrangement avec le gène *ETO* dans la t(8;21) et a par la suite été observé dans plusieurs autres translocations : t(16;21), t(12;21), t(3;21). Le gène *AML1* code pour un facteur de transcription (activateur) composé d'un domaine de liaison à l'ADN (domaine RUNT) et d'un domaine de transactivation (domaine TA) [45-48]. Le gène *ETV6* est quant à lui un répresseur transcriptionnel de la famille Ets. Il a été découvert par Golub *et al.* en fusion avec le gène *PDGFR β* dans la translocation t(5;12) [49] et il est aussi impliqué dans de nombreux autres réarrangements. Toutefois, de tous les réarrangements chromosomiques, la t(12;21) est la translocation la plus fréquente dans la LAL pré-B pédiatrique, puisqu'on la retrouve dans environ 25% des cas [50-53].

1.3.1. Translocation t(12;21)(p13;q22)

En 1995, deux équipes ont démontré que la translocation t(12;21)(p13;q22) résulte en une juxtaposition des gènes *ETV6* (chr 12) et *AML1* (chr 21), produisant un transcrit hybride codant pour la protéine ETV6-AML1 [54, 55]. Cette protéine de fusion est composée du domaine d'interaction protéine-protéine (PNT) et du domaine de répression d'ETV6, ainsi que de tous les domaines fonctionnels de la protéine AML1 (fig. 4A). La structure d'ETV6-

AML1 se distingue donc des autres protéines de fusion impliquant AML1, qui ne contiennent que son domaine de liaison à l'ADN (domaine RUNT).

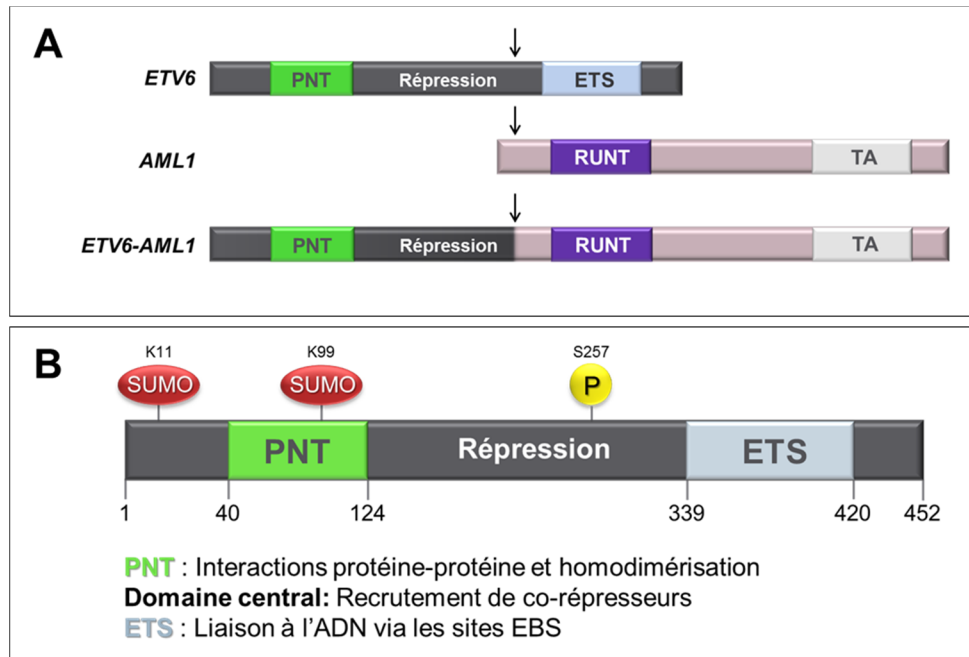


Figure 4. Structure de la protéine de fusion ETV6-AML1 et de la protéine sauvage ETV6. (A) La protéine de fusion ETV6-AML1 résulte de la translocation t(12;21). Elle est composée du domaine PNT et du domaine de répression d'ETV6 ainsi que de tous les domaines fonctionnels d'AML1. Le point de cassure est indiqué par une flèche. (B) La protéine ETV6 est constituée de 452 acides aminés. Le domaine fonctionnel d'interaction protéique (PNT) est situé entre les acides aminés 40 et 124, alors que le domaine fonctionnel de liaison à l'ADN (ETS) se situe entre les acides aminés 339 et 420. Le domaine de répression est située entre les domaines PNT et ETS. Les modifications post-traductionnelles connues et la fonction biologique des domaines sont indiquées.

1.3.1.1. Origine prénatale de la t(12;21)

Contrairement aux autres réarrangements qui sont souvent impliqués dans plusieurs désordres hématologiques différents, la t(12;21) est unique à la LAL. Cette translocation est d'ailleurs la plus commune chez les enfants, alors qu'elle est très rare chez les adultes (~3%). Cette récurrence dans les cas pédiatriques suggère que la recombinaison survient

très tôt dans le développement de l'enfant. De plus en plus d'évidences démontrent même que la translocation est déjà présente avant la naissance de l'enfant [56-59]. Cette hypothèse a été développée suite à deux études, soit une analyse comparative de clones leucémiques dans des jumeaux identiques et un criblage systématique des échantillons de sang provenant des tests de Guthrie archivés de plusieurs enfants atteints de leucémie.

La première étude a d'abord démontré que dans les cas de leucémies chez les jumeaux, les points de cassure de la translocation t(12;21) sont situés exactement au même nucléotide, alors qu'ils sont habituellement différents et uniques d'un patient à l'autre [59-62]. Ces observations indiquent que la maladie aurait une origine clonale commune, ce qui appuierait l'hypothèse proposée il y a plus de 45 ans selon laquelle le premier clone pré-leucémique surviendrait *in utero* dans un des jumeaux et que sa descendance se propagerait dans l'autre jumeau via des anastomoses vasculaires dans le placenta commun [63]. Une autre étude, réalisée chez des patients leucémiques non-jumeaux, a également été effectuée en utilisant les cartes de Guthrie ou «*blood spots*», ayant initialement servi à dépister la phénylcétonurie chez les nouveau-nés. Ce criblage a permis de confirmer que presque tous les cas de t(12;21) surviennent *in utero*, puisque la translocation est déjà présente dans les cellules sanguines au moment du test [60, 64, 65]. Cette étude sous-estime cependant la fréquence des leucémies initiées avant la naissance puisque dans certains cas, la concentration de cellules pré-leucémiques n'était pas suffisante pour être détectée au moment du test (faux négatif). Ces deux études suggèrent donc que la plupart des cas de leucémies pédiatriques ayant la t(12;21) trouvent leur origine *in utero*, probablement dans une cellule souche hématopoïétique au niveau du foie fœtal ou de la moelle osseuse [66, 67]. Certaines évidences laissent croire que cette translocation serait causée par des bris d'ADN double-brin mal réparés [58, 68]. On en connaît peu sur les facteurs qui augmenteraient les risques d'occurrence des bris d'ADN menant à des réarrangements génomiques, mais on soupçonne

que la carence en folate et certains carcinogènes chimiques pouvant traverser la barrière placentaire pourraient contribuer à augmenter la fréquence d'erreurs dans la réplication et la réparation de l'ADN durant le stade foetal [60, 69-72].

1.3.1.2. Rôle de la t(12;21) dans la pathogénèse de la LAL pré-B

Le rôle de la protéine de fusion ETV6-AML1 dans l'initiation de la LAL de type pré-B est encore peu compris. Puisque le développement d'un clone cancéreux requiert en général l'accumulation de plusieurs mutations [73], on s'interroge à savoir si la translocation t(12;21) est suffisante pour transformer une cellule saine en cellule leucémique. En effet, même si deux équipes de recherche ont observé que la surexpression de la protéine de fusion ETV6-AML1 pouvait induire la leucémie dans un petit groupe de souris [74, 75], il semble que la t(12;21) serait insuffisante pour initier par elle-même la leucémie chez l'humain [76-78]. Les études sur les jumeaux et les cartes de Guthrie de patients non-leucémiques, mentionnées ci-dessus, supportent cette hypothèse. En effet, on a observé dans les paires de jumeaux étudiées une latence très variable de la maladie pouvant varier de 5 à 14 ans [61, 79]. Au moment du diagnostic du premier jumeau, le deuxième était parfaitement normal du point de vue hématologique et celui-ci était à son tour diagnostiqué environ 9 ans plus tard. Quant aux *blood spots* prélevés sur des enfants non-leucémiques, ceux-ci ont révélé que la fréquence de la translocation t(12;21) dans la population saine est jusqu'à cent fois plus élevée que la fréquence de la LAL pré-B [77]. En d'autres mots, seulement 1% des enfants ayant la t(12;21) développeront une leucémie. Andreasson *et al.* ont également tenté d'exprimer la protéine de fusion *in vivo* sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux cellules B et aucune souris ne présentait de symptômes associés à la leucémie [76]. La somme de ces observations indique que la protéine de fusion ETV6-AML1 est nécessaire à l'éclosion d'un clone pré-leucémique et que d'autres événements génétiques seraient requis pour

transformer ce clone en cellule cancéreuse. Pour confirmer cette hypothèse, des expériences ont été réalisées dans des souris $p16^{\text{INK4a}}p19^{\text{ARF}}^{-/-}$, caractérisées par une importante instabilité génétique. En effet, $p16^{\text{INK4a}}$ et $p19^{\text{ARF}}$ régulent normalement le point de contrôle G1/S en empêchant la cellule de passer en phase S lorsqu'elle présente des mutations non-réparées. L'inactivation de ces deux gènes suppresseurs de tumeurs provoque ainsi une importante accumulation de mutations au fil des divisions cellulaires. Bernardin *et al.* ont démontré que la surexpression de la protéine de fusion ETV6-AML1 dans ces souris induisait une leucémie dans 75% des cas, ce qui suggère que des mutations secondaires doivent survenir pour initier le développement de la maladie [74].

Même si la translocation $t(12;21)$ ne peut induire par elle-même une leucémie, elle engendre une population de cellules pré-leucémiques ayant un potentiel accru de renouvellement et une plus grande résistance aux signaux pro-apoptotiques [66]. En effet, plusieurs études ont démontré que la surexpression d'ETV6-AML1 inhibe la différenciation des cellules B, menant à une accumulation de précurseurs et à un déficit en cellules B matures [80]. Ces précurseurs possèdent une capacité d'auto-renouvellement plus importante, mise en évidence par des essais *in vitro* de capacité de formation de colonies et des expériences de repopulation *in vivo* [78]. Les mécanismes moléculaires responsables de cette prolifération excessive ne sont pas connus, mais on sait que la protéine de fusion ETV6-AML1 exerce plusieurs effets biologiques importants, entre autres via la dérégulation de l'expression de plusieurs gènes. Il a effectivement été suggéré qu'ETV6-AML1 a un effet de dominant négatif sur AML1, en convertissant son activité régulatrice d'activateur à répresseur de la transcription [81]. Ichikawa *et al.* ont proposé que la protéine AML1 serait impliquée dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des lymphocytes B lors du développement [82]. De plus, on sait que l'inactivation d'AML1 provoque une augmentation du nombre de précurseurs multipotents. Ces effets sont donc similaires à ceux observés lors

de la surexpression d'ETV6-AML1, supportant l'hypothèse que la protéine de fusion agit comme un antagoniste de la protéine AML1 sauvage.

Par ailleurs, Fuka *et al.* ont proposé que la voie PI3K/AKT/mTOR pourrait être impliquée directement ou indirectement dans la prolifération excessive des cellules hématopoïétiques pré-leucémiques. En effet, leurs travaux suggèrent que cette voie de signalisation est activée de façon aberrante dans les cas de leucémie ayant la t(12;21) [75]. Puisque la voie PI3K/AKT/mTOR régule la synthèse des protéines, la prolifération cellulaire et l'apoptose via la réponse à différents stimuli, son activation plus importante dans les CSH pourrait contribuer à l'éclosion d'un clone pré-leucémique et ainsi favoriser l'acquisition d'autres mutations en raison des divisions cellulaires plus fréquentes.

La protéine de fusion ETV6-AML1 peut également interférer avec la fonction du facteur de transcription ETV6 puisque dans certains cas, la grande concentration d'ETV6-AML1 provoque la séquestration de la protéine ETV6 sauvage en formant un hétérodimère via son domaine d'interaction protéique (PNT), qui reste intact suite à la translocation. Toutefois, dans la majorité des cas où la t(12;21) est présente, l'expression d'ETV6 est perdue.

1.4. Délétion de l'allèle résiduel d'ETV6 associée à la translocation t(12;21)

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence la perte d'hétérozygotie fréquente du bras court du chromosome 12 dans certains cancers hématologiques, incluant la LAL pédiatrique [83-87]. La perte récurrente de matériel génétique dans des cellules tumorales est généralement indicative de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Montpetit *et al.* se sont donc penchés sur la région chromosomique fréquemment délétée du chromosome 12, afin de cartographier et identifier un potentiel suppresseur de tumeurs dans ce locus.

Cette étude a permis d'identifier huit unités transcriptionnelles, dont cinq étaient des gènes déjà caractérisés [88]. Pour déterminer plus précisément la cible de la délétion, l'expression de ces gènes a été évaluée dans une cohorte de patients ayant la LAL pré-B et le gène *ETV6* a été identifié comme étant la cible principale de la délétion hémizygote [89]. Cette étude a également révélé que cette délétion était toujours accompagnée de la translocation t(12;21) [89-91]. Ces résultats sont appuyés par d'autres analyses d'expression comparant des sujets sains à des patients leucémiques portant la translocation t(12;21), qui révèlent que l'expression d'*ETV6* est perdue au moment du diagnostic [92]. Des expériences d'allélotypage combinées à des études d'expression ont montré que cette perte d'expression est souvent due à la délétion d'*ETV6*, mais dans d'autres cas, il s'agirait plutôt d'une forte répression du locus [90, 93].

En résumé, l'allèle résiduel non-transloqué du gène *ETV6* est fréquemment délété ou réprimé chez les patients ayant la LAL pré-B t(12;21)+, ce qui entraîne la perte permanente de l'expression du gène et l'abolition de sa fonction biologique. On sait maintenant que cette inactivation complète d'*ETV6* survient chez environ 75% des patients ayant la translocation t(12;21).

1.5. Le facteur de transcription ETV6

ETV6 (ETS variant 6), aussi appelé TEL, est un facteur de transcription de la famille Ets. Ce groupe est composé d'environ 30 protéines régulatrices de la transcription possédant tous un domaine très conservé de liaison à l'ADN (domaine ETS) [94]. Les facteurs de transcription Ets jouent un rôle important dans différents processus cellulaires, incluant la prolifération, la différenciation et l'apoptose [95]. Presque tous les membres de la famille Ets sont des activateurs transcriptionnels, à l'exception d'*ETV6*, qui est un répresseur.

Le locus d'*ETV6* est situé sur le bras court du chromosome 12. Le gène est organisé en 8 exons, dispersés sur environ 250 kb [96]. Le transcrit d'*ETV6* possède deux sites d'initiation de la traduction (ATG1 et ATG43), ce qui engendre l'expression de deux protéines distinctes, ayant un poids moléculaire de 57 kDa et 50 kDa respectivement [97]. Il a été démontré que les deux isoformes peuvent réprimer la transcription [98].

1.5.1. Structure et domaines fonctionnels

Le domaine de liaison à l'ADN d'*ETV6* est situé à l'extrémité C-terminale de la protéine (fig. 4B). Ce domaine de type helix-turn-helix (HTH) est responsable de la reconnaissance d'une séquence spécifique d'ADN, appelée site EBS (Ets-binding site). Les sites EBS reconnus par les facteurs Ets sont tous caractérisés par un motif central GGA(A/T), mais une étude à large échelle réalisée par Jolma *et al.* a permis de préciser le motif reconnu spécifiquement par *ETV6* (fig. 5A) [99]. Ce motif consensus a été élucidé grâce à la méthode SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) qui consiste à sélectionner et amplifier, à partir d'une banque d'oligonucléotides aléatoires, les séquences qui sont capables de se fixer *in vitro* à une protéine d'intérêt. Les étapes de sélection et d'amplification sont répétées plusieurs fois afin d'enrichir les fragments d'ADN ayant la plus haute affinité pour la protéine cible. D'ailleurs, cette méthode a également permis d'identifier une nouvelle séquence d'ADN potentiellement reconnue par *ETV6*, caractérisée par deux motifs EBS en tandem (fig. 5B).

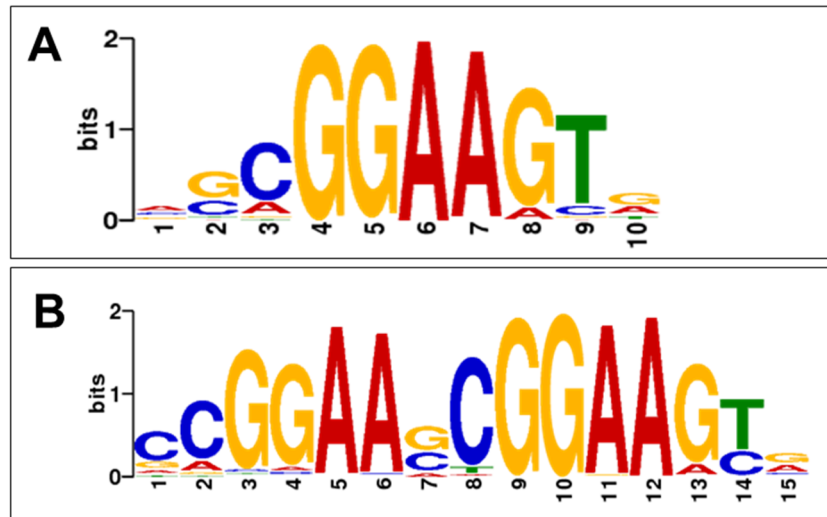


Figure 5. Séquences d'ADN consensus liées par le facteur de transcription ETV6, caractérisées par la méthode SELEX. (A) Motif consensus lié par ETV6, constitué d'un site EBS simple. (B) Motif consensus lié par ETV6, constitué de deux sites EBS en tandem, nouvellement caractérisé par *Jolma et al.* 2013 [99].

La protéine ETV6 possède également un domaine helix-loop-helix (HLH) en N-terminal, appelé domaine PNT (fig. 4B). Ce domaine est responsable des interactions protéine-protéine et de l'homodimérisation d'ETV6, ce qui favoriserait l'efficacité de la répression transcriptionnelle [100, 101]. À ce jour, on sait qu'ETV6 peut interagir directement ou en complexe avec L(3)MBTL, appartenant au groupe de protéines Polycomb [102], STAT3 [103] ainsi que FLI-1 et ETV7, deux autres membres de la famille Ets [100, 104, 105].

L'activité de régulation transcriptionnelle d'ETV6 est aussi médiée par un domaine central impliqué dans le recrutement de protéines régulatrices. En effet, plusieurs équipes de recherche ont caractérisé une interaction avec les corépresseurs nucléaires SMRT, Sin3A et N-CoR [106, 107], qui recrutent à leur tour les déacétylases HDAC3 et HDAC9 au niveau du domaine de répression [108, 109]. ETV6 semble donc réprimer la transcription via un mécanisme de condensation de la chromatine, rendant l'ADN moins accessible à la machinerie transcriptionnelle. De façon intéressante, il a été démontré qu'ETV6 peut

également interagir avec TIP60, une protéine histone acétyltransférase (HAT) ayant une fonction d'activateur de la transcription [110]. Toutefois, des essais de gène rapporteur montrent que l'interaction entre TIP60 et ETV6 favorise la répression transcriptionnelle d'un promoteur ciblé par ETV6 [110, 111]. Le recrutement de TIP60 produit donc un effet synergique, plutôt qu'une inhibition de la répression comme on s'y attendrait.

1.5.2. Localisation cellulaire et modifications post-traductionnelles

La protéine ETV6 est localisée principalement au noyau, où elle interagit directement avec l'ADN. Même si le signal de localisation nucléaire n'a pas été précisément cartographié, Park *et al.* ont démontré que celui-ci se situe entre les acides aminés 332-452, c'est-à-dire à l'intérieur ou à proximité du domaine de liaison à l'ADN [112].

L'activité de répression transcriptionnelle d'ETV6 est régulée par différentes modifications post-traductionnelles (fig. 4B). Chakrabarti *et al.* ont démontré à l'aide d'un système de levure double-hybride qu'ETV6 peut interagir avec UBC9, une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine [113]. L'interaction avec UBC9 permet le recrutement de la protéine SUMO-1, qui modifie ETV6 au niveau de la lysine 99. Cette modification post-traductionnelle provoque la séquestration d'ETV6 dans des foci nucléaires et son exportation du noyau [114, 115]. La lysine 11 de la protéine est aussi une cible de sumoylation par la protéine PIAS3 [116]. ETV6 est également phosphorylé au niveau de la sérine 257 par la kinase p38 en condition de stress [117]. Il a été démontré que toutes ces modifications post-traductionnelles diminuent la capacité d'ETV6 à réprimer la transcription [113-117], ce qui suggère que la sumoylation et la phosphorylation de la protéine régulent finement sa fonction biologique entre autres via son exportation nucléaire.

1.5.3. Fonction biologique

La protéine ETV6 est exprimée de façon ubiquitaire, mais elle exerce un rôle crucial dans les cellules hématopoïétiques au cours du stade foetal. En effet, Wang *et al.* ont montré que des souris *ETV6*^{-/-} meurent entre E10.5 et E11.5 dû à une angiogenèse défectueuse du sac vitellin et une mort accrue des cellules mésenchymateuses et neurales [118]. ETV6 est également impliqué dans la différenciation hématopoïétique et la survie des lignées cellulaires issues de la moelle osseuse. Ce facteur de transcription semble essentiel durant l'hématopoïèse précoce, puisqu'il ne participe pas à la maturation des cellules dont la différenciation est déjà amorcée [119, 120]. Ceci suggère que la fonction biologique exercée par ETV6 dépend grandement du type cellulaire. Par ailleurs, une étude suggère qu'ETV6 aurait un rôle pro-apoptotique via l'activation de p53 dans des cellules myéloïdes murines 32Dcl3 [121]. Il a également été démontré que l'expression d'ETV6 peut inhiber la prolifération cellulaire de fibroblastes murins et induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 [122]. Certaines études ont aussi montré que la délétion de l'allèle normal d'*ETV6* peut conférer aux cellules un avantage sélectif [122, 123].

Toutes ces évidences suggèrent qu'ETV6 aurait un rôle de suppresseur de tumeurs. Ce gène est d'ailleurs impliqué dans de nombreux réarrangements associés à plusieurs désordres hématologiques et néoplasies solides, impliquant entre autres des protéines tyrosine kinase comme *ABL1* et *JAK2* [124-126]. Jusqu'à maintenant, plus de 50 réarrangements ont été caractérisés, impliquant environ 30 partenaires de fusion (fig. 6). On croit donc que l'inactivation complète d'ETV6 pourrait contribuer à transformer un clone pré-leucémique en clone leucémique, en raison de son rôle potentiel de suppresseur de tumeurs.

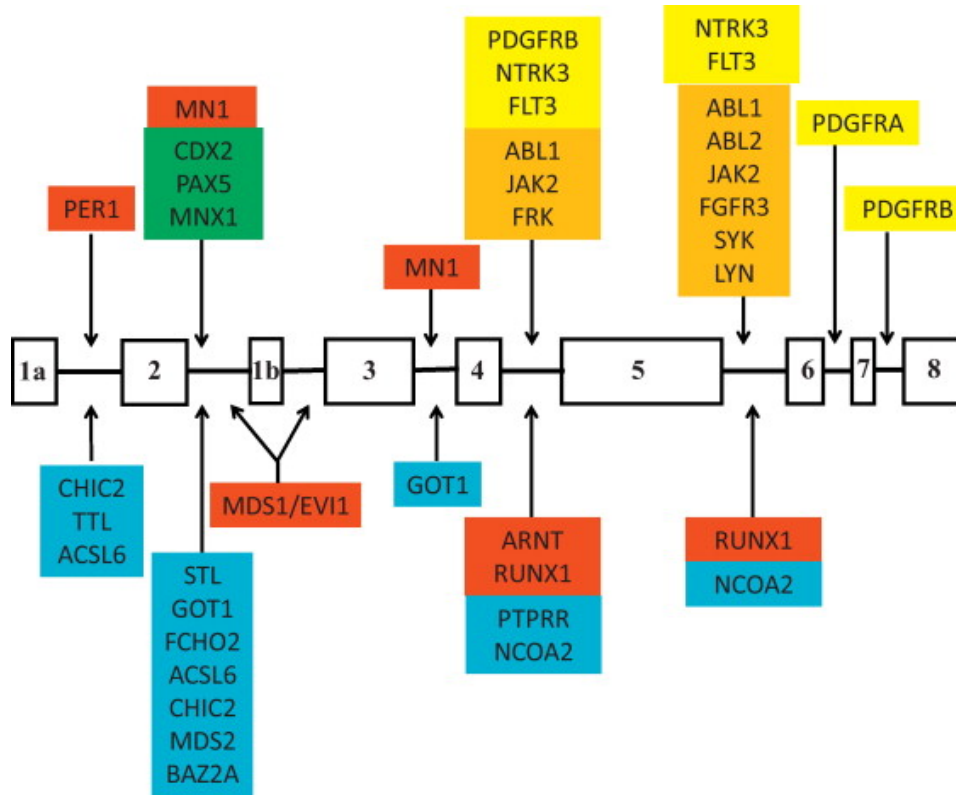


Figure 6. Partenaires de fusion connus du gène *ETV6* et cartographie des points de cassure correspondants. En jaune : gènes codant pour des récepteurs de tyrosine kinase. En orange : gènes codant pour des protéines tyrosine kinase. En rouge : gènes codant pour des facteurs de transcription. En vert : gènes codant pour des protéines homeobox. En bleu : autres catégories de gènes. Tiré de De Braekeleer *et al.* 2012 [127].

Puisque la protéine ETV6 agit comme un régulateur transcriptionnel, elle exerce sa fonction biologique via la modulation de l'expression de ses gènes cibles. Cependant, très peu d'études se sont intéressées à la caractérisation des cibles transcriptionnelles d'ETV6 et leur rôle potentiel dans le développement tumoral.

1.5.4. Cibles transcriptionnelles

CSF1R (*colony stimulating factor 1 receptor*), aussi appelé *MCSFR*, est un gène impliqué dans l'hématopoïèse. Son expression est régulée entre autres par les facteurs de

transcription AML1 et C/EBP α [128]. Il a également été démontré que l'expression du gène *CSF1R* peut être modulée par ETV6 dans des fibroblastes murins NIH 3T3. En effet, des essais de gène rapporteur ont montré que la cotransfection d'ETV6 inhibe l'activation transcriptionnelle d'AML1 et C/EBP α sur le promoteur basal de *CSF1R* [129]. Une expérience similaire dans des cellules HEK293T a démontré qu'ETV6 peut inhiber l'effet activateur de FLI-1 sur le promoteur de *GPIIb α* et *GPIX*, deux gènes impliqués dans l'adhésion plaquettaire [100]. ETV6 peut donc moduler les gènes *CSF1R*, *GPIIb α* et *GPIX*, mais cette régulation est indirecte puisqu'ETV6 seul n'a aucun effet sur l'expression de ces gènes dans le type cellulaire étudié [100, 129].

Fenrick *et al.* ont montré que l'activité transcriptionnelle du gène *MMP-3* (*métalloprotéase-3*, aussi appelé *stromelysine-1*) est réprimée par ETV6 dans des cellules NIH 3T3 [123]. Cette régulation nécessite la présence du domaine de liaison à l'ADN d'ETV6 et de deux sites EBS consensus, suggérant une interaction directe entre ETV6 et le promoteur de *MMP-3*. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée par des expériences de retard sur gel.

La même équipe de recherche a montré que le gène anti-apoptotique *BCL-X_L* est aussi une cible transcriptionnelle d'ETV6 [130]. Ceci a été confirmé par des essais de gène rapporteur et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). De plus, l'interaction semble être directe puisque le domaine ETS est essentiel à la répression. On démontre également dans cet article que la surexpression d'ETV6 induit l'apoptose des cellules NIH 3T3 et cet effet serait dû en partie à la répression endogène de *BCL-X_L* par ETV6. Cette étude est d'ailleurs la première à proposer l'implication d'ETV6 dans la mort cellulaire.

Récemment, la présence du facteur de transcription ETV6 a été détectée au niveau d'une séquence STR (*Short Tandem Repeat*) appelée *READ1* [131]. Cette région répétée hautement polymorphique est située dans une région intronique du gène *DCDC2*, qui semble

jouer un rôle dans la dyslexie et les troubles de langage. La méthode SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) couplée à la spectrométrie de masse, de même que des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis de mettre en évidence la présence d'ETV6 sur la région STR *READ1* dans des cellules Raji (lignée cellulaire dérivée d'un lymphome de Burkitt) et HeLa. Toutefois, aucune expérience dans cette étude ne démontre qu'ETV6 peut réguler l'expression du gène étudié.

Il est à noter que toutes les cibles transcriptionnelles énumérées ci-dessus n'ont jamais été reproduites au sein de notre laboratoire. En effet, nous n'avons jamais pu confirmer la liaison physique d'ETV6 au niveau du promoteur de ces gènes, ni l'effet de régulation d'ETV6 sur leur niveau d'expression, et ce, dans différentes lignées cellulaires. Ceci suggère donc que les gènes cibles d'ETV6 caractérisés dans la littérature pourraient dépendre grandement du contexte et du type cellulaire, d'où l'importance d'utiliser un modèle cellulaire le plus près possible du compartiment d'intérêt.

1.6. Étude de la régulation génique

Depuis quelques années, la technologie de séquençage de nouvelle génération (SNG) a révolutionné la génomique, l'épigénomique et la transcriptomique. En effet, cette approche globale permet d'interroger le génome et son réseau de régulation de façon rapide et non-biaisée. La baisse des coûts liés à l'utilisation du séquençage a également rendu cette technologie plus accessible.

Une diversité d'applications dérivées du SNG ont été développées afin de disséquer les mécanismes moléculaires régulant la transcription [132]. Entre autres, l'immunoprécipitation de la chromatine couplée au séquençage à haut débit (ChIP-Seq) est une méthode

permettant de caractériser les interactions ADN-protéines à l'échelle du génome. Les études d'expression sont également facilitées par le séquençage du transcriptome (RNA-Seq), qui permet de quantifier et caractériser tous les transcrits d'une cellule.

1.6.1. RNA-Seq

La méthode de RNA-Seq utilise la technologie de séquençage de nouvelle génération pour mesurer précisément la quantité de chaque molécule d'ARN présente dans la cellule à un moment précis. Cette technique permet ainsi d'obtenir un portrait complet du transcriptome d'une cellule dans une condition donnée. Cette méthode succède aux micropuces, qui ont été largement utilisées depuis leur arrivée dans les années 90. Le RNA-Seq permet non seulement de mettre en évidence le niveau d'expression de gènes connus, mais également de découvrir de nouveaux transcrits et isoformes, comparativement aux micropuces qui ne contiennent que des sondes connues. Cet outil non-biaisé permet d'ailleurs de détecter des altérations génétiques comme des fusions, des SNV et des mutations de type *indel*. De plus, il a été démontré que le RNA-seq a une meilleure sensibilité puisqu'il est plus efficace pour détecter des transcrits peu abondants. Malgré le coût plus élevé du RNA-Seq, cette méthode présente de nombreux avantages comparativement aux micropuces et elle est à ce jour la technique la plus puissante pour interroger le transcriptome d'une cellule (revu dans [133]).

1.6.2. ChIP-Seq

La combinaison de ChIP et d'hybridation sur puce (ChIP-on-chip) a été largement utilisée dans les dernières années pour déterminer les sites de fixation d'une protéine sur l'ADN. Toutefois, de récents progrès dans le séquençage à haut-débit a permis la caractérisation d'interactions ADN-protéines à l'échelle du génome en combinant le ChIP et le séquençage

de nouvelle génération (ChIP-Seq). Le ChIP-Seq est une technique *in vivo* non-biaisée et très puissante pour enrichir spécifiquement les régions occupées entre autres par des facteurs de transcription ou des histones. Cette méthode a également une meilleure résolution, moins d'artéfacts et une meilleure couverture que le ChIP-on-chip, ce qui permet d'obtenir des résultats plus précis et plus fiables (revu dans [134]). L'utilisation de cellules primaires est également simplifiée par le ChIP-Seq puisque cette méthode nécessite moins de matériel de départ (10-50 ng d'ADN) comparativement au ChIP-on-chip (200-250 ng d'ADN).

1.7. Hypothèse de recherche

La présence de la translocation t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1 est un évènement commun chez les enfants atteints de la leucémie aiguë lymphoblastique de type pré-B, mais celle-ci n'est pas suffisante pour enclencher par elle-même la leucémogénèse (*section 1.3.1*). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la délétion de l'allèle résiduel d'*ETV6* est observée dans environ 75% des cas de LAL pré-B ayant la translocation t(12;21) (*section 1.4*). Chez la majorité des patients, le facteur de transcription ETV6 est donc complètement inactivé. La perte de l'allèle non-transloqué d'*ETV6* serait un évènement clé dans l'initiation de la leucémogénèse. En effet, nous croyons que la perturbation du réseau de régulation d'*ETV6* influencerait la transformation oncogénique, puisque ce facteur de transcription semble avoir une fonction de suppresseur de tumeurs.

L'hypothèse de mon mémoire de maîtrise est que l'inactivation du facteur de transcription ETV6 constitue un évènement initiateur dans la LAL pré-B t(12;21)+ via la dérégulation de l'expression de ses cibles transcriptionnelles.

1.8. But principal du projet

Puisque très peu de cibles transcriptionnelles d'*ETV6* ont été caractérisées à ce jour (*section 1.5.4*), le but principal de ce projet est d'établir le réseau de régulation transcriptionnelle d'*ETV6* afin de comprendre le rôle physiologique de la protéine et ainsi prédire son implication dans le développement de la LAL pré-B chez l'enfant.

1.9. Objectifs spécifiques du projet

Pour confirmer l'hypothèse de recherche et répondre au but principal, il faudra répondre à trois objectifs spécifiques :

1. Moduler le niveau d'expression d'ETV6 et identifier les gènes dont l'expression est co-régulée avec celle d'ETV6.
2. Mettre en place un protocole robuste d'immunoprécipitation de la chromatine.
3. Caractériser les régions génomiques liées physiquement par le facteur de transcription ETV6.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Culture de lignée cellulaire

La lignée cellulaire Reh (cellules pré-B leucémiques t(12;21)+) a été cultivée dans du milieu RPMI (Wisent) supplémenté avec 10% de sérum foetal bovin (FBS) (Wisent).

2.2. Purification de cellules souches hématopoïétiques CD34+ à partir de sang de cordon

Les échantillons de sang de cordon ombilical ont été fournis par différents hôpitaux de Montréal en collaboration avec Héma-Québec et la banque de sang de cordon du CHU Sainte-Justine. Ceux-ci sont prélevés à la naissance de nouveau-nés en bonne santé. Cette étude a été approuvée par le Comité Institutionnel d'Éthique et toutes les participantes ont donné leur consentement.

Les leucocytes ont été isolés à partir du sang de cordon par centrifugation sur un gradient de densité Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare). Les cellules CD34+ ont ensuite été purifiées à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps α -CD34 (Miltenyi Biotec). La pureté a été déterminée par cytométrie en flux en marquant les cellules purifiées avec un anticorps couplé à un fluorophore α -CD34-PE ou un anticorps isotypique IgG-PE (BD Biosciences). Les cellules marquées ont été analysées par cytométrie en flux sur un appareil BD LSRFortessa™ avec le logiciel BD FACSDiva™. Le rendement est d'environ 1 million de cellules CD34+ par sang de cordon, avec une pureté d'environ 99%. Les cellules isolées ont été cultivées dans du milieu Stemspan SFEM (Stemcell Technologies) supplémenté avec les cytokines suivantes : 100 ng/mL TPO (thrombopoïétine), 100 ng/mL SCF (stem cell factor), 100 ng/mL Flt3-Ligand (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) et 100 ng/mL IL-6 (interleukine-6) (PeproTech).

2.3. Modulation de l'expression d'ETV6 dans les cellules CD34+

Différentes méthodes de transfert d'ADN et différentes constructions ont été testées pour moduler l'expression d'ETV6 dans les cellules CD34+. De toutes les méthodes utilisées, la transduction lentivirale était la méthode la plus robuste entre nos mains. Les constructions lentivirales pCCL.hPGK-ETV6-HA et pLKO.1.puro.shRNA-ETV6 ont été utilisées pour moduler l'expression d'ETV6. Toutes les autres constructions testées sont représentées à l'annexe A.

2.3.1. Constructions

Le vecteur d'expression lentiviral pCCL.hPGK-ETV6-HA a été construit en remplaçant la séquence de la GFP par l'ADN codant pour la protéine de fusion ETV6-HA dans le vecteur pCCL.hPGK-GFP (obtenu du laboratoire du Dr. Christian Beauséjour au CHU Sainte-Justine). Le sous-clonage a été fait à l'aide d'une digestion avec des enzymes de restriction.

Le vecteur pLKO.1.puro.shRNA-ETV6 a été acheté de la compagnie OpenBiosystems (TRCN0000003856). Le shRNA cible la région codante d'*ETV6* et la séquence de l'ARN interférent exprimée par le vecteur est la suivante : CCATAAGAACAGAACAAACAT. Un schéma des vecteurs lentiviraux est présenté à la figure 7.

2.3.2. Production de lentivirus

Des lentivirus ont été produits en transfectant les plasmides d'empaquetage de 3e génération (6 µg pRSV-Rev, 7,8 µg pMD2.VSVG et 15 µg pMDL) (fig. 8) et le plasmide d'intérêt (9 µg pCCL.hPGK-ETV6-HA ou pLKO.1.puro.shRNA-ETV6) dans un pétri 15 cm de cellules 293T (à 70-80% confluence). La transfection a été faite à l'aide de polyéthylèneimine (PEI, Sigma)

comme agent de transfection. Les particules virales libérées dans le surnageant ont été récoltées 48h post-transfection et ont été concentrées par ultracentrifugation. Le titre a été déterminé par ELISA en ciblant l'antigène p24 (Advanced Bioscience Laboratories).

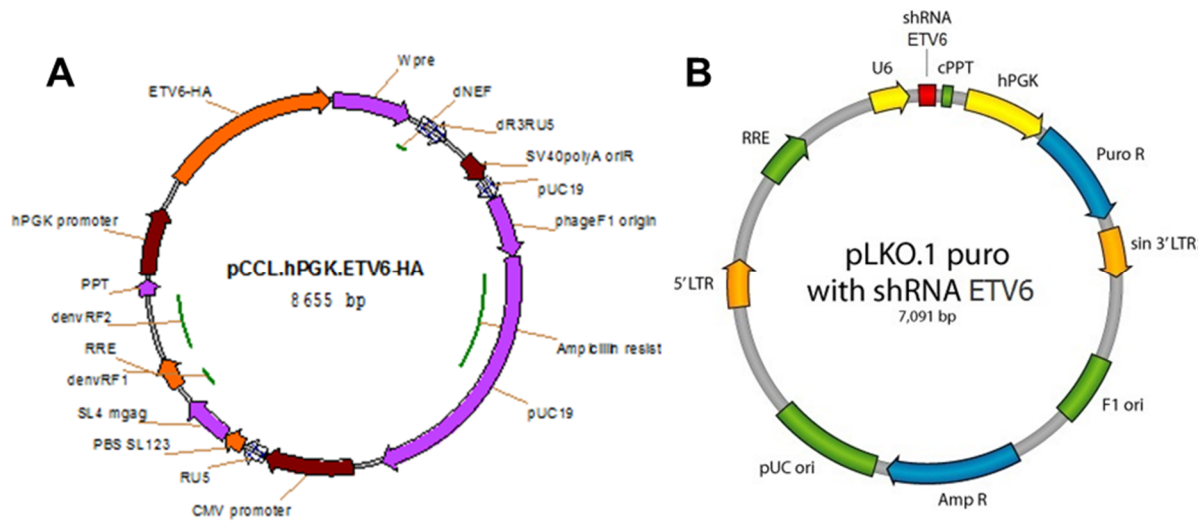


Figure 7. Schéma des vecteurs lentiviraux utilisés pour moduler l'expression d'ETV6. (A) Le vecteur pCCL.hPGK-ETV6-HA permet de surexprimer la protéine ETV6-HA. Le vecteur a été produit en sous-clonant la séquence codant pour ETV6-HA dans le vecteur pCCL.hPGK-GFP. (B) Le vecteur pLKO.1.puro.shRNA-ETV6 permet de réprimer l'expression d'ETV6. Le vecteur a été synthétisé par la compagnie OpenBiosystems.

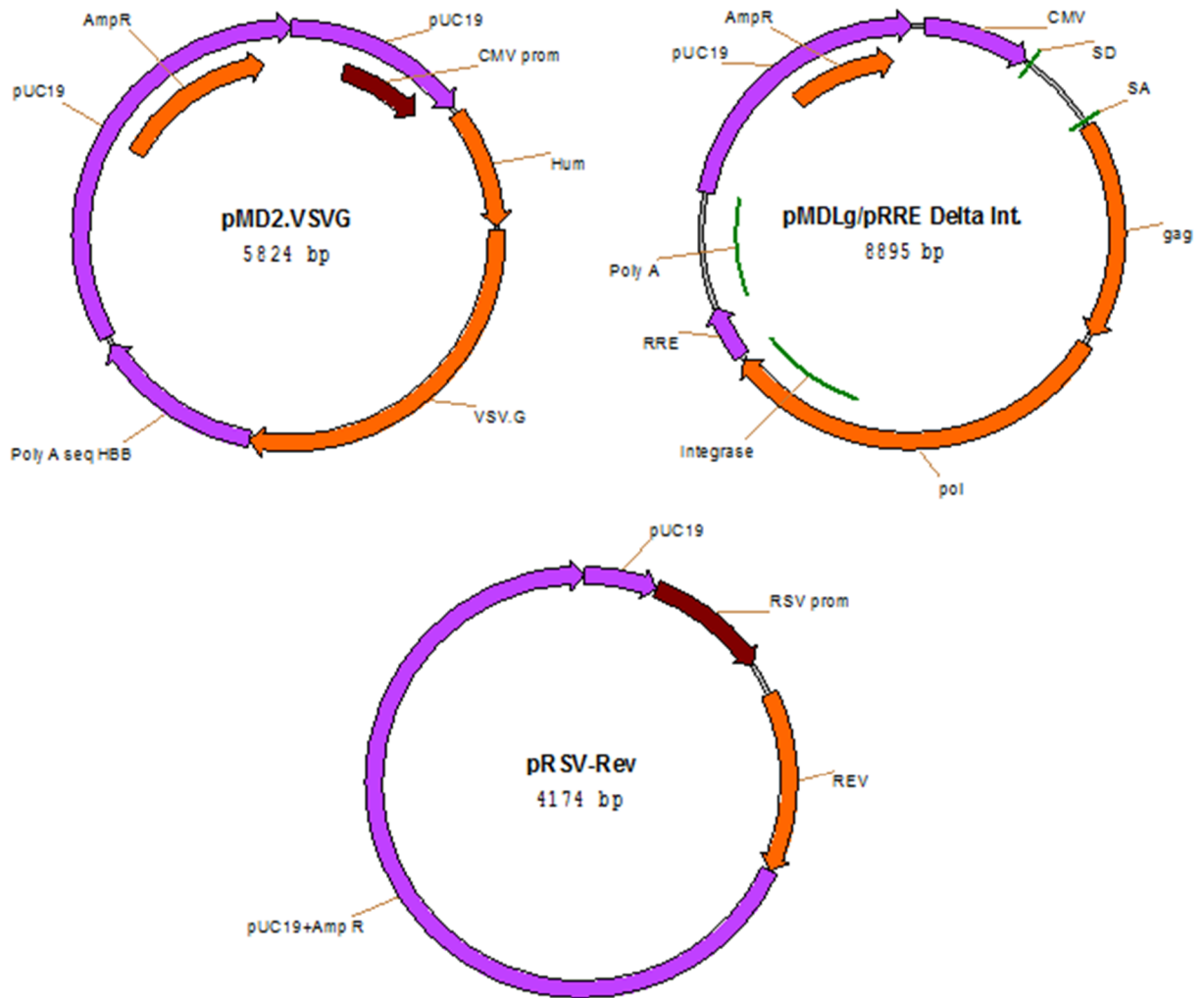


Figure 8. Schéma des plasmides d'empaquetage de 3^e génération utilisés pour produire des lentivirus. Les vecteurs pMD2.VSVG, pMDL et pRSV-Rev ont été obtenus du laboratoire du Dr. Christian Beauséjour.

2.3.3. Transduction lentivirale

Après 24 heures en culture suite à la purification, les cellules CD34+ ont été transduites avec 100 ng (p24) de lentivirus pour 1×10^5 ϕ . Du polybrène (Sigma) a été ajouté à une concentration finale de 8 $\mu\text{g/mL}$ pour augmenter l'efficacité de transduction. 24h après l'infection, le milieu de culture a été changé. Lorsque nécessaire, de la puromycine a été ajouté 48h après l'infection à une concentration de 2 $\mu\text{g/mL}$ pour sélectionner les cellules ayant intégré le vecteur lentiviral. Les cellules ont été récoltées 7 jours après la transduction. Le niveau d'expression d'ETV6 et ETV6-HA a été évalué par PCR en temps réel.

2.3.4. Extraction d'ARN et transcription inverse

L'ARN des cellules transduites a été extrait avec le RNeasy Mini kit (QIAGEN) selon le protocole fourni par la compagnie. Les réactions de transcription inverse ont été réalisées en utilisant 250 ng d'ARN total, 0,5 mM de chaque dNTPs, 250 ng d'oligos (dT)12-18, 10 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 20 U d'inhibiteur de RNase et 100 U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Les réactions ont été incubées à 37°C pendant 50 minutes et inactivées à 70°C pendant 15 minutes. L'ADN complémentaire (ADNc) produit lors de cette réaction a été utilisé comme matériel de départ pour une amplification par PCR en temps réel.

2.3.5. Design des amorces

Les amorces ont été conçues pour amplifier spécifiquement le fragment d'intérêt provenant de l'ADNc et ainsi éviter l'amplification d'ADN génomique résiduel. Pour y arriver, les amorces choisies étaient situées dans deux exons consécutifs, séparés par un intron d'au moins 2 kb. Le choix des amorces reposait sur plusieurs conditions : avoir une longueur

entre 18-23 pb, une température d'hybridation entre 58-62°C, peu de complémentarité interne, peu de tendance à former des structures secondaires et un pourcentage de GC d'environ 50%. Chacune des amorces a également été analysée avec l'outil BLAST afin de confirmer leur spécificité pour la région d'intérêt [135]. Les paires d'amorces ont été conçues de manière à amplifier des fragments d'une longueur totale de 85-120 pb. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau III.

Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour le PCR en temps réel

Gène ciblé	Amorce	Séquence
<i>ETV6</i>	ETV6.ENDO-F1	TGA ACC ACA TCA TGG TCT CTG
	ETV6.ENDO-R1	CGT AAT CCC AAA GCA GTC TAC A
<i>ETV6-HA</i>	ETV6-HA RT 1F	TGA GTG GCC GAA CAG ACC
	ETV6-HA RT 1R	TCG TAT GGG TAT AAG CAT TCA TC
<i>GAPDH</i>	GAPDH-RT-F1	GAT CAT CAG CAA TGC CTC
	GAPDH-RT-R1	TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA
<i>MMP-9</i>	MMP9_RT_F1	GAG GTG GAC CGG ATG TTC C
	MMP9_RT_R1	AAC TCA CGC GCC AGT AGA AG
<i>SLCO2B1</i>	SLCO2B1_RT_F1	GCC TGT CTC ACC CAC ACA C
	SLCO2B1_RT_R1	TCA GGA ACA TGA ACT GGA TGC
<i>CTSL</i>	CTSL_RT_F1	CTG GTG AAG AAC AGC TGG G
	CTSL_RT_R1	GGC AAT TCC ACA ATG GTT TC
<i>LGMN</i>	LGMN_RT_F1	GCA CAG CTG CTA CCC AGA G
	LGMN_RT_R1	CTC ACA AAG GTT GAC CAG CA
<i>C1QA</i>	C1QA_RT_F1	AGC ACC AGA CGG GAA GAA AG
	C1QA_RT_R1	TAA GGC CTT GGA TGC CTG T
<i>C1QB</i>	C1QB_RT_F1	GAT AAA AGG AGA GAA AGG GCT TC
	C1QB_RT_R1	GCC GAC TTT TCC TGG ATT C
<i>C1QC</i>	C1QC_RT_F1	AAG GAT GGG TAC GAC GGA CT
	C1QC_RT_R1	GTA AGC CGG GTT CTC CCT TC

2.3.6. PCR en temps réel

L'amplification PCR des ADNc a été réalisée sur un appareil ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) dans un volume total de 25 µL contenant 0,5 µL d'ADNc, 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) et 0,2 µM de chaque amorce. Le programme PCR est le suivant : 1X 50°C/2 min, 1X 95°C/10min, 40X 95°C/15 sec, 60°C/1 min. Une courbe de dissociation a été générée à chaque expérience afin de contrôler la présence d'amplicons non-spécifiques. Les valeurs d'expression des gènes ont été normalisées par rapport à l'expression du gène de référence *GAPDH*. La méthode comparative de Livak *et al.* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) a été utilisée pour calculer l'expression relative des gènes d'intérêt [136]. Chaque réaction PCR a été faite en duplicata.

2.4. RNA-Seq

2.4.1. Extraction d'ARN

L'ARN total a été extrait à partir de 1×10^6 de cellules CD34+ à l'aide du kit RNeasy Mini (QIAGEN), selon les instructions du fabricant. L'ARN extrait a ensuite été traité avec la TURBO™ DNase (Ambion) pour enlever toute trace d'ADN résiduelle. La concentration et la qualité de l'ARN ont été déterminées à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) en utilisant des puces RNA 6000 Nano (Agilent Technologies). La qualité d'un échantillon d'ARN est déterminée par le *RNA Integrity Number* (RIN), pouvant varier de 1 à 10 (1 étant très dégradé et 10 étant parfaitement intact). En général, on considère que le RIN des échantillons d'ARN doit être supérieur à 7 pour s'assurer de ne pas compromettre les étapes subséquentes.

2.4.2. Préparation des librairies pour le séquençage du transcriptome

Pour la préparation des librairies, 1 ug d'ARN total a été utilisé. Les librairies ont été générées avec le kit TruSeq® Stranded Total RNA Ribo-Zero (Illumina) en suivant le protocole LS (Low Sample) fourni par le manufacturier. La séquence de l'adaptateur utilisé pour le séquençage (Illumina TruSeq Adapter) est la suivante : GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACXXXXXXATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG, où les X correspondent à la position des codes-barres, uniques à chaque échantillon. Finalement, la concentration et la distribution de la taille des fragments des librairies ont été déterminées à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) en utilisant des puces DNA 1000 (Agilent Technologies).

2.4.3. Séquençage des échantillons d'ARN

Les échantillons ont été séquencés sur un appareil HiSeq 2500 (Illumina) en mode haut débit. Deux échantillons ont été déposés par ligne (*lane*) en visant l'obtention d'environ 80 millions de lectures (*reads*) par transcriptome séquencé.

2.4.4. Contrôle de qualité et analyse des données de RNA-Seq

La qualité des données a été déterminée avec l'outil FastQC [137]. Les séquences ont été alignées sur le génome de référence de l'humain (GrCh37) avec le logiciel d'alignement STAR v2.3.0 en utilisant les options par défaut [138]. Le nombre de fragments alignés dans chacun des gènes annotés a été obtenu avec le logiciel HTseq v0.5.3p3 en utilisant l'option «-stranded=no» [139]. Seuls les gènes ayant une valeur de CPM supérieure à 1 dans au moins une condition ont été considérés pour les analyses subséquentes. L'analyse d'expression différentielle a été réalisée à l'aide du logiciel edgeR en utilisant un coefficient

de variation biologique (BCV) de 0,1 (coefficient typiquement utilisé pour les organismes génétiquement identiques lorsque l'expérience n'inclut pas de répliques biologiques) [140]. La correction pour les tests multiples a été faite selon la méthode Benjamini-Hochberg. Les gènes ayant une valeur de FDR inférieure à 0,1 ont été considérés comme différentiellement exprimés dans l'échantillon traité par rapport au contrôle. La fonction plotSmear du logiciel edgeR a été utilisée pour générer les graphiques de nuages de points.

2.5. Enrichissement de processus biologiques

L'outil informatique DAVID a été utilisé pour déterminer l'enrichissement des termes GO (*Gene ontology*) associés aux processus biologiques dans le sous-groupe de gènes étudiés [141]. Le *background* utilisé correspondait à l'ensemble des gènes exprimés dans les cellules CD34+. Un filtre a été appliqué pour conserver les processus biologiques ayant une p-valeur inférieure à 5,0E-5. Les termes enrichis ont été téléchargés sous forme de catégories non-regroupées (*Functional Annotation Chart*).

2.6. Enrichissement de motifs consensus de liaison

Les séquences promotrices des gènes étudiés ont été extraites à l'aide de l'outil BioMart de Ensembl en utilisant l'option *Flank (gene) ; upstream : 1000 bp* [142]. L'outil CentriMo de la suite MEME a ensuite été utilisé pour évaluer l'enrichissement du motif consensus de liaison d'ETV6 (fig. 5A) dans les séquences promotrices des 248 gènes identifiés par RNA-Seq [143]. L'option *Any Localization* a été utilisée pour rechercher un enrichissement dans toutes les régions possibles au sein des séquences fournies. L'enrichissement a été déterminé par un test binomial suivi d'un test exact de Fisher comparatif. Les séquences promotrices des gènes dont l'expression n'est pas influencée par ETV6 ont été utilisées comme contrôle négatif. L'analyse a été faite en comparant les 248 gènes cibles potentiels avec 248 gènes

contrôles. Pour s'assurer que les séquences contrôles n'étaient pas biaisées, l'analyse a été refaite 10 fois avec 10 sous-ensembles aléatoires de 248 séquences contrôles. Les séquences contrôles provenaient d'un ensemble de 2500 gènes dont l'expression n'est pas influencée par ETV6 (FDR>0,7 dans P1 et P2).

2.7. ChIP-Seq

2.7.1. Immunoprécipitation de la chromatine

Un schéma représentant le principe d'une immunoprécipitation de la chromatine est présenté à la figure 9. Tout d'abord, pour fixer les interactions ADN-protéines, du formaldéhyde 16% sans méthanol a été ajouté à 5×10^6 de cellules CD34+ ETV6-HA resuspendues dans du PBS 1X (concentration finale 1% formaldéhyde) et incubé à température pièce pendant 7 minutes. Il est à noter qu'étant très réactif, le formaldéhyde est habituellement en solution avec du méthanol pour stabiliser la molécule. Toutefois, il a été démontré que le méthanol affaiblit les membranes cellulaires et accentue l'effet du formaldéhyde, ce qui provoque une fixation trop intense. Nous avons donc utilisé du formaldéhyde sans méthanol pour une fixation plus douce. Puisque cette solution est beaucoup moins stable à long terme, elle est conservée dans des ampoules en verre à usage unique pour éviter son oxydation causée par le contact avec l'air ambiant.

De la glycine a été ajoutée à une concentration finale de 0,125 nM pour stopper la réaction de fixation. Après 5 minutes d'incubation à température pièce, les cellules ont été lavées, congelées à l'azote liquide par «flash freeze» et conservées à -80°C.

Les cellules et leur noyau ont ensuite été lysés et l'ADN des cellules a été fragmenté par sonication à l'aide du Covaris S2 pour générer des fragments de 100-400 pb (paramètres

utilisés : *duty cycle* 10%, intensité 3, 4 min). Une aliquote représentant 10% de l'échantillon a été prélevé comme *input*. L'immunoprécipitation a été faite avec 50 uL de billes magnétiques pré-couplées à un anticorps anti-HA (Roche) pendant 4 heures. Les complexes billes-protéines-ADN ont ensuite été lavés avec une solution douce (0,5% NP40, 150 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA). Les complexes protéines-ADN ont été élués des billes magnétiques par compétition à l'aide d'une solution contenant 2 mg/mL de peptide HA (Thermo Fischer Scientific Inc.) pendant 10 minutes à 37°C avec rotation. L'éluat a ensuite été incubé à 65°C O/N dans un tampon contenant 0,4M NaCl pour dissocier les fragments d'ADN des protéines. L'ARN et les protéines ont été digérés à l'aide de RNase A et de protéinase K (Invitrogen) afin d'éliminer toutes traces résiduelles. L'ADN immunoprécipité a ensuite été purifié par extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique (ratio 25:24:1) (Sigma) à l'aide de colonnes MaXtract High Density (QIAGEN). Finalement, les billes Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) ont été utilisées pour éliminer les fragments <100 pb et >400 pb. Les échantillons d'ADN immunoprécipité ont été expédiés à la plateforme de séquençage du Centre d'innovation Génome Québec de l'Université McGill pour procéder à la préparation des bibliothèques et au séquençage.

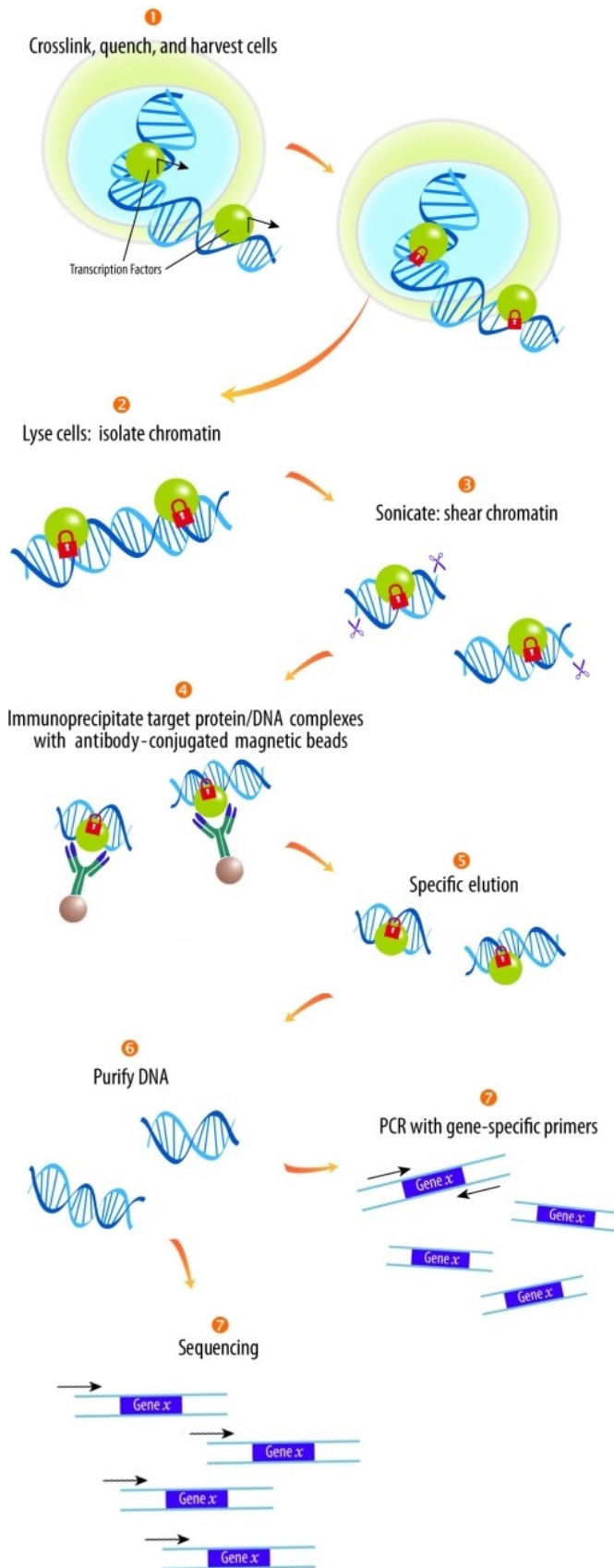


Figure 9. Schéma d'une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine.

Les cellules sont d'abord fixées afin d'immobiliser les interactions ADN-protéines (1). Les cellules sont lysées (2) et l'ADN est fragmenté par sonication (3). Les complexes ADN-protéines sont ensuite capturés par immunoprécipitation (4) et élués de façon spécifique (5). L'ADN est finalement purifié (6) et peut être amplifié par qPCR ou séquencé (7). Les étapes de fixation (1), de sonication (3) et d'éluion (5) ont été mises au point dans la section 3.3.1.

2.7.2. Préparation des bibliothèques pour ChIP-Seq

La concentration, la pureté et la distribution de la taille des fragments d'ADN ont été déterminées à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) en utilisant des puces High Sensitivity DNA (Agilent Technologies). Les bibliothèques ont été générées de façon robotisée à partir de 10 ng d'ADN fragmenté. Pour ce faire, le kit de préparation de bibliothèques Kapa HTP (Kapa Biosystems) a été utilisé selon les instructions du fabricant, à l'exception des adaptateurs et des amorces PCR qui ont été dilués 100 fois et des étapes de sélection de taille et d'amplification PCR qui ont été inversées. Également, lors de l'amplification PCR, 6 cycles supplémentaires ont été faits. Les adaptateurs et les amorces PCR ont été synthétisés par Integrated DNA Technologies et la purification selon la taille a été réalisée à l'aide de l'appareil Pippin Prep (SAGE Biosciences Inc). Les séquences des adaptateurs sont présentées dans le tableau IV. Les bibliothèques ont finalement été quantifiées avec le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (Life Technologies) et avec l'appareil KAPA Illumina Genome Analyzer en utilisant le kit Revised Primers-SYBR Fast Universal (D-Mark). La taille moyenne des fragments d'ADN a été déterminée avec l'appareil LabChip® GX (PerkinElmer).

Tableau IV. Séquences des adaptateurs pour la préparation des bibliothèques de ChIP

Adaptateur	Séquence
Illumina TruSeq DNA Read 1	AGA TCG GAA GAG CAC ACG TCT GAA CTC CAG TCA
Illumina TruSeq DNA Read 2	AGA TCG GAA GAG CGT CGT GTA GGG AAA GAG TGT

2.7.3. Séquençage des échantillons de ChIP

Les bibliothèques ont été chargées sur une *flow cell* en utilisant l'appareil automatisé cBot (Illumina). Chaque ligne (*lane*) a été chargée avec un mélange de quatre bibliothèques différentes.

Le séquençage en mode SR100 (*Single read* 100 bases) a été fait sur un appareil Illumina HiSeq 2000 en utilisant le kit Illumina TruSeq SBS v3, selon les instructions du manufacturier.

2.7.4. Analyse des données de ChIP-Seq

Suite au séquençage, les données ont été analysées en collaboration avec le Dr. Arnaud Droit (Centre de recherche de l'Université Laval à Québec). L'outil SAMStat a d'abord été utilisé pour évaluer la qualité des données de séquençage [144]. Les régions enrichies ont été déterminées avec l'outil MACS en utilisant les paramètres par défaut [145].

2.8. ChIP-qPCR

2.8.1. Immunoprécipitation de la chromatine

Le même protocole qu'à la section 2.7.1 a été réalisé en utilisant un anticorps ciblant RNAPolIII (mouse monoclonal anti-RNAPolIII clone 4H8, Active motif), H3K4me3 (rabbit polyclonal anti-H3K4me3 ab8580, Abcam) ou H3K27me3 (rabbit polyclonal anti-H3K27me3 CS200603, Millipore). Les anticorps ont été couplés à des billes de protéine A et G (ratio 1 :1) pendant 24h avant de procéder à l'immunoprécipitation.

2.8.2. Design des amorces

Les amorces ont été conçues pour amplifier spécifiquement un fragment de 90-130 pb provenant de la région promotrice des gènes étudiés. Dans le cas des gènes potentiellement liés par le facteur de transcription ETV6, les amorces ont été choisies de manière à amplifier la région la plus susceptible d'être liée par ETV6. Pour y arriver, l'algorithme FIMO a été utilisé pour mettre en évidence la présence de motifs consensus de liaison d'ETV6 dans les

promoteurs proximaux (1000 pb) des gènes étudiés [146]. Dans le cas où aucun motif n'était présent, les amorces ont été conçues pour amplifier un fragment situé aléatoirement dans le promoteur proximal de 1000 pb du gène. Les mêmes critères que ceux présentés à la section 2.3.5 ont été utilisés pour concevoir les amorces. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau V.

Tableau V. Séquences des amorces utilisées pour le PCR en temps réel (ChIP)

Promoteur ciblé	Amorce	Séquence
<i>GAPDH</i>	GAPDH-CHIP-F	TAC TAG CGG TTT TAC GGG CG
	GAPDH-CHIP-R	TCG AAC AGG AGG AGC AGA GAG CGA
<i>MYT1</i>	CHIP_MYT1_F	GAA GGT TTG GGG TGT AAG ACA TC
	CHIP_MYT1_R	ATT CAG CTG AGA GCA CTC CTG
<i>MMP-9</i>	MMP9_ChIP_F1	AGA TTC AGC CTG CGG AAG AC
	MMP9_ChIP_R1	CTC CCT GAC AGC CTT CTT TG
<i>SLCO2B1</i>	SLCO2B1_ChIP_F1	TTG CCT AGA TGG CTG AAA TTG
	SLCO2B1_ChIP_R1	AAG AAG GGG CTC TGT CCA CTA
<i>CTSL</i>	CTSL_ChIP_F1	GAG ACG CCC GAC CCT ACT C
	CTSL_ChIP_R1	GGT TCG TGG CTT GTT TAC TGA
<i>LGMN</i>	LGMN_ChIP_F1	TTC CTA AGT GGC TCC AAT GTG
	LGMN_ChIP_R1	ACT GAA GTG AGG TGG GGA ATC
<i>C1QA</i>	C1QA_ChIP_F2	AAT GTC CCA GTC TTG CTG AAG
	C1QA_ChIP_R2	CTG TGG CCA AGT TTC ACA TC
<i>C1QB</i>	C1QB_ChIP_F1	GAA GAG ATG AGC CCA GAA AGG
	C1QB_ChIP_R1	CAC TGG GAG GAT AAT GGA GGA
<i>C1QC</i>	C1QC_ChIP_F1	TAC ATC CTC CTG AGC CTG TTT C
	C1QC_ChIP_R1	CAG AGT CAG GTT CAT CCC ATC
Neg*	NegChip-F	ATG GTT GCC ACT GGG GAT CT
	NegChip-R	TGC CAA AGC CTA GGG GAA GA

* Amplifie une jonction exon-intron du gène NCAPD2 (ctrl négatif)

2.8.3. PCR en temps réel

L'amplification PCR a été réalisée de la même façon qu'à la section 2.3.6, à l'exception du matériel de départ qui n'est pas composé d'ADNc mais plutôt d'ADN génomique immunoprécipité (ou *input*). Dans le cas d'une expérience de ChIP-qPCR, la méthode de «pourcentage d'input» a été utilisée pour calculer l'enrichissement d'un gène après immunoprécipitation par rapport à une région non-liée par la protéine étudiée. Cette méthode permet de calculer le rapport entre le signal obtenu pour un gène à partir de l'ADN immunoprécipité et le signal obtenu pour le même gène dans l'échantillon *input*. L'échantillon *input* est constitué d'une fraction de la chromatine utilisée pour l'expérience d'immunoprécipitation. Un exemple de calcul est présenté ci-dessous.

Étape 1. Ajustement de l'input à 100%

Gène	Signal	Ct brut	Ct brut - $\log_2(\text{facteur de dilution})$	Ct corrigé
Gène d'intérêt	Input (dilué 10X)	22,9	$22,9 - \log_2(10)$	19,6
Contrôle négatif	Input (dilué 10X)	23,8	$23,8 - \log_2(10)$	20,5

Étape 2. Calcul du pourcentage d'input

Gène	Signal	Ct moyen	Ct moyen - Input corrigé	$2^{-(\text{Ct moyen} - \text{Input corrigé})} \times 100\%$
Gène d'intérêt	Après IP	30,2	$30,2 - 19,6$	0,06%
Contrôle négatif	Après IP	32,3	$32,3 - 20,5$	0,03%

2.9. Immunobuvardage de type Western

Les échantillons ont été dilués dans un tampon de charge Laemmli 1X (63 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 100 mM DTT, 0,0025% bleu de bromophénol) et ont été dénaturés à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons ont ensuite été migrés sur un gel de polyacrylamide (37.5 :1) de 12% SDS et transférés sur une membrane de PVDF pendant 16h

à 4°C. Les membranes ont été incubées pendant 1h à température pièce dans une solution de blocage (5% lait écrémé, 0,05% Tween-20, dilués dans du TBS), suivie d'une hybridation de 1h à température pièce avec l'anticorps primaire (mouse monoclonal anti-ETV6, Abcam, ab54705) dilué 1000 fois dans le tampon de blocage. L'hybridation avec le deuxième anticorps couplé à la HRP (rabbit anti-mouse IgG-HRP sc-358914, dilué 5000 fois dans le tampon de blocage) a été faite pendant 1h à température pièce. Les protéines ont été détectées avec le système Western Lightning® Plus-ECL (PerkinElmer), selon les instructions du fabricant.

2.10. Essais de gène rapporteur

Des cellules HeLa ont été resuspendues dans du milieu DMEM + 10% FBS à une concentration finale de 5×10^5 ϕ /mL. Les cellules ont été transfectées dans des plaques 96-puits en utilisant le réactif Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent, selon le protocole du fabricant. Les quantités d'ADN transfectées sont décrites dans le tableau VI et les plasmides utilisés sont représentés à l'annexe B. Le vecteur pRL exprimant la Luciférase Renilla a été co-transfecté afin de normaliser pour l'efficacité de transfection. Les cellules transfectées ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 24h. Le milieu de culture a été changé après 24h et les cellules ont été réincubées pour 24h supplémentaires. Les cellules ont été lysées et préparées avec le kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega), selon le protocole fourni par le fabricant. La bioluminescence a été quantifiée avec l'appareil Wallac EnVision™ (Perkin Elmer).

Tableau VI. Quantité d'ADN transfectée pour les essais de gène rapporteur

Vecteur transfecté	Quantité d'ADN transfectée (ng)	
	Surexpression ETV6	Expression endogène ETV6
pcDNA3.1 (vide)	60	100
pcDNA3.1 ETV6	40	-
pGL3b EBS3tk	99,5	99,5
pRL	0,5	0,5

Chapitre 3. Résultats

3.1. Mise en contexte

Pour tenter d'identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles d'ETV6, notre équipe a réalisé en 2007 une étude à grande échelle en combinant des expériences de micropuces à ADN et de PCR quantitatif. Cette étude a permis d'identifier et valider 10 gènes modulés par l'induction de l'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules HeLa [147]. Afin d'évaluer l'importance des gènes candidats dans le développement de la leucémie, leur niveau d'expression a été déterminé dans une cohorte pédiatrique de 15 patients atteints de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) de type pré-B. Cette expérience a révélé que l'expression des gènes *IL-18*, *LUM*, *PTGER4*, *SPHK1* et *TP53* était significativement corrélée avec celle d'*ETV6*, ce qui suggère qu'*ETV6* pourrait réguler le niveau d'expression de ces gènes dans la leucémie.

Récemment, notre équipe s'est penchée plus particulièrement sur la caractérisation de l'interaction entre ETV6 et les gènes *PTGER4* et *SPHK1*, ainsi que sur l'implication potentielle de ces gènes dans la leucémogénèse. Des expériences de gène rapporteur et d'immunoprécipitation de la chromatine ont confirmé *PTGER4* et *SPHK1* comme étant des cibles transcriptionnelles directes d'ETV6. Nous avons également démontré que l'altération de l'expression de ces gènes provoque la perturbation de plusieurs processus cellulaires impliqués dans la tumorigénèse (apoptose, prolifération cellulaire et migration cellulaire). Ceci suggère que l'inactivation d'*ETV6* via la translocation t(12;21) pourrait favoriser l'initiation de la leucémie en dérégulant les gènes *PTGER4* et *SPHK1*. Cette étude sera soumise pour publication en janvier 2015. Le manuscrit est présenté en annexe C.

Puisque les facteurs de transcription régulent généralement l'expression des gènes via leur liaison à l'ADN, le RNA-Seq et de CHIP-Seq sont des méthodes efficaces pour caractériser les mécanismes moléculaires de ces protéines régulatrices. Dans ce projet, nous avons utilisé ces deux approches afin d'identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles d'ETV6, car elles sont plus sensibles et plus puissantes que celles utilisées dans les études antérieures.

3.2. Identification des gènes co-modulés avec l'expression d'ETV6 par RNA-Seq

Le RNA-Seq est une méthode de choix pour mettre en évidence les gènes dont l'expression est co-modulée avec le niveau d'expression du facteur de transcription ETV6. Pour répondre à notre premier objectif, l'expression d'ETV6 a donc été modulée dans des cellules souches hématopoïétiques CD34+ et le RNA-Seq a été utilisé pour caractériser l'impact de ce changement d'expression sur le profil transcriptomique des cellules.

3.2.1. Purification de cellules souches hématopoïétiques CD34+ à partir de sang de cordon

Plusieurs évidences suggèrent que le facteur de transcription ETV6 joue un rôle crucial durant l'hématopoïèse précoce. Par ailleurs, il a été démontré que les interactions moléculaires et la fonction biologique exercées par ETV6 sont très différentes selon le contexte cellulaire. Afin de bien caractériser le rôle du facteur de transcription ETV6, il est donc primordial d'étudier cette protéine dans un compartiment cellulaire pertinent. Ainsi, nous avons utilisé les cellules souches hématopoïétiques CD34+ comme modèle d'étude. Les cellules CD34+ ont été isolées à partir de sang de cordon ombilical, qui est particulièrement riche en cellules souches.

Les cellules CD34+ ont été purifiées à l'aide d'un tri cellulaire immuno-magnétique. La pureté de l'échantillon a été déterminée par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps fluorescent spécifique à la protéine de surface CD34. L'expérience a démontré qu'après la séparation immuno-magnétique, 99,5% des cellules étaient CD34+ (fig. 10).

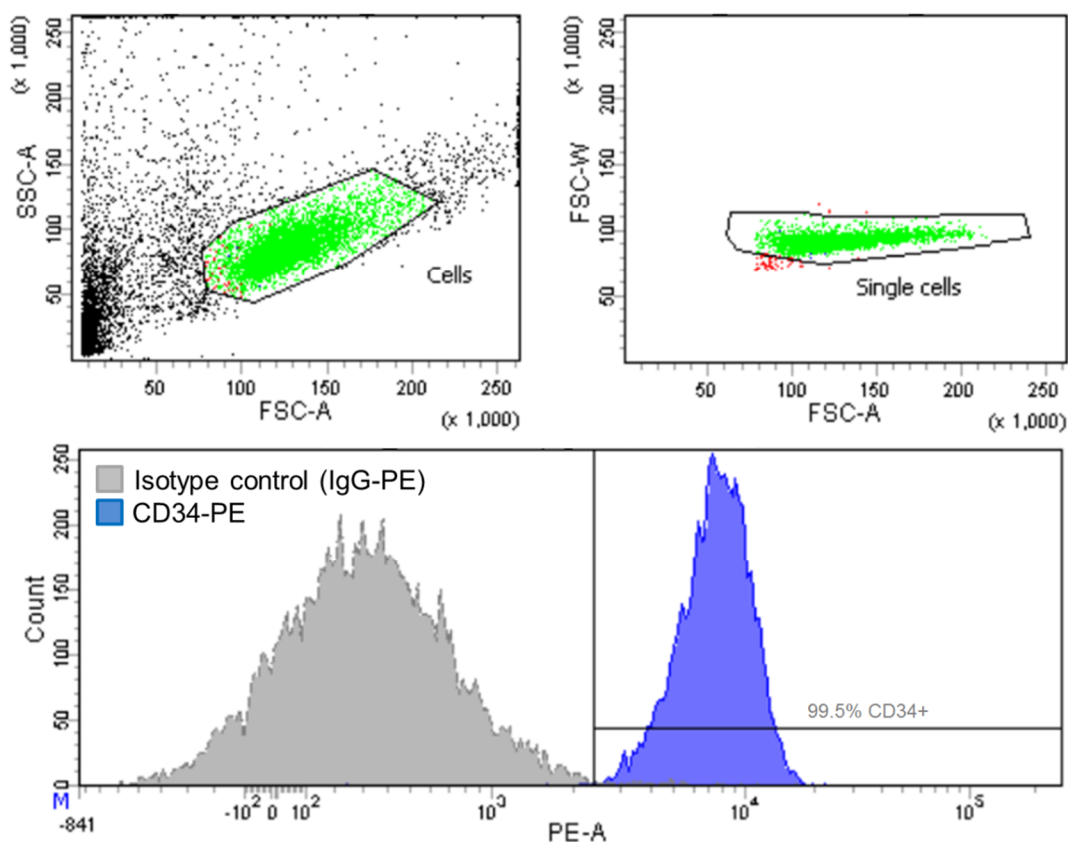


Figure 10. Pureté des cellules CD34+ isolées à partir de sang de cordon ombilical. L'expression du marqueur de surface CD34 a été mesurée par cytométrie en flux. Les débris cellulaires et les doublets de cellules ont été exclus de l'analyse. Gris: autofluorescence des cellules marquées avec un anticorps non-spécifique couplé à la phycoérythrine (IgG-PE); bleu : fluorescence des cellules marquées avec un anticorps anti-CD34 couplé à la phycoérythrine (α -CD34-PE).

3.2.2. Modulation de l'expression d'ETV6 dans les cellules CD34+

Afin d'identifier les transcrits régulés par le facteur de transcription ETV6, son expression a été modulée dans les cellules CD34+. Comparativement aux lignées cellulaires, le transfert d'ADN est souvent peu efficace dans les cellules primaires [148]. Différentes constructions et plusieurs méthodes de transfert d'ADN ont donc été testées afin de surexprimer ou réprimer ETV6 dans les cellules CD34+ (tableaux VII et VIII).

Tableau VII. Efficacité des différentes méthodes et constructions testées pour le transfert d'ADN exogène (surexpression) dans des cellules CD34+

Méthode de transfert d'ADN	Constructions	Efficacité*	Viabilité
Transfection	pcDNA3.1.ETV6-HA	Nulle	Bonne
Nucléofection	pMAX.CMV-ETV6-HA	Nulle	Bonne
Transduction lentivirale	pLenti.CMV-ETV6-HA-hPGK-GFP	Faible	Excellente
	pCCL.hPGK-ETV6-HA-IRES-GFP	Faible	Excellente
	pCCL.hPGK-ETV6	Faible	Excellente
	pCCL.hPGK-ETV6-HA	Bonne	Excellente
	pSMPUW.EF-1 α -ETV6-HA	Nulle	Excellente

*Nulle : 0%, faible : 1-30%, bonne : 31-60%, très bonne : 60-90%, excellente : 90% et +

Tableau VIII. Efficacité des différentes méthodes et constructions testées pour le transfert d'ADN exogène (répression) dans des cellules CD34+

Méthodes de transfert d'ADN	Constructions	Efficacité de la répression*
Nucléofection	siACE-RNAi hETV6-1	0%
	Silencer Select siETV6-1	10%
	Silencer Select siETV6-2	11%
Transduction lentivirale	pLKO.1.GFP.shRNA-ETV6	32%
	pLKO.1.puro.shRNA-ETV6	53%

*Mesurée par PCR en temps réel et normalisée par rapport à l'expression de *GAPDH*

La transduction lentivirale s'est avérée être la méthode la plus efficace et la moins dommageable pour les cellules. Pour réprimer ETV6, la construction lentivirale pLKO.1.puro.shRNA-ETV6 a été utilisée en raison de sa meilleure capacité à diminuer l'expression d'ETV6. Pour surexprimer le gène, nous avons utilisé la construction lentivirale pCCL.hPGK-ETV6-HA, qui exprime la protéine ETV6 couplée à une étiquette HA. Cette construction était plus efficace pour transduire les cellules que sa contrepartie pCCL.hPGK-ETV6, qui exprime la forme sauvage d'ETV6. Par ailleurs, l'utilisation d'une forme étiquetée était nécessaire pour effectuer une expérience de CHIP-Seq (discuté à la section 3.3.3). Des expériences de gène rapporteur ont d'ailleurs démontré que l'ajout d'une étiquette HA à

l'extrémité C-terminale de la protéine ETV6 affecte de façon négligeable sa capacité à réprimer la transcription. En effet, ETV6 et ETV6-HA peuvent réprimer de façon similaire l'expression du gène de la luciférase lorsqu'il est sous le contrôle du promoteur EBS3tk, qui est composé du promoteur minimal de la thymidine kinase précédé de 3 motifs EBS en tandem reconnus par le domaine de liaison à l'ADN d'ETV6 (annexe B).

L'expression d'ETV6 a donc été modulée dans deux populations de cellules CD34+ issues de sang de cordon différents et infectées avec des lentivirus exprimant ETV6-HA (population P1) ou shRNA-ETV6 (population P2). Nous observons une augmentation (14,9 fois) ou une répression (53%) de l'expression d'ETV6 dans les populations P1 et P2, respectivement (fig. 11).

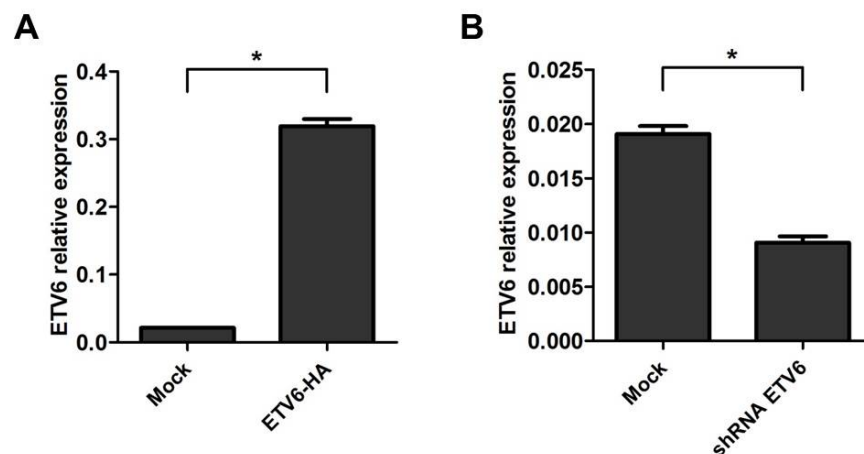


Figure 11. Niveau d'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules CD34+. (A) ETV6 est surexprimé 14,9 fois suite à une transduction de lentivirus exprimant ETV6-HA. (B) L'expression de ETV6 est réprimée de 53% suite à une transduction de lentivirus exprimant shRNA-ETV6. Le niveau d'expression a été déterminé par PCR en temps réel et l'expression de ETV6 a été normalisée par rapport à l'expression du gène de référence *GAPDH* (n=1). Les différences statistiques ont été mesurées avec un test Mann-Whitney bilatéral (* = p<0,05).

3.2.3. Préparation des librairies et séquençage du transcriptome

L'intégrité des échantillons d'ARN extraits des populations P1 et P2 a été évaluée par électrophorèse capillaire à l'aide du Bioanalyzer 2100 et le *RIN* variait entre 7,4 et 10. Les librairies ont été préparées à partir de ces ARN, en prenant soin d'éliminer les ARN ribosomiaux (ARNr). La qualité des librairies (concentration et distribution des fragments) a été déterminée à l'aide du Bioanalyzer 2100. Comme attendu, les librairies étaient composées de fragments de 200-800 pb. Les échantillons ont ensuite été séquencés sur un appareil Illumina HiSeq2500.

Suite au séquençage, nous avons évalué la qualité des données brutes (tableau IX). La moyenne du nombre total de *reads* pour les échantillons testés était de 109 millions. Le pourcentage moyen de *reads* alignés était de 90,78%, ce qui signifie que moins de 10% des *reads* étaient ambigus et n'ont pas été alignés correctement sur le génome de référence. Le séquençage des échantillons a généré un très faible taux d'erreur par base (environ 0,27%). Le séquençage a donc généré des données de bonne qualité pour tous les échantillons.

Tableau IX. Statistiques sur les données de séquençage du transcriptome

Échantillon	Nombre total de reads	Pourcentage de reads uniques alignés	Taux d'erreur par base
P1.CD34+.Mock	117 189 598	91,15%	0,25%
P1.CD34+.ETV6-HA	114 901 480	91,48%	0,28%
P2.CD34+.Mock	106 078 060	89,95%	0,27%
P2.CD34+.shRNA-ETV6	99 113 524	90,52%	0,28%
Moyenne	109 320 666	90,78%	0,27%

3.2.4. Identification des gènes co-modulés avec l'expression d'ETV6

Dans les populations P1 et P2, les gènes différentiellement exprimés par rapport au contrôle ont été identifiés (fig. 12A et 12B). Puisqu'ETV6 est un répresseur transcriptionnel, seuls les gènes réprimés au moins 1,5 fois ($\log_2\text{FoldChange} < -0,585$) ont été considérés dans la population P1 et seuls les gènes surexprimés au moins 1,5 fois ($\log_2\text{FC} > 0,585$) ont été considérés dans la population P2. Les gènes ayant un $\text{FDR} < 0,1$ ont été considérés comme significativement modulés. Au total, 1510 gènes étaient réprimés de façon significative lorsqu'ETV6 était surexprimé (P1) et 1609 gènes étaient surexprimés lorsque l'expression d'ETV6 était diminuée (P2). Parmi ceux-ci, 248 gènes étaient communs entre les deux populations (fig. 12C). L'expression de ces 248 gènes est donc inversement corrélée de façon significative avec l'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules souches hématopoïétiques CD34+. Le tableau X présente les 50 gènes dont l'expression est la plus fortement corrélée avec celle d'ETV6. Une liste exhaustive de tous les gènes co-modulés avec ETV6 est présentée en annexe D.

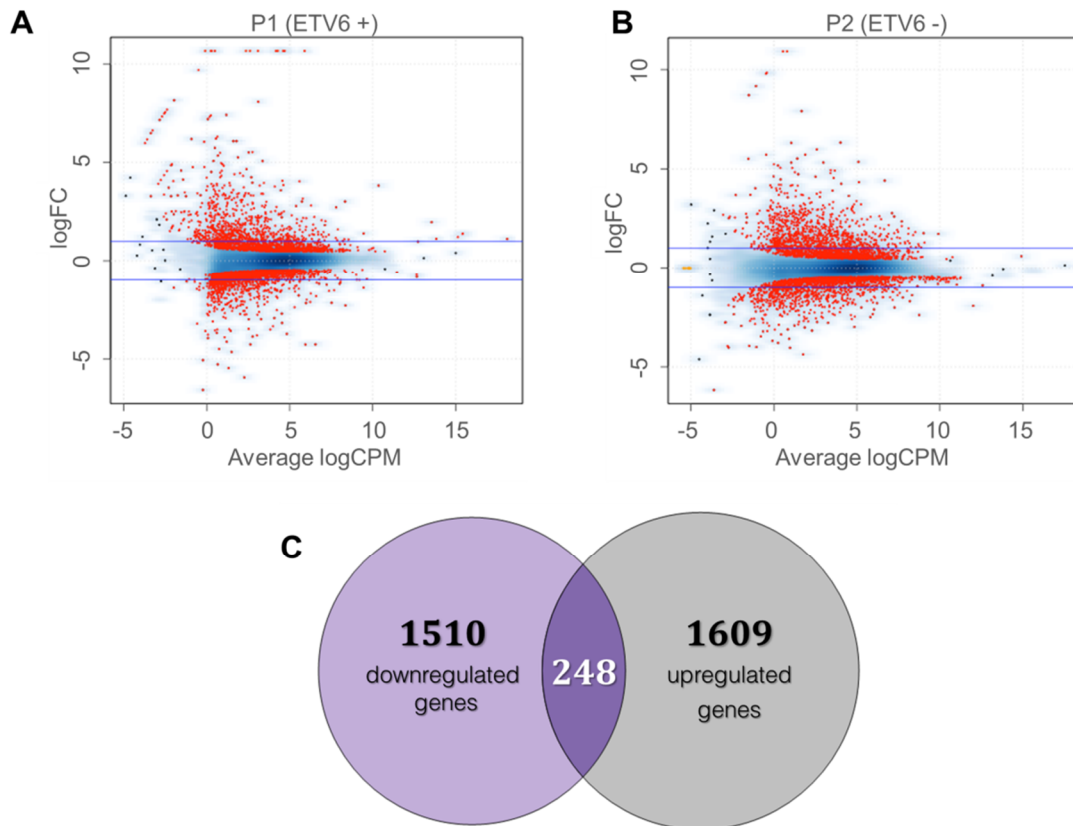


Figure 12. Gènes différentiellement exprimés suite à la modulation de l'expression d'ETV6 dans des cellules CD34+. Représentation en nuage de points de la distribution des gènes différentiellement exprimés lorsque le facteur de transcription ETV6 est surexprimé (A) et réprimé (B) dans des cellules souches hématopoïétiques CD34+. Les gènes dont l'expression est modulée de façon significative ($FDR < 0,1$) sont représentés par des points rouges. Puisque ETV6 est un répresseur transcriptionnel, seuls les gènes ayant un $\log_2FC < 0,585$ (P1) et $\log_2FC > 0,585$ (P2) ont été considérés pour les analyses subséquentes. (C) Diagramme de Venn illustrant le nombre de gènes réprimés au moins 1,5 fois de façon significative ($FDR < 0,1$) dans la population P1 (à gauche), le nombre de gènes surexprimés au moins 1,5 fois de façon significative ($FDR < 0,1$) dans la population P2 (à droite) et le nombre de gènes communs aux deux populations (au centre).

Tableau X. Liste de 50 gènes co-modulés de façon significative avec l'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules CD34+

Numéro Ensembl	Symbole	P1 (ETV6 +)			P2 (ETV6 -)		
		log ₂ FC	p-valeur	FDR	log ₂ FC	p-valeur	FDR
ENSG00000100985	<i>MMP9</i>	-5,937	7,50E-61	5,67E-58	5,984	6,24E-71	1,79E-67
ENSG00000137491	<i>SLCO2B1</i>	-3,819	1,37E-46	5,46E-44	4,252	3,85E-63	5,03E-60
ENSG00000100600	<i>LGMN</i>	-3,517	2,33E-46	9,06E-44	3,206	3,39E-39	1,35E-36
ENSG00000177575	<i>CD163</i>	-3,738	6,68E-55	4,36E-52	3,014	6,24E-39	2,42E-36
ENSG00000135047	<i>CTSL</i>	-2,994	2,59E-34	5,10E-32	3,910	3,72E-53	3,56E-50
ENSG00000136235	<i>GPNMB</i>	-4,275	1,08E-70	1,20E-67	2,617	4,89E-33	1,25E-30
ENSG00000159189	<i>C1QC</i>	-5,472	6,55E-42	2,04E-39	4,154	6,50E-33	1,61E-30
ENSG00000173369	<i>C1QB</i>	-5,282	3,74E-32	6,17E-30	4,181	2,34E-34	6,46E-32
ENSG00000129538	<i>RNASE1</i>	-4,650	3,99E-40	1,20E-37	2,960	7,90E-32	1,86E-29
ENSG00000180113	<i>TDRD6</i>	-2,771	1,29E-29	1,78E-27	2,715	3,90E-29	7,00E-27
ENSG00000120708	<i>TGFBI</i>	-2,535	9,02E-29	1,17E-26	2,913	2,55E-36	8,14E-34
ENSG00000146070	<i>PLA2G7</i>	-2,940	4,10E-36	9,34E-34	2,498	1,46E-27	2,16E-25
ENSG00000174600	<i>CMKLR1</i>	-3,875	1,84E-45	6,96E-43	2,855	2,55E-26	3,30E-24
ENSG00000135929	<i>CYP27A1</i>	-3,910	5,10E-29	6,78E-27	2,788	6,57E-25	7,20E-23
ENSG00000187474	<i>FPR3</i>	-3,488	8,73E-38	2,32E-35	2,794	4,00E-24	4,15E-22
ENSG00000173372	<i>C1QA</i>	-3,515	2,71E-22	2,19E-20	5,049	1,01E-40	4,42E-38
ENSG00000131981	<i>LGALS3</i>	-2,246	3,16E-22	2,53E-20	2,666	1,05E-31	2,43E-29
ENSG00000104972	<i>LILRB1</i>	-2,414	3,16E-19	2,05E-17	2,547	4,91E-21	3,75E-19
ENSG00000156113	<i>KCNMA1</i>	-2,688	1,83E-18	1,12E-16	2,692	1,28E-28	2,19E-26
ENSG00000132514	<i>CLEC10A</i>	-2,167	4,91E-20	3,30E-18	2,152	3,88E-17	2,00E-15
ENSG00000244482	<i>LILRA6</i>	-2,379	4,59E-17	2,53E-15	2,453	3,19E-18	1,87E-16
ENSG00000099250	<i>NRP1</i>	-1,883	6,46E-17	3,50E-15	2,452	6,87E-27	9,49E-25
ENSG00000170458	<i>CD14</i>	-1,845	6,53E-17	3,53E-15	2,362	8,29E-27	1,11E-24
ENSG00000136160	<i>EDNRB</i>	-2,585	1,67E-23	1,53E-21	1,849	1,05E-16	5,09E-15
ENSG00000158714	<i>SLAMF8</i>	-2,537	2,18E-16	1,11E-14	3,024	4,48E-21	3,44E-19
ENSG00000153823	<i>PID1</i>	-2,468	4,29E-16	2,14E-14	2,793	6,30E-21	4,73E-19
ENSG00000171051	<i>FPR1</i>	-2,118	1,75E-20	1,20E-18	1,752	7,49E-16	3,31E-14
ENSG00000131042	<i>LILRB2</i>	-1,861	8,88E-16	4,31E-14	2,238	2,19E-22	1,90E-20
ENSG00000197629	<i>MPEG1</i>	-2,125	4,74E-23	4,10E-21	1,708	1,19E-15	5,19E-14
ENSG00000102575	<i>ACP5</i>	-2,935	2,33E-21	1,75E-19	2,425	1,65E-15	6,95E-14
ENSG00000140749	<i>IGSF6</i>	-1,869	8,86E-16	4,31E-14	1,972	6,62E-16	2,95E-14
ENSG00000115919	<i>KYNU</i>	-1,828	2,15E-15	1,01E-13	1,970	4,58E-18	2,62E-16
ENSG00000186818	<i>LILRB4</i>	-2,730	2,85E-24	2,73E-22	2,011	4,83E-15	1,91E-13
ENSG00000088827	<i>SIGLEC1</i>	-4,274	2,02E-49	9,38E-47	2,947	5,66E-15	2,21E-13
ENSG00000118849	<i>RARRES1</i>	-2,081	2,03E-16	1,04E-14	1,985	6,15E-15	2,39E-13
ENSG00000130203	<i>APOE</i>	-2,259	1,28E-14	5,67E-13	2,643	1,02E-26	1,36E-24
ENSG00000184060	<i>ADAP2</i>	-2,057	3,56E-14	1,51E-12	2,624	7,37E-18	4,07E-16
ENSG00000165168	<i>CYBB</i>	-1,830	6,95E-18	4,03E-16	1,580	5,76E-14	1,99E-12
ENSG00000102962	<i>CCL22</i>	-3,778	3,80E-19	2,45E-17	8,709	8,98E-14	3,06E-12
ENSG00000166523	<i>CLEC4E</i>	-2,801	1,07E-13	4,24E-12	2,654	6,24E-16	2,80E-14
ENSG00000143546	<i>S100A8</i>	-1,693	1,34E-15	6,41E-14	1,550	1,49E-13	4,90E-12
ENSG00000120217	<i>CD274</i>	-2,457	2,40E-13	9,21E-12	1,896	1,08E-13	3,64E-12
ENSG00000198719	<i>DLL1</i>	-2,312	1,60E-16	8,31E-15	2,125	4,32E-13	1,34E-11
ENSG00000108846	<i>ABCC3</i>	-2,247	4,07E-13	1,53E-11	2,608	2,98E-19	1,87E-17
ENSG00000183748	<i>MCR1L1</i>	-2,626	4,16E-13	1,56E-11	3,998	2,95E-25	3,36E-23
ENSG00000110446	<i>SLC15A3</i>	-2,330	1,51E-18	9,33E-17	2,064	5,18E-13	1,59E-11
ENSG00000178695	<i>KCTD12</i>	-1,792	5,35E-17	2,94E-15	1,521	8,70E-13	2,57E-11
ENSG00000169439	<i>SDC2</i>	-1,714	7,67E-13	2,82E-11	2,408	8,40E-22	6,86E-20
ENSG00000180672	<i>AC007362.2</i>	-2,607	5,42E-13	2,02E-11	2,890	2,79E-13	8,82E-12
ENSG00000103811	<i>CTSH</i>	-1,525	2,49E-12	8,74E-11	2,144	6,62E-21	4,93E-19

3.2.4.1. Validation des gènes fortement co-modulés avec ETV6

Étant donné le nombre important de gènes identifiés, seuls les gènes dont l'expression est fortement influencée par ETV6 ont été validés. En raison de leur fonction biologique moins pertinente dans un contexte de tumorigenèse, certains gènes n'ont pas été inclus dans la validation malgré leur réponse en fonction de la modulation d'ETV6. L'expression des gènes *MMP-9*, *SLCO2B1*, *LGMN*, *CTSL*, *C1QC*, *C1QB* et *C1QA* a donc été confirmée dans les populations P1 et P2 par PCR en temps réel (fig. 13). L'expérience a confirmé que l'expression des 7 gènes est fortement corrélée avec celle d'ETV6. Ceci suggère que le facteur de transcription ETV6 peut réguler l'expression des gènes *MMP-9*, *SLCO2B1*, *LGMN*, *CTSL*, *C1QC*, *C1QB* et *C1QA* dans les cellules souches hématopoïétiques CD34+.

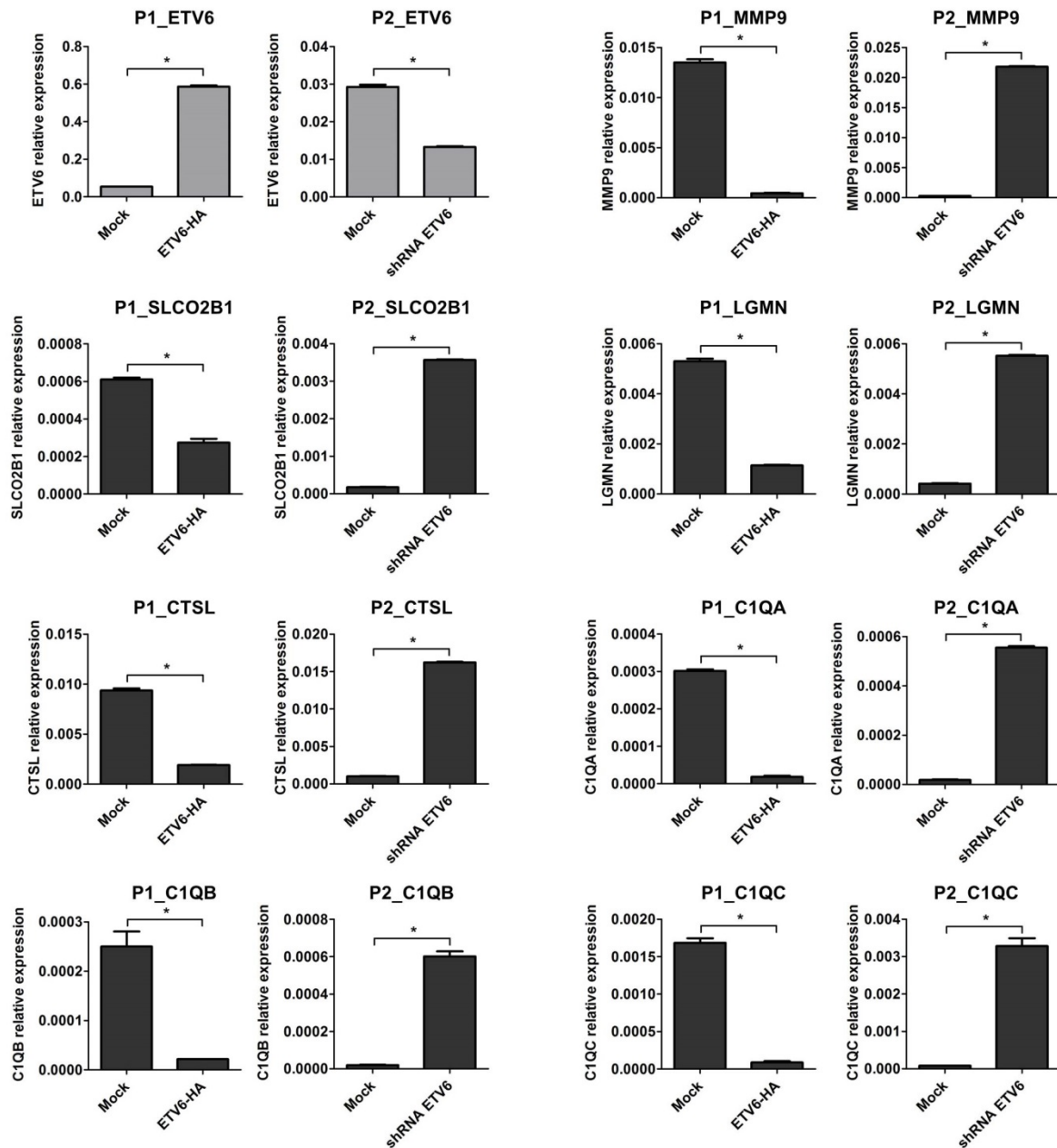


Figure 13. Validation du niveau d'expression d'ETV6 et de 7 gènes fortement co-modulés avec l'expression d'ETV6 dans des cellules CD34+. L'expression des gènes indiqués a été déterminée par PCR en temps réel dans les populations P1 et P2 (n=1) et l'expression de chacun des gènes a été normalisée par rapport à l'expression du gène de référence *GAPDH*. Les différences statistiques ont été mesurées avec un test Mann-Whitney bilatéral (* = $p < 0,05$).

3.2.4.2. Enrichissement de processus biologiques

On sait qu'un facteur de transcription exerce sa fonction biologique via la modulation de l'expression de différents gènes. Certains facteurs régulent peu de gènes et ont par conséquent une fonction biologique très spécifique. D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation d'un grand nombre de gènes et participent ainsi à plusieurs processus biologiques.

Afin de déterminer les processus cellulaires impliquant le facteur de transcription ETV6, l'outil informatique DAVID a été utilisé pour mettre en évidence les fonctions biologiques enrichies dans le sous-groupe de gènes dont l'expression est influencée par ETV6. L'analyse a révélé que de nombreux gènes sont impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire, la migration cellulaire, la transduction de signaux, la phagocytose et l'homéostasie des ions (tableau XI). Ceci suggère que le facteur de transcription ETV6 pourrait participer, directement ou indirectement, à la régulation de ces différents processus biologiques.

Tableau XI. Processus biologiques enrichis dans le sous-groupe de gènes co-modulés avec l'expression d'ETV6

GO Term	Count	%	P-value	Benjamini	FDR
Defense response	39	17,26	9,99E-22	1,50E-18	1,66E-18
Inflammatory response	30	13,27	3,70E-20	2,78E-17	6,15E-17
Response to wounding	35	15,49	8,75E-19	4,39E-16	1,45E-15
Immune response	37	16,37	3,00E-17	1,13E-14	4,99E-14
Innate immune response	14	6,19	1,58E-09	4,76E-07	2,63E-06
Chemotaxis	13	5,75	3,61E-08	9,06E-06	6,00E-05
Cell surface receptor linked signal transduction	35	15,49	3,68E-08	7,91E-06	6,11E-05
Locomotory behavior	15	6,64	1,11E-07	2,08E-05	1,84E-04
Lymphocyte mediated immunity	10	4,42	1,20E-07	2,00E-05	1,99E-04
G-protein coupled receptor signaling pathway	19	8,41	1,65E-07	2,49E-05	2,75E-04
Leukocyte mediated immunity	10	4,42	6,00E-07	7,52E-05	9,97E-04
Acute inflammatory response	9	3,98	7,71E-07	8,93E-05	1,28E-03
Endocytosis	15	6,64	3,12E-06	3,35E-04	5,18E-03
Immune effector process	11	4,87	4,01E-06	4,02E-04	6,66E-03
Phagocytosis	8	3,54	4,08E-06	3,84E-04	6,79E-03
Behavior	16	7,08	4,84E-06	4,29E-04	8,05E-03
Metal ion homeostasis	11	4,87	6,68E-06	5,58E-04	1,11E-02
Cation homeostasis	13	5,75	1,28E-05	1,01E-03	2,13E-02
Organic acid transport	10	4,42	1,33E-05	1,00E-03	2,21E-02
Positive regulation of immune system process	13	5,75	2,21E-05	1,59E-03	3,68E-02
Immunoglobulin mediated immune response	7	3,10	2,61E-05	1,79E-03	4,34E-02
Cellular metal ion homeostasis	10	4,42	3,52E-05	2,30E-03	5,84E-02
Positive regulation of immune response	10	4,42	3,52E-05	2,30E-03	5,84E-02
B cell mediated immunity	7	3,10	3,71E-05	2,33E-03	6,17E-02
Complement activation, classical pathway	5	2,21	4,90E-05	2,95E-03	8,14E-02

3.2.4.3. Enrichissement de motifs

Puisque le facteur de transcription ETV6 peut lier directement l'ADN pour réguler la transcription, nous avons vérifié si les promoteurs des gènes cibles potentiels contiennent des motifs consensus de liaison d'ETV6. L'outil informatique CentriMo a été utilisé pour évaluer si le motif illustré à la figure 5A est enrichi dans la région promotrice des 248 gènes

identifiés, comparativement aux promoteurs des gènes dont l'expression n'est pas influencée par la modulation d'ETV6. Puisque certaines évidences suggèrent qu'ETV6 se lie à proximité du site d'initiation de la transcription (TSS), nous nous sommes concentrés sur les 1000 pb avant le TSS. L'analyse a démontré qu'il y a un enrichissement du motif consensus de liaison d'ETV6 près du TSS dans le promoteur des gènes cibles potentiels, mais le même enrichissement est observé dans les séquences contrôles (fig. 14). En d'autres mots, on n'observe pas d'enrichissement de motifs spécifique aux promoteurs des gènes potentiellement ciblés par ETV6.

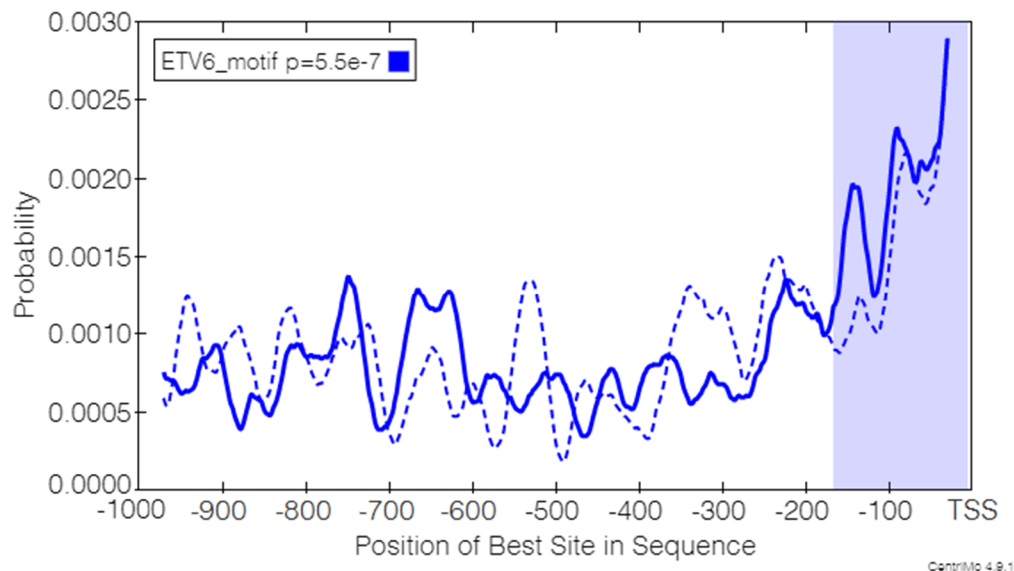


Figure 14. Enrichissement du motif consensus de liaison d'ETV6 dans les séquences promotrices des gènes cibles potentiels. Le graphique représente la probabilité de la meilleure correspondance du motif selon la position dans les promoteurs des gènes cibles identifiés (ligne pleine) et dans les promoteurs des gènes dont l'expression est indépendante d'ETV6 (ligne pointillée). La zone bleue correspond à la région où le motif est le plus enrichi. Il n'y a pas de différence d'enrichissement significative entre les séquences cibles et les séquences contrôles. L'enrichissement de motifs a été déterminé par l'outil CentriMo de la suite MEME.

3.3. Identification des sites de liaison du facteur de transcription ETV6

L'expérience de RNA-Seq a permis d'identifier plus de 200 gènes dont l'expression est co-modulée avec le facteur de transcription ETV6. Toutefois, cette étude ne permet pas d'affirmer que la protéine régule directement l'expression de ces gènes. Nous avons donc utilisé une approche de ChIP-Seq pour nous permettre de caractériser les régions génomiques et les gènes auxquels le facteur de transcription ETV6 peut se lier. Ainsi, en combinant les données de RNA-Seq et ChIP-Seq, nous serons en mesure d'identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles d'ETV6.

3.3.1. Mise en place du protocole de ChIP

Le principe du ChIP est simple, mais de nombreux facteurs peuvent compromettre les résultats. Ainsi, il est primordial d'optimiser toutes les étapes du protocole dans un modèle cellulaire et des conditions appropriés pour obtenir des résultats reproductibles. Chaque paramètre considéré comme étant crucial a donc été contrôlé et amélioré.

3.3.1.1. Optimisation de la fragmentation de la chromatine

Pour réussir une expérience de ChIP, la chromatine doit être fractionnée de façon uniforme et les fragments d'ADN doivent se situer dans une gamme de taille définie. En effet, la fragmentation de l'ADN influence la résolution de l'expérience et modifie également sa spécificité, puisque des fragments d'ADN trop longs peuvent mener à l'identification de liaisons ADN-protéine non-spécifiques (faux positifs). De plus, l'étape de fragmentation est essentielle puisqu'elle rend la chromatine soluble. Généralement, la chromatine utilisée pour une expérience de ChIP-Seq doit être constituée de fragments entre 100-400 pb.

La digestion enzymatique avec la nucléase micrococcale peut être utilisée pour fragmenter l'ADN, mais la méthode la plus couramment employée est la sonication, qui consiste à briser l'ADN en le soumettant à des ultrasons. La sonication est préférable puisqu'elle engendre une fragmentation non-biaisée et aléatoire, contrairement à la nucléase micrococcale qui peut cliver l'ADN de façon non-uniforme. En effet, cette enzyme digère seulement l'ADN libre entre les nucléosomes et présente aussi une spécificité pour les séquences riches en A/T.

La sonication de l'ADN est affectée par plusieurs facteurs. Évidemment, la distribution des fragments d'ADN peut être modifiée en changeant l'intensité et la fréquence des ultrasons émis par l'appareil utilisé, mais la fragmentation d'ADN peut aussi varier selon la durée de fixation des cellules et la nature du milieu utilisé. Nous avons donc déterminé l'impact de ces différents facteurs sur la fragmentation de l'ADN pour être en mesure de choisir les paramètres appropriés.

3.3.1.1.1. Influence des paramètres des ultrasons sur la fragmentation de l'ADN

Plusieurs types d'appareils peuvent être utilisés pour fragmenter l'ADN par sonication. Dans notre laboratoire, nous utilisons un ultrasonicateur Covaris S2. L'appareil permet de varier entre autres la fréquence, l'intensité et la durée des ultrasons émis. Puisque tous les types cellulaires n'ont pas la même résistance aux ultrasons, il est important de déterminer les paramètres qui permettront d'obtenir une distribution d'ADN optimale, composée d'une majorité de fragments ayant une taille entre 100-400 pb. L'impact des différents paramètres du Covaris S2 a donc été évalué.

Pour y arriver, nous avons utilisé la lignée cellulaire Reh (cellules pré-B leucémiques humaines). En effet, puisque la quantité de cellules CD34+ issues d'un sang de cordon est très limitée et que la culture de cellules souches est coûteuse, nous avons opté pour une

lignée cellulaire afin d'optimiser les différentes étapes du protocole de CHIP. Les cellules Reh se cultivent très facilement, prolifèrent rapidement et sont également comparables aux cellules CD34+ quant à leur taille (environ 8 µm) et leur contenu en ADN et en protéines.

Des cellules Reh ont été fixées au formaldéhyde dans du milieu de culture RPMI 10% FBS pendant 10 minutes et l'ADN provenant de ces cellules a été fragmenté à l'aide du Covaris S2 en modifiant les paramètres suivants : *duty cycle* (fréquence), intensité et durée. L'ADN fragmenté a été analysé sur le Bioanalyzer 2100. L'expérience a démontré que chaque paramètre influence de façon importante la distribution des fragments d'ADN après sonication (fig. 15). On observe également qu'une portion de l'ADN n'est pas fragmenté, peu importe les conditions utilisées. Cet effet est dû entre autres à la structure de l'ADN qui rend certaines régions résistantes à la fragmentation suite à la fixation au formaldéhyde. La présence d'ADN non-fragmenté est nuisible dans une expérience de CHIP puisque les risques d'amplifier une région liée de façon non-spécifique par la protéine d'intérêt sont augmentés et le bruit de fond est également plus important. Les paramètres optimaux permettront donc d'obtenir des fragments de 100-400 pb, tout en minimisant la quantité d'ADN non-fragmenté.

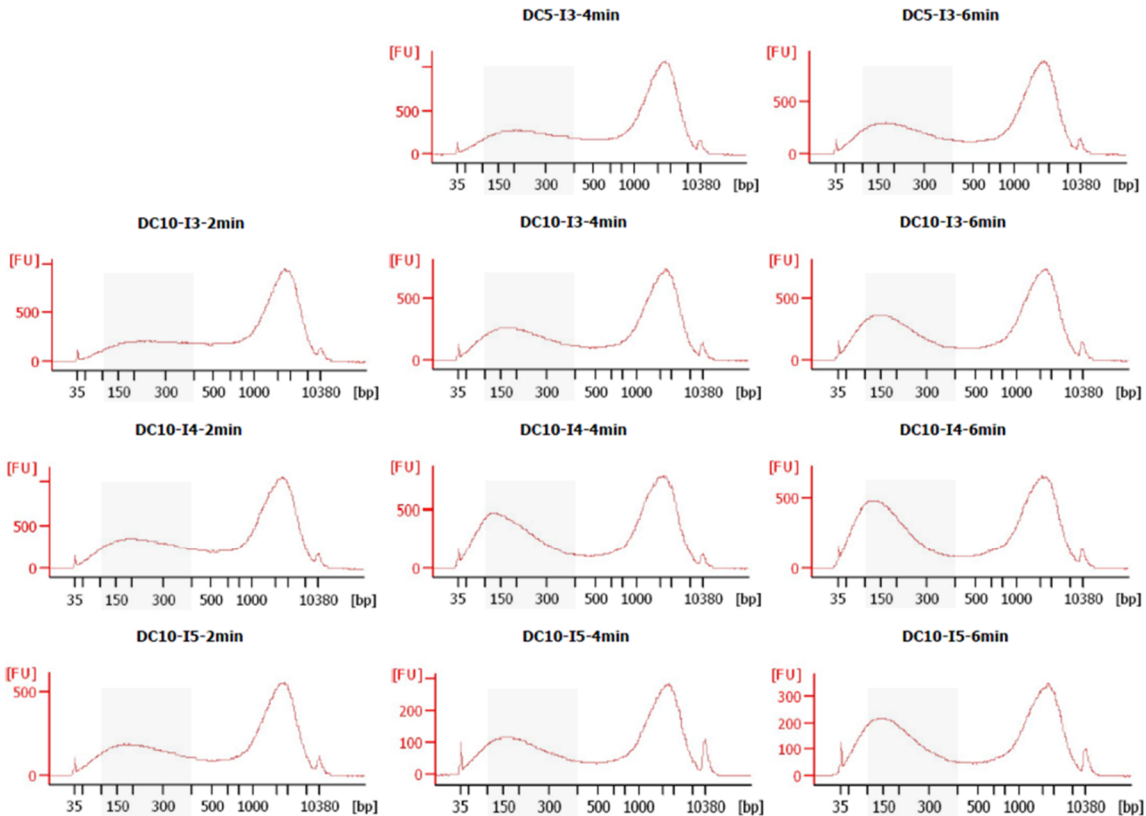


Figure 15. Influence des différents paramètres d'ultrasons sur la fragmentation de l'ADN. L'ADN provenant de cellules Reh a été fragmenté par sonication en utilisant les paramètres indiqués. L'ADN a été analysé avec le Bioanalyzer 2100. La région grise met en évidence les fragments de 100-400 pb.

La proportion d'ADN ayant une taille entre 100-400 pb a été mesurée à l'aide du Bioanalyzer 2100 et la taille moyenne des fragments dans cette gamme a également été calculée (tableau XII). Les différentes conditions testées ont été ordonnées de façon croissante selon la fraction d'ADN obtenue ayant une taille entre 100-400 pb. On observe que plus l'ADN est fragmenté, plus la taille moyenne des fragments diminue. Pour ne pas compromettre le séquençage en raison de fragments trop courts, nous avons déterminé que les conditions optimales sont : *duty cycle* 10%, intensité 3, 4 minutes. En effet, ces paramètres permettent d'obtenir une bonne proportion d'ADN entre 100-400 pb (42 %) sans toutefois obtenir des fragments d'ADN trop courts (228 pb en moyenne). Ces conditions ont donc été utilisées pour toutes les expériences subséquentes nécessitant une sonication.

Tableau XII. Profil de l'ADN fragmenté par sonication à l'aide du Covaris S2 en variant les paramètres des ultrasons

Paramètres du Covaris S2			Fragments 100-400 pb*	
Duty Cycle (%)	Intensité	Temps (min)	Moyenne (pb)	Fraction du total (%)
10	4	6	201	46
10	5	6	210	47
10	4	4	211	46
10	3	6	213	44
10	5	4	223	43
10	3	4	228	42
5	3	6	228	41
10	5	2	236	41
10	4	2	241	41
5	3	4	242	38
10	3	2	251	34

*Les données ont été ordonnées selon la taille moyenne des fragments entre 100-400 pb. Une mise en forme conditionnelle a été appliquée à la moyenne (pb) et à la fraction du total (%) à l'aide du logiciel Excel afin de mettre en évidence la corrélation inverse entre les deux paramètres (rouge<blanc<bleu).

3.3.1.1.2. Influence de la durée de fixation au formaldéhyde sur la fragmentation de l'ADN

La fixation des cellules au formaldéhyde est la première étape d'une immunoprécipitation de la chromatine. Le but de la fixation est d'immobiliser la protéine d'intérêt sur son site de liaison dans l'ADN. En effet, le formaldéhyde forme des liaisons covalentes réversibles entre une protéine interagissant directement avec l'ADN ou avec d'autres protéines. Il permet donc de conserver intacte la liaison de la chromatine avec une protéine seule ou en complexe.

Le temps de fixation est un paramètre important à considérer dans une expérience de ChIP. En effet, la fixation doit être effectuée pendant quelques minutes seulement. Un temps de fixation trop court peut diminuer le rendement de l'expérience en raison d'une trop faible quantité de complexes ADN-protéine efficacement fixés. Un temps de fixation trop long peut également compromettre l'expérience si l'antigène ciblé par l'anticorps se trouve masqué par

encombrement stérique, réduisant ainsi le matériel disponible dans l'échantillon. De plus, on sait que le temps de fixation peut affecter l'efficacité de la sonication des cellules. Nous avons donc tenté de déterminer le temps de fixation optimal.

Des cellules Reh ont d'abord été fixées avec du formaldéhyde directement dans le milieu de culture (concentration finale 1% formaldéhyde) pendant 5, 7 ou 10 minutes avant d'y ajouter de la glycine pour arrêter la réaction. Des cellules n'ayant pas été fixées ont également été récoltées. L'ADN provenant de ces cellules a ensuite été fragmenté par sonication en utilisant les paramètres suivants : *duty cycle* 10%, intensité 3, 4 minutes. L'ADN a finalement été analysé sur le Bioanalyzer 2100. L'expérience a confirmé que le temps de fixation influence grandement l'efficacité de sonication (fig. 16). En effet, l'ADN de cellules non-fixées est facilement fragmenté, alors que la fixation provoque l'apparition de fragments d'ADN de 800-2000 pb, que la sonication ne parvient pas à fragmenter davantage. On observe également que plus le temps de fixation est long, plus la quantité d'ADN résistant à la sonication est importante.

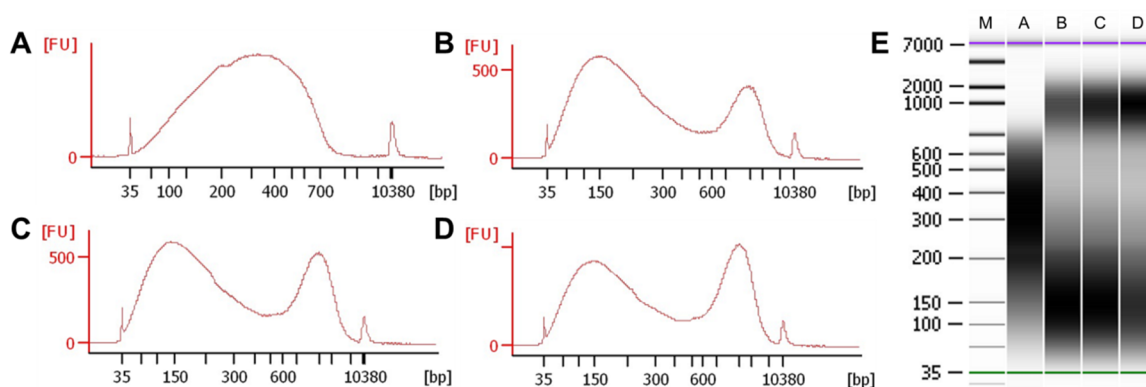


Figure 16. Influence du temps de fixation des cellules au formaldéhyde sur la fragmentation de l'ADN par sonication. Sonication de l'ADN provenant de cellules non-fixées (A) et provenant de cellules fixées au formaldéhyde pendant 5 minutes (B), 7 minutes (C) et 10 minutes (D). (E) Simulation d'une électrophorèse sur gel des échantillons A-D. Les échantillons A-D ont été fragmentés avec le Covaris S2 avec les paramètres suivants : *duty cycle* 10%, intensité : 3, 4 minutes. L'ADN a été analysé avec un appareil Bioanalyzer 2100.

Pour évaluer l'impact de la distribution des fragments d'ADN sur une expérience de ChIP, une immunoprécipitation a été faite dans les différentes populations de cellules (5, 7 et 10 min) en ciblant la RNA polymérase II. La protéine RNAPolIII est une enzyme qui se fixe à proximité du site d'initiation de la transcription des gènes et catalyse la transcription de l'ADN en ARNm. Elle est présente au niveau de la région promotrice de la majorité des gènes activement transcrits, y compris le gène *GAPDH* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Suite à l'immunoprécipitation de RNAPolIII, l'enrichissement du promoteur de *GAPDH* a donc été évalué par qRT-PCR dans les trois conditions afin de déterminer l'efficacité de l'expérience de ChIP selon le temps de fixation. Comme contrôle négatif, l'enrichissement d'une région qui n'est pas liée par la RNAPolIII a été mesuré dans les trois conditions. L'expérience a démontré que le promoteur de *GAPDH* est fortement enrichi dans les trois conditions par rapport au contrôle négatif (fig. 17). Toutefois, cet enrichissement est plus important lorsque les cellules sont fixées au formaldéhyde pendant 7 et 10 min. En effet, *GAPDH* est enrichi 8,9 fois avec un temps de fixation de 5 min, alors que l'enrichissement est de 11 fois et 14,3 fois, lorsque les cellules sont fixées pendant 7 et 10 min, respectivement.

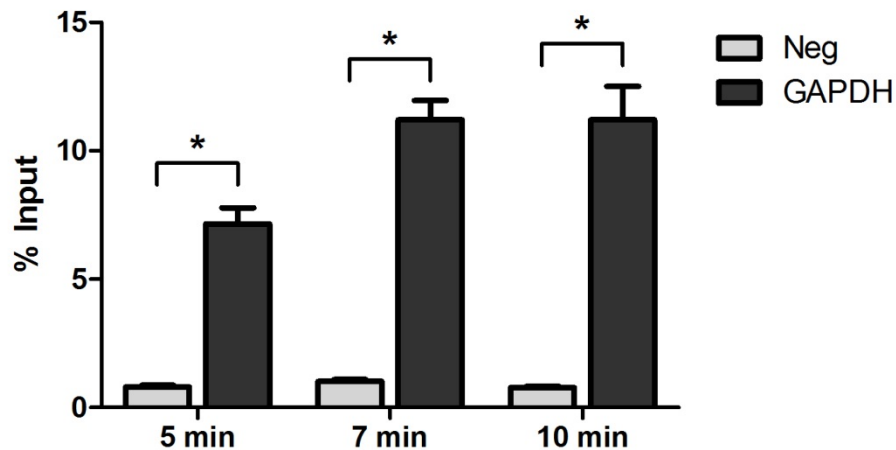


Figure 17. Influence du temps de fixation sur une immunoprécipitation de la chromatine. Les cellules Reh ont été fixées au formaldéhyde pendant 5, 7 ou 10 minutes. L'IP a été réalisée avec un anticorps α -RNAPolIII et l'enrichissement du gène *GAPDH* et du contrôle négatif a été déterminé par PCR en temps réel (n=1). Les différences statistiques ont été mesurées avec un test Mann-Whitney unilatéral (* = $p < 0,05$).

Les résultats montrent qu'une fixation au formaldéhyde de 5 minutes n'est pas suffisante, puisqu'une minorité des complexes ADN-protéines sont efficacement fixés, ce qui engendre un plus faible enrichissement après immunoprécipitation. Fixer les cellules pendant 10 minutes semble suffisant pour enrichir fortement le promoteur du gène *GAPDH*, mais une plus grande quantité d'ADN reste non-fragmentée après la sonication par rapport aux deux autres conditions (fig. 16). Comme discuté plus tôt, la présence d'ADN non-fragmenté est nuisible dans une expérience de ChIP. Nous avons donc décidé d'effectuer les expériences de ChIP subséquentes sur des cellules fixées au formaldéhyde pendant 7 minutes. Cette condition permet de fragmenter la majorité de l'ADN entre 100-400 pb, tout en permettant d'enrichir efficacement les régions génomiques liées par la protéine d'intérêt.

3.3.1.1.3. Influence de la nature du milieu de fixation sur la fragmentation de l'ADN

Nous avons également déterminé l'impact de la nature du milieu de fixation sur l'efficacité de la fragmentation de l'ADN. En général, la fixation est réalisée directement dans le milieu de culture des cellules. Toutefois, certains protocoles recommandent plutôt l'utilisation de PBS 1X. Des cellules Reh ont donc été resuspendues dans du milieu de culture RPMI 10% FBS ou du PBS 1X et les cellules ont été fixées au formaldéhyde pendant 7 minutes. L'ADN provenant de ces deux populations de cellules a été fragmenté par sonication (*duty cycle* 10%, intensité 3, 4 minutes) et analysé sur le Bioanalyzer 2100. L'expérience a démontré que la nature du milieu influence l'efficacité de la fixation et par conséquent la distribution des fragments d'ADN après sonication (fig. 18). En effet, une plus grande quantité d'ADN est résistante à la sonication lorsque les cellules sont fixées directement dans le milieu de culture. Les cellules utilisées pour les expériences subséquentes ont donc été fixées dans du PBS 1X pendant 7 minutes.

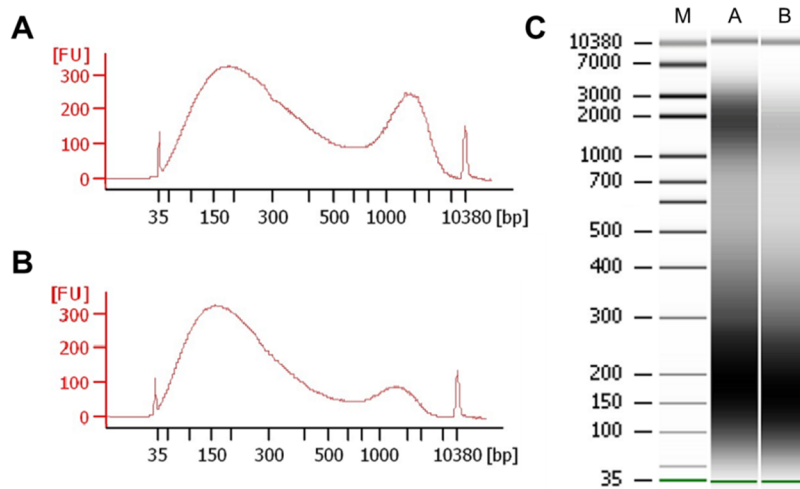


Figure 18. Influence de la nature du milieu de fixation au formaldéhyde sur la fragmentation de l'ADN par sonication. Sonication de l'ADN provenant de cellules fixées au formaldéhyde dans du milieu de culture RPMI 10% FBS (A) et du PBS 1X (B). (C) Simulation d'une électrophorèse sur gel des échantillons A et B. Les échantillons A et B ont été fragmentés avec le Covaris S2 avec les paramètres suivants : *duty cycle* 10%, intensité : 3, 4 minutes. L'ADN a été analysé avec un appareil Bioanalyzer 2100.

3.3.1.2. Optimisation de l'élution des complexes ADN-protéines

Pendant l'immunoprécipitation, la protéine d'intérêt et la chromatine s'y rattachant est reconnue par un anticorps couplé à des billes magnétiques. Toutefois, des interactions non-spécifiques peuvent également se former entre l'anticorps et d'autres protéines. Nous avons donc décidé d'inclure une étape d'élution spécifique afin d'éliminer la majorité des protéines et de l'ADN contaminants. Cette étape sera effectuée avant de procéder à l'étape de *reverse cross-linking*, qui vise à renverser la fixation au formaldéhyde pour séparer les protéines et les fragments d'ADN s'y rattachant.

Plusieurs méthodes peuvent être employées pour éluer la protéine de l'anticorps. Par exemple, on peut ajouter un agent chaotropique ou un détergent, augmenter la concentration de sel afin d'accroître la force ionique, induire un changement de pH extrême ou introduire un ligand compétiteur. Nous avons donc évalué l'efficacité de plusieurs méthodes d'élution.

3.3.1.2.1. Éluion basique

Afin de déterminer l'efficacité d'une élution induite par un pH alcalin, une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée dans des cellules Reh. Puisque ces cellules n'expriment pas ETV6 de façon endogène, les cellules ont été transduites avec des lentivirus exprimant la protéine ETV6-HA. L'anticorps utilisé pour le ChIP était dirigé contre l'étiquette HA. La même expérience a été réalisée avec des cellules Reh surexprimant la protéine ETV6 sauvage comme contrôle négatif. Suite à l'immunoprécipitation (IP), les complexes billes-anticorps-protéines-ADN ont été incubés avec une solution de NaHCO_3 0,1M pH 9,0 pendant 30 minutes à température ambiante afin de libérer les complexes protéines-ADN enrichis par l'IP. Le pH de la solution a ensuite été neutralisé et un immunobuvardage de type Western a été fait sur l'éluat. L'expérience a permis d'observer

que la protéine ETV6-HA est élue de façon peu efficace par un pH basique, puisque le signal de la protéine ETV6-HA élue est relativement faible comparativement à l'*input* (fig. 19A). On peut toutefois affirmer que l'immunoprécipitation avec l'anticorps α -HA est spécifique puisque la protéine ETV6 sans étiquette n'a pas été enrichie par l'anticorps et n'est donc pas détectée par immunobuvardage. On détecte cependant la présence de la chaîne lourde des immunoglobulines dans l'éluat. En effet, un pH extrême peut provoquer la dissociation des chaînes lourdes et légères de l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation. Les immunoglobulines se retrouvent ainsi dans l'éluat et sont ensuite détectées par l'anticorps secondaire (α -IgG-HRP) utilisé lors de l'immunobuvardage.

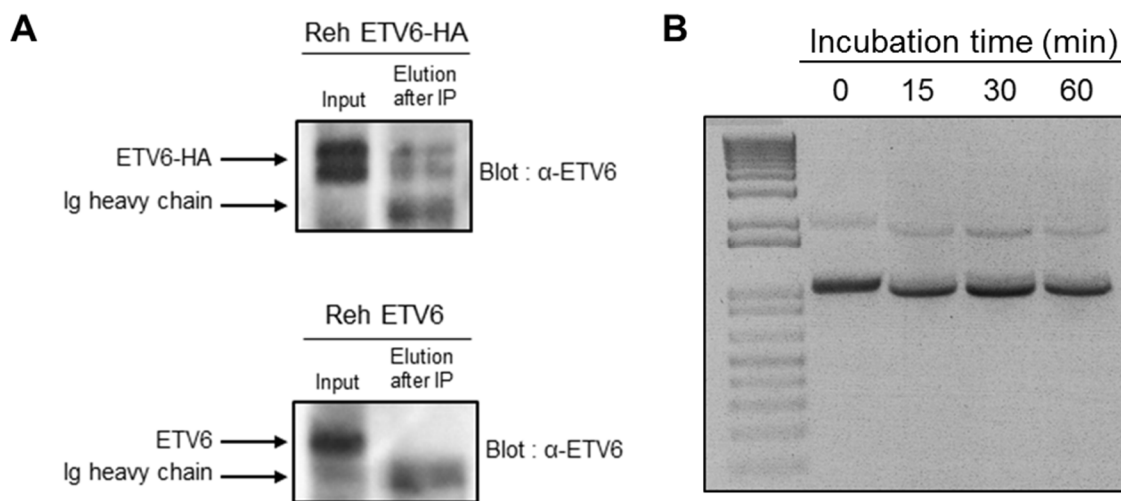


Figure 19. Efficacité et spécificité d'une élution basique. (A) Une immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée sur des cellules Reh ETV6-HA et Reh ETV6 en utilisant un anticorps α -HA. Suite à l'immunoprécipitation, les complexes ADN-protéines ont été élués avec du NaHCO_3 pH 9,0. Un immunobuvardage de type Western a été réalisé sur l'échantillon *input* et l'éluat (blot α -ETV6). L'élution est spécifique mais peu efficace. (B) L'effet d'un traitement alcalin sur l'ADN a été déterminé en incubant un fragment d'ADN linéaire avec du NaHCO_3 pH 9,0 pendant 0, 15, 30 et 60 minutes et en migrant l'ADN par électrophorèse sur gel. Après traitement, la charge et la structure de l'ADN semblent intactes.

Le pH peut influencer la structure de l'ADN puisqu'il dicte la charge ionique des nucléotides et de leur groupement phosphate. Puisqu'il est primordial de conserver intacte la structure de l'ADN lors d'une expérience de CHIP, l'effet d'une augmentation de pH sur l'ADN a été déterminé. Pour y arriver, un fragment d'ADN linéaire a été incubé dans une solution de NaHCO_3 0,1M pH 9,0 pendant 0, 15, 30 ou 60 minutes à température ambiante avant d'être neutralisé avec du Tris 1M pH 8,0. L'ADN a ensuite été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. L'expérience a démontré que suite à un traitement alcalin, l'ADN migre de la même façon que l'ADN non-traité (fig. 19B). Ce résultat suggère que la structure de l'ADN n'est pas affectée par un pH basique.

3.3.1.2.2. Éluion acide

L'efficacité de l'éluion par un pH acide a été déterminée de la même façon, sauf que les complexes billes-anticorps-protéines-ADN ont été incubés avec une solution de glycine 0,1M pH 2,0 pendant 10 minutes à température ambiante suite à l'immunoprécipitation. Le pH de la solution a été neutralisé et un immunobuvardage de type Western a également été fait sur l'éluat. L'expérience démontre qu'un pH acide permet d'éluier la protéine ETV6-HA très efficacement, puisque le signal de la protéine éluee est aussi intense que celui de l'*input* (fig. 20A). Toutefois, on peut voir que le pH acide provoque également la dissociation des chaînes lourdes des immunoglobulines.

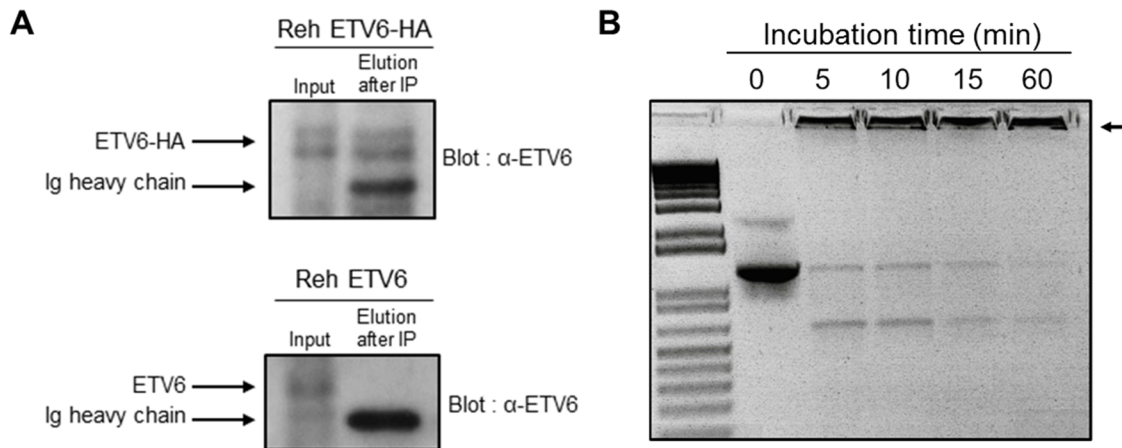


Figure 20. Efficacité et spécificité d'une élution acide. (A) Une immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée sur des cellules Reh ETV6-HA et Reh ETV6 en utilisant un anticorps α -HA. Suite à l'immunoprécipitation, les complexes ADN-protéines ont été élués avec de la glycine pH 2,0. Un immunobuvardage de type Western a été réalisé sur l'échantillon *input* et l'éluat (blot α -ETV6). L'élution est spécifique et très efficace. (B) L'effet d'un traitement acide sur l'ADN a été déterminé en incubant un fragment d'ADN linéaire avec de la glycine pH 2,0 pendant 0, 5, 10, 15 et 60 minutes et en migrant l'ADN par électrophorèse sur gel. Après traitement, la charge et la structure de l'ADN sont altérées.

L'exposition prolongée à un pH acide peut provoquer une hydrolyse des liens phosphodiester de l'ADN et une dépurination (rupture du lien entre une purine et le désoxyribose auquel elle est attachée), ce qui rend l'ADN complètement inutilisable pour une expérience de ChIP. L'effet d'une diminution de pH sur l'ADN a donc été déterminé en incubant un fragment d'ADN linéaire dans une solution de glycine 0,1M pH 2.0 pendant 0, 5, 10, 15 ou 60 minutes. L'ADN a été neutralisé et migré par électrophorèse sur gel d'agarose. L'expérience a démontré que suite à un traitement acide, l'ADN ne migre pas ou peu (fig. 20B). On observe en effet que la majorité de l'ADN reste dans les puits. Ce résultat démontre que malgré la neutralisation, un pH acide modifie les charges de l'ADN et affecte possiblement sa structure.

Même si la glycine pH 2,0 permet d'éluer efficacement les complexes ADN-protéines d'un anticorps dans une expérience de ChIP, cette méthode ne peut pas être utilisée puisqu'elle altère la structure et les propriétés de l'ADN.

3.3.1.2.3. Éluion par compétition

Contrairement à l'élution par changement de pH, la méthode d'élution par compétition peut être réalisée dans des conditions physiologiques. Elle consiste à ajouter en excès un ligand reconnu par l'anticorps afin de compétitionner pour le site de liaison et ainsi libérer la protéine d'intérêt et l'ADN s'y rattachant. Cette méthode est beaucoup plus spécifique qu'un changement de pH. Puisque l'anticorps utilisé dans notre projet reconnaît l'étiquette HA, le ligand compétiteur est une solution de peptide HA.

L'efficacité de cette méthode a été évaluée de la même façon que précédemment. Suite à l'immunoprécipitation, les complexes ont été incubés avec une solution de peptide HA à 2mg/mL pendant 10 minutes à 37°C. Un immunobuvardage de type Western a été fait sur l'éluat. L'expérience démontre que l'élution par compétition est spécifique et très efficace (fig. 21). De plus, puisque l'élution est réalisée dans des conditions douces, les chaînes lourdes des immunoglobulines ne se dissocient pas.

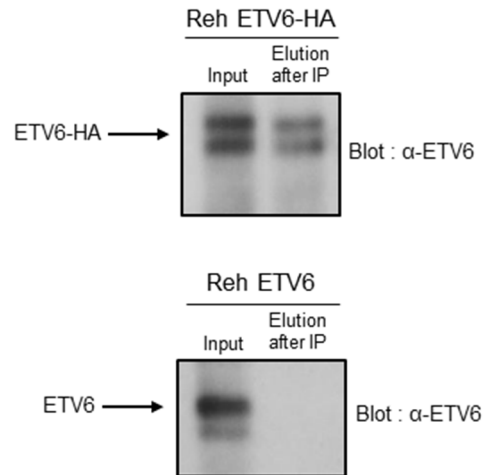


Figure 21. Efficacité et spécificité d'une élution par compétition. (A) Une immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée sur des cellules Reh ETV6-HA et Reh ETV6 en utilisant un anticorps α -HA. Suite à l'immunoprécipitation, les complexes ADN-protéines ont été élués avec une solution de peptide HA 2 mg/mL. Un immunobuvardage de type Western a été réalisé sur l'échantillon *input* et l'éluat (blot α -ETV6). L'élution est spécifique et très efficace.

Même si l'utilisation d'un peptide synthétisé est plus coûteuse, nous avons choisi d'utiliser cette méthode d'élution puisqu'elle est efficace et ne compromet pas l'intégrité de la structure de l'ADN. Sa spécificité permet également de s'assurer que l'éluat ne contient que la protéine d'intérêt et la chromatine associée.

3.3.2. Évaluation de l'efficacité du protocole de ChIP

Avant d'effectuer une expérience de ChIP-Seq sur le facteur de transcription ETV6, nous avons voulu nous assurer de l'efficacité et de la spécificité du protocole de ChIP dans le modèle cellulaire d'intérêt (cellules CD34+). Pour y arriver, une expérience de ChIP-qPCR a été réalisée. Contrairement au ChIP-Seq, le ChIP-qPCR permet seulement de déterminer l'enrichissement d'une région génomique ciblée. Il est donc nécessaire de connaître la séquence des gènes liés par la protéine étudiée. Ainsi, puisqu'aucune cible transcriptionnelle

d'ETV6 n'a encore été caractérisée dans les cellules souches CD34+, nous avons dû valider le protocole en ciblant d'autres protéines dont les sites de liaisons sont connus. Ainsi, nous avons réalisé une immunoprécipitation sur la protéine ARN polymérase II (RNAPolII) et les histones H3K4me3 et H3K27me3 dans des cellules CD34+. L'histone H3 triméthylée sur la lysine 4 est caractéristique d'une chromatine activement transcrite, alors que l'histone H3 triméthylée sur la lysine 27 est spécifique à la chromatine inactive. Suite à l'immunoprécipitation, une expérience de qPCR a été faite pour vérifier l'enrichissement de régions génomiques connues comme étant liées par les protéines d'intérêt. On sait que RNAPolII est très présente entre autres au niveau du promoteur du gène *GAPDH*. Aussi, puisque ce gène est activement transcrit, les histones H3 au niveau de la région promotrice sont modifiées post-traductionnellement sur la lysine 4. On devrait donc enrichir le promoteur de *GAPDH* en faisant une IP sur RNAPolII et H3K4me3. Par ailleurs, on sait que le gène *MYT1* est exprimé spécifiquement dans les neurones et que son promoteur est constitutivement réprimé dans des cellules hématopoïétiques. On s'attend donc à enrichir le promoteur de *MYT1* suite à une immunoprécipitation de l'histone H3K27me3.

L'expérience a démontré que dans les trois expériences de ChIP réalisées, le contrôle positif est fortement enrichi par rapport au contrôle négatif (fig. 22). En effet, le gène *GAPDH* est enrichi 10 fois lorsqu'on réalise une IP sur RNAPolII, 22 fois avec une IP sur H3K4me3 et le gène *MYT1* est enrichi 45 fois en immunoprécipitant H3K27me3. Ceci suggère donc que le protocole de ChIP utilisé permet d'enrichir efficacement la chromatine associée à une protéine cible.

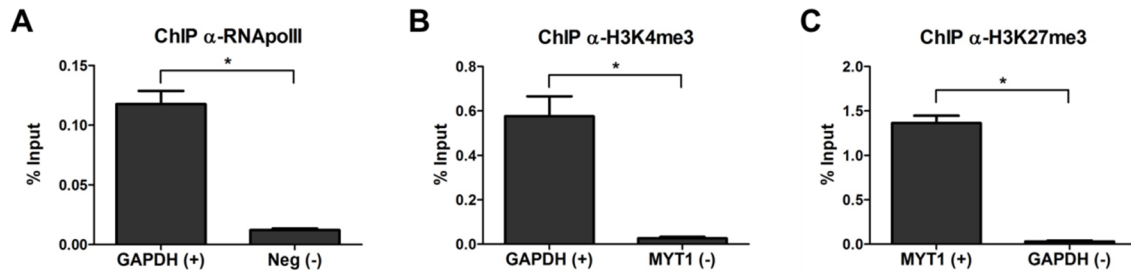


Figure 22. Immunoprécipitation de la chromatine dans des cellules CD34+ ciblant la protéine RNApolIII (A) et les histones H3K4me3 (B) et H3K27me3 (C). Les contrôles positifs (+) et négatifs (-) pour chaque expérience sont indiqués. L'enrichissement de *GAPDH*, *MYT1* et Neg a été déterminé par PCR en temps réel (n=1). Les contrôles positifs sont enrichis 10 fois, 22 fois et 45 fois, respectivement. Les différences statistiques ont été mesurées avec un test Mann-Whitney unilatéral (* = $p < 0,05$).

3.3.3. ChIP-Seq sur le facteur de transcription ETV6

Après avoir optimisé les différentes étapes du protocole de ChIP et vérifié son efficacité dans le modèle cellulaire d'intérêt, une expérience de ChIP-Seq a été réalisée sur le facteur de transcription ETV6. Puisqu'aucun anticorps commercial dirigé contre ETV6 n'est adapté pour faire du ChIP, nous avons dû introduire dans les cellules la protéine ETV6-HA, qui possède une étiquette HA en C-terminal.

3.3.3.1. Immunoprécipitation de la chromatine associée au facteur de transcription ETV6

Dans cette étude, nous avons utilisé la même population de cellules CD34+ (P1) que celle utilisée pour faire une expérience de RNA-Seq. La population P1 était composée de cellules CD34+ pures à 99,5% (fig. 10). Les cellules avaient été transduites avec des lentivirus exprimant ETV6-HA et le niveau d'expression avait été déterminé par qPCR (fig. 11).

Dans le but de caractériser les sites de liaison du facteur de transcription ETV6, une immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée sur les cellules CD34+ ETV6-HA en utilisant le protocole optimisé. Un anticorps α-HA a été utilisé afin de cibler la protéine ETV6-

HA. L'ADN enrichi suite à l'IP a ensuite été soumis à une purification à l'aide du système Agencourt AMPure XP afin d'éliminer les fragments de <100 pb et >400 pb.

Comme contrôle négatif, une immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée dans les mêmes conditions sur des cellules CD34+ WT, qui exprime la protéine ETV6 sauvage (sans étiquette). Cette expérience permet de déterminer le bruit de fond provenant de l'ADN enrichi de façon non-spécifique pendant l'immunoprécipitation.

3.3.3.2. Préparation des librairies et séquençage des échantillons de ChIP

L'ADN enrichi par l'IP et l'échantillon *input* provenant des deux expériences de ChIP (CD34+ WT et CD34+ ETV6-HA) ont ensuite été transférés au Centre d'innovation Génome Québec (McGill) pour procéder au séquençage à haut débit. Un contrôle de qualité effectué à l'aide du Bioanalyzer 2100 a permis de déterminer que les deux échantillons d'ADN immunoprécipité contenaient en moyenne 45 ng d'ADN et les échantillons *input* contenaient en moyenne 515 ng d'ADN. Comme attendu, les fragments d'ADN se situaient entre 100-400 pb. Des librairies ont ensuite été préparées afin d'ajouter des adaptateurs aux extrémités des fragments d'ADN. La concentration des librairies et la taille des fragments générés étaient celles attendues. Les quatre librairies d'ADN ont finalement été séquencées sur la plateforme Illumina avec un appareil HiSeq 2000 en mode SR100. Le nombre total de *reads* séquencés, le pourcentage d'alignement et la qualité moyenne des données pour chaque échantillon sont présentés dans le tableau XIII. Environ 97,7% des *reads* alignent sur le génome de façon unique avec un très faible risque d'erreur (qualité moyenne supérieure à 30). Toutefois, le nombre de *reads* séquencés pour l'échantillon CD34.ETV6-HA.Input était plus faible que les autres échantillons.

Tableau XIII. Statistiques sur les données de séquençage de ChIP

Échantillon	Nombre total de reads	Pourcentage de reads uniques alignés	Qualité moyenne d'alignement
CD34.ETV6-HA.Input	27 287 187	97,7%	36
CD34.ETV6-HA.IP.HA	67 066 725	97,6%	35
CD34.WT.Input	66 309 816	98,0%	36
CD34.WT.IP.HA	57 302 839	97,5%	35

3.3.3.3. Identification des régions génomiques enrichies par ChIP

Pour déterminer les sites de liaison du facteur de transcription ETV6, l'outil informatique MACS a été utilisé afin d'identifier les régions génomiques enrichies suite à l'immunoprécipitation par rapport à l'échantillon *input*. L'enrichissement a été déterminé dans les deux expériences de ChIP, soit dans les cellules CD34+ WT exprimant ETV6 et celles exprimant ETV6-HA. 841 régions ont été enrichies par l'IP dans les cellules CD34+ WT, alors que seulement 12 régions étaient enrichies par l'IP dans les cellules exprimant ETV6-HA (fig. 23). Ce résultat est inattendu puisque l'immunoprécipitation ciblait l'antigène HA (et donc la protéine ETV6-HA) qui n'est pas exprimée dans les CD34+ WT. On devrait trouver au contraire beaucoup plus de régions enrichies dans les CD34+ ETV6-HA que dans les CD34+ WT. Toutefois, puisque les régions enrichies sont déterminées en comparant l'ADN immunoprécipité à l'ADN *input*, il est possible que le nombre plus faible de *reads* total dans l'échantillon CD34.ETV6-HA.Input ait influencé le résultat de l'expérience.

Par ailleurs, 9 des 12 régions identifiées dans les CD34+ ETV6-HA étaient également enrichies par l'IP réalisée dans les CD34+ WT, ce qui suggère fortement que l'enrichissement de ces 9 régions n'était pas spécifique et que ces régions ne sont probablement pas liées par ETV6-HA. Trois régions étaient uniquement enrichies dans les CD34+ ETV6-HA, dont deux

sont des régions intergéniques désertes. La dernière région se situe entre les locus codant pour les miR-3648 et miR-3687 (tableau XIV).

Malheureusement, nos expériences d'immunoprécipitation de la chromatine n'ont pas permis d'identifier les régions liées spécifiquement par la protéine ETV6-HA. Ceci pourrait être dû à un bruit de fond trop important, ce qui aurait masqué le signal provenant de l'ADN immunoprécipité de façon spécifique.

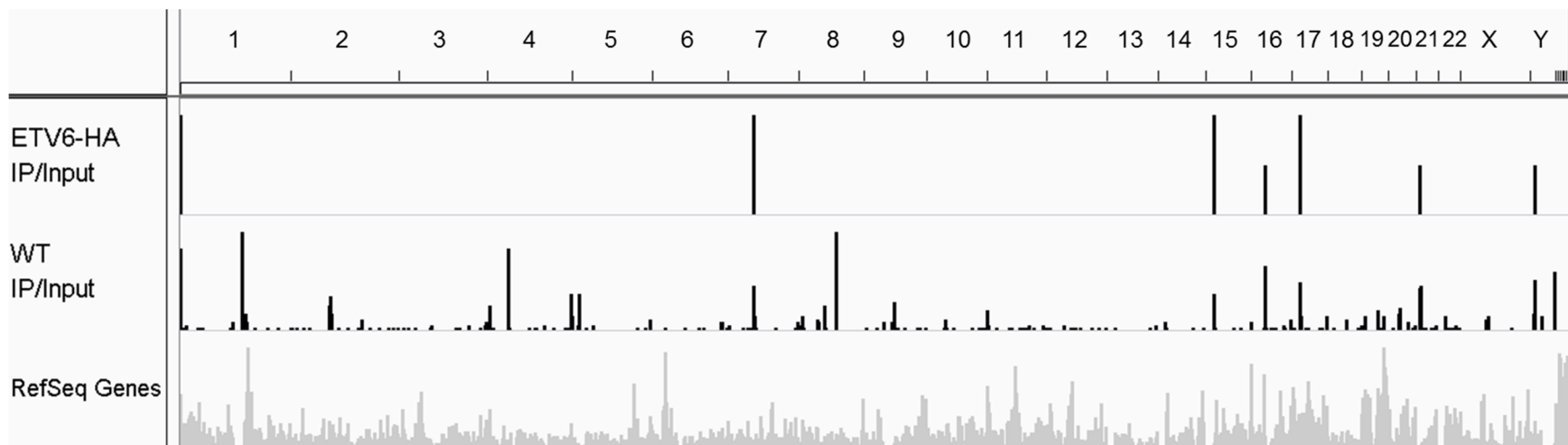


Figure 23. Régions génomiques enrichies par CHIP dans des cellules CD34+ ETV6-HA (panneau du haut) et CD34+ WT (panneau du centre) en ciblant l'étiquette HA. Tous les gènes annotés sont représentés en gris (panneau du bas). Les régions enrichies ont été représentées à l'aide du logiciel IGV.

Tableau XIV. Régions génomiques enrichies par CHIP dans des cellules CD34+ ETV6-HA en ciblant l'étiquette HA

Région enrichie	Chromosome	Début	Fin	Unique à CD34+ ETV6-HA	Région génomique
ETV6-HA_IP/Input_1	1	2583701	2583895	non	Intron du gène <i>TTC34</i>
ETV6-HA_IP/Input_2	1	2629106	2629235	non	Intron du gène <i>TTC34</i>
ETV6-HA_IP/Input_3	7	56438285	56438424	non	Région déserte
ETV6-HA_IP/Input_4	7	56440296	56440449	non	Région déserte
ETV6-HA_IP/Input_5	7	56442231	56442409	non	Région déserte
ETV6-HA_IP/Input_6	15	20306161	20306312	oui	Région déserte
ETV6-HA_IP/Input_7	15	21313471	21313582	oui	Région déserte
ETV6-HA_IP/Input_8	16	33293958	33294130	non	Région déserte
ETV6-HA_IP/Input_9	17	21549547	21549664	non	Région déserte
ETV6-HA_IP/Input_10	17	21906265	21906420	non	Intron du gène <i>FLJ36000</i>
ETV6-HA_IP/Input_11	21	9825996	9826096	oui	À proximité des miR-3648 et miR-3687
ETV6-HA_IP/Input_12	Y	13478295	13478438	non	Région déserte

3.3.3.4. Évaluation de l'enrichissement par ChIP des gènes co-modulés avec ETV6

L'expérience de ChIP-Seq n'a pas permis d'identifier les régions génomiques spécifiquement liées par le facteur de transcription ETV6. Toutefois, nous avons évalué si les gènes dont l'expression est influencée par la présence d'ETV6 (identifiés par RNA-Seq) peuvent être liés par la protéine. Pour y arriver, une expérience de ChIP a été réalisée dans une nouvelle population de CD34+ exprimant la protéine ETV6-HA. L'enrichissement des gènes *MMP-9*, *SLCO2B1*, *LGMN*, *CTSL*, *C1QA*, *C1QB* et *C1QC* a ensuite été déterminé par qPCR, en ciblant la région promotrice. Afin de guider le choix des paires d'amorces, nous avons vérifié si des motifs consensus de liaison étaient présents dans la région promotrice de chacun des gènes (1000 pb en amont du TSS). L'expérience a démontré que le gène *SLCO2B1* est enrichi 2,3 fois par rapport au contrôle négatif, alors que les autres gènes ne montrent pas d'enrichissement significatif (fig. 24). Ce résultat suggère donc qu'ETV6 peut lier le promoteur du gène *SLCO2B1*, en plus de réguler son niveau d'expression.

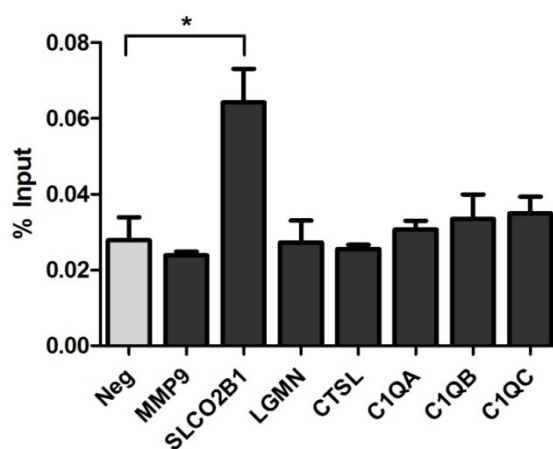


Figure 24. Immunoprécipitation de la chromatine dans des cellules CD34+ ETV6-HA en ciblant l'étiquette HA. L'enrichissement des gènes indiqués a été évalué par PCR en temps réel (n=1). Le promoteur du gène *SLCO2B1* est enrichi 2,3 fois par rapport au contrôle négatif (région intronique) de façon significative. Les différences statistiques ont été mesurées avec un test Mann-Whitney unilatéral (* = $p < 0,05$).

Chapitre 4. Discussion

4.1. ETV6 régule l'expression d'un grand nombre de gènes de façon directe ou indirecte

Dans ce projet, nous avons étudié l'impact d'un changement d'expression du facteur de transcription ETV6 sur le transcriptome de cellules souches hématopoïétiques CD34+. Cette étude a démontré que la modulation de l'expression d'ETV6 provoque un important changement dans le profil d'expression des gènes des cellules CD34+. Plus de 1500 gènes sont réprimés au moins 1,5 fois lorsque l'expression d'ETV6 est augmentée et environ 1600 gènes sont surexprimés suite à une diminution de l'expression du facteur de transcription. Parmi ceux-ci, 248 gènes sont co-modulés dans les deux conditions en fonction de l'expression d'ETV6, ce qui suggère qu'ETV6 est impliqué dans la régulation de ces gènes. À ce jour, seulement six cibles transcriptionnelles avaient été caractérisées. Toutefois, notre étude suggère qu'ETV6 peut participer à la régulation d'un grand nombre de gènes, de façon directe ou indirecte. En effet, la méthode utilisée ne permet pas de différencier les gènes dont l'expression est régulée de façon directe par ETV6, ceux qui sont plutôt régulés de façon indirecte et ceux dont l'expression est modulée via une cascade de régulation. On sait qu'ETV6 peut lier directement l'ADN via son domaine ETS et réprimer la transcription en recrutant certains co-répresseurs. Parmi ces co-répresseurs, on retrouve entre autres SMRT, Sin3A et N-CoR, qui recrutent à leur tour HDAC3 et HDAC9 [106-109]. Lorsque ce complexe est recruté au niveau d'une région régulatrice, il provoque la déacétylation de certains résidus sur les histones, ce qui engendre une condensation de la chromatine et la rend inaccessible à la machinerie transcriptionnelle. De plus, ETV6 pourrait agir comme un co-répresseur puisque la présence de mutations ponctuelles abolissant la liaison à l'ADN du domaine ETS et même l'ablation complète du domaine n'empêchent pas la répression transcriptionnelle médiée par ETV6 [103, 149]. Dans ce cas, ETV6 réprimerait plutôt la transcription via son recrutement par un autre facteur de transcription pouvant lier directement l'ADN. Finalement,

certaines gènes identifiés comme étant co-régulés avec ETV6 pourraient être modulés suite à une cascade de régulation. En effet, il est possible qu'ETV6 régule l'expression d'autres facteurs de transcription et protéines régulatrices, modifiant ainsi l'expression de leurs gènes cibles en aval. D'ailleurs, en faisant l'analyse inverse, c'est-à-dire en considérant les gènes dont l'expression est directement corrélée avec celle d'ETV6, on observe que 150 gènes semblent activés de façon significative par ETV6 (résultats non montrés). Étant donné la fonction de répresseur transcriptionnel d'ETV6, ces 150 gènes sont probablement des cibles secondaires, c'est-à-dire des gènes modulés via une cascade de régulation, mais on ne peut pas exclure la possibilité que certains d'entre eux soient des cibles directes.

Ceci démontre que la modulation de l'expression du facteur de transcription ETV6 affecte globalement le transcriptome des cellules CD34+, puisqu'en plus de réprimer l'expression de ses gènes cibles directs et indirects, ETV6 est impliqué dans la régulation positive et négative de certaines cibles secondaires via une cascade de régulation.

4.2. Les cibles potentielles d'ETV6 ne présentent pas d'enrichissement de motifs de liaison

Notre étude a démontré que les promoteurs proximaux des cibles potentielles d'ETV6 ne contiennent pas davantage de motifs consensus de liaison par rapport à des gènes dont l'expression est indépendante d'ETV6. Plusieurs facteurs pourraient expliquer ce résultat. Tout d'abord, il a été mentionné plus haut que les cibles potentielles identifiées par RNA-Seq pourraient être régulées de façon directe, indirecte ou via une cascade de régulation. On suppose donc que les gènes ne possèdent pas tous un motif de liaison d'ETV6, puisque seulement certains d'entre eux seraient directement liés par le facteur de transcription. Pour cette raison, il est possible qu'aucun enrichissement de motif ne soit détecté dans le sous-ensemble de gènes étudiés. Le résultat obtenu pourrait également s'expliquer du fait que

l'outil CentriMo détermine la présence d'un enrichissement par rapport à la position. En d'autres termes, cet algorithme permet seulement de mettre en évidence les motifs qui sont souvent présents au même endroit dans les séquences fournies. Or, aucune évidence n'indique qu'ETV6 se lie toujours au même endroit au sein d'une région régulatrice. Il faut également considérer que le motif consensus de liaison d'ETV6 a été déterminé par une méthode *in vitro* (discuté à la section 1.5.1). Ainsi, la séquence d'ADN liée spécifiquement par ETV6 dans un contexte *in vivo* pourrait différer.

Plusieurs facteurs peuvent donc expliquer qu'aucun enrichissement de motif de liaison n'a été détecté dans le promoteur des gènes cibles potentiels d'ETV6 à l'aide de CentriMo.

4.3. ETV6 régule l'expression de plusieurs cibles transcriptionnelles des facteurs Ets

On sait que les différents facteurs de la famille Ets ont des cibles transcriptionnelles communes [150]. Pour cette raison, nous avons vérifié si certains gènes identifiés dans notre étude étaient également régulés par d'autres facteurs Ets. Nous avons identifié plus d'une vingtaine de gènes pouvant être régulés à la fois par le répresseur transcriptionnel ETV6 et par d'autres facteurs de transcription Ets, qui sont plutôt des activateurs de la transcription (tableau XV). Puisque l'expression de SPI1, ETS1, ETS2, ETV4, ELK-1 et FLI-1 varie de façon négligeable lorsqu'on module ETV6 (annexe E), on peut croire qu'ETV6 est responsable de leur variation d'expression. En effet, il est possible qu'ETV6 régule ces gènes en compétitionnant avec les facteurs Ets. Par exemple, ETV6 pourrait interagir physiquement avec différents facteurs Ets via leur domaine PNT et bloquer l'activation de leurs gènes cibles par un mécanisme de séquestration ou encore en recrutant des co-répresseurs. Il a d'ailleurs été démontré qu'ETV6 peut former un hétérodimère avec FLI-1 et inhiber son activité transcriptionnelle [100, 151]. Par ailleurs, puisqu'ETV6 et les autres membres de la famille

Ets peuvent lier des séquences d'ADN très similaires, ETV6 pourrait occuper le site de liaison d'un facteur Ets sur l'ADN et ainsi empêcher son recrutement. Notre étude suggère qu'ETV6 réprimerait l'expression de gènes qui sont normalement activés par d'autres facteurs de transcription de la famille Ets.

Tableau XV. Liste des gènes pouvant être régulés par ETV6 et par d'autres facteurs Ets

Gène	Facteur Ets	Référence
<i>ACP5</i>	SPI1	[152, 153]
<i>CD163</i>	SPI1, ETS2	[154]
<i>CD4</i>	ETS1, ETS2	[155]
<i>CD40</i>	SPI1	[156]
<i>CHI3L1</i>	SPI1	[157]
<i>CSF1R</i>	ETS1, ETS2, SPI1	[158-163]
<i>CTSB</i>	ETS1	[164]
<i>CYBB</i>	SPI1	[165, 166]
<i>FGL2</i>	ETS1	[167, 168]
<i>HMOX1</i>	FLI1, ETS1	[169]
<i>HPSE</i>	ETS1, ETS2, ETV4	[170]
<i>ICAM1</i>	SPI1	[171]
<i>KCNMA1</i>	ELK1, ETV4, SPI1	[172]
<i>LTB</i>	ETS1	[173]
<i>MMP-9</i>	FLI1, ETS1, ETS2, ETV4	[174-182]
<i>MSR1</i>	SPI1, ETS1, ETS2	[183-185]
<i>NCF2</i>	SPI1	[186]
<i>NRG1</i>	ETV4	[187]
<i>NRP1</i>	ETS1	[188]
<i>S100A9</i>	SPI1	[189]
<i>SLC11A1</i>	ETV4, SPI1	[190-192]
<i>TGFBI</i>	ETS1	[193]
<i>THBD</i>	ETS1, ETS2	[194]

4.4. ETV6 peut lier le promoteur du gène *SLCO2B1* et réprimer son expression

Dans la première partie du projet, nous avons identifié plus de 200 gènes comme étant des cibles potentielles du facteur de transcription ETV6, puisque nous avons démontré que leur expression est inversement corrélée à celle d'ETV6. Parmi ceux-ci, les gènes *MMP-9*, *SLCO2B1*, *LGMN*, *CTSL*, *C1QA*, *C1QB* et *C1QC* montraient une très forte réponse suite à la variation d'ETV6. L'expression de ces sept gènes a d'ailleurs été confirmée par PCR en temps réel. Ensuite, nous avons tenté de mettre en évidence une liaison entre ETV6 et le promoteur proximal des sept gènes identifiés à l'aide d'une immunoprécipitation de la chromatine. Cette expérience a démontré qu'ETV6 est présent au niveau de la région régulatrice du gène *SLCO2B1*, codant pour un transporteur membranaire de molécules organiques. Il est important de considérer que le ChIP ne permet pas de distinguer une liaison directe d'une liaison indirecte, puisqu'un enrichissement sera détecté si la protéine d'intérêt est directement liée à l'ADN ou encore si la protéine est présente au sein d'un complexe protéique associé à la région promotrice. En d'autres mots, ETV6 pourrait lier directement le promoteur de *SLCO2B1*, mais il est possible qu'il agisse plutôt comme un co-répresseur impliqué dans un complexe de régulation.

L'absence d'enrichissement pour les gènes *MMP-9*, *LGMN*, *CTSL*, *C1QA*, *C1QB* et *C1QC* pourrait signifier qu'ETV6 n'interagit pas avec la région promotrice de ces gènes, mais il est possible que les amorces choisies pour effectuer l'amplification par PCR n'aient pas permis de détecter un enrichissement. On sait que certains facteurs de transcription se lient très près de la région codante, alors que d'autres se fixent à des régions plus éloignées. Dans le cas d'ETV6, aucune étude n'a permis de cartographier précisément la région où la protéine se lie pour réguler la transcription de ses cibles. Pour vérifier l'enrichissement des gènes *MMP-9*, *LGMN*, *CTSL*, *C1QA*, *C1QB* et *C1QC*, nous nous sommes concentrés sur les 1000 pb en

amont du site d'initiation de la transcription, en ciblant plus précisément une région contenant un ou plusieurs motifs consensus de liaison d'ETV6. Puisque cette méthode est purement empirique, il est possible que nous n'ayons pas ciblé la bonne région et ainsi, aucun enrichissement n'a pu être détecté. Pour pallier à ce problème, l'expérience pourrait être faite à nouveau en utilisant plusieurs paires d'amorces situées tout au long de la région régulatrice des gènes étudiés (*tiling*).

En résumé, notre étude démontre une liaison entre ETV6 et le promoteur de *SLCO2B1* (directe ou indirecte) et n'exclut pas la possibilité d'une liaison entre ETV6 et les gènes *MMP-9*, *LGMN*, *CTSL*, *C1QA*, *C1QB* et *C1QC*.

4.5. La délétion d'ETV6 contribuerait à la leucémogénèse

Nous avons mis en évidence qu'ETV6 peut réguler, directement ou indirectement, l'expression de 248 gènes. Puisqu'ETV6 est un répresseur transcriptionnel, on observe que l'expression de ces gènes est augmentée lorsqu'on réprime ETV6. Ceci suggère que la délétion d'*ETV6* dans la LAL pré-B provoquerait une activation aberrante de ces gènes. Parmi les 248 gènes identifiés, plusieurs sont impliqués dans des processus oncogéniques, notamment *SPHK1*, *MMP-9*, *C1QA*, *C1QB*, *C1QC*, *MAF* et *MAFB*. Ainsi, on soupçonne que la surexpression de ces gènes causée par la délétion d'*ETV6* pourrait participer à la progression de la leucémie.

4.5.1. *SPHK1*

Parmi les 248 gènes dont l'expression est modulée par ETV6, on retrouve notamment la sphingosine kinase 1 (*SPHK1*), qui a déjà été identifiée comme étant une cible transcriptionnelle d'ETV6 par notre groupe de recherche (annexe C). En effet, nous avons

récemment démontré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine que le facteur de transcription ETV6 est présent au niveau du promoteur proximal du gène *SPHK1* dans des cellules IM9 (lymphocytes B humains) et HeLa. Des expériences de gène rapporteur ont également démontré qu'ETV6 peut réprimer la transcription du promoteur de *SPHK1 in vitro* et que le gène semble être une cible directe, puisque le domaine de liaison à l'ADN d'ETV6 est nécessaire à la répression transcriptionnelle du promoteur de *SPHK1*.

À l'aide de la méthode de RNA-Seq, nous avons montré que le niveau d'expression de *SPHK1* est modifié lorsqu'ETV6 est surexprimé ou réprimé dans des cellules CD34+ (annexe F). Notre étude est donc la première à démontrer qu'ETV6 peut également réguler l'expression de *SPHK1* dans un contexte *in vivo*. Ceci vient renforcer l'hypothèse selon laquelle le gène *SPHK1* est une cible transcriptionnelle du facteur de transcription ETV6.

La sphingosine kinase 1 catalyse la phosphorylation de la sphingosine en sphingosine-1-phosphate (S1P). Le S1P est impliqué dans la régulation de plusieurs voies biologiques dont la différenciation cellulaire, la migration des lymphocytes, le maintien de l'intégrité vasculaire et la production de cytokines et de chimiokines [195]. De plus, il a été démontré que l'expression de *SPHK1* et son activité enzymatique sont favorables à la prolifération de cellules cancéreuses du sein (MCF-7) [196]. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ciblant l'activité enzymatique de *SPHK1* a également mis en évidence le rôle anti-apoptotique de *SPHK1* dans des cellules leucémiques U937 et Jurkat [197, 198]. Notre équipe a d'ailleurs confirmé que *SPHK1* agit comme un régulateur négatif de l'apoptose des lymphocytes pré-B leucémiques et qu'il favorise la prolifération cellulaire (annexe C). *SPHK1* agit donc comme un oncogène. Dans notre étude, nous avons démontré que l'expression de *SPHK1* est augmentée lorsque l'expression d'ETV6 est réprimée. L'ensemble de ces observations suggèrent que la délétion d'*ETV6*, via la translocation t(12;21), provoquerait la surexpression

de SPHK1 et contribuerait ainsi au développement de la LAL pré-B en favorisant la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose des cellules B immatures.

4.5.2. MMP-9

La métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9) est une endopeptidase capable de dégrader différentes composantes de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, dont le collagène et la gélatine. Cette enzyme est impliquée dans plusieurs processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, la réponse inflammatoire et l'angiogenèse. MMP-9 joue aussi un rôle essentiel dans les compartiments hématopoïétiques. En effet, la prolifération, la différenciation et la migration des cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont finement régulées par des interactions complexes entre les CSH et le microenvironnement de la moelle osseuse, contrôlées par de nombreuses cytokines et différentes protéines de la matrice extracellulaire [199, 200]. Normalement, les CSH sont maintenues en phase G0 par une interaction avec les cellules stromales de la moelle osseuse [201]. En présence d'un stimulus tel que le G-CSF ou l'IL-8, MMP-9 est activée par clivage et force les CSH à migrer à travers la membrane basale vers le sang périphérique [202-206]. Cette mobilisation est provoquée par plusieurs mécanismes contrôlés par MMP-9, soit le clivage du facteur de croissance KitL, la dégradation de la matrice extracellulaire et la surexpression du récepteur CXCR4, induisant ainsi un déséquilibre de l'axe SDF-1/CXCR4 (fig. 25) [207].

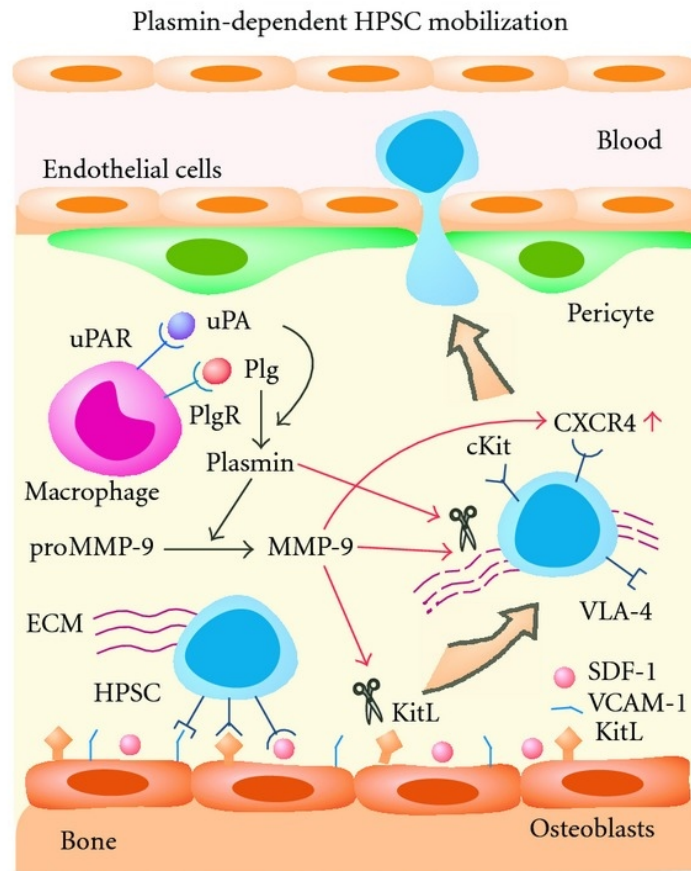


Figure 25. Mécanisme de mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans la circulation induite par la métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9). La plasmine active proMMP-9 et la forme active de MMP-9 clive ensuite le facteur de croissance KitL, dégrade les composantes de la matrice extracellulaire et provoque la surexpression du récepteur CXCR4, ce qui engendre la mobilisation des CSH dans la circulation sanguine. Tirée de Gong *et al.* 2012 [207].

Il a été démontré que la dérégulation de l'activité de MMP-9 peut influencer le comportement des CSH. En effet, la surexpression de cette enzyme favorise la mobilisation des cellules CD34+ [208, 209]. D'ailleurs, MMP-9 est souvent exprimée de façon aberrante dans les cas de leucémie et favorise ainsi les cellules cancéreuses à envahir le sang périphérique [210]. Dans notre étude, nous avons démontré que le gène *MMP-9* est très fortement régulé par ETV6 au niveau transcriptionnel. Nous croyons donc que la surexpression de MMP-9,

causée par la délétion d'ETV6, pourrait contribuer à la leucémogénèse en favorisant la mobilisation des cellules leucémiques vers le sang périphérique. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait d'abord confirmer que la surexpression du gène résulte en une augmentation de l'activité enzymatique de MMP-9 à l'aide d'une expérience de zymographie. Cette méthode permet d'évaluer la capacité d'une protéase à dégrader son substrat. Cette expérience est essentielle puisqu'on sait que MMP-9 est soumis à plusieurs niveaux de régulation. En effet, en plus d'être régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, la protéine est exprimée sous forme d'une pro-enzyme et nécessite un clivage enzymatique par la plasmine pour être active et exercer son activité catalytique [211]. En somme, si la surexpression de MMP-9 causée par ETV6 se traduit en une augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme, nous croyons que la dérégulation de MMP-9 contribuerait au développement de la LAL pré-B.

4.5.3. C1QA/C1QB/C1QC

Les gènes *C1QA*, *C1QB* et *C1QC* codent pour les trois sous-unités du complexe C1q, un acteur important du système du complément. Le système du complément est un mécanisme d'élimination des pathogènes faisant partie de l'immunité innée. Puisque la mobilisation des CSH de la moelle osseuse vers le sang périphérique fait partie d'une réponse systémique aux stress (infection, blessure, etc.), plusieurs composantes de l'immunité innée sont impliquées dans le mécanisme de mobilisation, dont le système du complément [212]. En effet, il a été démontré que l'activation du complément provoque la migration des CSH vers le sang périphérique [213-216]. Certaines évidences suggèrent que la sortie des CSH engendrée par l'activation du complément pourrait être due entre autres à une augmentation de l'activité de métalloprotéases telles que MMP-9 [217].

Notre étude a démontré que les gènes *C1QA*, *C1QB* et *C1QC* sont fortement régulés par ETV6. Le facteur de transcription peut également influencer l'expression de d'autres composantes du système du complément, dont C3 et C5AR1 (annexe D). Ainsi, nous croyons que la perte d'expression d'ETV6 dans la LAL pré-B pourrait activer de façon aberrante le système du complément et ainsi perturber le trafic des CSH. Cette dérégulation pourrait participer à la progression de la leucémie en provoquant la sortie des cellules cancéreuses de la moelle osseuse.

4.5.4. MAF/MAFB

Le gène *MAF* code pour un facteur de transcription. Des études de *knock-out* ont mis en évidence le rôle clé de MAF dans la différenciation terminale des chondrocytes et dans la différenciation des cellules T naïves CD4+ via la régulation de l'expression de la cytokine IL-4 [218-222]. MAF est également un oncogène impliqué dans différents cancers. Entre autres, MAF exerce un rôle causal dans le myélome multiple, où il est exprimé de façon aberrante [223]. Il a été démontré que la surexpression de MAF favorise la prolifération des cellules tumorales via l'induction de la cycline D2 (*CCND2*), qui fait partie d'un complexe essentiel à la transition G1/S lors de la mitose [224-226]. En effet, l'activation aberrante de la cycline D2 permet de contourner le point de contrôle G1/S et de compléter le cycle cellulaire malgré l'accumulation de dommages à l'ADN ou l'absence de signaux de croissance.

MAFB est également un facteur de transcription de la famille d'oncogènes MAF et il participe entre autres à la régulation de la différenciation hématopoïétique. Tout comme *MAF*, le gène *MAFB* est souvent altéré dans le myélome multiple. En effet, la translocation t(14;20) fusionne *MAFB* avec la région régulatrice de l'immunoglobuline H (IgH/*MAFB*), ce qui se résulte en une augmentation de l'expression de MAFB [227-229]. Ce réarrangement est

généralement associé à un mauvais pronostic [230]. On soupçonne que l'expression aberrante de *MAFB* soit impliquée dans la transformation oncogénique des cellules t(14;20)+, mais le mécanisme est encore peu connu [231]. Toutefois, on observe que la surexpression de *CCND2* est également caractéristique de la t(14;20) [232].

Notre étude de RNA-Seq a permis de mettre en évidence la corrélation entre l'expression d'*ETV6* et les gènes *MAF* et *MAFB* (annexe G). Nous croyons donc que la délétion d'*ETV6* dans la LAL pré-B pourrait provoquer la surexpression des gènes *MAF* et *MAFB* et ainsi participer au développement tumoral, en altérant le point de contrôle G1/S du cycle cellulaire lors de la mitose.

4.5.5. L'implication d'ETV6 dans la leucémogénèse

L'expérience de RNA-Seq réalisée dans des cellules souches hématopoïétiques CD34+ a mis en évidence l'implication du facteur de transcription ETV6 dans la régulation de plusieurs gènes ayant une fonction oncogénique. Nous proposons un modèle où la délétion d'ETV6, induite par la translocation t(12;21), contribue au développement de la LAL pré-B via la surexpression des gènes *SPHK1*, *MMP-9*, *C1QA*, *C1QB*, *C1QC*, *MAF* et *MAFB* (fig. 26).

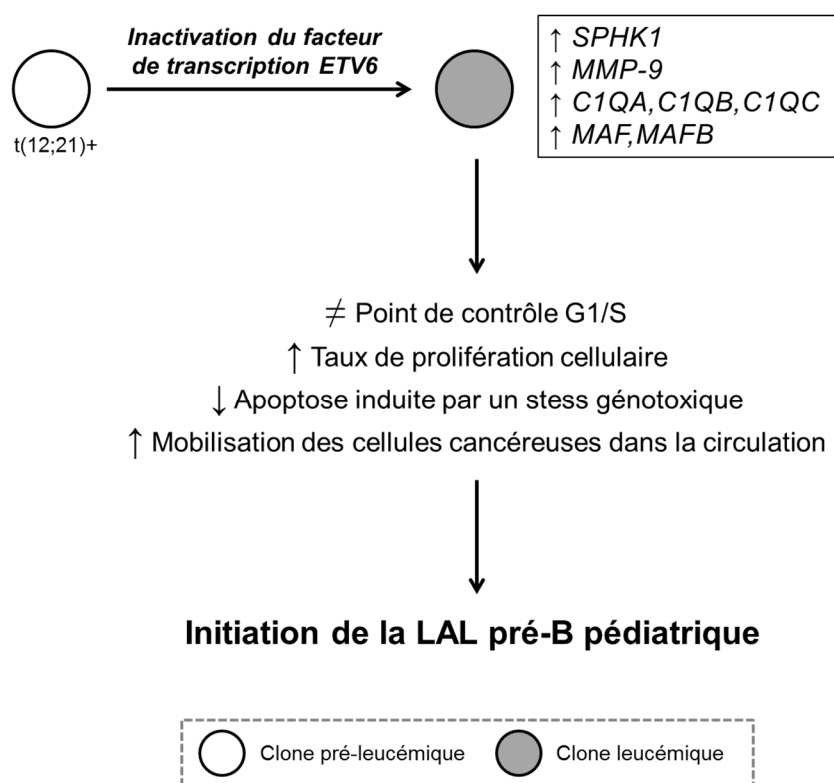


Figure 26. Modèle décrivant le rôle d'ETV6 dans l'initiation de la leucémogénèse pédiatrique.

L'inactivation du facteur de transcription ETV6 provoque la surexpression des gènes *SPHK1*, *MMP-9*, *C1QA*, *C1QB*, *C1QC*, *MAF* et *MAFB*. L'activation aberrante de ces gènes pourrait contribuer à abolir le point de contrôle G1/S de la mitose, augmenter le taux de prolifération cellulaire, diminuer l'apoptose induite par un stress génotoxique et favoriser la mobilisation des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine. ETV6 pourrait donc contribuer à l'initiation et à la progression de la leucémie aiguë lymphoblastique de type pré-B.

4.6. Travaux futurs

Cette étude avait pour but d'élucider le réseau de régulation du facteur de transcription ETV6. Nous avons identifié plus de 200 gènes dont l'expression semble dépendante d'ETV6. Toutefois, aucune conclusion n'a pu être tirée de l'expérience de ChIP-Seq, visant à caractériser les sites de liaison d'ETV6 dans le génome. Il serait intéressant de refaire cette expérience, puisqu'il s'agit d'une étape clé dans la compréhension de la fonction biologique d'ETV6.

Dans le but de comprendre l'impact de la délétion d'*ETV6* sur le développement de la LAL pré-B, il serait intéressant d'effectuer une validation fonctionnelle des cibles transcriptionnelles ayant un potentiel oncogénique. En d'autres mots, il faudrait déterminer l'effet d'une surexpression des gènes cibles d'ETV6 sur le phénotype des cellules souches hématopoïétiques et évaluer leur capacité à acquérir des caractéristiques cancéreuses. Pour y arriver, chaque gène d'intérêt doit être surexprimé dans des cellules CD34+ et on détermine ensuite l'impact sur la prolifération cellulaire, la progression du cycle cellulaire, la résistance à l'apoptose et la capacité de migration des cellules modifiées comparativement aux cellules contrôles.

Chapitre 5. Conclusion et perspectives

Mon projet de maîtrise contribue à la compréhension du réseau de régulation du facteur de transcription ETV6, qui est altéré dans plus de 25% des cas de LAL de type pré-B. Nous avons démontré qu'ETV6 peut moduler l'expression de 248 gènes dans des cellules souches hématopoïétiques CD34+. Notre étude suggère également que ce facteur de transcription est impliqué dans une multitude de voies biologiques, dont la réponse immunitaire et inflammatoire, la migration cellulaire, la signalisation intracellulaire et l'homéostasie ionique. Aucune étude réalisée jusqu'à présent n'avait décrit l'implication d'ETV6 dans ces différents processus cellulaires. Par ailleurs, nous avons montré que certains gènes peuvent être régulés par plusieurs facteurs Ets, dont ETV6. Une approche d'immunoprécipitation de la chromatine a également été mise en place afin de caractériser les gènes liés par le facteur de transcription ETV6. Cette expérience a permis d'identifier une nouvelle cible transcriptionnelle pouvant être liée par ETV6, soit le gène *SLCO2B1*.

À la lumière de nos observations, nous proposons que l'inactivation du facteur de transcription ETV6 pourrait contribuer à la leucémogénèse en provoquant la surexpression de plusieurs gènes ayant un potentiel oncogénique, notamment *SPHK1*, *MMP-9*, *C1QA*, *C1QB*, *C1QC*, *MAF* et *MAFB*. En effet, une activation aberrante de ces gènes augmenterait la prolifération cellulaire, favoriserait la sortie des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et rendrait les cellules résistantes à l'apoptose. Ces hypothèses devront toutefois être confirmées par des validations fonctionnelles. Une meilleure compréhension du rôle d'ETV6 dans la LAL pré-B permettrait finalement d'explorer de nouvelles avenues thérapeutiques plus ciblées et moins agressives.

Chapitre 6. Bibliographie

1. Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada: *Statistiques canadiennes sur le cancer 2008*. Toronto (Ontario). 2008
2. Comité consultatif de la Société canadienne du cancer: *Statistiques canadiennes sur le cancer 2013*. Toronto (Ontario). Société canadienne du cancer, 2013
3. Comité consultatif de la Société canadienne du cancer: *Statistiques canadiennes sur le cancer 2014*. Toronto (Ontario). Société canadienne du cancer, 2014
4. Larsson, J., and Karlsson, S. (2005) The role of Smad signaling in hematopoiesis, *Oncogene*, vol.24 p.5676-5692.
5. Inaba, H., Greaves, M., et al. (2013) Acute lymphoblastic leukaemia, *Lancet*, vol.381 p.1943-1955.
6. Greaves, M. (2006) Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia, *Nature reviews. Cancer*, vol.6 p.193-203.
7. Khalid, S., Moiz, B., et al. (2010) Retrospective review of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a single center experience, *Indian journal of pathology & microbiology*, vol.53 p.704-710.
8. Kumar, K., Kaur, J., et al. (2014) L-asparaginase: an effective agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia & lymphoma*, vol.55 p.256-262.
9. Pui, C. H., and Evans, W. E. (2013) A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia, *Seminars in hematology*, vol.50 p.185-196.
10. Robison, L. L. (2011) Late effects of acute lymphoblastic leukemia therapy in patients diagnosed at 0-20 years of age, *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, vol.2011 p.238-242.
11. Abu-Ouf, N. M., and Jan, M. M. (2014) Metabolic syndrome in the survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Obesity research & clinical practice*.
12. Bhatia, S. (2012) Long-term complications of therapeutic exposures in childhood: lessons learned from childhood cancer survivors, *Pediatrics*, vol.130 p.1141-1143.
13. Ness, K. K., Armenian, S. H., et al. (2011) Adverse effects of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia: general overview and implications for long-term cardiac health, *Expert review of hematology*, vol.4 p.185-197.
14. Winick, N. (2011) Neurocognitive outcome in survivors of pediatric cancer, *Current opinion in pediatrics*, vol.23 p.27-33.
15. Khan, R. B., Hudson, M. M., et al. (2014) Neurologic morbidity and quality of life in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a prospective cross-sectional study, *Journal of cancer survivorship : research and practice*.
16. Brassesco, M. S., Xavier, D. J., et al. (2011) Cytogenetic instability in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors, *Journal of biomedicine & biotechnology*, vol.2011.
17. Essig, S., Li, Q., et al. (2014) Risk of late effects of treatment in children newly diagnosed with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort, *The Lancet. Oncology*, vol.15 p.841-851.
18. Winick, N. J., McKenna, R. W., et al. (1993) Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol.11 p.209-217.
19. Loning, L., Zimmermann, M., et al. (2000) Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy, *Blood*, vol.95 p.2770-2775.

20. Tong, J., Qin, L., et al. (2012) Environmental radon exposure and childhood leukemia, *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, vol.15 p.332-347.
21. Greaves, M. F. (1997) Aetiology of acute leukaemia, *Lancet*, vol.349 p.344-349.
22. Mullighan, C. G., Goorha, S., et al. (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia, *Nature*, vol.446 p.758-764.
23. Trevino, L. R., Yang, W., et al. (2009) Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia, *Nature genetics*, vol.41 p.1001-1005.
24. Sherborne, A. L., Hosking, F. J., et al. (2010) Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk, *Nature genetics*, vol.42 p.492-494.
25. Miller, R. W. (1971) Deaths from childhood leukemia and solid tumors among twins and other sibs in the United States, 1960-67, *Journal of the National Cancer Institute*, vol.46 p.203-209.
26. Kende, G., Toren, A., et al. (1994) Familial leukemia: description of two kindreds and a review of the genetic aspects of the disease, *Acta haematologica*, vol.92 p.208-211.
27. Seif, A. E. (2011) Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis, *Cancer genetics*, vol.204 p.227-244.
28. Zhou, Y., You, M. J., et al. (2012) Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia, *Human pathology*, vol.43 p.1347-1362.
29. Harrison, C. J. (2009) Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia, *British journal of haematology*, vol.144 p.147-156.
30. Kearney, L. (2001) Molecular cytogenetics, *Best practice & research. Clinical haematology*, vol.14 p.645-669.
31. Scurto, P., Hsu Rocha, M., et al. (1998) A multiplex RT-PCR assay for the detection of chimeric transcripts encoded by the risk-stratifying translocations of pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, vol.12 p.1994-2005.
32. Pui, C. H., Carroll, W. L., et al. (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol.29 p.551-565.
33. Lo Nigro, L. (2013) Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Journal of pediatric hematology/oncology*, vol.35 p.245-252.
34. Rabbitts, T. H. (1994) Chromosomal translocations in human cancer, *Nature*, vol.372 p.143-149.
35. Look, A. T. (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias, *Science*, vol.278 p.1059-1064.
36. Rowley, J. D. (1998) The critical role of chromosome translocations in human leukemias, *Annual review of genetics*, vol.32 p.495-519.
37. McCulloch, E. A. (1983) Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982), *Blood*, vol.62 p.1-13.
38. Reya, T., Morrison, S. J., et al. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*, vol.414 p.105-111.
39. He, L. Z., Merghoub, T., et al. (1999) In vivo analysis of the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia in the mouse and its therapeutic implications, *Oncogene*, vol.18 p.5278-5292.
40. Rego, E. M., Wang, Z. G., et al. (2001) Role of promyelocytic leukemia (PML) protein in tumor suppression, *The Journal of experimental medicine*, vol.193 p.521-529.
41. Sattler, M., and Griffin, J. D. (2001) Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene, *International journal of hematology*, vol.73 p.278-291.

42. Klein, F., Feldhahn, N., et al. (2004) The BCR-ABL1 kinase bypasses selection for the expression of a pre-B cell receptor in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells, *The Journal of experimental medicine*, vol.199 p.673-685.
43. Klein, F., Feldhahn, N., et al. (2004) Interference of BCR-ABL1 kinase activity with antigen receptor signaling in B cell precursor leukemia cells, *Cell cycle*, vol.3 p.858-860.
44. Greaves, M. (1999) Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia, *European journal of cancer*, vol.35 p.173-185.
45. Meyers, S., Downing, J. R., 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, *Molecular and cellular biology*, vol.13 p.6336-6345.
46. Kagoshima, H., Shigesada, K., et al. (1993) The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators, *Trends in genetics : TIG*, vol.9 p.338-341.
47. Bae, S. C., Ogawa, E., et al. (1994) PEBP2 alpha B/mouse AML1 consists of multiple isoforms that possess differential transactivation potentials, *Molecular and cellular biology*, vol.14 p.3242-3252.
48. Tanaka, T., Tanaka, K., et al. (1995) An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms, *The EMBO journal*, vol.14 p.341-350.
49. Golub, T. R., Barker, G. F., et al. (1994) Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation, *Cell*, vol.77 p.307-316.
50. Romana, S. P., Le Coniat, M., et al. (1994) t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia, *Genes, chromosomes & cancer*, vol.9 p.186-191.
51. Fears, S., Vignon, C., et al. (1996) Correlation between the ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) fusion gene and karyotypic abnormalities in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, *Genes, chromosomes & cancer*, vol.17 p.127-135.
52. Romana, S. P., Poirel, H., et al. (1995) High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, vol.86 p.4263-4269.
53. Pui, C. H., Mullighan, C. G., et al. (2012) Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?, *Blood*, vol.120 p.1165-1174.
54. Romana, S. P., Mauchauffe, M., et al. (1995) The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion, *Blood*, vol.85 p.3662-3670.
55. Golub, T. R., Barker, G. F., et al. (1995) Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.92 p.4917-4921.
56. Greaves, M. F., Maia, A. T., et al. (2003) Leukemia in twins: lessons in natural history, *Blood*, vol.102 p.2321-2333.
57. Greaves, M. (2003) Pre-natal origins of childhood leukemia, *Reviews in clinical and experimental hematology*, vol.7 p.233-245.
58. Greaves, M. F., and Wiemels, J. (2003) Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia, *Nature reviews. Cancer*, vol.3 p.639-649.
59. Ford, A. M., Bennett, C. A., et al. (1998) Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.95 p.4584-4588.
60. Wiemels, J. L., Cazzaniga, G., et al. (1999) Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children, *Lancet*, vol.354 p.1499-1503.

61. Wiemels, J. L., Ford, A. M., et al. (1999) Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero, *Blood*, vol.94 p.1057-1062.
62. Maia, A. T., Ford, A. M., et al. (2001) Molecular tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy, *Blood*, vol.98 p.478-482.
63. Clarkson, B. D., and Boyse, E. A. (1971) Possible explanation of the high concordance for acute leukaemia in monozygotic twins, *Lancet*, vol.1 p.699-701.
64. Hjalgrim, L. L., Madsen, H. O., et al. (2002) Presence of clone-specific markers at birth in children with acute lymphoblastic leukaemia, *British journal of cancer*, vol.87 p.994-999.
65. Gale, K. B., Ford, A. M., et al. (1997) Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.94 p.13950-13954.
66. Hong, D., Gupta, R., et al. (2008) Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia, *Science*, vol.319 p.336-339.
67. Kong, Y., Yoshida, S., et al. (2008) CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL, *Leukemia*, vol.22 p.1207-1213.
68. Eguchi-Ishimae, M., Eguchi, M., et al. (2001) Breakage and fusion of the TEL (ETV6) gene in immature B lymphocytes induced by apoptogenic signals, *Blood*, vol.97 p.737-743.
69. Thompson, J. R., Gerald, P. F., et al. (2001) Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukaemia in childhood: a case-control study, *Lancet*, vol.358 p.1935-1940.
70. Strick, R., Strissel, P. L., et al. (2000) Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.97 p.4790-4795.
71. Smith, M. T., Wang, Y., et al. (2002) Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children, *Blood*, vol.100 p.4590-4593.
72. Alexander, F. E., Patheal, S. L., et al. (2001) Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion, *Cancer research*, vol.61 p.2542-2546.
73. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell*, vol.100 p.57-70.
74. Bernardin, F., Yang, Y., et al. (2002) TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice, *Cancer research*, vol.62 p.3904-3908.
75. Fuka, G., Kantner, H. P., et al. (2012) Silencing of ETV6/RUNX1 abrogates PI3K/AKT/mTOR signaling and impairs reconstitution of leukemia in xenografts, *Leukemia*, vol.26 p.927-933.
76. Andreasson, P., Schwaller, J., et al. (2001) The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo, *Cancer genetics and cytogenetics*, vol.130 p.93-104.
77. Mori, H., Colman, S. M., et al. (2002) Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.99 p.8242-8247.
78. Morrow, M., Horton, S., et al. (2004) TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity, *Blood*, vol.103 p.3890-3896.

79. Maia, A. T., Koechling, J., et al. (2004) Protracted postnatal natural histories in childhood leukemia, *Genes, chromosomes & cancer*, vol.39 p.335-340.
80. Tsuzuki, S., Seto, M., et al. (2004) Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.101 p.8443-8448.
81. Hiebert, S. W., Sun, W., et al. (1996) The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription, *Molecular and cellular biology*, vol.16 p.1349-1355.
82. Ichikawa, M., Goyama, S., et al. (2008) AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis, *Journal of immunology*, vol.180 p.4402-4408.
83. Prigogina, E. L., Puchkova, G. P., et al. (1988) Nonrandom chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia of childhood, *Cancer genetics and cytogenetics*, vol.32 p.183-203.
84. Johansson, B., Mertens, F., et al. (1993) Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci, *Genes, chromosomes & cancer*, vol.8 p.205-218.
85. Raimondi, S. C. (1993) Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, vol.81 p.2237-2251.
86. Baccichet, A., Qualman, S. K., et al. (1997) Allelic loss in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia research*, vol.21 p.817-823.
87. Takeuchi, S., Bartram, C. R., et al. (1995) Allelotype analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Cancer research*, vol.55 p.5377-5382.
88. Montpetit, A., Boily, G., et al. (2002) A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus, *European journal of human genetics : EJHG*, vol.10 p.62-71.
89. Montpetit, A., Larose, J., et al. (2004) Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, vol.18 p.1499-1504.
90. Patel, N., Goff, L. K., et al. (2003) Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia, *British journal of haematology*, vol.122 p.94-98.
91. Romana, S. P., Le Coniat, M., et al. (1996) Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21), *Leukemia*, vol.10 p.167-170.
92. Stegmaier, K., Pendse, S., et al. (1995) Frequent loss of heterozygosity at the TEL gene locus in acute lymphoblastic leukemia of childhood, *Blood*, vol.86 p.38-44.
93. Agape, P., Gerard, B., et al. (1997) Analysis of ETV6 and ETV6-AML1 proteins in acute lymphoblastic leukaemia, *British journal of haematology*, vol.98 p.234-239.
94. Crepieux, P., Coll, J., et al. (1994) The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners, *Critical reviews in oncogenesis*, vol.5 p.615-638.
95. Oikawa, T., and Yamada, T. (2003) Molecular biology of the Ets family of transcription factors, *Gene*, vol.303 p.11-34.
96. Baens, M., Peeters, P., et al. (1996) Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6, *Genome research*, vol.6 p.404-413.
97. Poirel, H., Oury, C., et al. (1997) The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties, *Oncogene*, vol.14 p.349-357.
98. Lopez, R. G., Carron, C., et al. (1999) TEL is a sequence-specific transcriptional repressor, *The Journal of biological chemistry*, vol.274 p.30132-30138.

99. Jolma, A., Yan, J., et al. (2013) DNA-binding specificities of human transcription factors, *Cell*, vol.152 p.327-339.
100. Kwiatkowski, B. A., Bastian, L. S., et al. (1998) The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity, *The Journal of biological chemistry*, vol.273 p.17525-17530.
101. Jousset, C., Carron, C., et al. (1997) A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein, *The EMBO journal*, vol.16 p.69-82.
102. Bocconi, P., MacGrogan, D., et al. (2003) The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6), *The Journal of biological chemistry*, vol.278 p.15412-15420.
103. Schick, N., Oakeley, E. J., et al. (2004) TEL/ETV6 is a signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)-induced repressor of Stat3 activity, *The Journal of biological chemistry*, vol.279 p.38787-38796.
104. Poirel, H., Lopez, R. G., et al. (2000) Characterization of a novel ETS gene, TELB, encoding a protein structurally and functionally related to TEL, *Oncogene*, vol.19 p.4802-4806.
105. Potter, M. D., Buijs, A., et al. (2000) Identification and characterization of a new human ETS-family transcription factor, TEL2, that is expressed in hematopoietic tissues and can associate with TEL1/ETV6, *Blood*, vol.95 p.3341-3348.
106. Chakrabarti, S. R., and Nucifora, G. (1999) The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A, *Biochemical and biophysical research communications*, vol.264 p.871-877.
107. Guidez, F., Petrie, K., et al. (2000) Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein, *Blood*, vol.96 p.2557-2561.
108. Petrie, K., Guidez, F., et al. (2003) The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms, *The Journal of biological chemistry*, vol.278 p.16059-16072.
109. Wang, L., and Hiebert, S. W. (2001) TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3, *Oncogene*, vol.20 p.3716-3725.
110. Nordentoft, I., and Jorgensen, P. (2003) The acetyltransferase 60 kDa trans-acting regulatory protein of HIV type 1-interacting protein (Tip60) interacts with the translocation E26 transforming-specific leukaemia gene (TEL) and functions as a transcriptional co-repressor, *The Biochemical journal*, vol.374 p.165-173.
111. Putnik, J., Zhang, C. D., et al. (2007) The interaction of ETV6 (TEL) and TIP60 requires a functional histone acetyltransferase domain in TIP60, *Biochimica et biophysica acta*, vol.1772 p.1211-1224.
112. Park, H., Seo, Y., et al. (2006) Identification of the nuclear localization motif in the ETV6 (TEL) protein, *Cancer genetics and cytogenetics*, vol.167 p.117-121.
113. Chakrabarti, S. R., Sood, R., et al. (1999) Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.96 p.7467-7472.
114. Chakrabarti, S. R., Sood, R., et al. (2000) Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.97 p.13281-13285.
115. Wood, L. D., Irvin, B. J., et al. (2003) Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.100 p.3257-3262.

116. Roukens, M. G., Alloul-Ramdhani, M., et al. (2008) Identification of a new site of sumoylation on Tel (ETV6) uncovers a PIAS-dependent mode of regulating Tel function, *Molecular and cellular biology*, vol.28 p.2342-2357.
117. Arai, H., Maki, K., et al. (2002) Functional regulation of TEL by p38-induced phosphorylation, *Biochemical and biophysical research communications*, vol.299 p.116-125.
118. Wang, L. C., Kuo, F., et al. (1997) Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL, *The EMBO journal*, vol.16 p.4374-4383.
119. Wang, L. C., Swat, W., et al. (1998) The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow, *Genes & development*, vol.12 p.2392-2402.
120. Hock, H., Meade, E., et al. (2004) Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival, *Genes & development*, vol.18 p.2336-2341.
121. Yamagata, T., Maki, K., et al. (2006) TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways, *Biochemical and biophysical research communications*, vol.347 p.517-526.
122. Rompaey, L. V., Potter, M., et al. (2000) Tel induces a G1 arrest and suppresses Ras-induced transformation, *Oncogene*, vol.19 p.5244-5250.
123. Fenrick, R., Wang, L., 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, *Molecular and cellular biology*, vol.20 p.5828-5839.
124. Papadopoulos, P., Ridge, S. A., et al. (1995) The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL, *Cancer research*, vol.55 p.34-38.
125. Lacronique, V., Boureux, A., et al. (1997) A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia, *Science*, vol.278 p.1309-1312.
126. Peeters, P., Raynaud, S. D., et al. (1997) Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia, *Blood*, vol.90 p.2535-2540.
127. De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., et al. (2012) ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review, *Leukemia research*, vol.36 p.945-961.
128. Zhang, D. E., Hetherington, C. J., et al. (1996) CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter, *Molecular and cellular biology*, vol.16 p.1231-1240.
129. Fears, S., Gavin, M., et al. (1997) Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.94 p.1949-1954.
130. Irvin, B. J., Wood, L. D., et al. (2003) TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL, *The Journal of biological chemistry*, vol.278 p.46378-46386.
131. Powers, N. R., Eicher, J. D., et al. (2013) Alleles of a polymorphic ETV6 binding site in DCDC2 confer risk of reading and language impairment, *American journal of human genetics*, vol.93 p.19-28.
132. Han, H., Nutiu, R., et al. (2011) SnapShot: High-throughput sequencing applications, *Cell*, vol.146 p.1044, 1044 e1041-1042.
133. Malone, J. H., and Oliver, B. (2011) Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome, *BMC biology*, vol.9 p.34.
134. Park, P. J. (2009) ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology, *Nature reviews. Genetics*, vol.10 p.669-680.

135. Altschul, S. F., Gish, W., et al. (1990) Basic local alignment search tool, *Journal of molecular biology*, vol.215 p.403-410.
136. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, vol.25 p.402-408.
137. Andrews, S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available at <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
138. Dobin, A., Davis, C. A., et al. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, vol.29 p.15-21.
139. Anders, S., Pyl, P. T., et al. (2014) HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data, *Bioinformatics*.
140. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., et al. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics*, vol.26 p.139-140.
141. Huang, D. W., Sherman, B. T., et al. (2007) DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists, *Nucleic acids research*, vol.35 p.W169-175.
142. Kasprzyk, A. (2011) BioMart: driving a paradigm change in biological data management, *Database : the journal of biological databases and curation*, vol.2011 p.bar049.
143. Bailey, T. L., and Machanick, P. (2012) Inferring direct DNA binding from ChIP-seq, *Nucleic acids research*, vol.40 p.e128.
144. Lassmann, T., Hayashizaki, Y., et al. (2011) SAMStat: monitoring biases in next generation sequencing data, *Bioinformatics*, vol.27 p.130-131.
145. Zhang, Y., Liu, T., et al. (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS), *Genome biology*, vol.9 p.R137.
146. Grant, C. E., Bailey, T. L., et al. (2011) FIMO: scanning for occurrences of a given motif, *Bioinformatics*, vol.27 p.1017-1018.
147. Boily, G., Larose, J., et al. (2007) Identification of transcripts modulated by ETV6 expression, *British journal of haematology*, vol.136 p.48-62.
148. Riviere, I., Dunbar, C. E., et al. (2012) Hematopoietic stem cell engineering at a crossroads, *Blood*, vol.119 p.1107-1116.
149. Kuwata, T., Gongora, C., et al. (2002) Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element, *Molecular and cellular biology*, vol.22 p.7439-7448.
150. Sementchenko, V. I., and Watson, D. K. (2000) Ets target genes: past, present and future, *Oncogene*, vol.19 p.6533-6548.
151. Kwiatkowski, B. A., Zielinska-Kwiatkowska, A. G., et al. (2000) The ETS family member Tel antagonizes the Fli-1 phenotype in hematopoietic cells, *Blood cells, molecules & diseases*, vol.26 p.84-90.
152. Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., et al. (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc, *Nucleic acids research*, vol.29 p.397-406.
153. Fernandez, P. C., Frank, S. R., et al. (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein, *Genes & development*, vol.17 p.1115-1129.
154. Ritter, M., Buechler, C., et al. (1999) The scavenger receptor CD163: regulation, promoter structure and genomic organization, *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, vol.67 p.257-261.
155. Salmon, P., Giovane, A., et al. (1993) Characterization of the human CD4 gene promoter: transcription from the CD4 gene core promoter is tissue-specific and is

- activated by Ets proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.90 p.7739-7743.
156. Nguyen, V. T., and Benveniste, E. N. (2000) Involvement of STAT-1 and ets family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages, *The Journal of biological chemistry*, vol.275 p.23674-23684.
 157. Rehli, M., Niller, H. H., et al. (2003) Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation, *The Journal of biological chemistry*, vol.278 p.44058-44067.
 158. Reddy, M. A., Yang, B. S., et al. (1994) Opposing actions of c-ets/PU.1 and c-myb protooncogene products in regulating the macrophage-specific promoters of the human and mouse colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms) genes, *The Journal of experimental medicine*, vol.180 p.2309-2319.
 159. Ross, I. L., Yue, X., et al. (1998) Interaction between PU.1 and another Ets family transcription factor promotes macrophage-specific Basal transcription initiation, *The Journal of biological chemistry*, vol.273 p.6662-6669.
 160. Hume, D. A., Yue, X., et al. (1997) Regulation of CSF-1 receptor expression, *Molecular reproduction and development*, vol.46 p.46-52; discussion 52-43.
 161. Zhang, D. E., Hetherington, C. J., et al. (1994) The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor, *Molecular and cellular biology*, vol.14 p.373-381.
 162. Zhang, D. E., Hohaus, S., et al. (1996) Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters, *Current topics in microbiology and immunology*, vol.211 p.137-147.
 163. Inaba, T., Gotoda, T., et al. (1996) Transcription factor PU.1 mediates induction of c-fms in vascular smooth muscle cells: a mechanism for phenotypic change to phagocytic cells, *Molecular and cellular biology*, vol.16 p.2264-2273.
 164. Yan, S., Berquin, I. M., et al. (2000) Transcription of human cathepsin B is mediated by Sp1 and Ets family factors in glioma, *DNA and cell biology*, vol.19 p.79-91.
 165. Voo, K. S., and Skalnik, D. G. (1999) E1f-1 and PU.1 induce expression of gp91(phox) via a promoter element mutated in a subset of chronic granulomatous disease patients, *Blood*, vol.93 p.3512-3520.
 166. Islam, M. R., Fan, C., et al. (2002) PU.1 is dominant and HAF-1 supplementary for activation of the gp91(phox) promoter in human monocytic PLB-985 cells, *Journal of biochemistry*, vol.131 p.533-540.
 167. Yuwaraj, S., Ding, J., et al. (2001) Genomic characterization, localization, and functional expression of FGL2, the human gene encoding fibroleukin: a novel human procoagulant, *Genomics*, vol.71 p.330-338.
 168. Liu, M., Leibowitz, J. L., et al. (2003) Gene transcription of fgl2 in endothelial cells is controlled by Ets-1 and Oct-1 and requires the presence of both Sp1 and Sp3, *European journal of biochemistry / FEBS*, vol.270 p.2274-2286.
 169. Deramandt, B. M., Remy, P., et al. (1999) Upregulation of human heme oxygenase gene expression by Ets-family proteins, *Journal of cellular biochemistry*, vol.72 p.311-321.
 170. Lu, W. C., Liu, Y. N., et al. (2003) Trans-activation of heparanase promoter by ETS transcription factors, *Oncogene*, vol.22 p.919-923.
 171. de Launoit, Y., Audette, M., et al. (1998) The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors, *Oncogene*, vol.16 p.2065-2073.
 172. Dhulipala, P. D., and Kotlikoff, M. I. (1999) Cloning and characterization of the promoters of the maxiK channel alpha and beta subunits, *Biochimica et biophysica acta*, vol.1444 p.254-262.

173. Kuprash, D. V., Osipovich, O. A., et al. (1996) Functional analysis of the lymphotoxin-beta promoter. Sequence requirements for PMA activation, *Journal of immunology*, vol.156 p.2465-2472.
174. Yabe, H., Fukuma, M., et al. (2002) Lack of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and -3 expression in Ewing sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo, *Biochemical and biophysical research communications*, vol.293 p.61-71.
175. Behrens, P., Rothe, M., et al. (2001) The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer, *The Journal of pathology*, vol.194 p.43-50.
176. Dittmer, J. (2003) The biology of the Ets1 proto-oncogene, *Molecular cancer*, vol.2 p.29.
177. Nakamura, Y., Esnault, S., et al. (2004) Ets-1 regulates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 and tenascin expression in primary bronchial fibroblasts, *Journal of immunology*, vol.172 p.1945-1952.
178. Watabe, T., Yoshida, K., et al. (1998) The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol.77 p.128-137.
179. Tsang, K. J., and Crowe, D. L. (2001) Retinoic acid and extracellular matrix inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression is mediated by the mitogen activated protein kinase pathway, *International journal of oncology*, vol.18 p.369-374.
180. Tremble, P., Damsky, C. H., et al. (1995) Components of the nuclear signaling cascade that regulate collagenase gene expression in response to integrin-derived signals, *The Journal of cell biology*, vol.129 p.1707-1720.
181. Gum, R., Lengyel, E., et al. (1996) Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences, *The Journal of biological chemistry*, vol.271 p.10672-10680.
182. He, C. (1996) Molecular mechanism of transcriptional activation of human gelatinase B by proximal promoter, *Cancer letters*, vol.106 p.185-191.
183. Wu, H., Moulton, K., et al. (1994) Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene, *Molecular and cellular biology*, vol.14 p.2129-2139.
184. Mietus-Snyder, M., Glass, C. K., et al. (1998) Transcriptional activation of scavenger receptor expression in human smooth muscle cells requires AP-1/c-Jun and C/EBPbeta: both AP-1 binding and JNK activation are induced by phorbol esters and oxidative stress, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol.18 p.1440-1449.
185. Horvai, A., Palinski, W., et al. (1995) Scavenger receptor A gene regulatory elements target gene expression to macrophages and to foam cells of atherosclerotic lesions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.92 p.5391-5395.
186. Nakatsu, M., Doshi, M., et al. (2005) Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells, *International journal of hematology*, vol.81 p.32-38.
187. Bieche, I., Tozlu, S., et al. (2004) Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression, *Carcinogenesis*, vol.25 p.405-411.

188. Teruyama, K., Abe, M., et al. (2001) Neurophilin-1 is a downstream target of transcription factor Ets-1 in human umbilical vein endothelial cells, *FEBS letters*, vol.504 p.1-4.
189. Henkel, G. W., McKercher, S. R., et al. (2002) Identification of three genes up-regulated in PU.1 rescued monocytic precursor cells, *International immunology*, vol.14 p.723-732.
190. Marquet, S., Lepage, P., et al. (2000) Complete nucleotide sequence and genomic structure of the human NRAMP1 gene region on chromosome region 2q35, *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, vol.11 p.755-762.
191. Alter-Koltunoff, M., Ehrlich, S., et al. (2003) Nramp1-mediated innate resistance to intraphagosomal pathogens is regulated by IRF-8, PU.1, and Miz-1, *The Journal of biological chemistry*, vol.278 p.44025-44032.
192. Blackwell, J. M., Barton, C. H., et al. (1995) Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism, *Molecular medicine*, vol.1 p.194-205.
193. Hahne, J. C., Okuducu, A. F., et al. (2011) Identification of ETS-1 target genes in human fibroblasts, *International journal of oncology*, vol.38 p.1645-1652.
194. von der Ahe, D., Nischan, C., et al. (1993) Ets transcription factor binding site is required for positive and TNF alpha-induced negative promoter regulation, *Nucleic acids research*, vol.21 p.5636-5643.
195. Spiegel, S., and Milstien, S. (2011) The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity, *Nature reviews. Immunology*, vol.11 p.403-415.
196. Sarkar, S., Maceyka, M., et al. (2005) Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells, *FEBS letters*, vol.579 p.5313-5317.
197. Gude, D. R., Alvarez, S. E., et al. (2008) Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol.22 p.2629-2638.
198. Paugh, S. W., Paugh, B. S., et al. (2008) A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia, *Blood*, vol.112 p.1382-1391.
199. Chaudhary, A. K., Pandya, S., et al. (2013) Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: an overview, *Mutation research*, vol.753 p.7-23.
200. Yu, X. F., and Han, Z. C. (2006) Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies, *Histology and histopathology*, vol.21 p.519-531.
201. Cheng, T., Rodrigues, N., et al. (2000) Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1, *Science*, vol.287 p.1804-1808.
202. Carion, A., Benboubker, L., et al. (2003) Stromal-derived factor 1 and matrix metalloproteinase 9 levels in bone marrow and peripheral blood of patients mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and chemotherapy. Relationship with mobilizing capacity of haematopoietic progenitor cells, *British journal of haematology*, vol.122 p.918-926.
203. Fibbe, W. E., Pruijt, J. F., et al. (1999) Biology of IL-8-induced stem cell mobilization, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol.872 p.71-82.

204. Jin, F., Zhai, Q., et al. (2008) Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization, *Bone marrow transplantation*, vol.42 p.581-588.
205. Pelus, L. M., Bian, H., et al. (2004) Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4, *Blood*, vol.103 p.110-119.
206. Heissig, B., Hattori, K., et al. (2002) Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand, *Cell*, vol.109 p.625-637.
207. Gong, Y., and Hoover-Plow, J. (2012) The plasminogen system in regulating stem cell mobilization, *Journal of biomedicine & biotechnology*, vol.2012 p.437920.
208. Bailon, E., Ugarte-Berzal, E., et al. (2014) Overexpression of progelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen, *Journal of leukocyte biology*.
209. Carstanjen, D., Ulbricht, N., et al. (2002) Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is elevated during mobilization of peripheral blood progenitor cells by G-CSF, *Transfusion*, vol.42 p.588-596.
210. Travaglio, E., Benatti, C., et al. (2008) Biological and clinical relevance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes, *European journal of haematology*, vol.80 p.216-226.
211. Gong, Y., Fan, Y., et al. (2011) Plasminogen regulates stromal cell-derived factor-1/CXCR4-mediated hematopoietic stem cell mobilization by activation of matrix metalloproteinase-9, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol.31 p.2035-2043.
212. Ratajczak, M. Z., Kim, C. H., et al. (2010) Innate immunity as orchestrator of stem cell mobilization, *Leukemia*, vol.24 p.1667-1675.
213. Ratajczak, M. Z., Borkowska, S., et al. (2013) An emerging link in stem cell mobilization between activation of the complement cascade and the chemotactic gradient of sphingosine-1-phosphate, *Prostaglandins & other lipid mediators*, vol.104-105 p.122-129.
214. Ratajczak, M. Z., Wysoczynski, M., et al. (2008) A pivotal role of activation of complement cascade (CC) in mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC), *Advances in experimental medicine and biology*, vol.632 p.47-60.
215. Ratajczak, M. Z., Reca, R., et al. (2004) Transplantation studies in C3-deficient animals reveal a novel role of the third complement component (C3) in engraftment of bone marrow cells, *Leukemia*, vol.18 p.1482-1490.
216. Reca, R., Cramer, D., et al. (2007) A novel role of complement in mobilization: immunodeficient mice are poor granulocyte-colony stimulating factor mobilizers because they lack complement-activating immunoglobulins, *Stem cells*, vol.25 p.3093-3100.
217. Jalili, A., Marquez-Curtis, L., et al. (2010) Complement C1q enhances homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells, *Transfusion*, vol.50 p.2002-2010.
218. Ho, I. C., Hodge, M. R., et al. (1996) The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4, *Cell*, vol.85 p.973-983.
219. Ho, I. C., Lo, D., et al. (1998) c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms, *The Journal of experimental medicine*, vol.188 p.1859-1866.

220. MacLean, H. E., Kim, J. I., et al. (2003) Absence of transcription factor c-maf causes abnormal terminal differentiation of hypertrophic chondrocytes during endochondral bone development, *Developmental biology*, vol.262 p.51-63.
221. Tanaka, Y., So, T., et al. (2005) Impaired IL-4 and c-Maf expression and enhanced Th1-cell development in Vav1-deficient mice, *Blood*, vol.106 p.1286-1295.
222. Kim, J. I., Ho, I. C., et al. (1999) The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines, *Immunity*, vol.10 p.745-751.
223. Kienast, J., and Berdel, W. E. (2004) c-maf in multiple myeloma: an oncogene enhancing tumor-stroma interactions, *Cancer cell*, vol.5 p.109-110.
224. Bergsagel, P. L., and Kuehl, W. M. (2003) Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma, *Immunological reviews*, vol.194 p.96-104.
225. Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., et al. (2005) Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma, *Blood*, vol.106 p.296-303.
226. Morito, N., Yoh, K., et al. (2006) Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human, *Cancer research*, vol.66 p.812-819.
227. Boersma-Vreugdenhil, G. R., Kuipers, J., et al. (2004) The recurrent translocation t(14;20)(q32;q12) in multiple myeloma results in aberrant expression of MAFB: a molecular and genetic analysis of the chromosomal breakpoint, *British journal of haematology*, vol.126 p.355-363.
228. Fabris, S., Agnelli, L., et al. (2005) Characterization of oncogene dysregulation in multiple myeloma by combined FISH and DNA microarray analyses, *Genes, chromosomes & cancer*, vol.42 p.117-127.
229. Hanamura, I., Iida, S., et al. (2001) Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations, *Japanese journal of cancer research : Gann*, vol.92 p.638-644.
230. Ross, F. M., Chiecchio, L., et al. (2010) The t(14;20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance, *Haematologica*, vol.95 p.1221-1225.
231. Vicente-Duenas, C., Romero-Camarero, I., et al. (2012) A novel molecular mechanism involved in multiple myeloma development revealed by targeting MafB to haematopoietic progenitors, *The EMBO journal*, vol.31 p.3704-3717.
232. Wiernik, P. H., Goldman, J.M., Dutcher, J., Kyle, R.A. (2013) *Neoplastic Diseases of the Blood*, 5th ed., Springer. p.625

Chapitre 7. Annexes

Annexe A

Plusieurs constructions ont été testées pour moduler l'expression du facteur de transcription ETV6 (section 3.2.2). Les constructions qui ont été testées mais qui n'ont pas été utilisées dans l'étude, en raison de leur faible efficacité, sont représentées ci-dessous (fig. 27-32). Les séquences des ARN interférants testés pour réprimer l'expression d'ETV6 sont également présentées (tableau XVI).

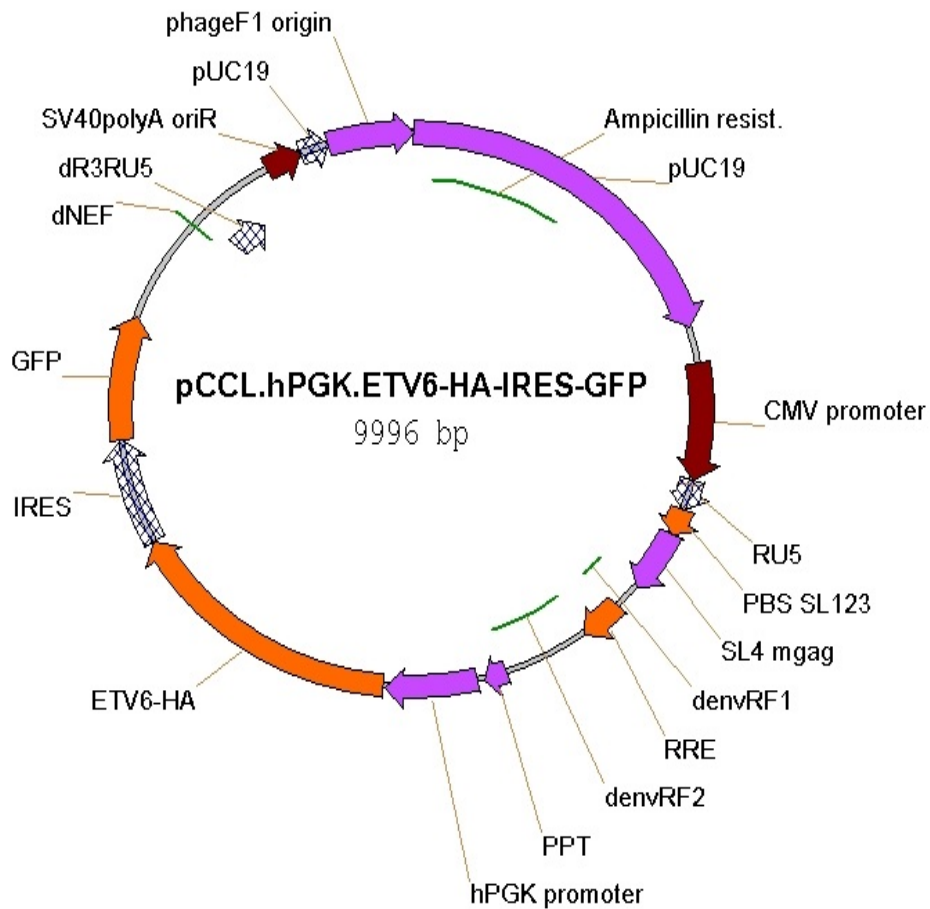


Figure 27. Schéma du vecteur lentiviral pCCL.hPGK.ETV6-HA-IRES-GFP. Le vecteur a été produit en remplaçant la séquence de la GFP par ETV6-HA-IRES-GFP dans le vecteur pCCL.hPGK.GFP. Le sous-clonage a été fait à l'aide d'une digestion par enzyme de restriction.

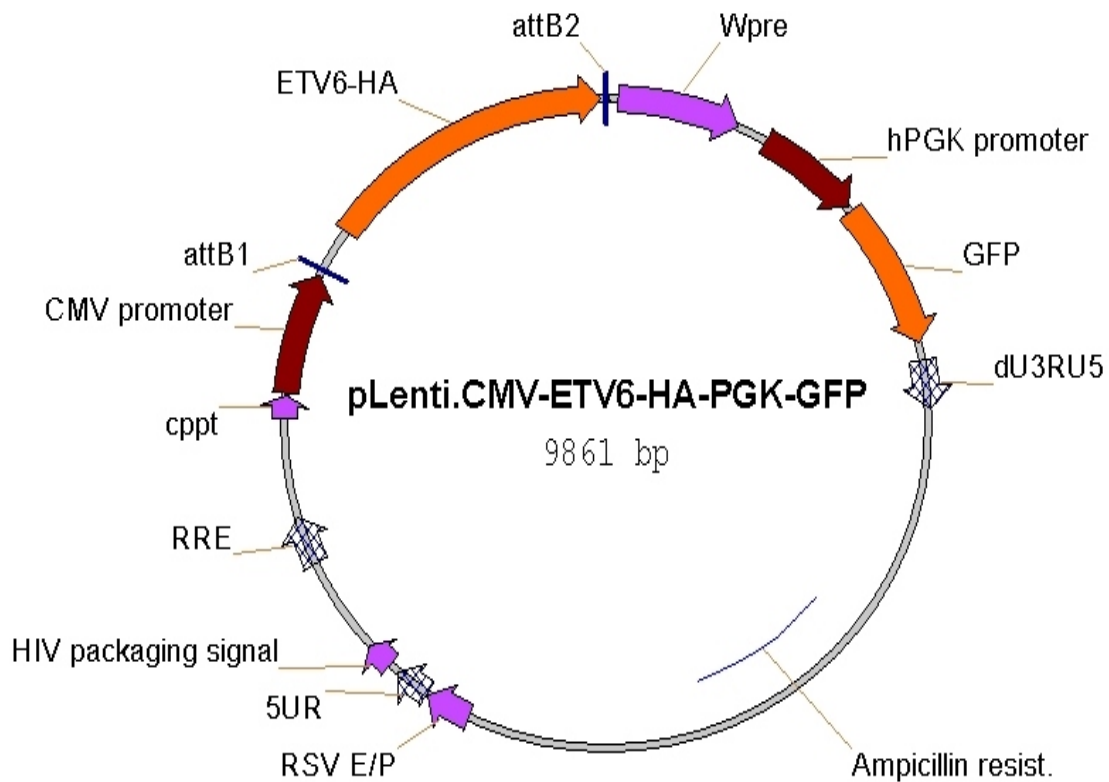


Figure 28. Schéma du vecteur lentiviral pLenti.CMV-ETV6-HA.hPGK-GFP. Le vecteur a été produit en insérant la séquence codant pour ETV6-HA grâce au système Gateway® et en remplaçant le gène de résistance PuroR par la GFP dans le vecteur pLenti.CMV.Puro.DEST à l'aide d'une digestion par enzyme de restriction.

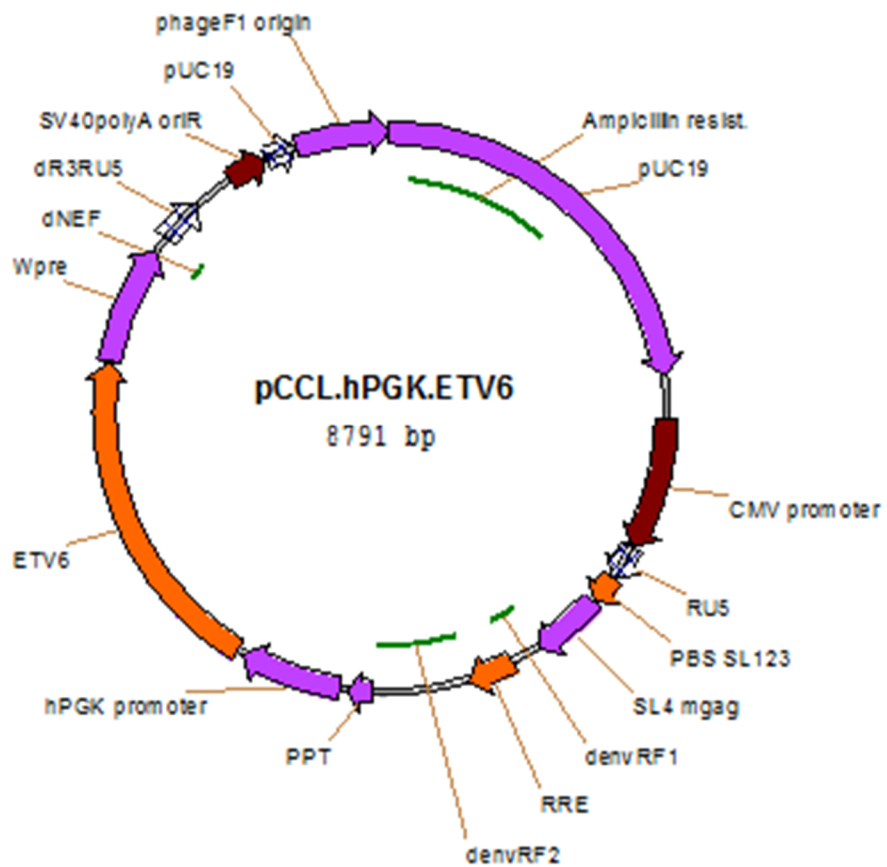


Figure 29. Schéma du vecteur lentiviral pCCL.hPGK-ETV6. Le vecteur a été produit en remplaçant la GFP par la séquence codant pour ETV6 dans le vecteur pCCL.hPGK.GFP. Le sous-clonage a été fait à l'aide d'une digestion par enzyme de restriction.

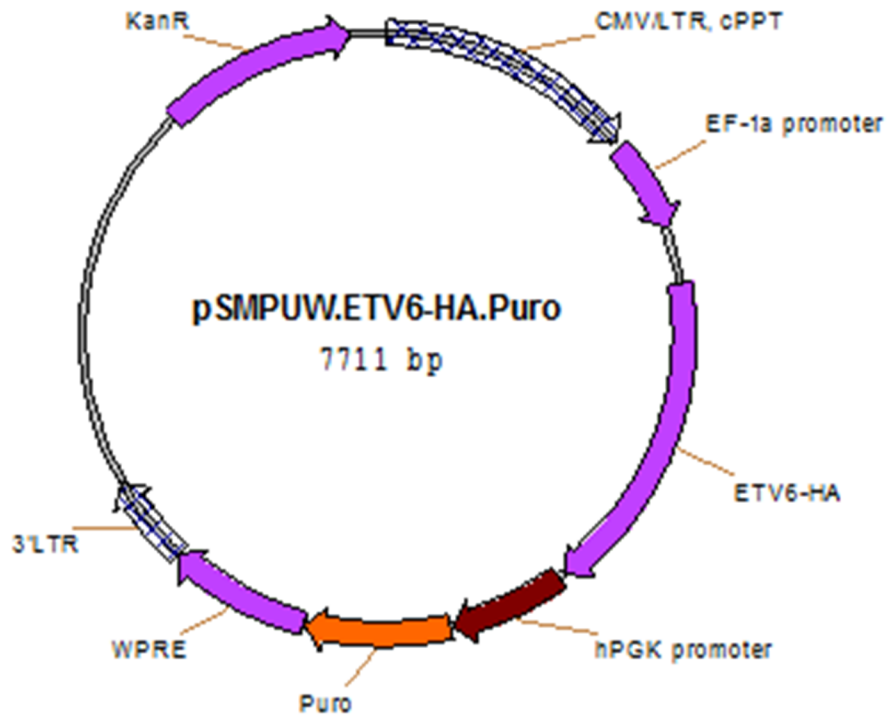


Figure 30. Schéma du vecteur lentiviral pSMPUW.EF-1 α -ETV6-HA. Le vecteur a été produit en insérant la séquence codant pour ETV6-HA dans le MCS (*multicloning site*) du vecteur pSMPUW-Puro à l'aide d'une digestion par enzyme de restriction.

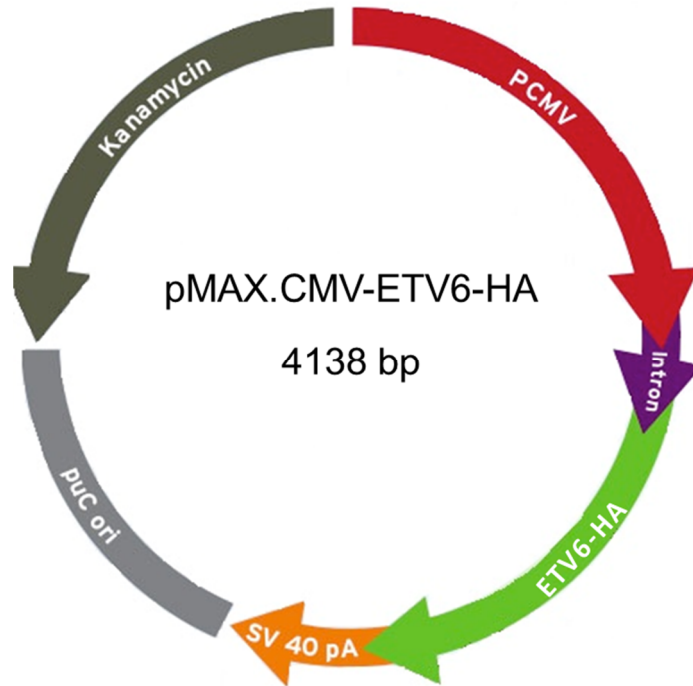


Figure 31. Schéma du vecteur pMAX.CMV-ETV6-HA. Le vecteur a été produit en insérant la séquence codant pour ETV6-HA grâce au système Gateway® dans le vecteur pMAX.GFP.

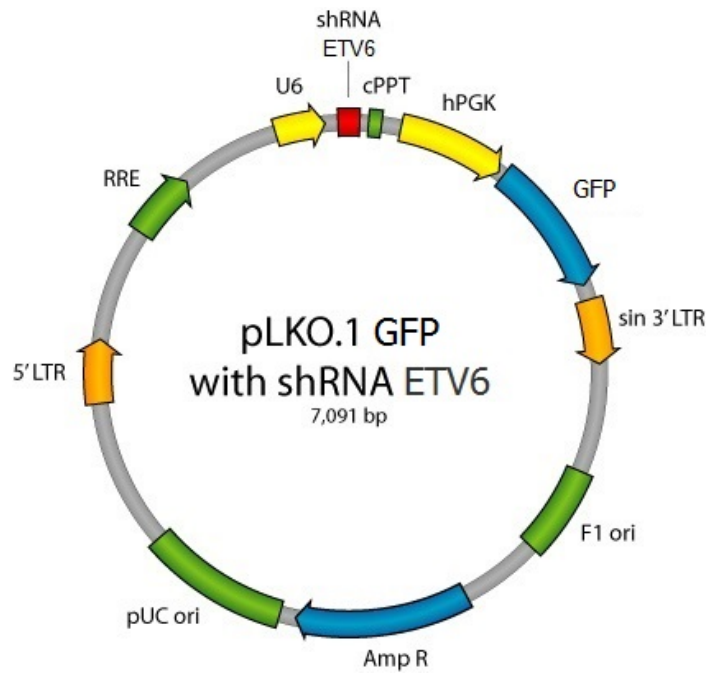


Figure 32. Schéma du vecteur lentiviral pLKO.1.GFP.shRNA-ETV6. Le vecteur a été produit en remplaçant le gène de résistance PuroR par la GFP dans le vecteur pLKO.1.puro.shRNA-ETV6 à l'aide d'une digestion par enzyme de restriction.

Tableau XVI. Séquences des siRNA testés pour réprimer l'expression d'ETV6

ARN interférent	Séquence 5'→3'	Région ciblée
siACE-RNAi hETV6-1	AAGGAGCCAGGACAAAGGCUU	Dernier exon (CDS)
Silencer Select siETV6-1	CCUGCAGUUUGACUCUUCATT	3' UTR
Silencer Select siETV6-2	CUCCAUCUGUAAUUCUCATT	3' UTR

Annexe B

Des essais de gène rapporteur ont été effectués afin de déterminer l'impact de l'ajout d'une étiquette HA à l'extrémité C-terminale du facteur de transcription ETV6 sur la répression transcriptionnelle (fig. 33 et 34).

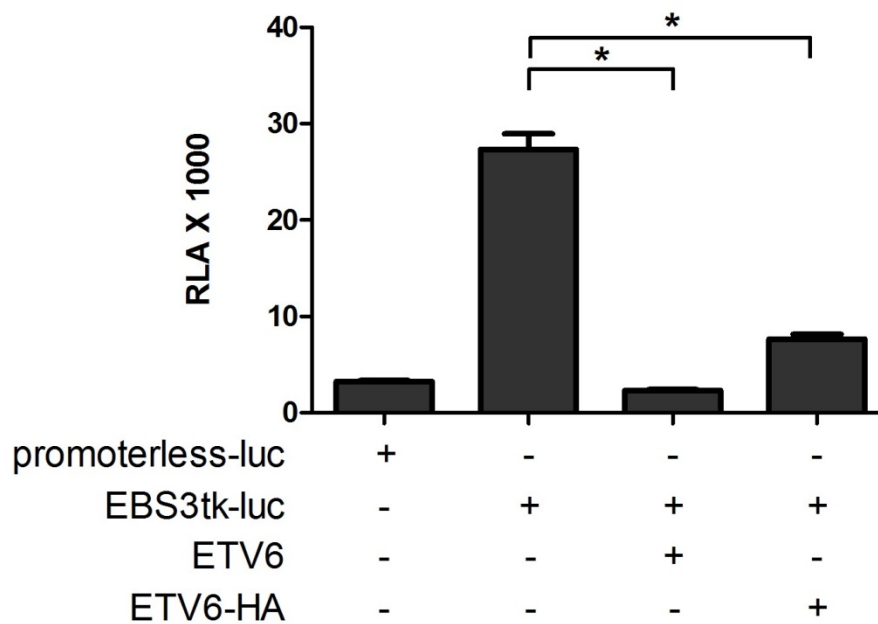


Figure 33. Influence de la présence d'une étiquette HA à l'extrémité C-terminale de la protéine ETV6 sur la répression transcriptionnelle du promoteur EBS3tk. Le gène de la luciférase a été mis sous le contrôle du promoteur EBS3tk, qui contient trois sites consensus EBS en tandem reconnus par le facteur de transcription ETV6. La répression transcriptionnelle du promoteur par ETV6 et ETV6-HA ont été déterminées par des essais de gène rapporteur. Les différences statistiques ont été mesurées avec un test Mann-Whitney bilatéral (* = $p < 0,05$). RLA = relative luciferase activity.

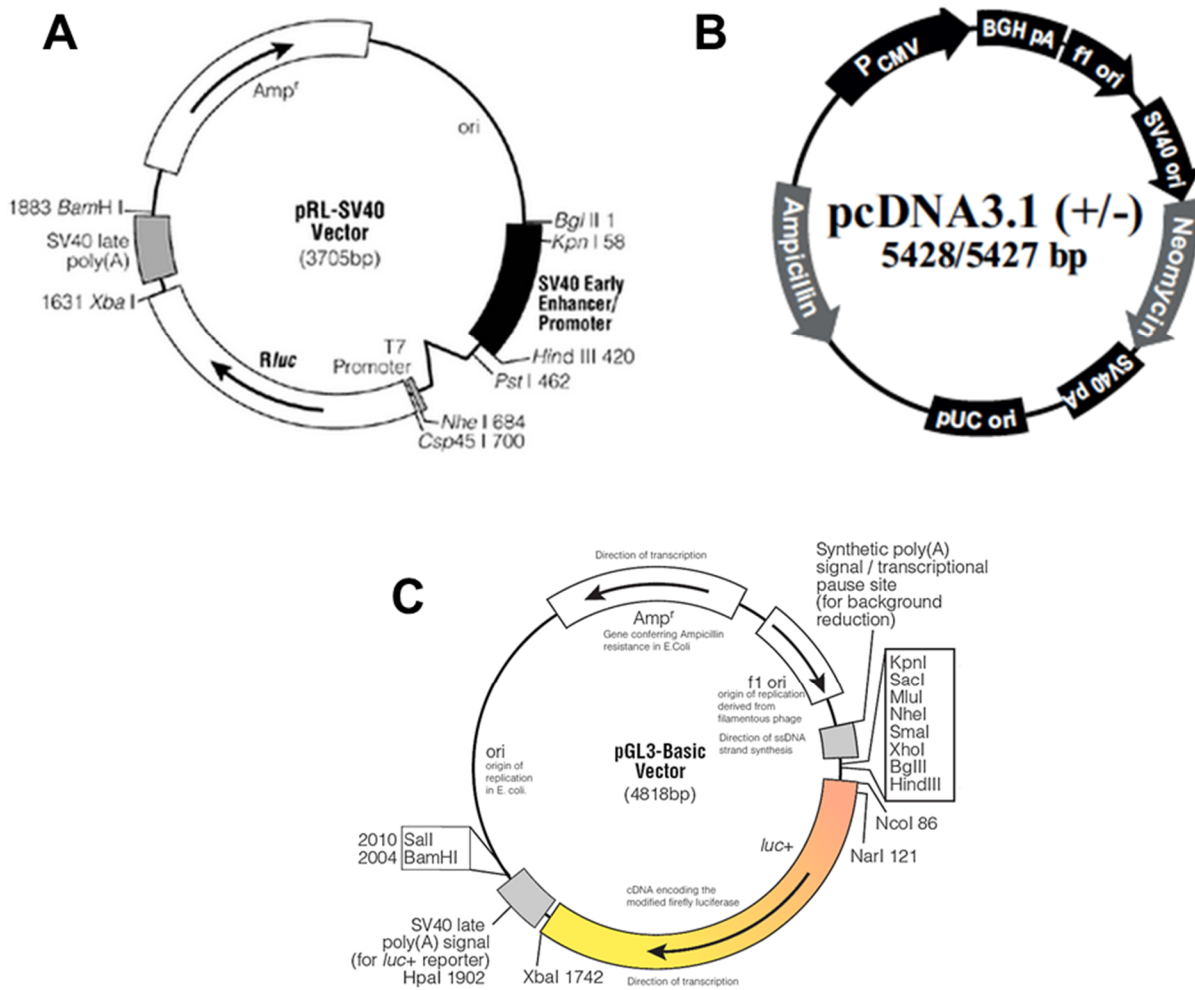


Figure 34. Schéma des vecteurs pRL-SV40, pcDNA3.1 et pGL3-Basic utilisés pour les expériences de gène rapporteur. (A) Vecteur pRL-SV40 exprimant la *Renilla* luciférase utilisé pour normaliser selon l'efficacité de transfection. (B) Vecteur d'expression pcDNA3.1 utilisé pour surexprimer ETV6 et ETV6-HA. (C) Vecteur pGL3-Basic utilisé pour exprimer le gène de luciférase sous le contrôle du promoteur EBS3tk.

Annexe C

Manuscrit de l'article *Novel transcriptional targets of ETV6, a transcription factor frequently altered in childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia.*

Auteurs : Camille Malouf, Karine Lagacé, Claire Drullion, Sylvie Langlois, Josiane Larose, Ekaterini A. Kritikou, Christian Sirard, Simon Drouin, Daniel Sinnett

Contributions des auteurs : Camille Malouf a élaboré le design expérimental et réalisé les expériences de gène rapporteur et les études fonctionnelles (fig. 2A, 3, 4, 5A-C, 5E, 6A-C et 6E), analysé les résultats et rédigé le manuscrit. Karine Lagacé a élaboré le design expérimental et réalisé certaines expériences de prolifération cellulaire, de clonogénicité et de migration cellulaire (fig. 1 et 7B). Claire Drullion a élaboré le design expérimental et réalisé certaines expériences de prolifération cellulaire et d'apoptose (fig 7A et 7C). Sylvie Langlois a élaboré le design expérimental et réalisé les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et certaines expériences de clonogénicité (fig. 2B-C, 5D et 6D). Josiane Larose et Ekaterini A. Kritikou ont participé à l'élaboration du design expérimental du projet et ont révisé le manuscrit. Christian Sirard a participé à l'élaboration du design expérimental du projet et a révisé le manuscrit. Simon Drouin a révisé le manuscrit. Daniel Sinnett est le principal investigateur du projet et a participé à l'élaboration du design expérimental ainsi qu'à l'interprétation des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Cet article sera soumis pour publication en janvier 2015.

**Novel transcriptional targets of ETV6, a transcription factor frequently altered in
childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia**

**Camille Malouf^{1,2}, Karine Lagacé^{1,2}, Claire Drullion¹, Sylvie Langlois¹, Josiane
Larose¹, Ekaterini A. Kritikou¹, Christian Sirard¹, Simon Drouin¹, Daniel Sinnett^{1-3,#}**

¹ Division of Hematology-Oncology, Research Center Sainte-Justine University Health
Center, Montreal, Canada H3T 1C5

² Department of Biochemistry and ³ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,
University of Montreal, Montreal, Canada, H3T 1C5

#: to whom correspondence should be addressed: Daniel Sinnett, Research Center, Sainte-
Justine University Health Center, 3175 chemin de la Côte Ste-Catherine, Montreal (Quebec)
Canada, H3T 1C5, Phone: +1-514-345-4931 ext. 3147

ABSTRACT

Pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL), the most common hematological malignancy in children, represents ~25% of all pediatric cancer cases. The most frequent genetic alteration associated with pre-B ALL is the t(12;21) translocation, which results in the expression of the ETV6-RUNX1 chimera. The frequent deletion of the residual *ETV6* allele leads to the complete loss of wildtype ETV6, a ubiquitously expressed Ets family transcriptional repressor with few known target genes. We had previously identified candidate ETV6 transcriptional targets using microarray gene expression profiling. Here we show, using chromatin immunoprecipitation experiments and reporter gene assays, that the sphingosine kinase 1 (*SPHK1*) and prostaglandin E2 receptor EP4 subtype (*PTGER4*) genes are direct ETV6 transcriptional targets. Furthermore, ETV6-mediated transcriptional repression of both genes requires both ETV6's pointed (PNT) and erythroblast transformation specific (ETS) functional domains, and depends on Ets-Binding Sites (EBS) in the proximal promoter region of the target genes. Functional studies in leukemic cells implicated SPHK1 and PTGER4 in cell survival, proliferation, clonogenic capacity and migration. This study is one of the first to elucidate the functional role of ETV6 transcriptional targets and to suggest their role in childhood leukemogenesis.

INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent pediatric cancer in children and accounts for ~25% of all pediatric cancers (1). Precursor B cell ALL (pre-B ALL), the predominant form of childhood ALL, has been associated with many genetic abnormalities including chromosomal translocations (2). The t(12;21) translocation is the most common genetic aberration in childhood pre-B ALL, occurring in 25% of pre-B ALL cases (2). This translocation leads to the formation of the ETV6-RUNX1 chimera, an in-frame fusion of an *ETV6* (erythroblast transformation-specific variant 6) allele with an allele of *RUNX1* (runt-related transcription factor 1) (3, 4). The expression of the ETV6-RUNX1 chimera is under the control of the *ETV6* promoter, which leads to the expression of a chimeric transcription factor composed of the N-terminal part of ETV6 fused to the near complete RUNX1 protein.

ETV6 is a ubiquitously expressed transcription factor of the Ets family (5). Unlike most Ets transcription factors that function as transcriptional activators, ETV6 has been shown to act as a transcriptional repressor (6). ETV6 is essential for embryonic development as ETV6 knockout mice succumb to severe defects in the vascular network of the yolk sac and to increased apoptosis of mesenchymal and neural tissues (7). Using inducible gene disruption and *ETV6*^{-/-} chimeric mice, ETV6 was shown to be involved in the survival/homing of the hematopoietic stem cells and in the differentiation of the megakaryocytic precursors within the bone marrow microenvironment (8, 9).

ETV6 has a C-terminal ETS DNA-binding domain and a pointed (PNT) helix-loop-helix domain required for protein-protein interactions (6). The ETS domain has been shown to recognize a consensus Ets-binding site (EBS), which consists of a core GGAA/T sequence with adjacent purine-rich sequences (10). The PNT domain is involved in the interactions of Ets transcription factors with other proteins (10). Unlike other Ets proteins, ETV6 has been shown to homodimerize *in vivo*. This interaction requires its PNT domain, which is also

required for its transcriptional repression activity (6). The central domain of ETV6 is also implicated in protein-protein interactions with members of the SMRT/N-CoR/mSin3A/HDAC corepressor complexes (11-13).

Several lines of evidence indicate that the inactivation of ETV6 is one of the early events in leukemogenesis of ALL (14). Studies in transgenic mice (15, 16), zebrafish (17), and humanized NOD/SCID γ mice transplanted with cord blood (18) have clearly shown that the ETV6-RUNX1 translocation is not sufficient for pre-B ALL development, indicating that additional steps are required for leukemic transformation (16). The non-translocated *ETV6* allele is inactivated through deletion (loss of heterozygosity (LOH)) in up to 90% of pre-B ALL cases carrying t(12;21) (19, 20). Interestingly, ETV6 expression is also absent in patients that do not have LOH in the residual allele, suggesting that other mechanisms contribute to the ETV6 inactivation (21, 22). Consistent with its tumor suppressor activity, overexpression of ETV6 in Ras-transformed fibroblasts inhibits cell growth and enhances apoptosis *in vitro* and suppresses tumor formation in nude mice (23-25). Thus, the complete inactivation of ETV6 appears to be required for leukemogenesis (26).

A complete understanding of the impact of the loss of ETV6 in the initiation and progression of leukemia requires the identification of its downstream target genes. Very few transcriptional targets of ETV6 are currently known: *MCSFR* (macrophage colony-stimulating factor receptor) (27), *Gplba* and *GpIX* (platelet glycoprotein Ib alpha chain and IX) (28), *stromelysin-1/MMP-3* (matrix metalloprotein-3) (23) and the anti-apoptotic protein *BCL-X_L* (25). Using a microarray-based approach, we had previously identified several putative ETV6-regulated genes, including *SPHK1* (sphingosine kinase 1) and *PTGER4* (prostaglandin E2 receptor EP4 subtype) (29).

In the present study, we investigated ETV6-mediated transcriptional regulation on the proximal promoters of *SPHK1* and *PTGER4* using chromatin immunoprecipitation (ChIP) and

gene reporter assays. We show that *SPHK1* and *PTGER4* are direct ETV6 transcriptional targets with ETV6-mediated transcriptional regulation requiring consensus EBS in the proximal promoter region. Furthermore, functional studies revealed that deregulated expression of these novel ETV6 transcriptional targets in REH, an ETV6-deficient t(12;21) pre-B leukemia cell line, play a role in the pathophysiology of childhood pre-B ALL.

RESULTS

ETV6 expression induces a tumor suppressor phenotype in lymphoblastic cells. ETV6 has previously been shown to have tumor suppressor capabilities in NIH-3T3 cells (23-25). To determine whether ETV6 has tumor suppressor activity in human lymphoblastic cells, we overexpressed ETV6 via lentivirus infection in REH cells, with high levels of ETV6 protein in infected cells confirmed by Western blot (Fig. 1A, inset). ETV6 overexpression reduced cell proliferation and clonogenic potential of REH cells compared to mock infected cells (Fig. 1A, B), suggesting that loss of ETV6 can increase the proliferative capacity of t(12;21)-positive pre-B leukaemia cells.

ETV6 mediates transcriptional repression of SPHK1 and PTGER4 via its PNT and ETS functional domains. We have previously identified several genes that were deregulated early after ETV6-induced expression using microarray expression profiling (29). Two of these genes, *SPHK1* and *PTGER4*, were retained for further analysis. To examine whether ETV6 can bind to these promoters endogenously, we first conducted ChIP assays in HeLa cells overexpressing HA-tagged ETV6 (ETV6-HA). Quantitative PCR (qPCR) analysis indicated that there was significant enrichment of chromatin-bound ETV6 to genomic fragments encompassing the proximal promoter regions of *SPHK1* and *PTGER4* (Fig. 2A) in HeLa cells when using an antibody against HA compared to a non-specific control antibody (Fig. 2B). Similar ChIP results were obtained using the IM-9 B lymphoblastoid cell line for the promoters of *SPHK1* and *PTGER4* (Fig. 2C). These results indicate that ETV6 can form a chromatin complex on the promoters of its target genes.

To examine the ETV6-dependent modulation of these genes, we used gene reporter assays in HeLa and Jurkat, two highly transfectable cells lines, that were co-transfected with a pcDNA3.1 expression vector overexpressing wildtype ETV6 or versions lacking either the PNT domain, involved in protein-protein interaction, or the ETS domain, required for DNA

binding at the consensus EBS (Fig. 3A). An artificial promoter containing three consensus EBS located upstream of the thymidine kinase minimal promoter (EBS₃tk) was used as control for ETV6-mediated transcriptional repression. Following ETV6 overexpression, the activity of EBS₃tk was dramatically reduced in both HeLa and Jurkat cells (Fig. 3B, C). Previous studies on ETV6 transcriptional targets have shown that ETV6 requires the PNT and ETS functional domains to repress transcription (23, 25, 27, 28), which we confirmed in our system in both cell lines (Fig. 3B, C).

To assess the ETV6-mediated transcriptional repression of the target genes, we subcloned a ~2 kb region of the *SPHK1* and *PTGER4* proximal promoters along with a region downstream of the transcription start site that contains putative EBS into the pGL3 reporter vector (Fig. 3A). Overexpression of ETV6 in both cell lines resulted in significant transcriptional repression of all reporter constructs (Fig. 3B, C), indicating that ETV6 can mediate transcriptional regulation of *SPHK1* and *PTGER4*. Deletion of either PNT or ETS domain resulted in the loss of ETV6-mediated repression of these target genes in both cell lines (Fig. 3B, C). These findings indicate that both ETS and PNT domains, through direct binding to the promoter and protein-protein interactions, respectively, are required for ETV6-mediated repressive function.

ETV6 recognizes consensus EBS for transcriptional repression. Similar to other Ets family members such as ETS1 and FLI1, ETV6 mediates transcriptional regulation by binding to a consensus EBS (30-32). Close examination of the *SPHK1* and *PTGER4* proximal promoter regions using the Transfac bioinformatics tool (33) predicted many consensus EBS. To delineate the minimal region of the proximal promoter required for ETV6-mediated repression, truncated versions of the *SPHK1* and *PTGER4* promoters (Fig. 2A) were subcloned in the pGL3 reporter vector. Co-transfection of the various reporter constructs with

ETV6 in both HeLa and Jurkat cell lines allowed us to identify these regions: -168/+115 for the *SPHK1* promoter and -337/+178 for the *PTGER4* promoter (data not shown).

Changing EBS consensus sequences from GGAA/T to CCAA/T is sufficient to abolish their function (34). Using site-directed mutagenesis, we tested the ability of the various EBS to mediate ETV6-induced transcriptional repression in the minimal promoters of each gene. The *SPHK1* minimal promoter has four putative consensus EBS: -158/-104/-84/+60. Mutation of any of these resulted in loss of ETV6-mediated repression in both HeLa and Jurkat cells (Fig. 4A, B). The minimal *PTGER4* promoter has six predicted consensus EBS: -305/-97/-92/-55/-49/+35. Because of the proximity of EBSs -97/-92 and of -55/-49, these pairs were mutated simultaneously. All EBS mutant constructs, with the exception of -305, abolished ETV6-dependant transcriptional repression (Fig. 4C, D). These results indicate that ETV6 mediates transcriptional inhibition by binding to EBS in the proximal promoter region of both these genes.

SPHK1 is a positive regulator of leukemic cell survival, proliferation, and migration. To assess the biological impact of ETV6 transcriptional targets, we knocked down their expression in the ETV6-deficient / t(12;21)-positive REH cell line (35) and monitored cell proliferation, DNA damage-induced apoptosis, clonogenic potential, and cell migration. *SPHK1* mRNA was reduced by ~40% by infecting REH cells with lentiviruses expressing a shRNA targeting its sequence (shSPHK1, Fig. 5A). Western blot analysis confirmed this knockdown (data not shown). A scrambled sequence was used as a negative control (scSPHK1).

The proliferative properties of REH cells were measured using the WST-1 colorimetric assay. *SPHK1* knockdown resulted in a significantly slower proliferation of REH cells, compared to control over a four day period (linear regression y intercept p=0.032) (Fig. 5B). However, downregulation of *SPHK1* had no detectable impact on the cell-cycle distribution of a

synchronized cell population 24 hours post-release (data not shown). These results are consistent with the well characterized role of the downstream effector of SPHK1, sphingosine-1-phosphate (S1P), on cell proliferation (36). Indeed, higher levels of SPHK1 allow for more sphingosine to be converted into S1P via its lipid kinase activity, which results in enhanced cellular proliferation (37). Sphingosine can also be transformed into pro-apoptotic ceramide via ceramide synthase (38). Thus, SPHK1 levels are believed to act as a survival rheostat that balances the cellular level of the pro-apoptotic ceramide with the anti-apoptotic, pro-proliferation S1P signal. The role of SPHK1 on apoptotic pathways was therefore examined in REH cells treated with camptothecin, a DNA damaging agent inhibiting the DNA repair ability of the DNA topoisomerase I. Downregulation of *SPHK1* increased the sensitivity of REH cells to camptothecin-induced apoptosis (Fig. 5C).

The clonogenic potential of leukemic cell lines kept in suspension culture is reflected in the proportion of cells capable of maintaining *in vitro* cell growth. Indeed, the higher the clonogenic potential of a cell line, the higher the number of cells capable of autonomous cell growth. To examine the role of SPHK1 on the clonogenic potential of REH cells colony formation in methylcellulose was assessed on cells expressing *SPHK1* shRNA. Downregulation of SPHK1 considerably decreased the clonogenic potential of REH cells compared to cells expressing scrambled control shRNA (Fig. 5D).

Finally, we assessed the role of SPHK1 on the migration potential of leukemic cells using the CXCL12 chemoattractant in a transmigration assay. CXCL12 is the ligand for CXCR4, a G-protein coupled receptor expressed in pre-B leukemic cell lines (39). *SPHK1* downregulation reduced the migration potential of REH cells at low CXCL12 concentration (Fig. 5E), indicating that higher expression of *SPHK1* can be favourable to the mobilisation of leukemic progenitors.

These results indicate SPHK1 is an important regulator of cell survival, proliferation, and migration in leukemic cells and suggest that ETV6, by repressing its expression, acts as a tumor repressor.

PTGER4 expression promotes leukemogenesis. PTGER4 is a G-protein coupled receptor responding to its ligand prostaglandin E2 (PGE2). To assess the functional role of PTGER4 during leukemogenesis its expression was knocked down by ~65-70% using shRNA infection, as detailed above (Fig. 6A). Western blot analysis confirmed this knockdown (data not shown). PTGER4 downregulation, with both shRNAs, led to a significant decrease in clonogenic capacity and proliferation rate of REH cells (Fig. 6B, D) but did not affect the cell cycle distribution of synchronized REH cells over a 24-hour period (data not shown). Furthermore, *PTGER4* repression inhibited CXCL12-induced migration (Fig. 6E). Interestingly, it had no effect on camptophecic-induced apoptosis (Fig. 6C).

These data were confirmed by specifically inhibiting PTGER4 with the L-161,982 antagonist, which prevents PTGER4-mediated signaling (40). Consistent dose-dependent growth inhibition was observed in the presence of PTGER4 inhibitor (Fig. 7A), confirming that PTGER4 signaling plays a positive role in REH cell proliferation. Cell migration was also inhibited in a dose-dependent manner with the addition of increasing concentrations of L-161,982 (Fig. 7B). Camptothecin-induced apoptosis was unaffected by PTGER4 chemical inhibition (Fig. 7C), confirming the results obtained using shRNA knockdown. These results indicate that PTGER4 transduces a positive leukemic signal enhancing cell proliferation and migration in REH cells.

DISCUSSION

Several childhood pre-B ALL harbor the t(12;21) translocation, yielding an ETV6-RUNX1 fusion protein thought to confer ETV6-dependant repressive activity to RUNX1 transcriptional targets (18). Experimental evidence indicates that the ETV6-RUNX1 fusion is insufficient to initiate leukemia, which instead requires the allelic loss of the remaining wildtype ETV6 allele, suggesting that the deregulation of ETV6 transcriptional targets play an important role in leukemogenesis. However, functional targets of ETV6 involved in leukemogenesis remain elusive. Using a combination of ChIP, gene reporter assays, and loss-of-function analyses we demonstrated that *SPHK1* and *PTGER4* are direct transcriptional targets of ETV6 and that they have a functional role in promoting or maintaining a leukemic phenotype. Although increased expression of both these genes has been associated with many types of cancer, this is the first demonstration that their expression could be modulated by the ETV6 tumor suppressor.

ETV6 binds directly to the promoter of *SPHK1* and *PTGER4*. ETV6 can both interact directly with the histone deacetylase co-repressor complex SMRT/N-CoR/mSin3A/HDAC and bind DNA in a sequence-specific manner (10-13). Using ChIP analysis, we have shown that ETV6 can bind the promoter region of *SPHK1* and *PTGER4* loci. The molecular mechanisms used by ETV6 to regulate transcription require both its PNT protein-protein interaction domain and its ETS DNA-binding domain. In this study, we have shown that the overexpression of ETV6 in two different cell lines can actively repress the proximal promoter region of both *SPHK1* and *PTGER4*. This repression was dependent on both ETV6 functional domains, indicating that these genes behave like typical ETV6 transcriptional targets. Mutational analysis of the EBS on the minimal promoter region still responsive to ETV6 revealed that they were required for ETV6-mediated repression. Taken together these data strongly

suggest that ETV6 binds directly to the promoter of these target genes to downregulate their expression.

A functional role of SPHK1 in the progression of ETV6-deficient pre-B ALL. Since the reporter assays revealed that the promoters of both target genes could be repressed by ETV6, our functional studies were conducted in the ETV6-deficient pre-B ALL REH cell line. We found that the downregulation of *SPHK1* expression reduced cellular proliferation and migration and enhanced apoptosis in response to DNA damage. SPHK1 is a lipid kinase that catalyzes the phosphorylation of sphingosine to S1P, which in turn stimulates cell proliferation, survival and migration by binding to various S1P receptors (S1PR) (38). S1PRs activate G proteins which interact with numerous intracellular pathways including MAPK/ERKs and PI3K, involved in cell proliferation and survival, as well as with PLC and Rac, both involved in cell migration. Sphingosine can also be transformed into ceramide, a pro-apoptotic signal, by ceramide synthase. Increased expression of SPHK1 would therefore shift sphingosine towards S1P rather than ceramide and would consequently favor cellular proliferation, survival, and migration. Our results are consistent with the known biological function of SPHK1 and attribute a functional role to SPHK1 in the progression of ETV6-deficient pre-B ALL. We have also observed that downregulation of SPHK1 results in decreased clonogenic potential of REH cells, suggesting SPHK1 levels regulate autonomous cell growth, which would also contribute to leukemogenesis.

Leukemia can originate from a blockage of differentiation process in early progenitors and a premature mobilization of these defective progenitors in the circulation (egress). Gradients of S1P are directly involved in hematopoietic stem cell (HSC)/progenitor cell (HPC) egress. High concentration of S1P in the peripheral blood and low levels of S1P in the bone marrow and other tissues promote the mobilization of HPC into the circulation (41, 42). Recently, crosstalk has been uncovered between CXCR4/CXCL12 pathway, responsible for the homing of the

HPC to the bone marrow, and the S1P signaling pathway (43). Increased levels of S1P activate the release of the CXCL12 ligand from the bone marrow stroma to the circulation and work in concert with S1P gradients to promote HPC egress from the bone marrow. Therefore, it is conceivable that increase of SPHK1 expression in ETV6-deficient ALL progenitors would favor their release from the bone marrow which, combined with the enhanced self-renewal potential and the increase in proliferation, migration, and survival signals, would contribute to leukemogenesis.

Our findings are consistent with previous observations documenting the up-regulation of SPHK1 in many cancers, including acute leukemia (38). Moreover, although the expression of SPHK1 has been shown to be regulated by a range of growth factors and protein kinases, this study provides the first evidence of *SPHK1* regulation by a transcriptional repressor involved in childhood leukemia.

A functional role of PTGER4 in the progression of ETV6-deficient pre-B ALL. PTGER4 expression is elevated in numerous cancers including breast, colon, and endometrial adenocarcinoma and is known to enhance cell survival and cell proliferation by activating PKB(Akt), ERK1/2, and early growth response factor-1 (EGR-1) (44-47). PTGER4 is one of four PGE2 receptors, which in turn is synthesized by COX enzymes (47). Overexpression of COX2 has a main role in the tumorigenesis of breast and colorectal cancer (48, 49), and has been the target in several therapeutic approaches using non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) similar to aspirin (50). Because of side effects related to the use of NSAIDS, mostly affecting the heart, PTGER4 inhibitors have gained increasing attention. In this study, we have demonstrated that ETV6 directly binds to the *PTGER4* promoter and represses its expression. Downregulation of PTGER4 activity by shRNA or receptor antagonists in an ETV6-deficient cell line resulted in decreased proliferation, migration, and clonogenic potential, indicating that the increased expression of PTGER4 could contribute to

leukemogenesis. These results indicate that the PGE2/PTGER4 pathway is involved in leukemogenic transformation and that increased PTGER4 receptor levels are sufficient to sensitize cells to transforming processes.

A recent study has uncovered a pivotal role for PGE2/PTGER4 signaling in HSC egress from the bone marrow. While the inhibition of PGE2/PTGER4 signaling in the stromal microenvironment causes HSC egress, inhibition of the PGE2/PTGER4 signaling within the hematopoietic cells favors myeloid hematopoietic progenitor cell, but not HSC, egress from the bone marrow (51). It is difficult to consolidate these results with enhanced PGE2/PTGER4 signaling in leukemic cells since it would favor homing of progenitor cells to the marrow. However, the role of PGE2/PTGER4 in pre-B lymphoid cells was not assessed in that study and repression of this pathway in the bone marrow stroma in pre-B ALL has never been investigated. It is noteworthy that murine ETV6^{-/-} hematopoietic cells are defective in homing to the bone marrow of transplanted mice (8), suggesting that ETV6-deficient tumor precursor cells could egress rather than enter the bone marrow. The role of PTGER4 in the egress of these ETV6-deficient tumor precursor cells remains to be examined.

Overall, this study provides evidence that deregulated expression of ETV6 transcriptional targets following the loss of ETV6 might be involved in the development of childhood pre-B ALL. Further evidence assessing the impact of *PTGER4* and *SPHK1* dysregulation in patients that lack functional ETV6 could provide further insights into the mechanisms underlying ETV6-mediated leukemogenesis. Furthermore, inhibition of the PGE2/PTGER4 pathway or S1P production could provide interesting avenues for the development of alternative therapeutic approaches.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. HeLa cells (immortalized cervical cells from an adenocarcinoma patient, ATCC #CCL-2TM) were cultured in DMEM 10% FBS (Wisent) at 37°C, 5% CO₂. Jurkat cells (immortalized leukemic T lymphocytes from a 14 years old patient, kindly provided by Dr. José Menezes), IM-9 cells (Epstein-Barr virus-transformed B lymphoblast from a multiple myeloma patient, ATCC #CCL-159) and REH cells (immortalized t(12;21)⁺ leukemic pre-B lymphocytes, ATCC #CRL-8286TM) were cultured in RPMI-1640 10% FBS (Wisent) at 37°C, 5% CO₂. Unless otherwise specified, cell culture conditions were the same for all experiments.

Constructs. *SPHK1* and *PTGER4* promoters were amplified by PCR (Platinum Taq, Invitrogen) and subcloned in the pGL3-basic vector (Promega) upstream of the Firefly luciferase gene. The proximal promoter region tested were as follows: *SPHK1* promoter - 858/+115 and *PTGER4* promoter -855/+601 (Fig. 2A). Full-length *ETV6* was subcloned downstream of the pcDNA3.1 vector's (Invitrogen) CMV promoter. Mutation of consensus EBS (GGAA→CCAA) was done using the QuickChange Multi-Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene). The PNT and ETS domains of *ETV6* were removed by restriction endonuclease after inserting, respectively, a *PacI* or *KpnI* restriction site at each end of the domain of *ETV6* subcloned in pcDNA3.1. The pLKO.1 constructs harboring the *SPHK1* shRNA and *PTGER4* shRNA were purchased from Open Biosystems (RHS4533, RHS4533 and EHS1001-43247). The integrity of all constructs was verified by direct sequencing of both strands with the ABI 3730 automatic sequencer. Primers, shRNA and scrambled shRNA sequences are presented in Table 1.

Gene reporter assays. HeLa and Jurkat cells were transfected using lipofectamineTM 2000 (Invitrogen) with a combination of constructs: promoter constructs in pGL3-basic vector (Promega), pRL-CMV vector (Promega) to normalize the transfection efficiency and *ETV6*

constructs in pcDNA3.1 vector. 1 µg/mL leucoagglutinin and 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate were added to each reaction 4-hour after transfection (Sigma Aldrich) in Jurkat cells. Luciferase activity was measured 48-hour later using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) and LLMAX³⁸⁴ LUMinometer (Molecular Devices).

Chromatin immunoprecipitation assays. HeLa cells with inducible *ETV6*-HA (29) were incubated for 48-hour with 2 µg/ml doxycycline and IM9 cells expressing a lentivirus harboring *ETV6*-HA (pLenti-*ETV6*-HA) were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 minutes at room temperature, glycine stopped, lysed, and sonicated to obtain 200-1500bp DNA fragments. After immunoprecipitation with an anti-HA antibody (Santa Cruz Biotechnology sc-7392), the precipitates were reverse cross-linked and treated with proteinase K. The purified endogenous DNA was analysed by quantitative real-time PCR. Experimental controls were selected according to a previous ChIP-chip experiment conducted by our group (unpublished data): Negative maps to an exon-intron junction region of the chromosome-associated protein D2 (*NCAPD2*), 14834 maps to the proximal promoter of the activator of basal transcription 1 (*ABT1*) gene and 10505 maps to the proximal promoter of the cAMP responsive element binding protein 1 (*CREB1*).

Lentiviral transduction. 1×10^6 REH cells were infected at a multiplicity of infection of 1 in RPMI-1640 10% FBS 8 µg/mL polybrene (Sigma-Aldrich). Forty-eight hours later 1 µg/µL puromycin (Sigma-Aldrich) was added to enrich for transduced cells.

Quantitative PCR and immunoblot. Quantitative real-time PCR of mRNA was done as previously described (29). For Western blots, 15×10^6 REH cells were homogenized in RIPA buffer and quantified using a Lowry assay (BioRad). Proteins were denatured in sample buffer with SDS (2%) and 2-mercaptoethanol (2 mM), separated on a 12% SDS-PAGE and electroblotted to a nitrocellulose membrane (Roche). Non-specific binding sites were blocked using skimmed milk followed by hybridization with the primary antibodies (SPHK1: Abcam ab-

56414; PTGER4 and GAPDH: Santa Cruz Biotechnology sc-13602 and sc-31915, respectively) and the secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology sc-166574 or sc-48167). Enhanced chemiluminescence (Pierce) allowed protein detection and their subsequent quantification by densitometry (Adobe Photoshop 7.0.1).

Cell proliferation. Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche) and cell counting was used to study REH cell proliferation. REH cells were seeded at 0.4×10^5 cells/mL and grown for four days without renewing the culture medium. Formazan dye absorbance was measured at 450 nm with a reference at 750 nm.

DNA damage-induced apoptosis and cell cycle. REH cells were seeded at a density of 4×10^5 cells/mL in 24-well plates for 12 hours and treated with 2 μ M camptothecin for 4 hours (Tocris Bioscience). Harvested cells were stained using the FITC AnnexinV/Dead Cell apoptosis kit (Invitrogen). Cell cycle analysis was done using the FITC BrdU Flow Kit (BD Pharmingen) where 4×10^5 REH cells were synchronized for 24-hour by serum-starvation and cultured in RPMI 1640 10% FBS medium for another 24-hour. Stained cells were captured and analyzed using BD Biosciences FACS Aria and BD FACSDiva software, respectively.

Transmigration assays. Migration of REH cells was performed for 2-hour in a ChemoTx[®] 3.2 mm diameter 96 well-plate (NeuroProbe) with an input of 2×10^5 cells and CXCL12 as a chemoattractant (ProSpec). Cell quantification was done using the Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche) or by cell count using a Coulter counter (Beckman).

Clonogenic assays. After 2 weeks of selection with 1 μ g/ μ L puromycin, 500 REH cells infected with lentivirus were plated in quadruplicate in 1 ml of HSC-CFU Basic Human medium (Miltenyi Biotec inc) (1.2% methylcellulose, 30% FBS, 1% BSA, 0.1mM 2-mercaptoethanol, and 2mM L-glutamine) onto 35mm tissue culture dishes and incubated for 18 days in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂ (52). Colonies consisting of >40 cells were counted using an inverted microscope.

Statistical analysis. Graphs and statistical analysis were done using the GraphPad 5.0 software. For all experiments, otherwise mentioned, statistical significance was indicated as follows: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

FUNDING

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (#MOP-93518 to D.S.) and the Cancer Research Society (#14162 to D.S.).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors have no potential conflicts of interest and no competing financial interests. The authors wish to thank the Canadian Institutes of Health Research and the Cancer Research Society for their financial support. At the time of the study, C.M. held a Ph.D. scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). D.S. holds the François-Karl Viau Chair in Pediatric Oncogenomics and is a scholar of the FRSQ. C.M. designed and performed the reporter gene assays and the functional studies, analyzed the results and wrote the paper. K.L. and C.D. designed and performed functional studies. S.L. performed the chromatin immunoprecipitation experiments. J.L. and E.A.K. participated to the design of the experiments and revised the manuscript. C.S. and S.D. participated in the design of the experiments with inhibitors and writing the manuscript. D.S. is the principal investigator of the research and participated in the design and interpretation of the results as well as in the writing of the paper.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors report no conflict of interest.

REFERENCES

1. Linabery, A.M. and Ross, J.A. (2008) Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004). *Cancer*, 112, 416-432.
2. Pui, C.H., Carroll, W.L., Meshinchi, S. and Arceci, R.J. (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*, 29, 551-565.
3. Golub, T.R., Barker, G.F., Bohlander, S.K., Hiebert, S.W., Ward, D.C., Bray-Ward, P., Morgan, E., Raimondi, S.C., Rowley, J.D. and Gilliland, D.G. (1995) Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4917-4921.
4. Shurtleff, S.A., Buijs, A., Behm, F.G., Rubnitz, J.E., Raimondi, S.C., Hancock, M.L., Chan, G.C., Pui, C.H., Grosveld, G. and Downing, J.R. (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, 1985-1989.
5. Poirel, H., Oury, C., Carron, C., Duprez, E., Laabi, Y., Tsapis, A., Romana, S.P., Mauchauffe, M., Le Coniat, M., Berger, R. et al. (1997) The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene*, 14, 349-357.
6. Lopez, R.G., Carron, C., Oury, C., Gardellin, P., Bernard, O. and Ghysdael, J. (1999) TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem*, 274, 30132-30138.
7. Wang, L.C., Kuo, F., Fujiwara, Y., Gilliland, D.G., Golub, T.R. and Orkin, S.H. (1997) Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J*, 16, 4374-4383.
8. Wang, L.C., Swat, W., Fujiwara, Y., Davidson, L., Visvader, J., Kuo, F., Alt, F.W., Gilliland, D.G., Golub, T.R. and Orkin, S.H. (1998) The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev*, 12, 2392-2402.
9. Hock, H., Meade, E., Medeiros, S., Schindler, J.W., Valk, P.J., Fujiwara, Y. and Orkin, S.H. (2004) Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev*, 18, 2336-2341.
10. Bohlander, S.K. (2005) ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Seminars in cancer biology*, 15, 162-174.
11. Chakrabarti, S.R. and Nucifora, G. (1999) The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun*, 264, 871-877.
12. Guidez, F., Petrie, K., Ford, A.M., Lu, H., Bennett, C.A., MacGregor, A., Hannemann, J., Ito, Y., Ghysdael, J., Greaves, M. et al. (2000) Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood*, 96, 2557-2561.
13. Wang, L. and Hiebert, S.W. (2001) TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene*, 20, 3716-3725.
14. Mori, H., Colman, S.M., Xiao, Z., Ford, A.M., Healy, L.E., Donaldson, C., Hows, J.M., Navarrete, C. and Greaves, M. (2002) Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8242-8247.
15. Tsuzuki, S., Seto, M., Greaves, M. and Enver, T. (2004) Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8443-8448.

16. van der Weyden, L., Giotopoulos, G., Rust, A.G., Matheson, L.S., van Delft, F.W., Kong, J., Corcoran, A.E., Greaves, M.F., Mullighan, C.G., Huntly, B.J. et al. (2011) Modeling the evolution of ETV6-RUNX1-induced B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in mice. *Blood*, in press.
17. Sabaawy, H.E., Azuma, M., Embree, L.J., Tsai, H.J., Starost, M.F. and Hickstein, D.D. (2006) TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 15166-15171.
18. Hong, D., Gupta, R., Ancliff, P., Atzberger, A., Brown, J., Soneji, S., Green, J., Colman, S., Piacibello, W., Buckle, V. et al. (2008) Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science*, 319, 336-339.
19. Montpetit, A., Boily, G. and Sinnett, D. (2002) A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus. *Eur J Hum Genet*, 10, 62-71.
20. Lilljebjorn, H., Sonesson, C., Andersson, A., Heldrup, J., Behrendtz, M., Kawamata, N., Ogawa, S., Koeffler, H.P., Mitelman, F., Johansson, B. et al. (2010) The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mol Genet*, 19, 3150-3158.
21. Montpetit, A., Larose, J., Boily, G., Langlois, S., Trudel, N. and Sinnett, D. (2004) Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18, 1499-1504.
22. Patel, N., Goff, L.K., Clark, T., Ford, A.M., Foot, N., Lillington, D., Hing, S., Pritchard-Jones, K., Jones, L.K. and Saha, V. (2003) Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia. *Br J Haematol*, 122, 94-98.
23. Fenrick, R., Wang, L., Nip, J., Amann, J.M., Rooney, R.J., Walker-Daniels, J., Crawford, H.C., Hulboy, D.L., Kinch, M.S., Matrisian, L.M. 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, 5828-5839.
24. Rompaey, L.V., Potter, M., Adams, C. and Grosveld, G. (2000) Tel induces a G1 arrest and suppresses Ras-induced transformation. *Oncogene*, 19, 5244-5250.
25. Irvin, B.J., Wood, L.D., Wang, L., Fenrick, R., Sansam, C.G., Packham, G., Kinch, M., Yang, E. and Hiebert, S.W. (2003) TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL. *J Biol Chem*, 278, 46378-46386.
26. Anderson, K., Lutz, C., van Delft, F.W., Bateman, C.M., Guo, Y., Colman, S.M., Kempinski, H., Moorman, A.V., Titley, I., Swansbury, J. et al. (2011) Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*, 469, 356-361.
27. Fears, S., Gavin, M., Zhang, D.E., Hetherington, C., Ben-David, Y., Rowley, J.D. and Nucifora, G. (1997) Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1949-1954.
28. Kwiatkowski, B.A., Zielinska-Kwiatkowska, A.G., Bauer, T.R., Jr. and Hickstein, D.D. (2000) The ETS family member Tel antagonizes the Fli-1 phenotype in hematopoietic cells. *Blood Cells Mol Dis*, 26, 84-90.
29. Boily, G., Larose, J., Langlois, S. and Sinnett, D. (2007) Identification of transcripts modulated by ETV6 expression. *Br J Haematol*, 136, 48-62.

30. Kwiatkowski, B.A., Bastian, L.S., Bauer, T.R., Jr., Tsai, S., Zielinska-Kwiatkowska, A.G. and Hickstein, D.D. (1998) The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem*, 273, 17525-17530.
31. Landry, J.R., Kinston, S., Knezevic, K., Donaldson, I.J., Green, A.R. and Gottgens, B. (2005) Fli1, Elf1, and Ets1 regulate the proximal promoter of the LMO2 gene in endothelial cells. *Blood*, 106, 2680-2687.
32. Mavrothalassitis, G. and Ghysdael, J. (2000) Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene*, 19, 6524-6532.
33. Matys, V., Kel-Margoulis, O.V., Fricke, E., Liebich, I., Land, S., Barre-Dirrie, A., Reuter, I., Chekmenev, D., Krull, M., Hornischer, K. et al. (2006) TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 34, D108-110.
34. Starck, J., Doubeikovski, A., Sarrazin, S., Gonnet, C., Rao, G., Skoultchi, A., Godet, J., Dusanter-Fourt, I. and Morle, F. (1999) Spi-1/PU.1 is a positive regulator of the Fli-1 gene involved in inhibition of erythroid differentiation in friend erythroleukemic cell lines. *Mol Cell Biol*, 19, 121-135.
35. Tsuzuki, S., Kaman, S., Horibe, K., Matsumoto, K., Kato, K., Inukai, T., Goi, K., Sugita, K., Nakazawa, S., Kasugai, Y. et al. (2007) Genetic abnormalities involved in t(12;21) TEL-AML1 acute lymphoblastic leukemia: analysis by means of array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci*, 98, 698-706.
36. Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S. and Spiegel, S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381, 800-803.
37. Nava, V.E., Lacana, E., Poulton, S., Liu, H., Sugiura, M., Kono, K., Milstien, S., Kohama, T. and Spiegel, S. (2000) Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Lett*, 473, 81-84.
38. Wallington-Beddoe, C.T., Bradstock, K.F. and Bendall, L.J. (2013) Oncogenic properties of sphingosine kinases in haematological malignancies. *Br J Haematol*, in press.
39. Corcione, A., Arduino, N., Ferretti, E., Pistorio, A., Spinelli, M., Ottonello, L., Dallegri, F., Basso, G. and Pistoia, V. (2006) Chemokine receptor expression and function in childhood acute lymphoblastic leukemia of B-lineage. *Leukemia research*, 30, 365-372.
40. Cherukuri, D.P., Chen, X.B., Goulet, A.C., Young, R.N., Han, Y., Heimark, R.L., Regan, J.W., Meuillet, E. and Nelson, M.A. (2007) The EP4 receptor antagonist, L-161,982, blocks prostaglandin E2-induced signal transduction and cell proliferation in HCA-7 colon cancer cells. *Experimental cell research*, 313, 2969-2979.
41. Seitz, G., Boehmler, A.M., Kanz, L. and Mohle, R. (2005) The role of sphingosine 1-phosphate receptors in the trafficking of hematopoietic progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1044, 84-89.
42. Ratajczak, M.Z., Lee, H., Wysoczynski, M., Wan, W., Marlicz, W., Laughlin, M.J., Kucia, M., Janowska-Wieczorek, A. and Ratajczak, J. (2010) Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex. *Leukemia*, 24, 976-985.

43. Golan, K., Kollet, O. and Lapidot, T. (2013) Dynamic Cross Talk between S1P and CXCL12 Regulates Hematopoietic Stem Cells Migration, Development and Bone Remodeling. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6, 1145-1169.
44. Robertson, F.M., Simeone, A.M., Mazumdar, A., Shah, A.H., McMurray, J.S., Ghosh, S. and Cristofanilli, M. (2008) Molecular and pharmacological blockade of the EP4 receptor selectively inhibits both proliferation and invasion of human inflammatory breast cancer cells. *J Exp Ther Oncol*, 7, 299-312.
45. Doherty, G.A., Byrne, S.M., Molloy, E.S., Malhotra, V., Austin, S.C., Kay, E.W., Murray, F.E. and Fitzgerald, D.J. (2009) Proneoplastic effects of PGE2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 9, 207.
46. Catalano, R.D., Wilson, M.R., Boddy, S.C., McKinlay, A.T., Sales, K.J. and Jabbour, H.N. (2011) Hypoxia and prostaglandin E receptor 4 signalling pathways synergise to promote endometrial adenocarcinoma cell proliferation and tumour growth. *PLoS One*, 6, e19209.
47. Regan, J.W. (2003) EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life sciences*, 74, 143-153.
48. Greenhough, A., Smartt, H.J., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C. and Kaidi, A. (2009) The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 30, 377-386.
49. Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S. and DuBois, R.N. (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 107, 1183-1188.
50. Brown, J.R. and DuBois, R.N. (2005) COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol*, 23, 2840-2855.
51. Hoggatt, J., Mohammad, K.S., Singh, P., Hoggatt, A.F., Chitteti, B.R., Speth, J.M., Hu, P., Poteat, B.A., Stilger, K.N., Ferraro, F. et al. (2013) Differential stem- and progenitor-cell trafficking by prostaglandin E2. *Nature*, 495, 365-369.
52. Lin, T.L., Wang, Q.H., Brown, P., Peacock, C., Merchant, A.A., Brennan, S., Jones, E., McGovern, K., Watkins, D.N., Sakamoto, K.M. et al. (2010) Self-renewal of acute lymphocytic leukemia cells is limited by the Hedgehog pathway inhibitors cyclopamine and IPI-926. *PLoS one*, 5, e15262.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Tumor suppressor activity of ETV6 in REH lymphoblastic cell line. (A) Overexpression of ETV6 in the REH ETV6-deficient cell line inhibits cell growth. Cell proliferation assay of REH cells (WT) stably infected with an empty lentivirus (Empty) or expressing ETV6-HA (ETV6) (inset). Cell counts were performed on triplicate samples and a representative growth curve from three independent experiments is shown. Statistical differences between the linear regression slopes (**) were assessed (days 0 to 4) using pLenti-empty as a reference. (B) Expression of ETV6 decreases the clonogenic potential of REH cells. The clonogenic surviving fraction corresponds to the plating efficiency of the lentivirus-infected cells normalized to the plating efficiency of the uninfected (WT) REH cells (expressed in percentage). Colony counts were performed in triplicate and shown is a representative clonogenic assay from three independent experiments. Statistical significance was assessed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison post-test.

FIGURE 2. ETV6 binds *SPHK1* and *PTGER4* proximal promoters. (A) Schematic diagrams depicting the promoter regions of *SPHK1* and *PTGER4* used for chromatin immunoprecipitation (ChIP) and reporter gene assay experiments. The transcription start site (TSS) corresponds to position +1. ETS binding site (EBS) predictions by Transfac are indicated by the thick black vertical lines. ChIP of the indicated promoter region in the HeLa (B) or the IM-9 lymphoblastoid (C) cell lines overexpressing HA-tagged ETV6. ETV6 binding enrichment is depicted as the fold enrichment of the HA antibody relative to the pre-immune serum immunoprecipitate, normalized to the negative control. Results were calculated using the Δ CT log values (mean \pm SE). Statistical significance was assessed using one-way

ANOVA with a Dunnett's multiple comparison post-test (n=2, in triplicates). Statistical significance: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***.

FIGURE 3. ETV6-dependent transcriptional repression requires both the ETS and PNT functional domains. (A) A schematic representation of the coding sequence of wild-type ETV6 and its deleted versions (ETV6 Δ PNT and ETV6 Δ ETS). Amino acid positions are indicated. Reporter gene assays conducted in HeLa (B) and Jurkat (C) cell lines. "Empty vector" is the promoter-less pGL3-basic luciferase reporter vector and "EBS₃tk" contains 3 EBS and a thymidine kinase minimal promoter (ETV6 transcriptional repression positive control). The luciferase value is depicted as the firefly luciferase value of the pGL3-basic reporter gene vector relative to the Renilla luciferase value of the pRL-CMV control vector normalized to the cells transfected with empty pcDNA3.1 vector. Statistical significance was assessed using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison post-test (n=3, in triplicates).

FIGURE 4. EBS consensus sites are involved in the ETV6-mediated transcriptional repression. Site-directed mutagenesis of predicted consensus EBS located in the basal promoters of *SPHK1* (A, B) and *PTGER4* (C, D) were performed on the corresponding luciferase reporter constructs. Gene reporter assays were conducted in HeLa and Jurkat cell lines. The luciferase value is depicted as the firefly luciferase value of the pGL3-basic reporter gene vector relative to the Renilla luciferase value of the pRL-CMV control vector normalized to the cells transfected with empty pcDNA3.1 vector. Statistical significance was assessed using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison post-test (n=3, in triplicates).

FIGURE 5. The ETV6-transcriptional target SPHK1 is a positive regulator of leukemia cell survival, clonogenic potential, and migration. (A) qPCR analysis of SPHK1 expression in REH

cells stably expressing a SPHK1-specific shRNA (shSPHK1) or a scrambled shRNA (scSPHK1). Expression levels were normalized to GAPDH and expressed relative to scSPHK1-expressing cells. Western blot analysis of SPHK1 protein levels confirms the knockdown of the endogenous protein (data not shown). (B) Knockdown of SPHK1 expression decreases REH cell proliferation. Formazan dye absorbance is proportional to cell density (mean \pm SE). Statistical significance of differences between the linear regression slopes ($*$)(days 0 to 4) were assessed, using scSPHK1 as reference (n = 4). (C) SPHK1 is a negative regulator of DNA damage-induced apoptosis in REH cells. The percent of apoptotic cells was determined by adding the fractions that were Annexin V⁺/PI⁺ and Annexin V⁺/PI⁻ gated outside the cellular debris (mean \pm SE). Statistical significance was assessed using an unpaired t-test (n = 3). (D) Knockdown of SPHK1 expression decreases the clonogenic potential of REH cells. The clonogenic surviving fraction corresponds to the plating efficiency of shSPHK1-infected cell normalized to the plating efficiency of the scSPHK1-infected REH cells (expressed in percentage). (E) Knockdown of SPHK1 expression decreases transmigration potential of REH cells. Relative cell migration is measured as the ratio of migrated cells/input (mean \pm SE). Statistical significance was assessed using a non-parametric Mann-Whitney t-test (n = 4).

FIGURE 6. The ETV6-transcriptional target, PTGER4, is a positive regulator of leukemia cell survival, clonogenic potential, and migration. (A) qPCR analysis of PTGER4 expression in REH cells stably expressing PTGER4-specific shRNA (shPTGER4) or a scrambled shRNA (scPTGER4). Expression levels were normalized to GAPDH and expressed relative to scPTGER4-expressing cells. Western blot analysis of PTGER4 protein levels confirms the knockdown of the endogenous protein (data not shown). (B) Knockdown of PTGER4 expression decreases REH cell proliferation. Formazan dye absorbance is proportional to cell

density (mean \pm SE). Statistical differences between the linear regression slopes (***) were assessed (days 0 to 4) using scPTGER4 as reference (n = 4). (C) Knockdown of PTGER4 expression has no DNA damage-induced apoptosis cytoprotective effect. The percent of apoptotic cells was determined by adding the fractions that were Annexin V⁺/PI⁺ and Annexin V⁺/PI⁻ gated outside the cellular debris (mean \pm SE). Statistical significance was assessed using an unpaired Student's t-test (n = 3). (D) Knockdown of PTGER4 expression decreases the clonogenic potential of REH cells. The clonogenic surviving fraction corresponds to the plating efficiency of shPTGER4-infected cells normalized to the plating efficiency of scPTGER4-infected REH cells (expressed in percentage). Statistical significance was assessed using an unpaired Student's t-test (n = 3). (E) Knockdown of PTGER4 expression decreases transmigration potential of REH cells. Relative cell migration is measured as the ratio of migrated cells/input (mean \pm SE). Statistical significance was assessed using a non-parametric Mann-Whitney t-test (n = 4).

FIGURE 7. Inhibition of PTGER4 using a specific inhibitor reveals a functional role in the leukemic transformation of REH cells. (A) The PTGER4 inhibitor L-161,982 prevents proliferation of REH cells in a dose-dependent manner. The inhibitor was added at the indicated concentrations and cell counts were performed over a 5-day period. No significant difference was observed on cell proliferation exposed to the different DMSO concentration corresponding to that used with the inhibitors. Data for the DMSO control, equivalent to that of 40 μ M inhibitor is shown. Statistical significance was assessed using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison post-test. (B) The PTGER4 inhibitor L-161,982 inhibits the migration capability of the REH cells through transwells containing 10 ng/mL of CXCL12 chemoattractant. The controls (C) contain DMSO concentrations equivalent to the ones used for the various inhibitor concentrations. The negative control (-) has no CXCL12 attractant,

while the positive control (+) has CXCL12. (C) The PTGER4 inhibitor L-161,982 induces no cytoprotective effect to DNA damage-induced apoptosis. The percent of apoptotic cells was determined by adding the fractions that were Annexin V⁺ and PI⁺ gated outside the cellular debris (mean \pm SE). Statistical significance for the migration and apoptosis assays was assessed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison post-test. All experiments were repeated three time and representative results shown.

Table 1: Primers used for molecular cloning, site-directed mutagenesis and chromatin immunoprecipitation.

Name	Sequence (5' to 3')
<u>Cloning : promoters</u>	
proSPHK1-858.R	agaggtcgaccggattcctggagcaag
proSPHK1-617.F	agaggtcgaccgctccctactggcctc
proSPHK1-351.GW.R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtacacgagttcgcgcgga
proSPHK1-168.GW.R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttgccgcttcttaggacctc
proSPHK1+115.F	agagaagctcccacgtctgagggactg
proSPHK1+115.GW.F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctcccacgtctgagggactg
proPTGER4-855.F	agagacgcgtaagctcacgctacccttca
proPTGER4-337.GW.F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctaaacggtcgccggttctcagt
proPTGER4+601.R	agagagatctctgcttctctaccgcta
proPTGER4+387.R	agagagatctccgaggtcagagttgcc
proPTGER4+178.R	agagagatctagctctggctgccctc
proPTGER4+178.GW.R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtagctctggctgccctcc
<u>Cloning : Site-directed mutagenesis</u>	
proSPHK1.mEBS-158	ttgccgcttgtaggacccgggagggaacc
proSPHK1.mEBS-104	ggccgtgccccaggcggcgctgagg
proSPHK1.mEBS-84	gctgaggccccaggcggcagaggccg
proSPHK1.mEBS+60	gttgaggccccaggagcgaggccggg
proPTGER4.mEBS-305	cagtggggccccactccaagccgagttcagg
proPTGER4.mEBS-97/-92	gctccgcccccttgaatggggccaatgggc
proPTGER4.mEBS-55/-49	cgcggttgctgggctgggcccagggaacttg
proPTGER4.mEBS+35	cagcccagagaccaagatgaacagccccaggc
ETV6.ΔPNT.Pacl	cacctgcgcttgagtaattaactggagcagggatgac
ETV6.ΔPNT.Pacl	gtgctctatgaactcctcagcatttaattaagcagaggaacctcgg
ETV6.ΔETS.KpnI	caggccatgccattggtaccatagcagactgtagactg
ETV6.ΔETS.KpnI	gtttatgaaaaccccagatggtaccatgagtgccgaacagac

<u>Cloning : shRNA and scrambled shRNA</u>	
SPHK1 shRNA (shSPHK1) (Clone TRCN0000036964)	ccgggcaggcatatggagatgaatctcgagattcactccatagcctgcttttg
scrambled SPHK1 shRNA (scSPHK1)	ccgggagtcctacgcctacatctcgagatgtatgaggcgtagggactctttt
PTGER4 shRNA (shPTGER4) (Clone TRCN000000204)	ccgggtactgtttctggacccttatctcgagataagggtccagaaacagtactttt
scrambled PTGER4 shRNA (scPTGER4)	ccgggctctctcctatgctagactctcgagagtctagcataggaagagagctttt
<u>Chromatin Immunoprecipitation</u>	
14834 ChIP.F (+)	ttgccaatcatttccttc
14834 ChIP.R (+)	cctccatgtgactgacacg
Negative ChIP.F (-)	atggtgccactgggatct
Negative ChIP.R (-)	tgccaaagcctaggggaaga
proSPHK1-849. ChIP.F	actggcctcaaagaagtga
proSPHK1-679. ChIP.R	ggagaggaggcttgacagt
proPTGER4-103.ChIP.F	gcttagccgctcctgaact
proPTGER4+76.ChIP.R	agcgcagacaccgtatttct
proPTGER4-258.ChIP.F	gcttagccgctcctgaact
proPTGER4-485.ChIP.R	agcgcagacaccgtatttct

Figure 1

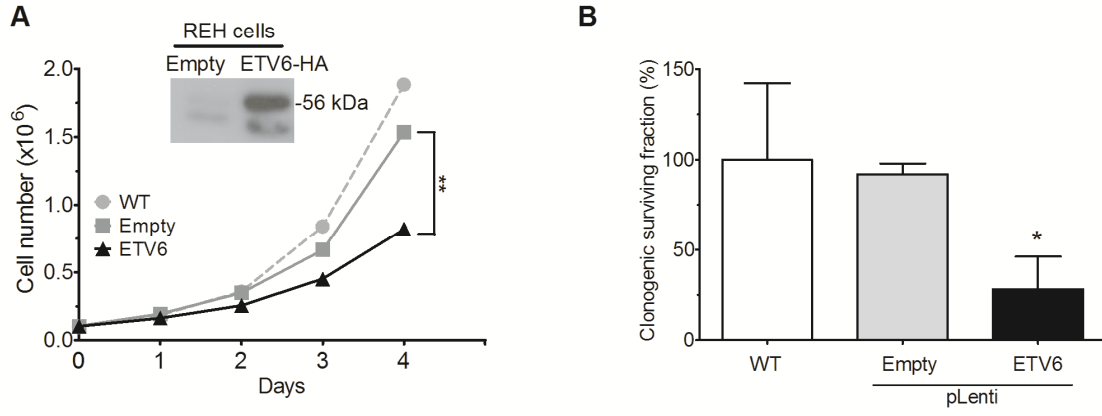


Figure 2

ETV6-dependent regulation of *SPHK1* and *PTGER4*

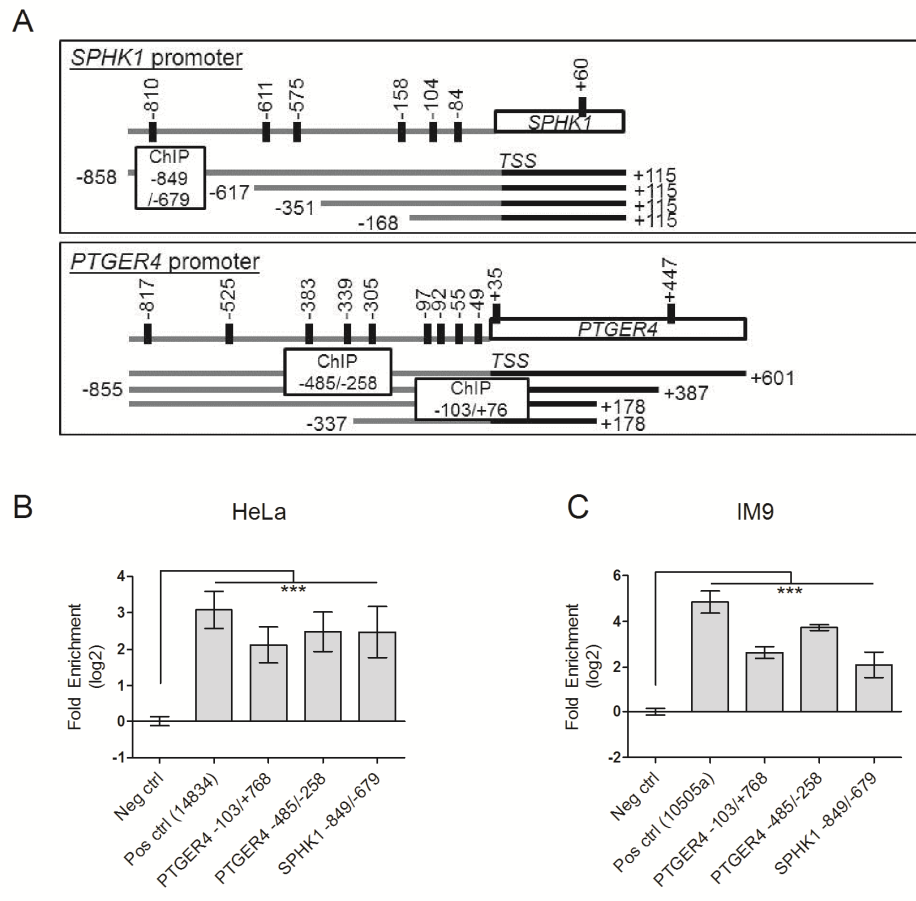


Figure 3

ETV6-dependent regulation of *SPHK1* and *PTGER4*

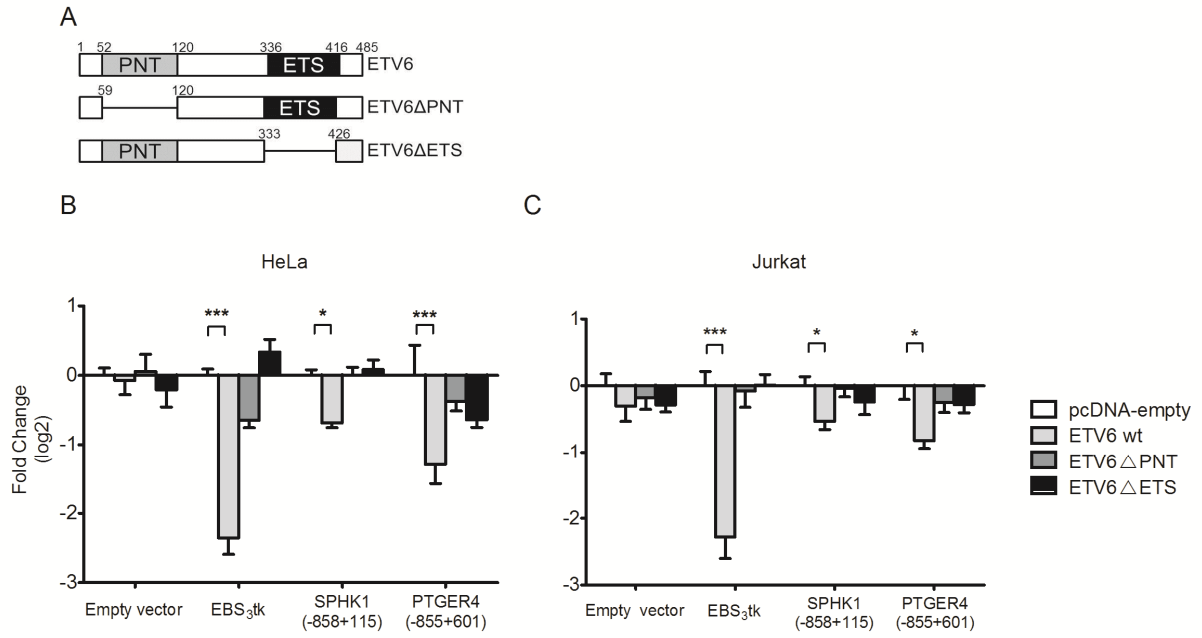


Figure 4

ETV6-dependent regulation of *SPHK1* and *PTGER4*

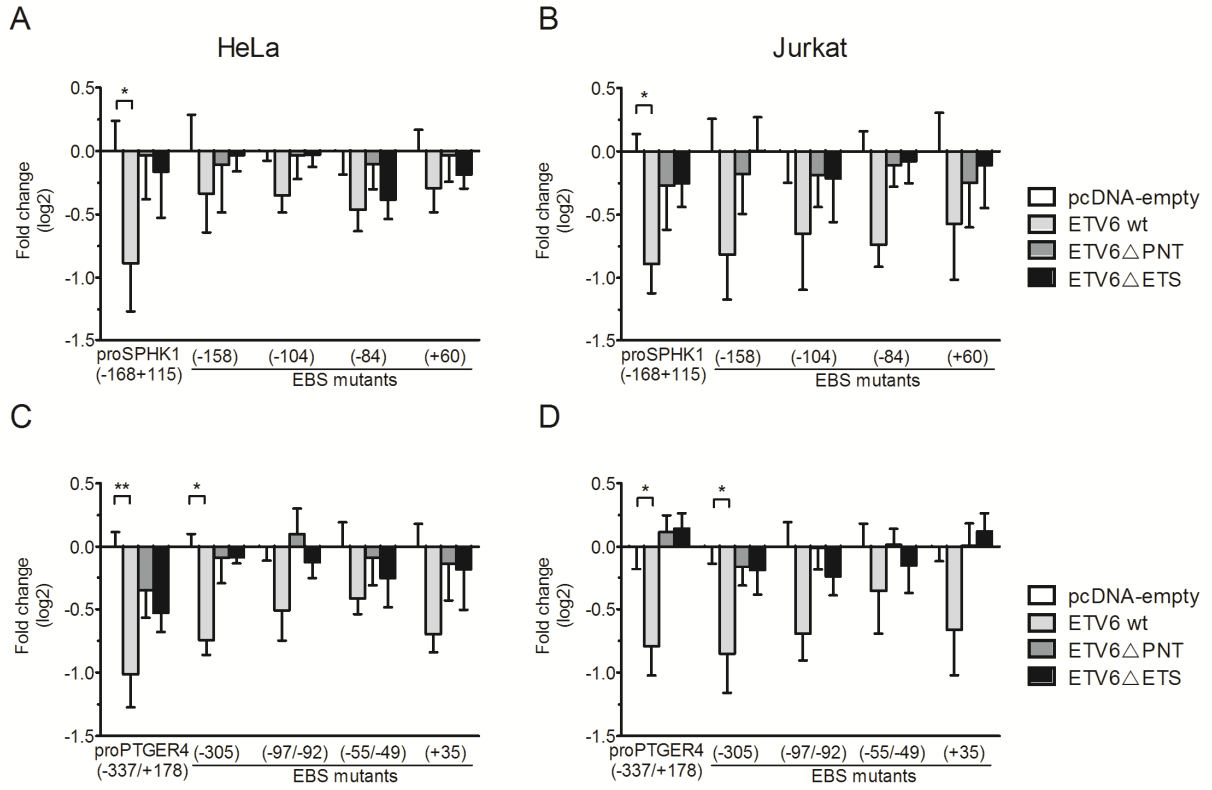


Figure 5

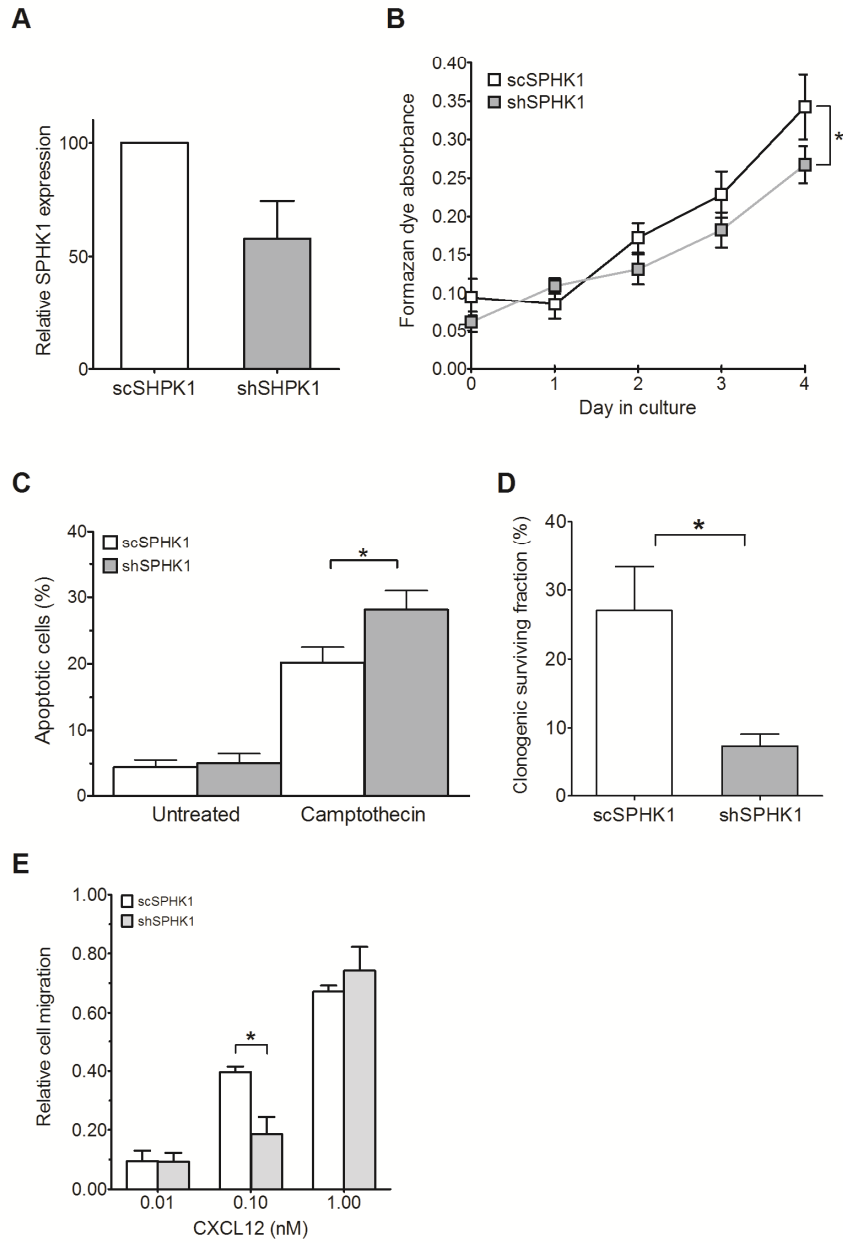


Figure 6

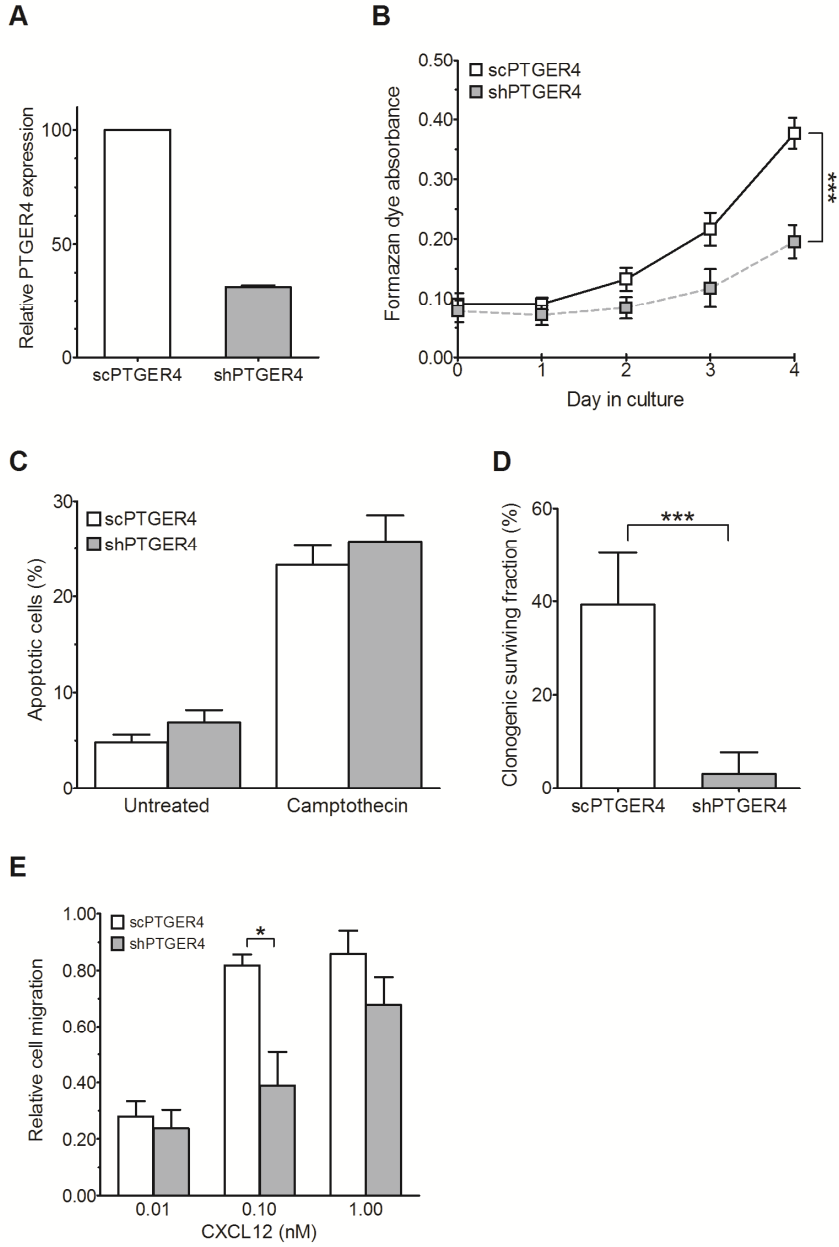
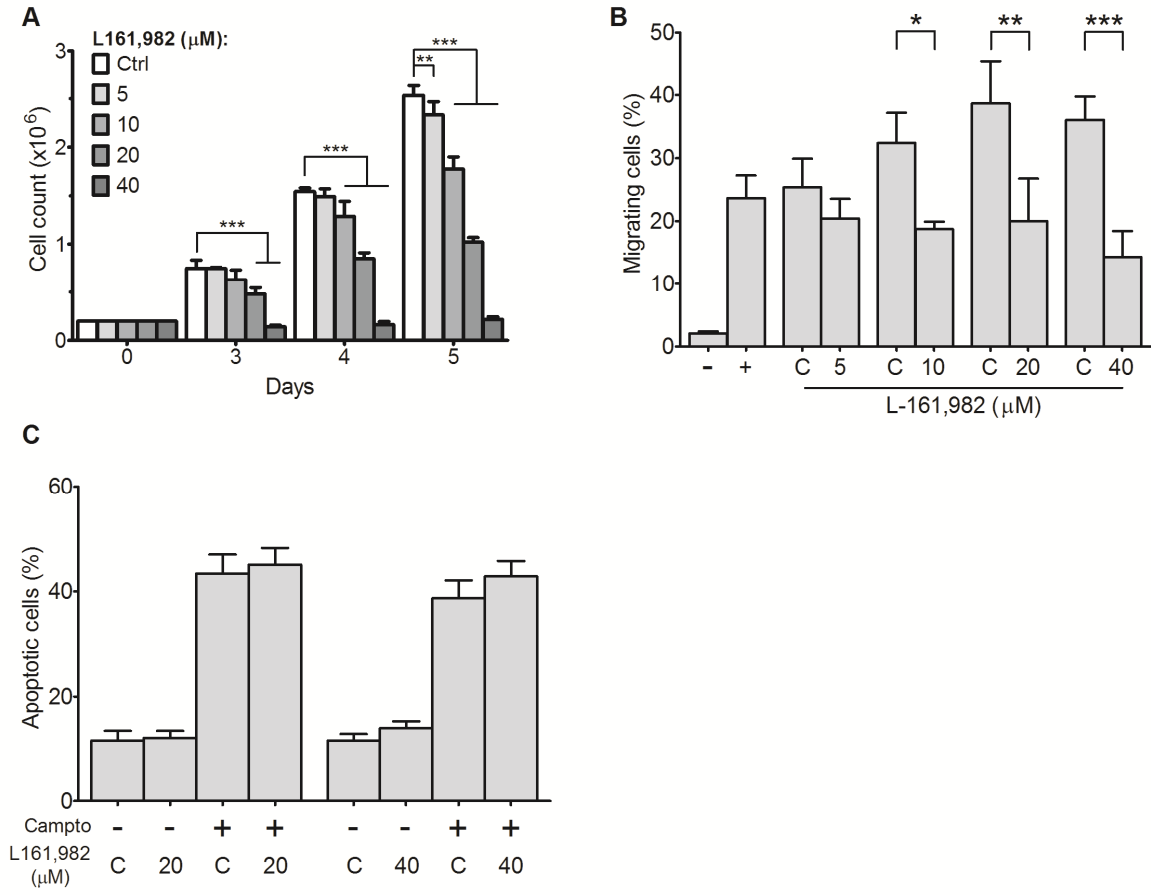


Figure 7

ETV6-dependent regulation of SPHK1 and PTGER4



Annexe D

Notre étude a permis d'identifier 248 gènes dont l'expression est influencée par la modulation de l'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules CD34+. Le tableau XVII présenté ci-dessous dresse la liste complète de tous les gènes identifiés.

Tableau XVII. Liste de tous les gènes co-modulés de façon significative avec l'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules CD34+

Numéro Ensembl	Symbole	P1 (ETV6 +)			P2 (ETV6 -)		
		log ₂ FC	p-valeur	FDR	log ₂ FC	p-valeur	FDR
ENSG00000100985	<i>MMP9</i>	-5,937	7,50E-61	5,67E-58	5,984	6,24E-71	1,79E-67
ENSG00000137491	<i>SLCO2B1</i>	-3,819	1,37E-46	5,46E-44	4,252	3,85E-63	5,03E-60
ENSG00000100600	<i>LGMN</i>	-3,517	2,33E-46	9,06E-44	3,206	3,39E-39	1,35E-36
ENSG00000177575	<i>CD163</i>	-3,738	6,68E-55	4,36E-52	3,014	6,24E-39	2,42E-36
ENSG00000135047	<i>CTSL</i>	-2,994	2,59E-34	5,10E-32	3,910	3,72E-53	3,56E-50
ENSG00000136235	<i>GNPMB</i>	-4,275	1,08E-70	1,20E-67	2,617	4,89E-33	1,25E-30
ENSG00000159189	<i>C1QC</i>	-5,472	6,55E-42	2,04E-39	4,154	6,50E-33	1,61E-30
ENSG00000173369	<i>C1QB</i>	-5,282	3,74E-32	6,17E-30	4,181	2,34E-34	6,46E-32
ENSG00000129538	<i>RNASE1</i>	-4,650	3,99E-40	1,20E-37	2,960	7,90E-32	1,86E-29
ENSG00000180113	<i>TDRD6</i>	-2,771	1,29E-29	1,78E-27	2,715	3,90E-29	7,00E-27
ENSG00000120708	<i>TGFB1</i>	-2,535	9,02E-29	1,17E-26	2,913	2,55E-36	8,14E-34
ENSG00000146070	<i>PLA2G7</i>	-2,940	4,10E-36	9,34E-34	2,498	1,46E-27	2,16E-25
ENSG00000174600	<i>CMKLR1</i>	-3,875	1,84E-45	6,96E-43	2,855	2,55E-26	3,30E-24
ENSG00000135929	<i>CYP27A1</i>	-3,910	5,10E-29	6,78E-27	2,788	6,57E-25	7,20E-23
ENSG00000187474	<i>FPR3</i>	-3,488	8,73E-38	2,32E-35	2,794	4,00E-24	4,15E-22
ENSG00000173372	<i>C1QA</i>	-3,515	2,71E-22	2,19E-20	5,049	1,01E-40	4,42E-38
ENSG00000131981	<i>LGALS3</i>	-2,246	3,16E-22	2,53E-20	2,666	1,05E-31	2,43E-29
ENSG00000104972	<i>LILRB1</i>	-2,414	3,16E-19	2,05E-17	2,547	4,91E-21	3,75E-19
ENSG00000156113	<i>KCNMA1</i>	-2,688	1,83E-18	1,12E-16	2,692	1,28E-28	2,19E-26
ENSG00000132514	<i>CLEC10A</i>	-2,167	4,91E-20	3,30E-18	2,152	3,88E-17	2,00E-15
ENSG00000244482	<i>LILRA6</i>	-2,379	4,59E-17	2,53E-15	2,453	3,19E-18	1,87E-16
ENSG00000099250	<i>NRP1</i>	-1,883	6,46E-17	3,50E-15	2,452	6,87E-27	9,49E-25
ENSG00000170458	<i>CD14</i>	-1,845	6,53E-17	3,53E-15	2,362	8,29E-27	1,11E-24
ENSG00000136160	<i>EDNRB</i>	-2,585	1,67E-23	1,53E-21	1,849	1,05E-16	5,09E-15
ENSG00000158714	<i>SLAMF8</i>	-2,537	2,18E-16	1,11E-14	3,024	4,48E-21	3,44E-19
ENSG00000153823	<i>PID1</i>	-2,468	4,29E-16	2,14E-14	2,793	6,30E-21	4,73E-19
ENSG00000171051	<i>FPR1</i>	-2,118	1,75E-20	1,20E-18	1,752	7,49E-16	3,31E-14
ENSG00000131042	<i>LILRB2</i>	-1,861	8,88E-16	4,31E-14	2,238	2,19E-22	1,90E-20
ENSG00000197629	<i>MPEG1</i>	-2,125	4,74E-23	4,10E-21	1,708	1,19E-15	5,19E-14
ENSG00000102575	<i>ACP5</i>	-2,935	2,33E-21	1,75E-19	2,425	1,65E-15	6,95E-14
ENSG00000140749	<i>IGSF6</i>	-1,869	8,86E-16	4,31E-14	1,972	6,62E-16	2,95E-14
ENSG00000115919	<i>KYNU</i>	-1,828	2,15E-15	1,01E-13	1,970	4,58E-18	2,62E-16
ENSG00000186818	<i>LILRB4</i>	-2,730	2,85E-24	2,73E-22	2,011	4,83E-15	1,91E-13
ENSG00000088827	<i>SIGLEC1</i>	-4,274	2,02E-49	9,38E-47	2,947	5,66E-15	2,21E-13
ENSG00000118849	<i>RARRES1</i>	-2,081	2,03E-16	1,04E-14	1,985	6,15E-15	2,39E-13

ENSG00000130203	<i>APOE</i>	-2,259	1,28E-14	5,67E-13	2,643	1,02E-26	1,36E-24
ENSG00000184060	<i>ADAP2</i>	-2,057	3,56E-14	1,51E-12	2,624	7,37E-18	4,07E-16
ENSG00000165168	<i>CYBB</i>	-1,830	6,95E-18	4,03E-16	1,580	5,76E-14	1,99E-12
ENSG00000102962	<i>CCL22</i>	-3,778	3,80E-19	2,45E-17	8,709	8,98E-14	3,06E-12
ENSG00000166523	<i>CLEC4E</i>	-2,801	1,07E-13	4,24E-12	2,654	6,24E-16	2,80E-14
ENSG00000143546	<i>S100A8</i>	-1,693	1,34E-15	6,41E-14	1,550	1,49E-13	4,90E-12
ENSG00000120217	<i>CD274</i>	-2,457	2,40E-13	9,21E-12	1,896	1,08E-13	3,64E-12
ENSG00000198719	<i>DLL1</i>	-2,312	1,60E-16	8,31E-15	2,125	4,32E-13	1,34E-11
ENSG00000108846	<i>ABCC3</i>	-2,247	4,07E-13	1,53E-11	2,608	2,98E-19	1,87E-17
ENSG00000183748	<i>MCR1L1</i>	-2,626	4,16E-13	1,56E-11	3,998	2,95E-25	3,36E-23
ENSG00000110446	<i>SLC15A3</i>	-2,330	1,51E-18	9,33E-17	2,064	5,18E-13	1,59E-11
ENSG00000178695	<i>KCTD12</i>	-1,792	5,35E-17	2,94E-15	1,521	8,70E-13	2,57E-11
ENSG00000169439	<i>SDC2</i>	-1,714	7,67E-13	2,82E-11	2,408	8,40E-22	6,86E-20
ENSG00000180672	<i>AC007362.2</i>	-2,607	5,42E-13	2,02E-11	2,890	2,79E-13	8,82E-12
ENSG00000103811	<i>CTSH</i>	-1,525	2,49E-12	8,74E-11	2,144	6,62E-21	4,93E-19
ENSG00000118257	<i>NRP2</i>	-2,420	9,07E-22	7,05E-20	1,819	3,54E-12	1,00E-10
ENSG00000162745	<i>OLFML2B</i>	-2,006	1,03E-14	4,60E-13	1,743	6,93E-12	1,90E-10
ENSG00000203747	<i>FCGR3A</i>	-3,222	8,26E-12	2,77E-10	4,469	1,93E-28	3,26E-26
ENSG00000186407	<i>CD300E</i>	-2,583	2,93E-23	2,58E-21	1,580	1,15E-11	3,02E-10
ENSG00000163221	<i>S100A12</i>	-1,690	6,15E-12	2,11E-10	1,572	4,25E-12	1,19E-10
ENSG00000177675	<i>CD163L1</i>	-4,138	4,62E-32	7,46E-30	2,443	1,34E-11	3,50E-10
ENSG00000074964	<i>ARHGEF10L</i>	-2,581	7,97E-20	5,25E-18	2,187	1,49E-11	3,86E-10
ENSG00000143344	<i>RGL1</i>	-1,444	1,25E-11	4,14E-10	2,065	1,47E-20	1,05E-18
ENSG00000204103	<i>MAFB</i>	-1,570	3,89E-11	1,22E-09	2,299	1,88E-21	1,50E-19
ENSG00000105499	<i>PLA2G4C</i>	-1,762	8,71E-11	2,60E-09	2,505	2,25E-11	5,74E-10
ENSG00000135838	<i>NPL</i>	-1,413	1,22E-10	3,57E-09	1,792	2,85E-16	1,31E-14
ENSG00000004799	<i>PDK4</i>	-2,131	1,25E-10	3,66E-09	3,410	4,11E-17	2,11E-15
ENSG00000248905	<i>FMN1</i>	-1,527	1,75E-10	5,06E-09	1,646	9,19E-13	2,69E-11
ENSG00000134028	<i>ADAMDEC1</i>	-2,718	8,15E-33	1,43E-30	1,342	5,15E-10	1,12E-08
ENSG00000223552	<i>RP11-24F11.2</i>	-2,053	5,44E-10	1,48E-08	2,095	9,51E-12	2,53E-10
ENSG00000178573	<i>MAF</i>	-1,414	5,57E-10	1,52E-08	2,699	2,28E-30	4,43E-28
ENSG00000168329	<i>CX3CR1</i>	-1,441	7,79E-10	2,08E-08	1,557	3,22E-10	7,19E-09
ENSG00000163220	<i>S100A9</i>	-1,563	9,89E-14	3,95E-12	1,246	2,06E-09	4,14E-08
ENSG00000160883	<i>HK3</i>	-1,827	1,77E-09	4,48E-08	1,669	1,90E-10	4,37E-09
ENSG00000166927	<i>MS4A7</i>	-1,281	2,15E-09	5,36E-08	1,634	2,75E-14	9,79E-13
ENSG00000123384	<i>LRP1</i>	-1,433	1,49E-11	4,86E-10	1,296	3,27E-09	6,40E-08
ENSG00000133048	<i>CHI3L1</i>	-1,948	1,87E-10	5,37E-09	1,300	4,67E-09	8,91E-08
ENSG00000085265	<i>FCN1</i>	-3,185	2,63E-42	8,60E-40	1,222	1,41E-08	2,52E-07
ENSG00000179163	<i>FUCA1</i>	-2,008	7,55E-21	5,32E-19	1,180	1,85E-08	3,24E-07
ENSG00000163823	<i>CCR1</i>	-1,446	3,47E-11	1,09E-09	1,196	2,06E-08	3,60E-07
ENSG00000128512	<i>DOCK4</i>	-1,279	8,18E-09	1,91E-07	1,278	1,99E-08	3,48E-07
ENSG00000125730	<i>C3</i>	-1,698	3,33E-08	7,28E-07	2,923	1,46E-22	1,30E-20
ENSG00000132669	<i>RIN2</i>	-1,323	4,47E-09	1,09E-07	1,249	4,41E-08	7,35E-07
ENSG00000110079	<i>MS4A4A</i>	-1,463	4,08E-10	1,13E-08	1,278	5,27E-08	8,69E-07
ENSG00000188906	<i>LRRK2</i>	-1,550	4,26E-12	1,48E-10	1,222	7,02E-08	1,14E-06
ENSG00000018280	<i>SLC11A1</i>	-1,282	6,81E-08	1,42E-06	1,275	1,58E-08	2,78E-07
ENSG00000127951	<i>FGL2</i>	-1,109	1,26E-07	2,49E-06	1,154	4,33E-08	7,22E-07
ENSG00000100292	<i>HMOX1</i>	-1,168	2,24E-07	4,20E-06	1,751	7,83E-15	3,00E-13
ENSG00000136603	<i>SKIL</i>	-1,129	3,56E-07	6,42E-06	1,637	1,98E-13	6,44E-12
ENSG00000026751	<i>SLAMF7</i>	-1,297	4,76E-07	8,36E-06	2,722	9,89E-22	8,03E-20
ENSG00000010704	<i>HFE</i>	-1,611	4,99E-07	8,74E-06	2,750	1,29E-21	1,04E-19
ENSG00000187134	<i>AKR1C1</i>	-1,173	6,51E-07	1,11E-05	2,120	4,99E-18	2,84E-16
ENSG00000182718	<i>ANXA2</i>	-1,033	8,25E-07	1,38E-05	1,732	2,45E-16	1,14E-14
ENSG00000101439	<i>CST3</i>	-1,055	9,62E-07	1,60E-05	1,355	1,91E-10	4,38E-09

ENSG00000177706	<i>FAM20C</i>	-1,955	9,04E-10	2,39E-08	2,058	1,23E-06	1,66E-05
ENSG00000157168	<i>NRG1</i>	-2,719	7,57E-13	2,79E-11	1,841	1,32E-06	1,77E-05
ENSG00000175899	<i>A2M</i>	-1,018	1,50E-06	2,39E-05	1,878	1,58E-14	5,80E-13
ENSG00000178726	<i>THBD</i>	-1,466	1,61E-06	2,55E-05	2,142	1,08E-12	3,16E-11
ENSG00000171631	<i>P2RY6</i>	-1,480	3,31E-07	6,01E-06	1,710	1,53E-06	2,04E-05
ENSG00000085514	<i>PILRA</i>	-1,238	4,08E-08	8,81E-07	1,046	2,89E-06	3,66E-05
ENSG00000164733	<i>CTSB</i>	-0,973	2,64E-06	4,03E-05	1,515	4,81E-13	1,49E-11
ENSG00000114554	<i>PLXNA1</i>	-1,368	1,78E-08	4,01E-07	1,153	3,20E-06	4,00E-05
ENSG00000105928	<i>DFNA5</i>	-1,475	8,65E-10	2,30E-08	1,323	3,43E-06	4,27E-05
ENSG00000129450	<i>SIGLEC9</i>	-1,222	4,69E-07	8,26E-06	1,115	3,55E-06	4,40E-05
ENSG00000092068	<i>SLC7A8</i>	-1,287	8,19E-07	1,37E-05	1,520	3,45E-06	4,29E-05
ENSG00000185532	<i>PRKG1</i>	-2,378	6,41E-13	2,38E-11	2,559	6,24E-06	7,39E-05
ENSG00000160791	<i>CCR5</i>	-1,867	1,76E-13	6,85E-12	1,112	8,52E-06	9,83E-05
ENSG00000161921	<i>CXCL16</i>	-1,308	8,57E-06	1,19E-04	3,609	7,64E-31	1,57E-28
ENSG00000260947	<i>RP11-384P7.7</i>	-1,495	2,62E-07	4,85E-06	1,386	1,14E-05	1,26E-04
ENSG00000103313	<i>MEFV</i>	-2,882	7,54E-20	4,99E-18	1,154	1,54E-05	1,65E-04
ENSG00000225217	<i>HSPA7</i>	-3,113	1,93E-17	1,09E-15	1,734	1,55E-05	1,67E-04
ENSG00000196549	<i>MME</i>	-1,337	1,28E-05	1,72E-04	2,370	5,65E-18	3,19E-16
ENSG00000112303	<i>VNN2</i>	-1,200	1,30E-05	1,74E-04	1,097	2,11E-06	2,72E-05
ENSG00000242498	<i>ARPIN</i>	-1,593	1,94E-08	4,37E-07	1,280	2,12E-05	2,23E-04
ENSG00000110324	<i>IL10RA</i>	-1,537	1,25E-12	4,48E-11	0,906	2,14E-05	2,25E-04
ENSG00000107551	<i>RASSF4</i>	-1,159	1,32E-07	2,59E-06	0,911	2,24E-05	2,34E-04
ENSG00000101916	<i>TLR8</i>	-1,836	6,72E-16	3,32E-14	0,913	3,01E-05	3,07E-04
ENSG00000006459	<i>KDM7A</i>	-0,892	3,12E-05	3,82E-04	1,098	5,75E-07	8,22E-06
ENSG00000134955	<i>SLC37A2</i>	-1,072	1,38E-05	1,84E-04	1,131	2,05E-05	2,16E-04
ENSG00000111729	<i>CLEC4A</i>	-1,018	3,54E-05	4,29E-04	1,379	1,36E-07	2,12E-06
ENSG00000165449	<i>SLC16A9</i>	-1,705	7,31E-13	2,70E-11	1,197	4,65E-05	4,56E-04
ENSG00000136040	<i>PLXNC1</i>	-0,854	3,81E-05	4,57E-04	1,425	1,10E-11	2,91E-10
ENSG00000169403	<i>PTAFR</i>	-0,905	2,59E-05	3,23E-04	0,915	1,41E-05	1,53E-04
ENSG00000155465	<i>SLC7A7</i>	-1,112	2,66E-06	4,05E-05	0,942	6,44E-05	6,15E-04
ENSG00000213853	<i>EMP2</i>	-1,520	6,22E-05	7,11E-04	2,738	4,30E-20	2,95E-18
ENSG00000139572	<i>GPR84</i>	-1,421	6,93E-05	7,81E-04	1,999	4,92E-12	1,37E-10
ENSG00000002933	<i>TMEM176A</i>	-2,097	2,03E-16	1,04E-14	0,972	8,66E-05	8,09E-04
ENSG00000240207	<i>RP11-379F4.4</i>	-1,080	8,24E-05	9,07E-04	1,649	2,32E-08	4,02E-07
ENSG00000133121	<i>STARD13</i>	-0,919	9,60E-05	1,04E-03	1,462	1,23E-10	2,91E-09
ENSG00000109436	<i>TBC1D9</i>	-1,699	1,29E-13	5,10E-12	0,904	1,39E-04	1,24E-03
ENSG00000178175	<i>ZNF366</i>	-1,172	1,30E-04	1,35E-03	1,712	2,07E-05	2,18E-04
ENSG00000230006	<i>ANKRD36BP2</i>	-1,056	3,67E-05	4,42E-04	1,186	1,36E-04	1,22E-03
ENSG00000010610	<i>CD4</i>	-1,585	3,02E-13	1,15E-11	0,799	2,01E-04	1,74E-03
ENSG00000244682	<i>FCGR2C</i>	-3,503	2,57E-28	3,22E-26	1,166	2,03E-04	1,76E-03
ENSG00000179331	<i>RAB39A</i>	-1,325	1,05E-04	1,12E-03	1,291	7,68E-05	7,23E-04
ENSG00000197249	<i>SERPINA1</i>	-2,629	1,10E-27	1,33E-25	0,827	2,25E-04	1,92E-03
ENSG00000162512	<i>SDC3</i>	-1,462	2,29E-04	2,21E-03	2,938	3,27E-31	7,35E-29
ENSG00000172243	<i>CLEC7A</i>	-0,880	3,57E-05	4,32E-04	0,790	2,20E-04	1,88E-03
ENSG00000179841	<i>AKAP5</i>	-0,889	2,50E-04	2,39E-03	1,997	1,02E-17	5,60E-16
ENSG00000106565	<i>TMEM176B</i>	-1,965	2,48E-17	1,39E-15	0,784	3,02E-04	2,47E-03
ENSG00000064042	<i>LIMCH1</i>	-1,124	2,16E-04	2,10E-03	2,296	3,79E-05	3,81E-04
ENSG00000116990	<i>MYCL</i>	-2,431	1,55E-18	9,53E-17	1,038	3,08E-04	2,51E-03
ENSG00000146192	<i>FGD2</i>	-1,513	8,69E-12	2,89E-10	0,815	3,21E-04	2,60E-03
ENSG00000198108	<i>CHSY3</i>	-1,352	3,19E-04	2,92E-03	1,674	6,53E-07	9,24E-06
ENSG00000162407	<i>PPAP2B</i>	-1,733	7,40E-08	1,53E-06	1,045	3,82E-04	3,04E-03
ENSG00000260802	<i>LINC00890</i>	-1,018	1,39E-04	1,43E-03	0,928	1,92E-04	1,67E-03
ENSG00000116117	<i>PARD3B</i>	-0,899	1,26E-04	1,31E-03	1,097	2,16E-04	1,85E-03
ENSG00000121769	<i>FABP3</i>	-1,005	1,86E-04	1,84E-03	1,119	1,72E-04	1,51E-03

ENSG00000151117	<i>TMEM86A</i>	-0,978	1,23E-04	1,28E-03	1,065	2,47E-04	2,08E-03
ENSG00000196735	<i>HLA-DQA1</i>	-2,391	9,88E-28	1,20E-25	0,749	4,59E-04	3,59E-03
ENSG00000104951	<i>IL4I1</i>	-1,187	4,25E-04	3,73E-03	2,115	1,60E-11	4,15E-10
ENSG00000135218	<i>CD36</i>	-0,708	6,48E-04	5,32E-03	1,804	2,21E-17	1,16E-15
ENSG00000160213	<i>CSTB</i>	-0,714	6,78E-04	5,52E-03	1,069	2,96E-07	4,45E-06
ENSG00000137959	<i>IFI44L</i>	-2,029	4,66E-11	1,45E-09	1,642	7,94E-04	5,83E-03
ENSG00000144057	<i>ST6GAL2</i>	-2,591	2,58E-14	1,11E-12	1,205	8,00E-04	5,87E-03
ENSG00000183023	<i>SLC8A1</i>	-0,747	7,30E-04	5,87E-03	1,192	1,51E-07	2,34E-06
ENSG00000090013	<i>BLVRB</i>	-0,715	7,36E-04	5,90E-03	0,942	6,44E-06	7,60E-05
ENSG00000133574	<i>GIMAP4</i>	-1,639	3,24E-08	7,11E-07	1,093	8,42E-04	6,14E-03
ENSG00000204577	<i>LILRB3</i>	-2,099	6,94E-11	2,11E-09	1,111	8,81E-04	6,39E-03
ENSG00000120594	<i>PLXDC2</i>	-0,700	7,71E-04	6,13E-03	0,827	8,20E-05	7,68E-04
ENSG00000141540	<i>TTYH2</i>	-0,764	9,15E-04	7,06E-03	1,088	4,23E-06	5,15E-05
ENSG00000152503	<i>TRIM36</i>	-1,079	9,47E-04	7,26E-03	1,793	2,59E-08	4,45E-07
ENSG00000120256	<i>LRP11</i>	-0,837	3,28E-04	3,00E-03	0,730	5,86E-04	4,44E-03
ENSG00000203710	<i>CR1</i>	-0,772	8,84E-04	6,86E-03	0,870	1,12E-04	1,02E-03
ENSG00000243335	<i>KCTD7</i>	-0,722	1,20E-03	8,84E-03	1,795	1,18E-14	4,44E-13
ENSG00000108932	<i>SLC16A6</i>	-3,586	8,61E-30	1,20E-27	1,118	1,34E-03	9,21E-03
ENSG00000176170	<i>SPHK1</i>	-0,832	1,28E-03	9,27E-03	1,037	2,39E-05	2,50E-04
ENSG00000116701	<i>NCF2</i>	-0,959	5,61E-06	8,04E-05	0,663	1,48E-03	1,01E-02
ENSG00000202515	<i>VTRNA1-3</i>	-0,921	1,48E-03	1,05E-02	1,324	4,69E-07	6,79E-06
ENSG00000143226	<i>FCGR2A</i>	-0,678	1,49E-03	1,06E-02	0,877	2,99E-05	3,06E-04
ENSG00000136541	<i>ERMN</i>	-0,839	1,40E-03	9,99E-03	1,575	1,15E-04	1,05E-03
ENSG00000198848	<i>CES1</i>	-3,596	7,78E-17	4,14E-15	1,641	1,65E-03	1,11E-02
ENSG00000090339	<i>ICAM1</i>	-0,743	1,67E-03	1,16E-02	1,396	7,90E-10	1,69E-08
ENSG00000139974	<i>SLC38A6</i>	-0,681	1,96E-03	1,34E-02	0,951	1,63E-05	1,75E-04
ENSG00000065534	<i>MYLK</i>	-0,694	2,02E-03	1,37E-02	1,390	1,37E-09	2,82E-08
ENSG00000181045	<i>SLC26A11</i>	-0,779	2,08E-03	1,40E-02	1,303	3,74E-07	5,52E-06
ENSG00000137496	<i>IL18BP</i>	-1,265	3,53E-08	7,71E-07	0,738	2,20E-03	1,43E-02
ENSG00000118503	<i>TNFAIP3</i>	-0,672	2,21E-03	1,47E-02	1,074	8,17E-07	1,14E-05
ENSG00000154229	<i>PRKCA</i>	-0,646	2,43E-03	1,58E-02	1,379	1,61E-10	3,75E-09
ENSG00000143369	<i>ECM1</i>	-0,771	2,47E-03	1,60E-02	2,119	5,24E-20	3,57E-18
ENSG00000151176	<i>PLBD2</i>	-0,662	2,43E-03	1,58E-02	0,861	1,06E-04	9,71E-04
ENSG00000154589	<i>LY96</i>	-0,856	1,30E-04	1,34E-03	0,671	2,41E-03	1,55E-02
ENSG00000111344	<i>RASAL1</i>	-0,762	2,62E-03	1,69E-02	1,335	4,46E-05	4,39E-04
ENSG00000103966	<i>EHD4</i>	-0,689	2,22E-03	1,47E-02	0,772	3,34E-04	2,70E-03
ENSG00000174705	<i>SH3PXD2B</i>	-0,674	2,44E-03	1,59E-02	0,827	1,96E-04	1,70E-03
ENSG00000120457	<i>KCNJ5</i>	-3,564	2,77E-21	2,07E-19	1,131	2,89E-03	1,80E-02
ENSG00000123342	<i>MMP19</i>	-1,319	4,28E-07	7,63E-06	0,856	2,96E-03	1,84E-02
ENSG00000050628	<i>PTGER3</i>	-0,765	2,95E-03	1,86E-02	1,746	8,79E-16	3,86E-14
ENSG00000267710	<i>AC006116.20</i>	-1,174	7,24E-07	1,23E-05	0,858	3,08E-03	1,90E-02
ENSG00000204681	<i>GABBR1</i>	-0,684	3,12E-03	1,95E-02	1,126	7,54E-07	1,06E-05
ENSG00000055732	<i>MCOLN3</i>	-2,296	2,20E-10	6,24E-09	1,559	3,18E-03	1,95E-02
ENSG00000156968	<i>MPV17L</i>	-0,689	3,17E-03	1,97E-02	1,061	4,84E-07	6,98E-06
ENSG00000137266	<i>SLC22A23</i>	-1,247	8,82E-08	1,80E-06	0,735	3,29E-03	2,01E-02
ENSG00000251023	<i>RP11-549J18.1</i>	-0,992	8,05E-04	6,35E-03	1,336	2,10E-03	1,38E-02
ENSG00000196329	<i>GIMAP5</i>	-0,802	1,40E-03	1,00E-02	0,785	1,55E-03	1,05E-02
ENSG00000119714	<i>GPR68</i>	-0,943	4,43E-05	5,24E-04	0,762	3,40E-03	2,05E-02
ENSG00000182578	<i>CSF1R</i>	-1,452	6,82E-12	2,31E-10	0,615	3,52E-03	2,12E-02
ENSG00000158869	<i>FCER1G</i>	-0,613	3,51E-03	2,14E-02	1,413	1,81E-11	4,68E-10
ENSG00000136098	<i>NEK3</i>	-0,718	1,11E-03	8,31E-03	0,691	2,33E-03	1,50E-02
ENSG00000261269	<i>RP11-389C8.2</i>	-0,851	3,67E-03	2,22E-02	1,501	2,68E-04	2,23E-03
ENSG00000059378	<i>PARP12</i>	-0,643	3,03E-03	1,90E-02	0,752	7,91E-04	5,81E-03
ENSG00000167703	<i>SLC43A2</i>	-1,008	2,46E-06	3,79E-05	0,632	4,30E-03	2,49E-02

ENSG00000174837	<i>EMR1</i>	-1,325	5,89E-09	1,40E-07	0,664	4,36E-03	2,51E-02
ENSG00000141337	<i>ARSG</i>	-1,486	6,44E-09	1,53E-07	0,727	4,52E-03	2,59E-02
ENSG00000165181	<i>C9orf84</i>	-0,878	7,71E-05	8,58E-04	1,143	4,33E-03	2,50E-02
ENSG00000157870	<i>FAM213B</i>	-0,752	1,39E-03	9,95E-03	0,674	2,68E-03	1,69E-02
ENSG00000129595	<i>EPB41L4A</i>	-0,972	4,73E-03	2,72E-02	1,897	1,05E-09	2,20E-08
ENSG00000165730	<i>STOX1</i>	-1,276	3,90E-06	5,74E-05	0,820	4,93E-03	2,79E-02
ENSG00000184674	<i>GSTT1</i>	-0,692	4,92E-03	2,80E-02	0,941	1,91E-04	1,66E-03
ENSG00000119888	<i>EPCAM</i>	-0,823	5,25E-03	2,97E-02	2,153	1,68E-15	7,05E-14
ENSG00000143643	<i>TTC13</i>	-0,714	1,19E-03	8,80E-03	0,627	3,82E-03	2,26E-02
ENSG00000074657	<i>ZNF532</i>	-1,504	2,97E-10	8,34E-09	0,822	5,80E-03	3,19E-02
ENSG00000148288	<i>GBGT1</i>	-0,676	1,74E-03	1,21E-02	0,618	3,62E-03	2,16E-02
ENSG00000197405	<i>C5AR1</i>	-0,648	6,30E-03	3,44E-02	2,579	2,91E-28	4,81E-26
ENSG00000012779	<i>ALOX5</i>	-0,700	7,09E-03	3,79E-02	1,278	4,65E-07	6,76E-06
ENSG00000227507	<i>LTB</i>	-0,956	2,13E-04	2,07E-03	0,766	6,99E-03	3,72E-02
ENSG00000137265	<i>IRF4</i>	-1,280	6,03E-07	1,04E-05	0,899	8,43E-03	4,35E-02
ENSG00000144115	<i>THNSL2</i>	-0,774	8,37E-03	4,33E-02	1,169	2,61E-04	2,18E-03
ENSG00000171115	<i>GIMAP8</i>	-0,640	8,94E-03	4,55E-02	1,315	4,53E-07	6,58E-06
ENSG00000153064	<i>BANK1</i>	-0,886	3,59E-04	3,24E-03	0,662	8,24E-03	4,27E-02
ENSG00000134245	<i>WNT2B</i>	-1,238	7,39E-06	1,04E-04	0,916	9,02E-03	4,61E-02
ENSG00000197712	<i>FAM114A1</i>	-0,685	9,66E-03	4,83E-02	1,002	3,11E-05	3,16E-04
ENSG00000251348	<i>HSPD1P11</i>	-0,953	6,66E-04	5,44E-03	0,909	8,37E-03	4,32E-02
ENSG00000175898	<i>CTD-2369P2.2</i>	-1,230	1,21E-06	1,97E-05	0,690	1,01E-02	5,03E-02
ENSG00000183579	<i>ZNR3</i>	-0,741	2,57E-03	1,66E-02	0,647	6,28E-03	3,41E-02
ENSG00000250698	<i>RP11-392B6.1</i>	-0,705	6,34E-03	3,46E-02	1,740	2,66E-03	1,68E-02
ENSG00000187783	<i>TMEM72</i>	-1,018	5,26E-05	6,13E-04	0,730	1,06E-02	5,26E-02
ENSG00000070087	<i>PFN2</i>	-0,669	1,14E-02	5,50E-02	1,466	4,69E-05	4,60E-04
ENSG00000173166	<i>RAPH1</i>	-0,749	1,30E-02	6,07E-02	2,751	8,60E-09	1,59E-07
ENSG00000101017	<i>CD40</i>	-0,736	1,33E-02	6,17E-02	1,604	9,24E-09	1,70E-07
ENSG00000226029	<i>RP4-798A10.2</i>	-0,762	9,27E-03	4,69E-02	1,064	2,40E-03	1,54E-02
ENSG00000154898	<i>CCDC144CP</i>	-0,677	1,12E-02	5,42E-02	1,097	1,26E-03	8,75E-03
ENSG00000174171	<i>RP11-23P13.6</i>	-1,000	1,25E-02	5,89E-02	1,028	7,29E-04	5,42E-03
ENSG00000150540	<i>HNMT</i>	-0,653	8,16E-03	4,24E-02	0,645	5,04E-03	2,84E-02
ENSG00000137474	<i>MYO7A</i>	-0,764	1,52E-02	6,89E-02	1,031	2,48E-04	2,09E-03
ENSG00000173083	<i>HPSE</i>	-0,639	1,59E-02	7,15E-02	1,925	1,95E-16	9,20E-15
ENSG00000082781	<i>ITGB5</i>	-0,783	1,61E-02	7,21E-02	2,543	3,00E-14	1,06E-12
ENSG00000157601	<i>MX1</i>	-1,803	4,34E-14	1,83E-12	0,655	1,60E-02	7,32E-02
ENSG00000267136	<i>RP11-53B2.3</i>	-0,719	2,07E-03	1,39E-02	0,908	1,28E-02	6,10E-02
ENSG00000138639	<i>ARHGAP24</i>	-1,501	4,80E-08	1,03E-06	0,679	1,66E-02	7,55E-02
ENSG00000121297	<i>TSHZ3</i>	-0,642	1,48E-02	6,73E-02	0,796	1,57E-03	1,06E-02
ENSG00000236581	<i>STARD13-AS</i>	-1,925	8,39E-12	2,79E-10	1,061	1,81E-02	8,09E-02
ENSG00000187554	<i>TLR5</i>	-2,485	3,18E-14	1,36E-12	0,677	1,93E-02	8,52E-02
ENSG00000038945	<i>MSR1</i>	-0,705	2,01E-02	8,59E-02	2,386	1,08E-16	5,20E-15
ENSG00000170866	<i>LILRA3</i>	-1,084	2,08E-02	8,79E-02	2,584	5,70E-17	2,85E-15
ENSG00000171621	<i>SPSB1</i>	-0,668	2,09E-02	8,83E-02	1,633	1,54E-09	3,16E-08
ENSG00000242732	<i>RGAG4</i>	-0,780	5,07E-04	4,32E-03	0,588	1,90E-02	8,42E-02
ENSG00000169515	<i>CCDC8</i>	-0,883	2,98E-04	2,76E-03	0,633	2,02E-02	8,84E-02
ENSG00000213934	<i>HBG1</i>	-1,404	2,19E-02	9,16E-02	4,609	7,11E-55	7,29E-52
ENSG00000214353	<i>VAC14-AS1</i>	-0,959	3,75E-04	3,36E-03	0,715	2,14E-02	9,26E-02
ENSG00000250361	<i>GYPB</i>	-0,976	2,37E-02	9,69E-02	1,931	1,80E-09	3,66E-08
ENSG00000115828	<i>QPCT</i>	-0,595	2,25E-02	9,33E-02	0,843	4,78E-04	3,72E-03
ENSG00000136856	<i>SLC2A8</i>	-0,663	1,23E-02	5,83E-02	0,709	8,65E-03	4,45E-02

Annexe E

La modulation de l'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules CD34+ n'affecte pas significativement l'expression des facteurs Ets ETS1, ETS2, SPI1, ELK-1 et FLI-1 (fig. 35).

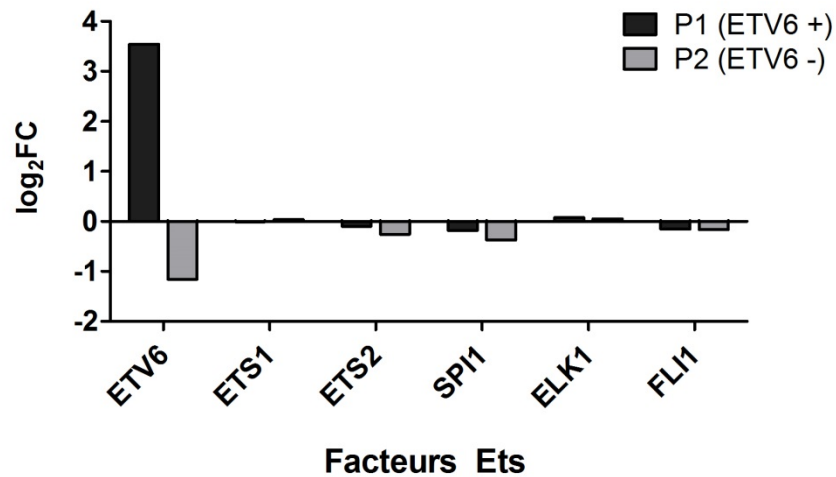


Figure 35. Différence d'expression des facteurs Ets dans les populations P1 et P2 suite à la modulation d'ETV6. L'histogramme représente l'expression des facteurs de transcription ETV6, ETS1, ETS2, SPI1, ELK1 et FLI1 dans les cellules CD34+ où l'expression d'ETV6 a été modulée (P1 = ETV6 +, P2 = ETV6 -). ETV4 est absent puisqu'il n'est pas exprimé dans les cellules CD34+. L'expression de chaque gène est exprimée en log₂FoldChange. L'expression des facteurs ETS1, ETS2, SPI1, ELK1 et FLI1 est relativement stable lorsque l'expression d'ETV6 est modulée.

Annexe F

L'expression du gène *SPHK1* est inversement corrélée avec l'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules CD34+ (fig. 36).

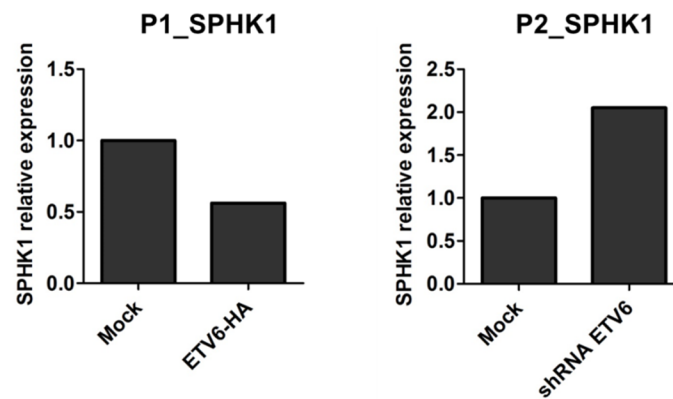


Figure 36. Niveau d'expression du gène *SPHK1* dans les populations P1 et P2. Les histogrammes représentent l'expression relative de *SPHK1* dans les populations de cellules CD34+ P1 et P2, où l'expression d'ETV6 a été modulée (P1 = ETV6 +, P2 = ETV6 -). L'expression du gène *SPHK1* est inversement corrélée à celle d'ETV6.

Annexe G

L'expression des gènes *MAF* et *MAFB* est inversement corrélée avec l'expression du facteur de transcription ETV6 dans des cellules CD34+ (fig. 37).

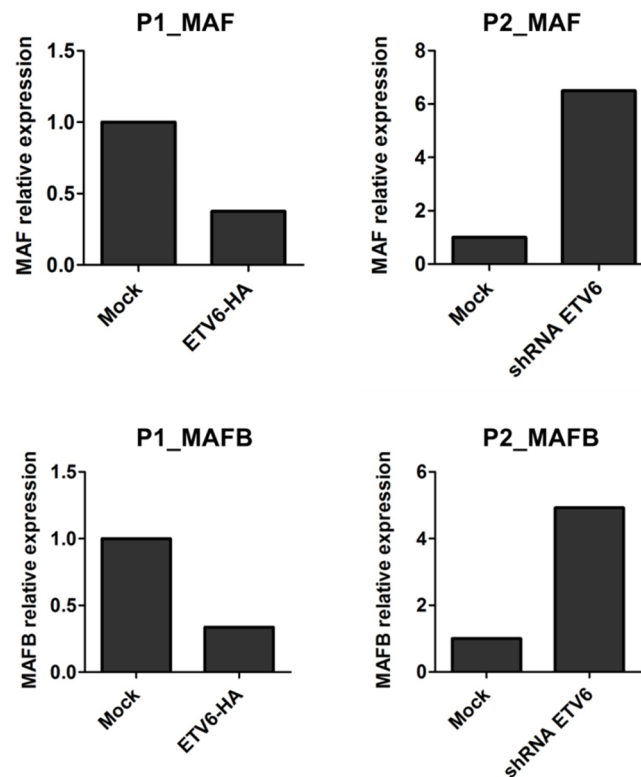


Figure 37. Niveau d'expression des gènes *MAF* et *MAFB* dans les populations P1 et P2. Les histogrammes représentent l'expression relative de *MAF* et *MAFB* dans les populations de cellules CD34+ P1 et P2, où l'expression d'ETV6 a été modulée (P1 = ETV6 +, P2 = ETV6 -). L'expression des gènes *MAF* et *MAFB* est inversement corrélée à celle d'ETV6.

