

Université de Montréal

Régulation de l'expression de SCL par la protéine à homéodomaine
Otx-1 et le facteur de transcription érythrocytaire GATA-1

Par

Virginie Sanguin Gendreau

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

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

Août 2004

© Virginie Sanguin Gendreau, 2004



AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Régulation de l'expression de SCL par la protéine à homéodomaine
Otx-1 et le facteur de transcription érythrocytaire GATA-1**

Présenté par :

Virginie Sanguin Gendreau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Sylvie Mader

Membre du jury : Alain Nepveu

Directeur de recherche : Trang Hoang

Mémoire accepté le : _____

SOMMAIRE

SCL, un facteur de transcription bHLH (hélice-boucle-hélice basique), est un régulateur clé de l'hématopoïèse; il est essentiel pour l'établissement du système hématopoïétique, pour la formation de toutes les lignées hématopoïétiques et plus tardivement, pour la différenciation érythrocytaire et mégacaryocytaire. Récemment, nous avons montré qu'un gain de fonction de SCL restaure la déficience érythrocytaire des souris nulles pour Otx-1, qui est un facteur de transcription à homéodomaine de la famille bicoïde. Ceci suggère fortement que SCL agit en aval d'Otx-1.

Au cours de cette étude, nous démontrons que SCL est une cible directe d'Otx-1 dans les cellules érythrocytaires. En effet, une collaboration transcriptionnelle entre Otx-1 et le facteur de transcription érythrocytaire GATA-1 est observée sur le promoteur de SCL de l'exon 1a. Otx-1 occupe le promoteur de SCL *in vivo* dans les cellules érythrocytaires via une interaction avec GATA-1 sur le site GATA situé à -35 pb. Par ailleurs, nous montrons qu'Otx-1 induit l'expression endogène de SCL dans des cellules primaires. Finalement, Otx-1 favorise la différenciation érythrocytaire au détriment de la différenciation myéloïde, un effet qui est associé par ailleurs à une expression ectopique de SCL.

Nous proposons un modèle par lequel le complexe protéique formé par GATA-1 et Otx-1 lie le site GATA du promoteur proximal 1a de SCL pour activer son expression et soutenir la différenciation érythrocytaire durant l'hématopoïèse. Notre étude a donc permis l'identification d'un nouveau régulateur transcriptionnel de SCL et d'un nouveau co-facteur de GATA-1.

Mots clés : SCL, Otx-1, GATA-1, hématopoïèse, transcription, interaction protéique, différenciation érythrocytaire.

ABSTRACT

SCL, a basic helix-loop-helix stem cell leukemia transcription factor, is a master regulator of hematopoiesis shown to be essential for hematopoietic and erythroid cell development. Recently, we have found that a gain of function of SCL rescues the erythroid deficiency observed in Otx-1 knock-out mice. These results suggest that SCL acts downstream of the bicoid-like homeodomain transcription factor Otx-1.

In the present study, we demonstrate that SCL is a direct target of Otx-1 in erythroid cells. We found that Otx-1 and the erythroid GATA-1 transcription factors physically interact to cooperatively activate the SCL promoter. Both proteins occupy the SCL exon 1a promoter *in vivo* in erythroid cells. Furthermore, we show that Otx-1 induces endogenous SCL expression in primary erythroid cells. Moreover, an Otx-1 gain-of-function enhances erythroid differentiation and blocks myeloid differentiation, an effect that is associated with the ectopic expression of SCL.

Taken together, these results support a model by which GATA-1 tethers Otx-1 to the -35 GATA site of the SCL promoter 1a to drive its expression and to sustain an erythroid fate during hematopoiesis. Our study has permitted the identification of Otx-1 as a novel cofactor of GATA-1 and as a transcriptional regulator of the SCL promoter 1a.

Key words : SCL, Otx-1, GATA-1, hematopoiesis, transcription, protein interaction, erythroid differentiation.

Le travail présenté dans la section du manuscrit a été effectué majoritairement par Virginie Sanguin Gendreau à l'exception de la figure 1B et 2A qui ont été effectuées par Richard Martin et Mathieu Tremblay.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xi

CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1. Hématopoïèse	2
1.1 Établissement de l'hématopoïèse au cours du développement.....	2
1.2 L'hématopoïèse	3
1.3 Régulateurs clés de l'hématopoïèse.....	5
2. Le facteur de transcription SCL	6
2.1 Origine du gène SCL.....	6
2.2 Facteur de transcription de la classe bHLH.....	6
2.3 Expression de SCL.....	7
2.4 Gènes cibles de SCL.....	8
3. Fonctions de SCL	10
3.1 Rôle essentiel au développement de toutes les lignées hématopoïétiques.....	9
3.2 Rôle sur le choix des lignées	10
3.3 Spécification du sang et de l'endothélium à partir du mésoderme	12
4. Régulation transcriptionnelle de SCL.....	13
4.1 Structure du gène SCL	14
4.2. Éléments de régulation.....	14
4.2.1.1 Enhancers de SCL	16
4.2.1.2 Activité transcriptionnelle des promoteurs de l'exon 1a et 1b	17
4.2.1.2.1 Régulation du promoteur de l'exon 1a.....	18

5. Les facteurs de transcription de la famille GATA.....	20
5.1 Les éléments GATA	20
5.2 Structure des protéines de la famille GATA.....	20
5.3 Membres de la famille GATA.....	21
5.4 Fonctions de GATA-1	22
5.4.1 Érythropoïèse définitive	22
5.4.2 Érythropoïèse primitive.....	23
5.4.3 Choix de lignées.....	23
5.5 GATA-1 et ses partenaires	24
5.5.1 Interaction avec FOG	24
5.5.2 Antagonisme avec PU.1	25
6. Les facteurs de transcription à homéodomaine	26
6.1 Les gènes homéotiques	26
6.2 Classification des homéoprotéines.....	27
6.2.1 Protéines à homéodomaine de classe II : paired et bicoïde	27
6.2.2 Les membres de la famille Otx	29
6.2.2.1 Otx-1 et Otx-2.....	29
6.2.2.2 Otx-3 et Crx	30
6.3 Otx-1 dans l'hématopoïèse.....	31
7. Rationnalisation.....	33
Légende des figures.....	35
Figures	38
CHAPITRE 2: PRÉSENTATION DU MANUSCRIT.....	42
TITRE : SCL is a direct transcriptional target of Otx1	43
ABSTRACT	44
INTRODUCTION	45
MATERIALS AND METHODS	47
Plasmids constructs.....	47
Luciferase assay	48
Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)	48
Chromatine immunoprecipitation, immunoprecipitation, western and pull-down assays	49

Cells cultures factors and retroviral infections	51
Flow cytometry	52
RT-PCR.....	52
RESULTS.....	54
Otx1 collaborates with GATA-1 to activate the exon 1a promoter of SCL	54
Otx1 and GATA-1 occupy the SCL promoter <i>in vivo</i>	54
Activation of the SCL promoter without direct binding of Otx1.....	55
Direct interaction between GATA-1 and Otx1.....	56
Otx1 homeodomain is sufficient for an interaction with GATA-1.....	57
CT, NT, HD domains of Otx1 are required for the synergy with GATA-1	58
Otx1 enhances SCL expression in primary hematopoietic cells	58
Otx1 gain-of-function enhances erythroid and blocks myeloid differentiation.....	59
DISCUSSION	61
SCL enhancers.....	61
GATA-containing complexes	62
Transcriptional activation by Otx1 without DNA-binding	63
Role of Otx1 during hematopoiesis	64
Role for a GATA/Otx1 complex in the CNS.....	65
Acknowledgements	67
REFERENCES.....	68
LEGENDS	80
FIGURES	85
CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION	91
Régulation transcriptionnelle de SCL	92
Complexes transcriptionnels	97
Les cibles moléculaires d'Otx-1 et Otx-2	102
Rôles d'Otx-1 dans l'hématopoïèse	104
Otx-1 vs Oxt-2	107
Mécanisme dans le cerveau.....	109

Conclusion.....	109
BIBLIOGRAPHIE.....	111
REMERCIEMENTS.....	138

LISTE DES TABLEAUX

TABLE I. Oligonucleotides used for RT-PCR and ChIP analysis.....	53
---	-----------

LISTE DES FIGURES

Figure I. Différenciation hématopoïétique	38
Figure II. Implication des facteurs de transcription dans la différenciation hématopoïétique	39
Figure III. Diagramme du gène SCL murin	40
Figure IV. Structure d'une protéine de la famille GATA	41
Figure V. Structure d'une protéine à homéodomaine	41
Figure VI. Comparaison des séquences des protéines à homéodomaine de la famille Otx et Pitx	41
Figure 1. Otx1 and GATA-1 transcription factors cooperatively activate and bind to the exon 1a promoter of <i>Scf</i>	85
Figure 2. Activation of the <i>Scf</i> promoter by Otx1 and GATA-1 without direct binding of Otx1	86
Figure 3. Otx1 and GATA-1 physically interact <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	87
Figure 4. Mapping of Otx1 domains required for interaction and synergy with GATA-1.....	88
Figure 5. Otx1 induces endogenous <i>Scf</i> expression.....	89
Figure 6. Otx1 enhances erythroid and impedes myeloid differentiation	90

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A	Adénosine
ANF	"natriuretic promoter"
α GSU	Sous-unité de la glycoprotéine
AP-1	"Activator protein 1"
ADN	Acide déoxyribonucléotide
ARNm	Acide ribonucléotide messenger
β FSH	Hormone de stimulation du follicule
β LH	"Luteinizing hormone"
B220	Marqueur de surface cellulaire pour les lymphocytes B
BFU-E	"Blast forming unit erythroid early"
bHLH	"Basic hélix-loop-hélix"
BL-CFC	"Blast colony-forming cells"
C	Cytosine
CD11b	Marqueur de surface cellulaire pour les monocytes et macrophages
cDNA	"Complémentaire DNA"
CE3	Site consensus bicoïde
CF	Doigt de zinc en C-terminal
CFU-E	"Colony forming unit erythroid late"
CFU-MIX	"Colony forming unit mixed"
CFU-S12	"Day 12 colony-forming unit in the spleen"
ChIP	"Chromatin immunoprecipitation"
c-Kit	Récepteur tyrosine kinase pour le ligand Kit
CLP	"Commun lymphoid progenitor"
CMP	"Commun myeloid progenitor"
CNS	"Central nervous system"
CRE	"Cre-recombinase"

CRX	"Photoreceptor-specific cone-rod homeobox protein"
CS	"Conserved sequence"
CT	Domaine C-terminal
Δ CT	Délétion du domaine C-terminal
d.p.c.	"Days post coitum"
E2A	"Enhancer binding factors E12/E47"
E 7.5	Jour embryonnaire 7.5
EKLF	"Erythroid Kruppel-like factor"
Elf-1	"Ecdysone-induced 74EF Like Factor 1 (ets domain transcription factor) "
EMSA	"Electrophoretic mobility shift assays"
EPOR	"Erythropoietin receptor"
ES	"Embryonic stem cell"
Fli-1	"Friend leukemia integration 1"
Flk-1	Récepteur du VEGF
FOG	"Friend of GATA-1"
G	Guanosine
G-CSF-R	"Granulocyte colony-stimulating factor"
GFP	"Green fluorescent protein"
GH	"Growth hormone"
GMP	"Granulocyte/monocyte progenitor"
GnRH	"gonadotropin-releasing hormone"
GPA	Glycophorine A
Gsc	Goosecoïde
GST	"Glutathione S-transferase"
HA	"Hemagglutinine epitope tag antibody"
Hbox	Boîte à homéodomaine
HD	Homéodomaine
HPRT	"Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase"
HSC	"Hematopoietic stem cell"

IRES	"Internal ribosome entry site"
KDA	Kilo Dalton
Kb	Kilo base
LCR	"Locus control region"
LDB-1	"LIM domain binding protein-1"
LIM(domaine)	Domaine riche en cystéines pouvant lier le zinc
LMO2	"LIM-only protein-2"
LT-HSC	"Long-term HSC"
MBP	"Maltose-binding protein"
MEL C88	"Mouse ErythroLeukemia" Clone 88
MEP	"Megakaryocyte-erythroid progenitor "
Mitf	"microphthalmia-associated transcription factor"
MPP	"Multipotent progenitor"
NF	Doigt de zinc en N-terminal
NF-E2	"nuclear factor (erythroid-derived 2)"
Nkx2.5	"NK2 transcription factor related, locus 5"
NT	Domaine en N-terminal
Δ NT	Délétion du domaine N-terminal
Oct	"Organic cation transporter"
OTD	"Orthodenticle"
Otx	"Othodenticle homolog"
P4.2	Protéine 4.2
Pan-1	"Pancreas protein 1"
PAX	"Paired box protein"
Pb	Paire de base
plpC	"Poly(I)-poly(C)"
Pit	"POU-domain transcriptional regulator"
Pitx	"Pituitary homeobox"
POMC	Gène hypophysaire de la pro-opiomélanocortine
POU	"POU domain gene"
PU.1	"Purine-rich-1"

QNR71	"Melanosome glycoprotein"
RPE	"Retina pigment epithelium"
RT-PCR	"Reverse transcription-polymerase chain reaction"
SCL	"Stem cell leukemia"
SCL ^{-/-}	"Knock out" SCL
SCL ^{tg}	Souris transgénique SCL sous le contrôle du promoteur SIL
SIL	"SCL interrupting locus"
SKN1	"Skin antigen 1"
SP1	"Sp1 transcription factor"
ST-HSC	"Short-time HSC"
T	Thymidine
T-ALL	Leucémies lymphoïdes aiguës des cellules T chez l'enfant
TBP	"TATA-box binding protein"
TCR	Récepteur des cellules T
TER 119	Marqueur de surface cellulaire pour les érythrocytes
TER 119 ⁺	Cellules positives pour le marqueur de surface cellulaire pour les érythrocytes
TRP	"Tyrosinase-related proteins"
Tyr	"Melanogenic enzyme tyrosinase"
µg	Microgramme
VEGF	"Vascular endothelial growth factor"
VEGF ^{lo/lo}	Souris VEGF hypomorphe
WT	"Wild type"

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Introduction

Une importante question en biologie est de comprendre ce qui contrôle la détermination et la différenciation de cellules souches vers un type cellulaire donné. L'hématopoïèse, le processus de la formation des cellules du sang, est un système de différenciation bien caractérisé utilisé comme modèle pour identifier les mécanismes fondamentaux qui régulent le destin d'une cellule. La présente introduction portera sur l'hématopoïèse et un de ses régulateur clé, le gène SCL. Mon projet de maîtrise portant plus précisément sur la régulation transcriptionnelle de celui-ci, une revue des régulateurs potentiels de SCL, les facteurs de transcription de la famille GATA et ceux la famille à homéodomaine sera abordée.

1. Hématopoïèse

1.1 Établissement de l'hématopoïèse au cours du développement

Le développement du système hématopoïétique chez les mammifères se fait en plusieurs étapes. Les premières cellules sanguines, les globules rouges embryonnaires, sont produites dans le sac vitellin à partir du mésoderme au jour embryonnaire 7.5 (E7.5) chez la souris. Cette hématopoïèse, dite primitive, est caractérisée par la présence d'érythrocytes nucléés qui synthétisent les chaînes de globines embryonnaires (ζ , ε/β H1). L'hématopoïèse définitive s'initie ensuite dans le foie foetal au jour E10-11 où est observée la production d'érythrocytes énucléés qui expriment les globines foetales α et γ . Finalement, avant la naissance, les cellules hématopoïétiques colonisent la moelle osseuse qui devient alors le site principal de l'hématopoïèse et le demeure tout au long

de la vie adulte. Les érythrocytes produits expriment alors les globines adultes (α et β) (Orkin, 1995; Orkin, 1996).

1.2 L'hématopoïèse

Tout au long de la vie d'un individu, les différentes cellules du sang sont continuellement produites suite à la différenciation d'un type cellulaire unique : les cellules souches hématopoïétiques (HSC). Les cellules souches hématopoïétiques se caractérisent par leur capacité d'auto-renouvellement, c'est-à-dire leur pouvoir de régénérer d'autres cellules HSC. Il existe 2 types de cellules HSC, les cellules LT-HSC (long-term) pouvant s'auto-renouveler indéfiniment ou les cellules ST-HSC (short-term) capables d'auto-renouvellement pour un nombre défini de division. En d'autres termes, les cellules LT-HSC peuvent reconstituer l'hématopoïèse d'un animal irradié pour sa vie entière tandis que les cellules ST-HSC peuvent reconstituer celui-ci seulement pour une courte période de temps. Les cellules HSC ont également le potentiel de se différencier pour générer toutes les lignées hématopoïétiques. Elles se différencient premièrement en cellules progénitrices qui vont éventuellement devenir précurseurs de différentes lignées et donner lieu à des cellules de plus en plus matures (Orkin, 1995; Orkin, 2000).

L'hématopoïèse est habituellement représentée de façon hiérarchique, c'est-à-dire par les cellules HSC qui donnent lieu à des progéniteurs multipotents qui se différencient en précurseurs commis selon les différentes lignées (Figure 1). Cette représentation simplifiée du développement hématopoïétique illustre les populations cellulaires intermédiaires de façon très structurée. La caractérisation de cellules selon leurs marqueurs de surface et leur potentiel de développement cellulaire ont permis de déterminer les différents stades de différenciation pour chaque type de cellules.

Lors de la division cellulaire, les deux cellules filles produites par la cellule LT-HSC peuvent garder les mêmes propriétés, se différencier ou mourir par apoptose. De plus, elles peuvent rester dans la moelle osseuse ou migrer en périphérie. Les cellules ST-HSC peuvent se différencier en progéniteurs multipotents (MPP), qui sont incapables ou seulement brièvement capables d'autorenouvellement. Ceux-ci vont se différencier en progéniteurs commis qui pourront donner lieu à une progéniture différenciée ayant des fonctions matures irréversibles. Ainsi, il y a une diminution du potentiel de différenciation à chaque étape pour finalement atteindre une perte complète de ce potentiel pour les cellules matures.

Deux types de progéniteurs commis ont été identifiés ; les progéniteurs lymphoïdes (CLP, common lymphoïde progenitor) et les progéniteurs myéloïdes (CMP, common myeloid progenitor) qui définissent 2 grandes classes de cellules hématopoïétiques (Passegue et al., 2003; Orkin, 2000). Les lymphocytes B et les lymphocytes T font partie de la lignée lymphoïde et ont différents rôles dans l'immunité. Les progéniteurs myéloïdes tant qu'à eux peuvent se différencier en 2 autres types de progéniteurs commis : les progéniteurs GMP (granulocyte-monocyte progenitor) qui se différencient en monocytes/macrophages et en neutrophiles/granulocytes ainsi que les progéniteurs MEP (megakaryocyte-erythroid progenitor) qui se différencient en cellules érythrocytaires, mégacaryocytaires et mastocytaires. Les monocytes/macrophages jouent un rôle de phagocytose tandis que les neutrophiles/granulocytes ingèrent et détruisent des microorganismes. Les érythrocytes (globules rouges) contiennent l'hémoglobine responsable du transport de l'oxygène vers les tissus tandis que les mégacaryocytes produisent des milliers de plaquettes qui ont un rôle dans la coagulation du sang (Orkin, 2000) (Figure I).

Les marqueurs de surface cellulaire sont très utiles pour l'identification des différents stades de maturation de différentes lignées de cellules hématopoïétiques. Ces marqueurs sont des protéines de surface exprimées spécifiquement par certaines lignées cellulaires et à différents

stades de différenciation. Parmi ceux-ci, c-kit, un récepteur tyrosine kinase pour le ligand Kit, est un marqueur exprimé dans les progéniteurs précoces et les cellules HSC. Il y a aussi des marqueurs pour les cellules matures comme TER 119 pour les érythrocytes, CD11b pour les monocytes/macrophages et B220 pour les lymphocytes B (Orkin, 2000) (figure I).

1.3 Régulateurs clés de l'hématopoïèse

La production de cellules hématopoïétiques matures est contrôlée à tous les stades de différenciation. La prolifération et la survie des cellules progénitrices impliquent principalement les facteurs de croissance provenant de l'environnement tandis la différenciation de celles-ci vers des cellules matures dépend de l'expression d'une combinaison de facteurs de transcription spécifiques aux lignées. Ces facteurs consolideraient un profil d'expression génique par l'activation de gènes spécifiques à chaque lignée (Orkin, 1995; Orkin, 2000; Zhu et Emerson, 2002).

L'invalidation génique a joué un rôle crucial dans l'identification de gènes essentiels à l'hématopoïèse. Il a été démontré que les facteurs de transcription SCL et LMO2 sont essentiels à la formation du tissu hématopoïétique à partir du mésoderme au cours du développement. GATA-2 semble impliqué dans l'expansion et le maintien du potentiel des cellules souches hématopoïétiques. De plus, la formation de globules rouges matures nécessite, entre autres, la présence de GATA-1, SCL et LMO2. De la même façon, PU.1 est requis pour les lignées myéloïdes, Ikaros, E2A, pax-5 et PU.1 pour les lymphocytes et NF-E2, GATA-1 et FOG-1 pour les mégacaryocytes (Orkin, 1995). Ainsi, tous ces facteurs de transcription jouent chacun un rôle essentiel et spécifique dans l'établissement et le développement des lignées hématopoïétiques (Figure II). Les travaux décrits ici porteront principalement sur l'un des facteurs de

transcription clé de l'hématopoïèse, le produit du gène SCL, et plus précisément de sa régulation transcriptionnelle.

2. Le facteur de transcription SCL

2.1 Origine du gène SCL

Le facteur de transcription SCL (leucémie de type cellule souche) est un des régulateurs clé de l'hématopoïèse. SCL a été originalement découvert suite à son expression ectopique dans les cellules T, lors de leucémies lymphoïdes. Les réarrangements génétiques du locus SCL représentent 25% des aberrations chromosomiques associées aux leucémies lymphoïdes aiguës des cellules T chez l'enfant (T-ALL). La plupart des recombinaisons du gène SCL résultent d'une translocation entre les chromosomes 1p32-33 et 14q11 où est retrouvé le locus des récepteurs des cellules T (TCR) α/δ provoquant une surexpression de SCL. Dans d'autres cas, une délétion positionne le locus SCL sous le contrôle du gène ubiquitaire SIL (SCL interrupting locus) entraînant son expression inappropriée dans le compartiment lymphoïde (Begley et Green, 1999).

2.2 Facteur de transcription de la classe bHLH

Le gène SCL code pour une protéine bHLH (hélice-boucle-hélice) qui existe sous 2 isoformes principales; une protéine pleine longueur de 42 kDa (SCLpp42) et une forme tronquée de 22 kDa (SCLpp22). Ces protéines résultent d'un épissage d'ARN messenger différent et de l'initiation de la traduction à partir d'un AUG interne (Goldfarb et al., 1992; Elwood et al., 1994). Les 2 protéines sont phosphorylées sur des résidus sérine (Prasad et Brandt, 1997) et sont principalement nucléaires. Dans certaines cellules en mitose, SCL peut être cytoplasmique, sa fonction dans ce compartiment étant inconnue (Pulford et al., 1995; Chetty et al., 1997)

Les 2 isoformes SCLpp42 et SCLpp22 conservent la région bHLH qui est essentielle pour la localisation nucléaire, la liaison à l'ADN et l'interaction avec d'autres protéines (Goldfarb et al., 1992; Hsu et al., 1991; Hsu et al., 1994). La région N-terminale de la protéine, absente dans l'isoforme p22, agit comme domaine de transactivation (Wadman et al., 1994) alors que la région C-terminale semble être nécessaire pour les effets anti-apoptotique de SCL (Condorelli et al., 1997).

Le gène SCL fait partie de la famille des facteurs de transcription hélice-boucle-hélice basique (bHLH) dont le domaine HLH (hélice-boucle-hélice) permet la dimérisation protéique alors que le domaine basique est responsable de la liaison à l'ADN sur des motifs CANNTG (boîte E). Les protéines bHLH lient l'ADN en homo- ou hétérodimères. Dans plusieurs types cellulaires, les décisions sur la croissance et la différenciation cellulaire sont déterminées par l'équilibre des complexes protéiques. Il existe 2 groupes de protéines bHLH, la classe I et la classe II. Les protéines de classe I sont exprimées de façon ubiquitaire et peuvent aussi bien s'homodimériser que s'hétérodimériser avec d'autres protéines HLH. Parmi les protéines de classe I, généralement appelées protéines E, on retrouve les produits du gène E2A, soit E12 et E47, ainsi que ceux des gènes E2-2 et HEB. Les protéines de classe II, dont SCL et myoD font partie, ont des patrons d'expression spécifiques aux tissus et nécessitent une hétérodimérisation avec des protéines de classe I pour lier l'ADN (Robb et Begley, 1997). De plus, les facteurs bHLH sont d'importants régulateurs de la détermination tissulaire puisque MyoD et SCL sont tous 2 nécessaires et capables d'induire la formation d'un tissu. MyoD, une protéine HLH musculo-spécifique, est capable d'induire la myogénèse (formation des muscles) alors que SCL, une protéine hémato-spécifique, est capable d'induire l'hématopoïèse, soit la formation du sang, une fonction de SCL qui sera discutée ultérieurement (Murre et al., 1989; Massari et Murre, 2000).

2.3 Expression de SCL

Au cours du développement, SCL est exprimé de façon précoce dans les sites d'hématopoïèse embryonnaire et foetale, dans l'endothélium vasculaire et dans certaines régions du système nerveux central. En effet, SCL se retrouve dans les cellules endothéliales vasculaires et dans la couche de l'endocarde du cœur (Kallianpur et al., 1994), ainsi que dans le mésencéphale, le cerveau postérieur et la moelle épinière lors du développement embryonnaire (Green et al., 1992; Sanchez et al., 1999); (Sinclair et al., 1999; Gottgens et al., 2000). De plus, chez l'adulte SCL a pu être détecté dans le cerveau (Green et al., 1992), dans des cellules de muscles lisses de l'aorte et de la vessie (Kallianpur et al., 1994). Ce patron d'expression semble hautement conservé à travers les vertébrés, des mammifères jusqu'au poisson "teleost" (Gottgens et al., 2002; Barton et al., 1999).

Au niveau du système hématopoïétique, SCL est exprimé dans les sites d'hématopoïèse primitive et définitive ainsi que dans les cellules HSC et les progéniteurs primitifs (Elefanty et al., 1998; Akashi et al., 2000; Herblot et al., 2000; Herblot et al., 2002; Ramalho-Santos et al., 2002). Lors de la différenciation cellulaire, son expression est diminuée dans la plupart des lignées excepté dans les voies de différenciation érythrocytaire, mégacaryocytaire et mastocytaire (Green et al., 1992; Akashi et al., 2000; Begley et al., 1989; Green et al., 1991; Visvader et al., 1991; Mouthon et al., 1993; Brady et al., 1995; Pulford et al., 1995; Hoang et al., 1996). Il est à remarquer que le patron d'expression de SCL dans les lignées différenciées est partagé avec le facteur de transcription à doigt de zinc GATA-1, qui est essentiel pour la différenciation érythrocytaire et mégacaryocytaire. Le fait que SCL et GATA-1 partagent un patron d'expression similaire est une première indication que SCL pourrait tout comme GATA-1 être important pour la différenciation et le choix de lignée durant l'hématopoïèse adulte.

2.4 Gènes cibles de SCL

SCL peut activer ou réprimer la transcription de plusieurs gènes et sa capacité à réguler l'expression des gènes est dépendante de son intégration dans des complexes multifactoriels. Malgré le rôle clé que joue ce facteur dans l'hématopoïèse, les gènes cibles directement régulés par celui-ci sont peu caractérisés. C-kit, un des premiers gènes identifiés comme cible directe de SCL (Krosi et al., 1998; Lecuyer et al., 2002), est un récepteur tyrosine kinase requis pour le maintien des cellules souches et des progéniteurs (Russell, 1979). L'activation de c-kit par SCL dans des cellules hématopoïétiques se fait spécifiquement via la formation d'un complexe multifactoriel incluant également E47, LMO2, Ldb-1, GATA-1/2 et Sp1 qui s'associent au promoteur de c-kit *in vivo* (Lecuyer et al., 2002). D'autres travaux ont permis d'identifier deux autres gènes cibles de SCL, la glycophorine A (Gpa), une glycoprotéine membranaire retrouvé à la surface des érythrocytes (Lahlil et al., 2003) ainsi que la protéine 4.2 (P4.2), un composant important de la membrane des érythrocytes (Xu et al., 2003). Les promoteurs de ces gènes cibles sont activés plus fortement par le complexe multifactoriel incluant GATA-1 alors que GATA-2 permet une activation plus élevée du promoteur c-kit. Cette spécificité d'action concorde avec les fonctions biologiques des facteurs GATA et leurs patrons d'expression. En effet, GATA-2 est requis pour la maintenance des progéniteurs hématopoïétiques et est exprimé précocement tout comme c-kit (Tsai et al., 1994; Tsai and Orkin, 1997) tandis que GATA-1 est essentiel pour le développement érythrocytaire et est exprimé plus tardivement lors de la différenciation érythrocytaire, comme Gpa et P4.2 (Weiss et al., 1994; Fujiwara et al., 1996). Ces variations dans la composition du complexe SCL durant la différenciation hématopoïétique démontrent une certaine flexibilité dans la régulation de la transcription en fonction du contexte cellulaire.

3. Fonctions de SCL

3.1 Rôle essentiel au développement de toutes les lignées hématopoïétiques

Plusieurs membres de la famille des facteurs de transcription bHLH sont impliqués dans la détermination tissulaire. Des études de perte et de gain de fonctions ont permis de révéler le rôle fondamental de SCL dans la formation du sang. Premièrement, les souris déficientes pour SCL (SCL^{-/-}) meurent au jour embryonnaire 9.5 dû à l'absence complète de cellules sanguines. Cette déficience en cellules hématopoïétiques démontre bien le rôle essentiel de SCL dans l'hématopoïèse primitive et l'établissement du tissu hématopoïétique à partir du mésoderme. Ces embryons sont pâles, oedémateux et présentent un retard de croissance au jour embryonnaire 8.75. Mais alors que SCL est aussi normalement exprimé dans le système nerveux central, l'organogenèse ainsi que le développement neural semblent normaux à ce stade du développement suggérant un effet spécifique au système hématopoïétique (Robb et al., 1996; Shivdasani et al., 1995).

La mort précoce des embryons SCL^{-/-} ne permet pas l'analyse du rôle de SCL dans l'hématopoïèse définitive. Pour répondre à cette question, l'injection de cellules souches embryonnaires (ES) SCL^{-/-} dans des souris chimériques a permis d'établir que ces cellules étaient incapables de contribuer aux différentes lignées hématopoïétiques, malgré un microenvironnement normal. Ainsi SCL est non seulement requis pour l'hématopoïèse primitive, mais aussi pour l'hématopoïèse définitive chez l'adulte, c'est-à-dire pour la génération de toutes les lignées hématopoïétiques (Robb et al., 1995; Porcher et al., 1996).

3.2 Rôle sur le choix des lignées

Les premières études sur la fonction de la protéine SCL proviennent de l'utilisation d'un antisens contre SCL, qui montre que SCL régule la

prolifération et l'autorenouvellement de cellules hématopoïétiques multipotentes (Green et al., 1991). Un premier rôle positif pour SCL dans la différenciation érythrocytaire a été suggéré suite à l'observation de l'augmentation des niveaux d'ARN messagers de SCL lors de la différenciation érythrocytaire induite par des agents chimiques ou par l'érythropoïétine (Cross et al., 1994). De plus, la sur-expression de SCL dans une lignée hématopoïétique favorise la différenciation érythrocytaire (Aplan et al., 1992b; Hoang et al., 1996). Inversement, lorsque les cellules se différencient vers la voie myéloïde/macrophage, on observe une diminution des niveaux d'ARN messagers et de protéines pour SCL, qui deviennent pratiquement indétectables (Cross et al., 1994). La diminution de l'expression de SCL est nécessaire pour la différenciation normale des macrophages puisqu'une surexpression de SCL empêche celle-ci (Hoang et al., 1996) Ces études suggèrent donc que SCL agit comme régulateur positif de la différenciation érythrocytaire et comme régulateur négatif de la différenciation en macrophage (Begley et Green, 1999).

Étant donné la létalité embryonnaire précoce des souris SCL^{-/-}, l'analyse du rôle de SCL dans l'hématopoïèse adulte n'a été possible que par l'ablation conditionnelle du gène SCL au stade adulte. Deux groupes de chercheurs ont utilisé cette approche et ont montré que SCL n'est pas nécessaire pour les fonctions des cellules souches hématopoïétiques, mais est requis pour la différenciation érythrocytaire et mégacaryocytaire chez la souris adulte (Hall et al., 2003; Mikkola et al., 2003). Les 2 études impliquent la génération de souris SCL-loxP dont les séquences introniques et exoniques importantes du gène SCL sont encadrées de sites loxP permettant leur délétion subséquente par l'expression de la Cre-recombinase (Cre) qui est dépendante de la voie de l'interferon qui peut-être induite par l'injection de pl-pC (poly(I)-poly(C)). Ces 2 études démontrent clairement la fonction cruciale de SCL dans la voie de différenciation des lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire (Hall et al., 2003; Mikkola et al., 2003).

3.3 Spécification du sang et de l'endothélium à partir du mésoderme

Plusieurs observations illustrent l'étroite connexion entre le développement endothélial et hématopoïétique. Plusieurs observations expérimentales viennent appuyer l'origine commune des cellules sanguines et endothéliales suggérant la présence d'un précurseur commun, l'hémangioblaste (Risau et Flamme, 1995; Orkin et Zon, 2002). Au jour embryonnaire 9.5, les cellules de l'îlot sanguin du sac vitellin se différencient en deux populations morphologiquement distinctes, les érythrocytes primitifs situés au centre et les précurseurs endothéliaux situés plus en périphérie de l'îlot sanguin. Il y a donc développement du premier précurseur endothélial en présence des précurseurs hématopoïétiques primitifs dans cet îlot sanguin (Shivdasani et al., 1995). La coexpression de plusieurs gènes comme CD34, Flk-1, Tie-2, c-kit, GATA-2, LMO2, Runx1 et SCL par les cellules hématopoïétiques et endothéliales supporte l'existence de l'hémangioblaste (Risau and Flamme, 1995; Orkin and Zon, 2002; Minegishi et al., 1999). De plus, le fait qu'un précurseur (BL-CFC) isolé à partir de cellules ES en différenciation est capable de générer les 2 types de tissus en culture vient appuyer cette hypothèse (Kennedy et al., 1997; Choi et al., 1998). SCL pourrait être un régulateur potentiel de cet hémangioblaste étant donné son rôle important dans la spécification des précurseurs endothéliaux et hématopoïétiques (Gering et al., 1998). En effet, durant le développement du poisson zèbre, SCL est co-exprimé avec le marqueur endothélial précoce flk-1, le récepteur du VEGF (vascular endothelial growth factor), dans une population de cellules qui donnent lieu à des précurseurs hématopoïétiques et endothéliaux. L'expression ectopique de SCL augmente grandement le nombre de cellules de cette population et amène un développement excessif du sang et de l'endothélium aux dépens des autres tissus provenant du mésoderme (Gering et al., 1998; Mead et al., 1998; Mead et al., 2001; Ema et al., 2003).

De plus, un défaut de signalisation de flk-1 chez les embryons hypomorphes pour le gène VEGF (VEGF^{lo/lo}) provoque la mort de l'embryon due à l'absence de cellules érythrocytaires primitives. Ce défaut peut être partiellement restauré par le transgène SCL (Martin et al., 2004). Ces observations montrent que SCL et le VEGF fonctionnent dans la même voie génétique pour favoriser le destin hématopoïétique. SCL semble donc capable de spécifier le développement de 2 types de tissus à partir du mésoderme et possède un rôle comparable à celui des autres protéines bHLH comme MyoD et NeuroD qui ont des rôles fondamentaux dans la détermination du tissu musculaire (Weintraub et al., 1991) et neuronal (Lee et al., 1995), respectivement. D'autres études de gain de fonction indiquent clairement l'importance de SCL dans la spécification du sang mais aussi de l'endothélium à partir du mésoderme. La mutation du gène *cloche* chez le poisson zèbre provoque des défauts hématopoïétiques et endothéliaux et s'accompagne d'une réduction de l'expression de SCL (Stainier et al., 1995). La surexpression de SCL dans ce mutant restaure les défauts autant hématopoïétiques que vasculaires suggérant que SCL est en aval du gène *cloche* et qu'il est important pour le développement des deux tissus (Liao et al., 1998). Le désaccord apparent entre les expériences de gains de fonction du poisson zèbre et les pertes de fonction chez la souris sont probablement le résultat d'une redondance fonctionnelle. Dans le cas de la mutation de SCL chez la souris, la redondance avec les protéines bHLH comme Lyl-1 et Tal-2 pourrait expliquer le développement normal des cellules endothéliales en absence de SCL (Barton et al., 1999; Bloor et al., 2002; Lecuyer et Hoang, 2004). Ces diverses études suggèrent que SCL spécifie le développement du tissu hématopoïétique et endothélial.

4. Régulation transcriptionnelle de SCL

Globalement, on peut affirmer que SCL est essentiel au développement de toutes les lignées hématopoïétiques, à la différenciation

des cellules érythrocytaires et mégacaryocytaires ainsi qu'à la spécification du sang et de l'endothélium. Ces différents rôles biologiques démontrent l'importance fonctionnelle de ce gène dans l'hématopoïèse. Mon projet de maîtrise s'est concentré plus spécifiquement à la compréhension des mécanismes qui régulent l'expression de celui-ci. Les prochaines sections montreront donc des différentes régions régulatrices du gène SCL.

4.1 Structure du gène SCL

Le gène SCL humain est composé de 8 exons qui sont distribués sur une longueur d'environ 20 Kb sur le chromosome 1p32. Cependant, seulement les exons 4, 5 et 6 codent pour la protéine complète. Le gène SCL murin est structurellement très similaire au gène humain. Une des principales différences vient de l'absence de l'exon IIa chez le gène SCL murin (Begley et al., 1991; Begley et al., 1994). Malgré cette différence, l'épissage des exons en 5' est similaire entre les 2 espèces. Bien que les cDNAs murin et humain de SCL ne possèdent qu'une homologie de 67%, leurs régions codantes possèdent une homologie de 88%, ce qui résulte à des protéines homologues à 94% (Begley et al., 1991; Baer, 1993; Barton et al., 1999) (Figure III).

4.2. Éléments de régulation

Malgré les nombreuses études portant sur l'identification des éléments de régulation contrôlant l'expression du gène SCL, les mécanismes sous-jacents à la transcription de celui-ci restent largement inconnus. L'identification d'éléments de régulation de SCL a été effectuée par la cartographie des régions hypersensibles à la DNase I et aux endonucléases ainsi que par "footprinting" (Leroy-Viard et al., 1994; Bockamp et al., 1995; Gottgens et al., 1997; Gottgens et al., 2000; Gottgens et al., 2001; Barton et al., 2001; Gottgens et al., 2002; Chapman et al.,

2004). Sur le gène SCL murin (Gottgens et al., 1997; Fordham et al., 1999) et humain (Leroy-Viard et al., 1994), différents sites d'hypersensibilité à la DNase I ont été identifiés dans les lignées cellulaires érythrocytaires, myéloïdes précoces et mastocytaires. Aucun site n'a été identifié dans les cellules T. Ces régions sont associées à un état actif de la chromatine et correspondent à des éléments de régulation comme des promoteurs, enhancers ou silencers (Figure III).

L'analyse de souris transgéniques pour des séquences plus ou moins grandes du locus SCL a permis d'identifier 5 enhancers indépendants. Chaque enhancer cible l'expression de SCL spécifiquement à des stades du développement et dans des tissus particuliers correspondant à des domaines d'expression normale de SCL (Sinclair et al., 1999; Sanchez et al., 1999; Gottgens et al., 2000; Bloor et al., 2002).

La portion 5' du gène SCL contient deux sites d'initiation de la transcription (Aplan et al., 1990; Aplan et al., 1992b), qui sont associés; soit au promoteur de l'exon 1a soit à celui de l'exon 1b, tous deux situés dans les exons alternatifs en 5'. Ces promoteurs montrent une activité spécifique et distincte selon le contexte cellulaire (Aplan et al., 1990; Begley et al., 1994; Lecointe et al., 1994; Bockamp et al., 1995; Bockamp et al., 1997; Bockamp et al., 1998). Un troisième promoteur situé dans l'exon 4 a été identifié dans le gène humain mais son activité n'a été observée que dans quelques cas de leucémies T-ALL (Aplan et al., 1990; Bernard et al., 1992). Le rôle de ce promoteur reste incertain puisqu'il n'est pas actif dans la moelle osseuse normale.

L'épissage complexe du locus impliquant les exons non-codants en 5' génère au moins 5 transcrits alternatifs, détectés dans une variété de types cellulaires. Dans 4 de ces transcrits, l'épissage en 5' converge vers l'exon 3 et code pour la protéine pleine longueur de 42 kDa (SCLpp42). Dans l'autre cas qui constitue plus de 30% de l'ARNm total, l'épissage se fait directement à l'exon 5 et entraîne la production d'une protéine tronquée

de 22 kDA (SCLpp22) n'ayant pas le domaine de transactivation putatif en amino-terminal (Aplan et al., 1990; Begley et al., 1991; Barton et al., 1999).

4.2.1.1 Enhancers de SCL

L'utilisation de souris transgéniques a permis d'identifier cinq enhancers, lesquels dirigent l'expression de SCL dans les différents domaines d'expression de SCL. Trois enhancers en 5' dirigent spécifiquement l'expression de SCL *in vivo* dans les régions de l'endothélium, du mésencéphale et du cerveau postérieur/moelle épinière (Sinclair et al., 1999). Deux enhancers en 3' ont été identifiés, l'un dirige l'expression de SCL dans le cerveau postérieur (Gottgens et al., 2000) et l'autre moins distal dirige l'expression de SCL dans le système hématopoïétique et l'endothélium (éléments +18 et +19 kb) (Sanchez et al., 1999; Gottgens et al., 2002). Celui-ci dirige spécifiquement l'expression de SCL dans les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques, mais pas dans les cellules érythrocytaires TER119⁺ primitives et définitives. L'ablation génique des éléments de l'enhancer en 3' du locus SCL (éléments +18 et +19 kb) n'altère pas l'expression endogène de SCL dans les cellules hématopoïétiques *in vivo*. De plus cet enhancer ne restaure pas le phénotype léthal des embryons SCL^{-/-} suggérant qu'il puisse être redondant avec d'autres éléments. La recherche d'éléments de régulation additionnels a permis l'identification et la caractérisation moléculaire d'un deuxième élément de régulation bi-fonctionnel, l'enhancer à -3.8 kb. Celui-ci est aussi capable de diriger l'expression dans les progéniteurs hématopoïétiques et dans l'endothélium (Gottgens et al., 2004).

Ces études ont donc permis l'identification de régions de régulation importantes pour l'expression de SCL dans le compartiment hématopoïétique incluant les promoteurs de l'exon 1a et 1b ainsi que deux enhancers, soit un en 3' et l'autre en 5' (Sanchez et al., 1999; Gottgens et al., 2004). Des éléments de régulation supplémentaires restent à être

identifiés pour permettre l'expression de SCL *in vivo* dans les cellules érythrocytaires (Figure III).

4.2.1.2 Activité transcriptionnelle des promoteurs de l'exon 1a et 1b

Les promoteurs 1a et 1b sont hautement conservés entre l'homme et la souris (Bockamp et al., 1995) et présentent chacun une activité transcriptionnelle spécifique et restrictive à certaines lignées du système hématopoïétique (Bockamp et al., 1995; Lecointe et al., 1994; Bockamp et al., 1997). Ces promoteurs peuvent fonctionner indépendamment l'un de l'autre (Bockamp et al., 1997). Par des essais de transactivation transitoire, il a été montré que le promoteur de l'exon 1a est actif dans des cellules érythrocytaires et mastocytaires. Celui-ci est régulé principalement par le facteur de transcription GATA-1 (Aplan et al., 1990; Bockamp et al., 1995); (Lecointe et al., 1994; Bockamp et al., 1998). À l'inverse, le promoteur de l'exon 1b est silencieux dans les cellules érythrocytaires mais est actif dans les cellules primitives myéloïdes et mastocytaires (Bockamp et al., 1997). L'activité du promoteur 1b en transfection transitoire est dépendante des facteurs de transcription PU.1, SP1 et SP3 (Bockamp et al., 1997; Bockamp et al., 1998; Barton et al., 1999). Par contre, l'intégration de ces promoteurs dans la chromatine supprime l'activité du promoteur de l'exon 1a dans la lignée érythrocytaire ainsi que celle du promoteur de l'exon 1b dans les lignées myéloïdes primitives alors qu'ils étaient respectivement actifs dans ces lignées en transfection transitoire (Bockamp et al., 1997). Ceci suggère l'existence d'éléments de régulation supplémentaires venant contrer l'effet répressif de la chromatine. L'enhancer en 3' (éléments +17/18 kb) du locus SCL semble agir comme un enhancer érythrocytaire puisqu'il augmente de 30 fois l'activité du promoteur de l'exon 1a en transfection stable. De plus, l'analyse de la séquence de cet enhancer a montré la présence de plusieurs sites GATA et suggère que cet enhancer pourrait être activé par GATA-1 dans les cellules érythrocytaires. Par contre, cet enhancer n'a aucun effet

sur l'activité du promoteur de l'exon 1b qui ne contient pas de site GATA (Gottgens et al., 1997). Cependant, l'enhancer en lui-même n'est pas suffisant *in vivo* pour diriger l'expression de SCL dans les cellules érythrocytaires (Sanchez et al., 1999). Le promoteur de l'exon 1a est donc jusqu'à présent le seul élément de régulation requis pour l'expression de SCL dans les cellules érythrocytaires.

Ces études donnent un aperçu des interactions complexes entre les divers facteurs de transcription régulant l'expression de SCL selon les lignées cellulaires. De plus, les études d'ablations géniques révèlent principalement les fonctions les plus précoces des facteurs de transcription et la hiérarchie transcriptionnelle peut être différente selon les lignées hématopoïétiques. En effet, les études d'ablation génique placent GATA-1 (Fujiwara et al., 1996) et PU.1 (Scott et al., 1994) en aval de SCL. Par contre, dans les mastocytes, GATA-1 et PU.1 activent l'expression de SCL ce qui montre qu'ils agissent en amont de SCL dans cette lignée (Barton et al., 1999).

4.2.1.2.1 Régulation du promoteur de l'exon 1a

L'analyse des séquences conservées à travers l'évolution peut être très instructive pour l'identification de régions de régulation. La comparaison du locus SCL entre 5 espèces de vertébrés montre que parmi les éléments de régulations connus, la région du promoteur de l'exon 1a est la seule qui est hautement conservée (Gottgens et al., 2000; Gottgens et al., 2002).

L'expression de SCL semble être co-modulée avec celle du facteur de transcription GATA-1 dans les lignées érythrocytaires, mégacaryocytaires et mastocytaires, suggérant que GATA-1 fonctionne avec SCL dans ces lignées.

Une étude du promoteur de l'exon 1a a montré que la région comprise entre -187 et +26 est suffisante pour son activité dans la lignée érythrocytaire (Bockamp et al., 1995). De plus, la comparaison des

séquences murine et humaine montre que la région en amont de l'exon 1a est hautement conservée et présente plusieurs sites potentiels pour la liaison de facteurs de transcription. Parmi ceux-ci, on retrouve un site AP-1 présent à -99, un site SP1 à -61 et 2 sites GATA consensus à -35 et -67. Il a été démontré que l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'exon 1a dans les cellules érythrocytaires est dépendante seulement du site GATA à -35 (Bockamp et al., 1995). De plus, des études de transfection transitoire dans un système hétérologue montrent que GATA-1 active le promoteur de l'exon 1a (Aplan et al., 1992b). Des essais de mobilité sur gel ont montré que le facteur de transcription GATA-1 se lie sur le promoteur de l'exon 1a au site GATA à -35 dans les cellules érythrocytaires (Aplan et al., 1992b; Lecointe et al., 1994; Bockamp et al., 1995). Ces données démontrent que le promoteur de l'exon 1a est régulé par GATA-1 dans les cellules érythrocytaires. Ainsi, durant la différenciation érythrocytaire, l'expression de GATA-1 semble essentielle à l'activité du gène SCL.

Plusieurs sites consensus conservés à travers les vertébrés se retrouvent sur le promoteur de l'exon 1a dont les deux sites GATA (-35 et -67) mentionnés précédemment, un site potentiel pour SKN1 et deux autres sites qui n'avaient pas été identifiés jusqu'à présent (CS1 à -110 et CS2 à -83 pour conserved sequences) (Gottgens et al., 2002). La mutation de ces 2 sites CS n'altère pas le patron d'expression de SCL dans des souris transgéniques mais semble avoir un effet sur l'activité du promoteur de l'exon 1a dans les cellules érythrocytaires. La séquence du site CS2 correspond à une boîte à homéodomaine (Hbox, TAAT) sur laquelle différents facteurs de transcription à homéodomaine peuvent se lier. Cette analyse ouvre la porte à d'éventuels candidats pouvant réguler SCL (Gottgens et al., 2002). De plus, dans la séquence du gène SCL humain, un site bicoïde potentiel (TAATCC) a été identifié à -230 pb sur le promoteur de l'exon 1a. Ce site peut être lié par les facteurs de transcription à homéodomaine de la famille bicoïde. Puisqu'il est connu que les membres

de la famille bicoïde jouent un rôle central dans le processus de détermination et de différenciation cellulaire dans d'autres tissus, notre laboratoire s'est intéressé à savoir si les membres de la famille bicoïde jouent un rôle semblable durant l'hématopoïèse, et si ce rôle s'effectuerait au niveau de la régulation transcriptionnelle de SCL. Les prochaines sections porteront donc sur les régulateurs potentiels du promoteur SCL de l'exon 1a, les facteurs de transcription de la famille GATA-1 et ceux de la famille à homéodomaine (Figure III).

5. Les facteurs de transcription de la famille GATA

5.1 Les éléments GATA

De nombreuses études effectuées sur les gènes exprimés dans les cellules hématopoïétiques ont permis de montrer que le motif GATA est un élément de régulation *cis* retrouvé dans divers gènes. Les éléments GATA, caractérisés par la séquence T/A GATA A/G, ont été identifiés initialement dans des séquences activatrices de promoteurs et enhancers des gènes érythrocytaires et des régions de contrôle du locus (LCR) des gènes α - et β -globine (Simon et al., 1992; Orkin, 1992; Orkin, 1995). De plus, ils ont aussi été identifiés dans les séquences de gènes exprimés par les cellules mégacaryocytaires, mastocytaires et endothéliales (Orkin, 1992).

5.2 Structure des protéines de la famille GATA

Les protéines GATA sont caractérisées par un motif à doigt de zinc d'une séquence primaire $CX_2CX_{17}CX_2X$ où C correspond à une cystéine et X à un acide aminé quelconque. Par cette structure spécifique, les protéines GATA constituent une nouvelle famille de protéine à doigt de zinc. Chez les eucaryotes supérieurs, les protéines GATA ont 2 doigts de zinc qui malgré leurs séquences similaires ont des fonctions bien différentes. Le doigt de

zinc en N-terminal (NF) stabilise la liaison à l'ADN tandis que le doigt de zinc en C-terminal (CF) est responsable de la reconnaissance de la séquence d'ADN (Martin et Orkin, 1990). Dans le cas de GATA-1, le CF est aussi important pour les interactions physiques avec d'autres facteurs de transcription, comme Sp1 et PU.1 (Merika et Orkin, 1995). Un autre domaine fonctionnel en N-terminal (NT) de GATA-1 a été identifié et celui-ci lui confère une forte activité transcriptionnelle.

La structure tridimensionnelle du doigt de zinc en C-terminal de GATA-1, lorsque lié à l'ADN a été déterminée par résonance magnétique. Celle-ci est formée principalement par 2 feuillets β antiparallèles, une hélice α ainsi qu'une longue boucle. Cette structure est stabilisée par l'atome de zinc au centre. On retrouve dans l'hélice α les acides aminés qui interagissent avec le grand sillon d'ADN tandis que ceux qui interagissent avec le petit sillon d'ADN se retrouvent dans la partie peu structurée en C-terminale du doigt de zinc. Ces acides aminés sont complètement conservés entre les protéines GATA-1, 2 et 3, ce qui suggère une redondance dans l'occupation des sites sur l'ADN par ces protéines (Omichinski et al., 1993).

5.3 Membres de la famille GATA

Six membres de la famille GATA ont été clonés dont les trois premiers, GATA-1, 2 et 3 sont exprimés principalement dans le système hématopoïétique tandis que les autres membres GATA-4, 5 et 6 sont principalement exprimés dans le cœur, l'intestin, les poumons et le foie (Ohneda et Yamamoto, 2002; Laverriere et al., 1994).

Dans les cellules hématopoïétiques, l'expression des protéines GATA-1, 2 et 3 est étroitement régulée. GATA-1 est exprimé dans les progéniteurs des lignées érythrocytaire, mégacaryocytaire et mastocytaire ainsi que dans les cellules différenciées des lignées érythrocytaire,

mégacaryocytaire et éosinophile. GATA-2 est plutôt exprimé dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques non déterminés et plus faiblement dans les progéniteurs des lignées myéloïde, érythrocytaire et mégacaryocytaire. L'expression de GATA-2 précède celle de GATA-1 dans les progéniteurs et diminue lorsque GATA-1 augmente lors de la différenciation érythrocytaire (Perry et Soreq, 2002; Ohneda et Yamamoto, 2002). GATA-3, quant à lui, semble être exprimé dans les cellules hématopoïétiques très immatures, les progéniteurs déterminés de la lignée lymphocytaire T et les lymphocytes T matures (Romeo, 1997).

Les rôles essentiels des facteurs GATA ont pu être démontrés par des études d'ablations géniques. Il a été montré que GATA-1 est essentiel pour la survie des progéniteurs érythrocytaires et leur différenciation terminale (Pevny et al., 1991; Ohneda et Yamamoto, 2002). GATA-2, pour sa part, est crucial pour le maintien et la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques immatures et des cellules souches (Tsai et Orkin, 1997; Tsai et al., 1994). L'absence de GATA-2 chez la souris entraîne des défauts hématopoïétiques sévères et précoces. Ces souris survivent jusqu'au jour E10-11 mais succombent d'une anémie due à la réduction importante du nombre d'érythrocytes embryonnaires (Tsai et al., 1994). GATA-3, quant à lui, est nécessaire à l'établissement de la lignée lymphocytaire T (Ting et al., 1996).

5.4 Fonctions de GATA-1

5.4.1 Érythropoïèse définitive

L'analyse des cellules souches embryonnaires (ES) nulles pour GATA-1 a permis de révéler son rôle essentiel dans le développement de la lignée érythrocytaire. Étant donné que GATA-1 est localisé sur le chromosome X (Chapman et al., 1990), les effets de la mutation d'un seul

allèle de GATA-1 peuvent être analysés directement dans les souris chimériques par l'utilisation de cellules ES mâles (Pevny et al., 1991) ou par leur différenciation *in vitro* en cellules hématopoïétiques (Pevny et al., 1995; Simon et al., 1992). Les cellules ES mutantes pour GATA-1 sont incapables de contribuer à la maturation des érythrocytes *in vivo* et *in vitro* étant donné que la maturation érythrocytaire est arrêtée au stade proérythroblaste (Pevny et al., 1991; Pevny et al., 1995; Weiss et al., 1994; Weiss and Orkin, 1995). Cette incapacité à se différencier peut être corrigée par la réintroduction de GATA-1 dans les cellules ES (Pevny et al., 1995; Simon et al., 1992; Orkin, 1992).

5.4.2 Érythropoïèse primitive

Ces différentes études ont révélé le rôle de GATA-1 dans l'érythropoïèse adulte mais n'ont pas clarifié son rôle dans les érythrocytes embryonnaires. Un rôle essentiel de GATA-1 pour l'érythropoïèse primitive a été établi et il a été démontré que GATA-1 est nécessaire aux mêmes stades dans les précurseurs embryonnaires et adultes puisque la différenciation est bloquée à des stades de développement similaires en absence de GATA-1 (Fujiwara et al., 1996). Une récente étude a démontré, par la double ablation génique de GATA-1 et GATA-2, que les fonctions de GATA-1 et GATA-2 se chevauchent durant les stages précoces de l'hématopoïèse primitive lors de l'embryogenèse. Ainsi, les facteurs GATA, GATA-1 et/ou GATA-2, sont requis pour initier la formation du sang dans l'embryon (Fujiwara et al., 2003).

5.4.3 Choix de lignées

L'absence de GATA-1 dans les mégacaryocytes amène des défauts de maturation qui sont caractérisés par une diminution de l'endoréplication et la formation de granules, une désorganisation de la synthèse

membranaire des plaquettes et une hyperprolifération (Shivdasani et al., 1997; Vyas et al., 1999; Cantor and Orkin, 2002). De plus, l'expression forcée de GATA-1 dans une lignée cellulaire myéloïde précoce provoque la différenciation mégacaryocytaire, suggérant que GATA-1 pourrait également affecter la sélection d'une lignée (Shivdasani et Orkin, 1996; Visvader et al., 1992; Shivdasani et al., 1997). Dans des cellules souches hématopoïétiques, la surexpression de GATA-1 entraîne la perte de leur capacité d'auto-renouvellement et induit la génération exclusive de cellules de lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire. De plus, l'expression forcée de GATA-1 reprogramme les précurseurs lymphoïdes (CLP), myéloïdes (CMP) et granulocyte/monocyte (GMP) à se différencier vers les lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire (Iwasaki et al., 2003). Il semble donc que GATA-1, tout comme SCL, ait un rôle essentiel sur le choix des lignées principalement dans la spécification des lignées érythrocytaires et mégacaryocytaires.

5.5 GATA-1 et ses partenaires

5.5.1 Interaction avec FOG

Une classe importante d'interaction protéine-protéine correspond aux interactions entre les facteurs de transcription spécifiques à chaque lignée et leurs co-facteurs. Récemment, un co-facteur transcriptionnel de GATA-1, appelé Friend of GATA-1 (FOG-1), a été identifié par double hybride. FOG-1 est une protéine nucléaire à 9 doigts de zinc (Tsang et al., 1997) dont 4 interagissent spécifiquement avec le doigt de zinc en N-terminal de GATA-1 (Fox et al., 1999). FOG-1 est co-exprimé avec GATA-1 tout au long du développement et est abondamment exprimé dans les érythrocytes et les mégacaryocytes (Tsang et al., 1997).

Comme son partenaire d'interaction GATA-1, FOG-1 joue un rôle essentiel lors de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse. Les souris

nulles pour FOG-1 meurent au jour E10.5-11.5 d'une anémie sévère due à un arrêt de la maturation érythrocytaire à un stade similaire à celui observé pour les souris nulles pour GATA-1 (Tsang et al., 1998). En comparaison avec les souris nulles pour GATA-1, les souris nulles pour FOG-1 présentent une absence complète de mégacaryopoïèse, indiquant que FOG-1 a aussi un rôle indépendant de GATA-1 lors de la mégacaryopoïèse précoce.

Des mutations ponctuelles qui réduisent l'affinité de GATA-1 à FOG-1, mais laissant le domaine de liaison à l'ADN de GATA-1 fonctionnel, ont permis de montrer que l'interaction directe entre GATA-1 et FOG-1 est requise pour la différenciation normale des érythrocytes *in vitro* (Crispino et al., 1999). Une mutation a été retrouvée chez des membres d'une famille atteints d'anémie dysérythropoïétique et de thrombocytopenie. Cette mutation empêche l'interaction entre GATA-1 et FOG-1 sans altérer l'affinité de la liaison à l'ADN (Nichols et al., 2000). Cette découverte montre l'importance fonctionnelle de l'interaction protéique de GATA-1 et FOG-1 pour l'hématopoïèse chez l'homme (Cantor et Orkin, 2001; Cantor et Orkin, 2002; Perry et Soreq, 2002).

5.5.2 Antagonisme avec PU.1

Un cas intéressant d'interaction entre facteurs de transcription de lignées spécifiques est celui de GATA-1 et PU.1 qui peuvent interagir directement pour inhiber leurs fonctions réciproques. Lorsque PU.1, un facteur de transcription de la famille Ets, est sur-exprimé, celui-ci induit l'expression de plusieurs gènes myéloïdes (Fisher et Scott, 1998). L'absence de PU.1 bloque complètement le développement des macrophages et induit d'autres défauts dans le développement myéloïde (Scott et al., 1994; McKercher et al., 1996; Spain et al., 1999). L'association de PU.1 et GATA-1 inhibe à la fois la capacité de GATA-1 à lier l'ADN ainsi que l'activité transcriptionnelle de PU.1 démontrant le rôle antagoniste des 2

protéines l'une envers l'autre (Warren and Rothenberg, 2003). Le ratio des protéines GATA-1 et PU.1 détermine donc le destin cellulaire d'un précurseur myéloïde précoce (CMP), GATA-1 favorisant la voie érythrocytaire et PU.1, la voie myéloïde (Zhu et Emerson, 2002).

Ces exemples d'interactions protéiques de GATA-1 avec FOG-1 et PU.1 montrent l'importance que celles-ci jouent au niveau de la régulation transcriptionnelle et du destin cellulaire.

6. Les facteurs de transcription à homéodomaine

6.1 Les gènes homéotiques

Les gènes homéotiques sont caractérisés par la présence d'une séquence conservée de 183 pb, la boîte « homéo » (homeobox) qui a été découverte dans des gènes de la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* (McGinnis et al., 1984). Des études de cristallographie et de résonance magnétique ont montré que la structure de « l'homéobox » est un motif hélice-tour-hélice, constitué de 4 hélices (Qian et al., 1992); (Wolberger et al., 1991; Qian et al., 1989; Billeter et al., 1993). Ces motifs reconnaissent les séquences d'ADN TGAT, TAAT, TTAT et TTAC (Desplan et al., 1988; Affolter et al., 1990). Les régions à l'extérieur de « l'homéobox » sont des domaines variables donnant la spécificité de liaison pour des séquences d'ADN. De plus, les homéoprotéines s'associent avec d'autres protéines pour réguler la transcription de leurs gènes cibles (Figure IV).

Des études d'expression au stade embryonnaire et l'analyse de mutants homéotiques ont révélé que les gènes homéotiques spécifient l'identité et le positionnement cellulaire dans l'embryon en développement (Harding et al., 1985; McGinnis et Krumlauf, 1992; Scott et al., 1989; Malicki et al., 1990). La mutation de ces gènes cause la duplication de structures morphologiques localisées dans les segments antérieurs ou postérieurs chez la drosophile. Par exemple, le mutant homéotique appelé

Antennapedia présente une paire supplémentaire de pattes sur la tête au lieu des antennes (Dessain et McGinnis, 1991; Gehring, 1992; Gehring et Hiromi, 1986; Gehring, 1985). L'identification de gènes homéotiques chez plusieurs autres espèces indique que ces gènes sont hautement conservés à travers l'évolution pour différents programmes de différenciation (Gehring, 1985; McGinnis et al., 1984; Holland et al., 1992; van Oostveen et al., 1999).

6.2 Classification des homéoprotéines

Les gènes homéotiques sont classifiés en 2 grands groupes. Les gènes de classe I sont hautement homologues (>80%) au premier gène homéotique découvert chez la drosophile, appelé Antennapedia. Ces gènes correspondent aux gènes HOX chez l'humain. Les gènes de classe II, ou gènes homéotiques divergents, montrent une homologie inférieure à 50% au gène Antennapedia. Ces gènes homéotiques sont regroupés en plusieurs familles. Parmi celles-ci, il y a la grande famille des protéines « paired » incluant les membres des sous-familles Pax, Pitx, Otx et goosecoïde, la famille bicoïde et celle du domaine POU incluant les membres Oct et Pit (van Oostveen et al., 1999; Drouin et al., 1998; Duboule et Morata, 1994; Drouin, 1998).

6.2.1 Protéines à homéodomaine de classe II : paired et bicoïde

Les protéines à homéodomaine de classe II sont séparées en différents groupes. Généralement, les membres d'une même famille ont des séquences très conservées, principalement au niveau de l'homéodomaine. L'acide aminé en position 50 est généralement conservé entre les membres d'une même famille et donne la spécificité de liaison à l'ADN. Ainsi, les homéoprotéines de la famille « paired » possèdent une sérine à cette position, celles de la famille POU possèdent une cystéine alors que les

membres de la famille bicoïde possèdent une lysine (Lamonerie et al., 1996).

Une sous-famille se distingue par le fait qu'elle possède des caractéristiques des familles « paired » et bicoïde. Les membres de cette sous-famille possèdent une lysine à la position 50 de leur homéodomaine et sont donc semblables aux membres de la famille bicoïde pour ce qui est de leur spécificité de liaison à l'ADN. Par contre, la structure générale de leur homéodomaine s'apparente plus avec celle de la famille « paired ». Cette sous-famille distincte inclut les membres des familles Pitx, Otx et goosecoïde (gsc) chez les vertébrés ainsi que orthodenticle (otd) chez la drosophile (Simeone et al., 1992; Lamonerie et al., 1996). L'homologie entre ces membres se situe principalement au niveau de l'homéodomaine puisque 62 % de la séquence de celui-ci est conservée entre le facteur Pitx-1 et les facteurs Otx-1 et Otx-2. En dehors de l'homéodomaine, la séquence de Pitx-1 est entièrement différente d'Otx-1 et 2 (Drouin et al., 1998) (Figure V).

Les protéines des familles de Pitx et Otx ainsi que le facteur bicoïde chez la drosophile reconnaissent la séquence TAATCC sur l'ADN dont les résidus cytosines (C) caractérisent la spécificité de liaison (Wilson et al., 1996). Les protéines Otx reconnaissent également le motif TAATCT sur l'ADN (Hanes et Brent, 1989; Hanes et Brent, 1991; Treisman et al., 1989). De plus, les facteurs de transcription de la famille Otx et Pitx montrent une efficacité de liaison à l'ADN semblable *in vitro* sur une sonde possédant un site TAATCC (Drouin et al., 1998). Dans les deux cas, la spécificité de reconnaissance se fait via la lysine 50 de l'homéodomaine qui reconnaît l'avant dernière cytosine (C) du consensus bicoïde (TAATCC) (Simeone et al., 1993). Tous les membres de la sous-famille bicoïde, de la drosophile à l'homme, ont conservé la même spécificité d'interaction à l'ADN. Par contre, la capacité transcriptionnelle des facteurs Otx et Pitx est bien différente malgré le fait que leur liaison à l'ADN ne diffère pas *in vitro* (Drouin et al.,

1998). L'interaction des facteurs Pitx ou Otx avec d'autres co-facteurs pourrait donc médier les effets spécifiques de chacun.

6.2.2 Les membres de la famille Otx

Jusqu'à présent, il a été montré que les protéines Otx ont essentiellement des fonctions dans le développement de la tête et du système nerveux central (CNS). La protéine orthodenticle (OTD) est l'homologue chez la drosophile des protéines Otx et sa mutation affecte le système nerveux (Finkelstein et al., 1990). On retrouve 4 membres de la famille Otx soit Otx-1, Otx-2, Otx-3 et Crx.

6.2.2.1 Otx-1 et Otx-2

Le patron d'expression et le rôle d'Otx-1 dans le cerveau a été grandement étudié (Simeone et al., 1993). Les souris nulles pour Otx-1 montrent un comportement épileptique spontané et de multiples anomalies au cerveau ainsi qu'au niveau des organes sensoriels acoustiques et visuels (Acampora et al., 1996). À l'âge pré-pubère, les souris Otx-1^{-/-} souffrent de nanisme transitoire et d'hypogonadisme dus au faible niveau des hormones hypophysaires (Acampora et al., 1996; Acampora et al., 2000a; Acampora et al., 2000b). Par contre, dès l'âge de 4 mois, le niveau des hormones hypophysaires redevient normal et ces souris retrouvent une croissance et un fonctionnement normal des gonades. Cependant, la taille du cerveau adulte de ces souris est réduite principalement au niveau du cortex (Simeone, 1998). D'un point de vue général, Otx-1 est impliqué dans la formation du cortex, des organes sensoriels et des fonctions de l'hypophyse.

Chez la souris, l'expression d'Otx-2 dans le cerveau est légèrement différente de celle d'Otx-1. (Ang et al., 1994; Simeone et al., 1992;

Acampora et Simeone, 1999; Simeone, 1998). Malgré la très grande similarité de séquence en acides aminés entre Otx-1 et Otx-2, le phénotype causé par l'ablation d'Otx-2 est différent de celui causé par Otx-1 (Acampora et al., 1995; Ang, 1996; Matsuo et al., 1995). Otx-2 est nécessaire plus tôt qu'Otx-1 dans le développement pour spécifier correctement la plaque neurale antérieure et organiser la couche primitive (Acampora et al., 2000a; Acampora et al., 2001).

Des domaines de transactivation ont été retrouvés dans les régions C-terminale et N-terminale des protéines Otx chez les oursins de mer (Mao et al., 1996; Chuang et al., 1996) et plusieurs études suggèrent que les protéines Otx agissent comme activateurs transcriptionnels (Finkelstein et Boncinelli, 1994; Simeone, 1998; Klein et Li, 1999; Kelley et al., 2000; Martinez-Morales et al., 2003).

6.2.2.2 Otx-3 et Crx

Un nouveau facteur de transcription à homéodomaine a été récemment isolé, Otx-3, structurellement et fonctionnellement semblable à Otx-1 et Otx-2. Sa séquence en acides aminés est homologue à 65% avec les autres membres de la famille Otx et son patron d'expression est sensiblement similaire à celui d'Otx-1 et Otx-2 dans le cerveau. Tout comme Otx-1 et Otx-2, Otx-3 est capable de lier le motif TAATCC. Par contre, des essais de transactivation suggèrent que Otx-3 fonctionne comme répresseur de la transcription en se liant sur ce motif (Zhang et al., 2002).

Crx a aussi été identifié comme étant un membre de la famille Otx. Son expression est hautement restreinte à la rétine où il est impliqué dans la différenciation et le maintien des neurones de la rétine (Furukawa et al., 1997).

6.3 Otx-1 dans l'hématopoïèse

Jusqu'à présent les études portant sur les membres de la famille Otx ont montré que les protéines de cette famille ont essentiellement des fonctions au cours du développement du cerveau et du système nerveux central. Néanmoins, une récente étude a permis de montrer qu'Otx-1 joue un rôle important dans le système hématopoïétique (Levantini et al., 2003).

Pour la première fois, cette étude montre qu'Otx-1 est exprimé dans la moelle osseuse et dans la rate de souris adultes ainsi que dans le foie foetal au jour 12 du développement embryonnaire. Otx-1 n'est pas détecté dans le thymus ni dans les ganglions lymphatiques. De plus, l'expression d'Otx-1 a été analysée dans différents types cellulaires de la moelle osseuse suite à leur différenciation *in vitro*. Otx-1 est exprimé dans les précurseurs érythrocytaires (colonies BFU-E pour Blast forming unit erythroid early) et les précurseurs multipotents (colonies CFU-MIX pour Colony forming unit mixed). Par contre, Otx-1 n'est pas détecté dans les colonies de macrophages. L'isolation de précurseurs a permis de détecter Otx-1 dans les précurseurs pluripotents et bipotents des lignées érythrocyte-mégacaryocytes et granulocyte-macrophages. Otx-1 est aussi détecté dans les précurseurs érythrocytaires et les cellules matures de lignée érythrocytaire et mégacaryocytaire (Levantini et al., 2003).

L'importance fonctionnelle d'Otx-1 dans le système hématopoïétique *in vivo* a pu être étudiée chez les souris nulles pour Otx-1. Ces souris montrent une diminution du nombre de globules rouges et des progéniteurs érythrocytaires précoces et tardifs (BFU-E et CFU-E (Colony forming unit erythroid late), respectivement). Par contre, aucune différence n'a été observée au niveau du nombre de leucocytes et de précurseurs myélo-monocytaires (Levantini et al., 2003).

Cette diminution de l'érythropoïèse peut être due soit à un défaut intrinsèque des cellules progénitrices Otx-1^{-/-}, soit à un défaut du microenvironnement. Pour distinguer ces possibilités, la capacité des

cellules de moelle osseuse des souris $Otx-1^{-/-}$ et WT à reconstituer l'hématopoïèse à long terme dans une souris hôte irradiée de façon létale a été comparée. Cette analyse a montré que la perte de la fonction d'Otx-1 est associée à un défaut dans l'érythropoïèse et que ce défaut est intrinsèque aux cellules $Otx-1^{-/-}$ (Levantini et al., 2003).

Le patron d'expression d'Otx-1 est similaire à celui du facteur de transcription SCL, qui est fortement exprimé dans les précurseurs érythrocytaires. La comparaison des niveaux d'expression de SCL dans la moelle osseuse des souris $Otx-1^{-/-}$ indique que ces souris expriment un niveau plus faible de SCL par rapport aux cellules de souris WT. La réduction du niveau d'expression de SCL peut être une conséquence directe de la perte d'Otx-1 ou peut indirectement venir d'un déséquilibre des populations de la moelle osseuse. Pour y répondre, deux approches ont été utilisées. Premièrement, l'expression de SCL a été mesurée dans des populations de moelle osseuse dont le nombre de cellules érythrocytaires a pu être évalué par leur niveau d'expression de la globine β major, un gène érythrocytaire. Même dans ces conditions, le niveau d'expression de SCL est réduit confirmant le fait qu'une diminution de l'expression de SCL est associée à la perte de fonction d'Otx-1 dans les cellules érythrocytaires (Levantini et al., 2003). Deuxièmement, étant donné que SCL est un régulateur clé de la différenciation érythrocytaire, l'effet d'une surexpression de SCL *in vivo* sur le phénotype hématopoïétique des souris $Otx-1^{-/-}$ a été testé. Pour ce faire, des souris transgéniques qui expriment constitutivement SCL sous le contrôle du promoteur *SIL* (SCL interrupting locus) ont été croisées avec les souris hétérozygotes $Otx-1^{+/-}$. Ces souris ont ensuite été croisées pour générer des souris déficientes pour Otx-1 exprimant constitutivement SCL ($Otx-1^{-/-}$ SCL^{tg}). L'analyse de ces souris montre que le nombre de progéniteurs érythrocytaires est rétabli à un niveau normal par le transgène SCL. En accord avec la restauration de l'érythropoïèse par SCL, les niveaux d'expression de deux gènes érythrocytaires, SCL et GATA-1, sont rétablis dans les souris $Otx-1^{-/-}$ SCL^{tg}

contrairement aux souris $Otx-1^{-/-}$. À l'inverse, un gène myéloïde, le récepteur G-CSF-R (granulocyte colony-stimulating factor) est hautement exprimé dans les souris $Otx-1^{-/-}$ alors que dans les souris $Otx-1^{-/-}$ SCL^{tg}, il est retrouvé à un niveau normal. Par conséquent, l'expression de SCL rétablit complètement le phénotype des souris $Otx-1^{-/-}$ (Levantini et al., 2003).

Ainsi, SCL et $Otx-1$ agissent dans la même voie pour spécifier la différenciation érythrocytaire. Cette étude amène la possibilité qu' $Otx-1$ pourrait être requis pour maintenir des niveaux adéquats de SCL et donc, un nombre normal de cellules érythrocytaires. Il reste à déterminer si SCL est une cible directe d' $Otx-1$ (Levantini et al., 2003).

7. Rationnalisation

L'étude des mécanismes de régulation de SCL est centrale pour la compréhension des processus qui contrôlent le destin des cellules hématopoïétiques. Mon projet de maîtrise s'est principalement concentré sur les mécanismes de régulation de SCL lors de la différenciation érythrocytaire.

Jusqu'à présent, il a été montré que l'expression de SCL dans le compartiment hématopoïétique requiert plusieurs éléments génétiques dont les promoteurs de l'exon 1a et 1b ainsi que deux enhancers, soit un en 3' et l'autre en 5' (Sanchez et al., 1999; Gottgens et al., 2004). Mon projet de maîtrise porte sur le mécanisme de régulation du promoteur de l'exon 1a qui est jusqu'à présent le seul élément de régulation essentiel pour l'expression de SCL dans les cellules érythrocytaires. Différentes études montrent que l'activité du gène SCL requiert la liaison de GATA-1 sur le site consensus GATA à 35 pb en amont du site d'initiation de la transcription du promoteur de l'exon 1a. De plus, la présence de plusieurs sites potentiels de liaison pour des protéines à homéodomaine sur ce promoteur, nous a

amené à considérer ces protéines comme des régulateurs potentiels de SCL.

Plus particulièrement, notre intérêt s'est concentré sur la protéine Otx-1 étant donné son nouveau rôle dans l'hématopoïèse. L'absence d'Otx-1 cause une anémie sévère qui peut être corrigé par une surexpression de SCL. Cette correction de l'anémie par SCL n'implique pas nécessairement un lien direct entre Otx-1 et SCL mais suggère qu'Otx-1 pourrait être requis pour maintenir des niveaux normaux de SCL et conséquemment, un nombre normal de cellules érythrocytaires.

SCL, GATA-1 et Otx-1 sont co-exprimés dans les cellules érythrocytaires et ont chacun un rôle dans le développement érythrocytaire. Étant donné que GATA-1 est requis pour la régulation du gène SCL dans les cellules érythrocytaires et que SCL peut corriger le défaut anémique des souris nulles pour Otx-1, nous suggérons que SCL est une cible directe des protéines GATA-1 et Otx-1. Mes travaux portent donc sur la compréhension du mécanisme de régulation de l'expression de SCL par les protéines GATA-1 et Otx-1.

LÉGENDE DES FIGURES

Figure I. Différenciation hématopoïétique. Les cellules HSC peuvent être divisées soit en LT-HSC (long-term HSC), des cellules hautement auto-renouvelables pouvant reconstituer le système hématopoïétique d'un animal pour sa vie entière, soit en ST-HSC (short-time HSC), qui ne permettent une reconstitution que pour une période de temps limitée. Les ST-HSC se différencient en MPP (multipotent progenitor), lesquelles ne s'autorenouvellent pas ou peu et ont la capacité de se différencier en progéniteurs de lignées spécifiques. Suite à une maturation en plusieurs étapes, ces progéniteurs vont donner lieu à une progéniture différenciée dont les fonctions matures acquises sont irréversibles. Les CLP (commun lymphoid progenitor) génèrent les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules « natural killer » (NK). Les CMP (commun myeloid progenitor) génèrent les GMP (granulocyte/monocyte progenitor), lesquels se différencient en monocytes/macrophages et granulocytes, ainsi que les MEP (megakaryocyte-erythroid progenitor), qui se différencient en érythrocytes et mégacaryocytes/plaquettes (Passegue et al., 2003). Les différents marqueurs de surface exprimés spécifiquement par certaines lignées cellulaires et à différents stades de différenciation sont indiqués. Parmi ceux-ci, c-Kit, un récepteur tyrosine kinase pour le ligand Kit, est exprimé dans les cellules HSC, les progéniteurs précoces et à un plus faible niveau dans les progéniteurs commis. Les marqueurs de cellules matures sont aussi indiqués tels que Ter 119 pour les érythrocytes, CD11b pour les monocytes/macrophages et B220 pour les lymphocytes B.

Figure II. Implication des facteurs de transcription dans la différenciation hématopoïétique. Les facteurs de transcription SCL et LMO2 sont essentiels pour la formation du tissu hématopoïétique à partir du mésoderme. GATA-2 est important pour l'expansion et le maintien du potentiel des cellules HSC, SCL et GATA-1 pour la différenciation

érythrocytaire, NF-E2, GATA-1, SCL et FOG-1 pour la différenciation mégacaryocytaire et PU.1 pour les lignées myéloïdes et lymphocytaires (Passegue et al., 2003).

Figure III. Diagramme du gène SCL murin. A) Structure du gène SCL murin qui est composé de 7 exons, distribués sur une longueur d'environ 20 Kb. Les exons non-codants sont représentés par des boîtes blanches et les exons codants par des boîtes noires. Les flèches représentent les sites d'hypersensibilité à la DNase identifiés précédemment. B) Représentation des différents enhancers identifiés qui dirigent l'expression de SCL dans différents domaines spécifiques. C) Représentation du promoteur proximal de l'exon 1a humain qui est dépendant du site GATA à -35 et qui est actif dans les cellules érythrocytaires et mastocytaires. Les différents sites potentiels de liaison pour des facteurs de transcriptions sont indiqués : GATA (-35), SP1 (-61), GATA (-67), CS2 HBOX (-83), AP-1 (-99), CS1 (-110) et bicoïde (-230).

Figure IV. Structure d'une protéine de la famille GATA. Les protéines GATA sont caractérisées par la présence de deux motifs à doigt de zinc où le doigt de zinc en N-terminal (NF) stabilise la liaison à l'ADN tandis que le doigt de zinc en C-terminal (CF) est responsable de la reconnaissance de la séquence d'ADN (Martin et Orkin, 1990). Dans le cas de GATA-1, le CF est aussi important pour les interactions physiques avec d'autres facteurs de transcription comme Sp1 et PU.1 (Merika et Orkin, 1995) alors que le CF interagit spécifiquement avec le co-facteur transcriptionnel de GATA-1 appelé Friend of GATA-1 (FOG-1) (Fox et al., 1999). Le domaine situé en N-terminal (NT) confère une forte activité transcriptionnelle aux protéines GATA tandis que les fonctions du domaine en C-terminal (CT) ne sont pas encore connues. Jusqu'à présent, 6 membres de la famille GATA ont été identifiés dont les 3 premiers GATA-1, 2, 3 sont exprimés principalement dans le système hématopoïétique et les autres sont principalement

exprimés dans le cœur, l'intestin, les poumons et le foie (Ohneda et Yamamoto, 2002; Laverriere et al., 1994).

Figure V. Structure d'une protéine à homéodomaine. Les protéines à homéodomaine sont composées de plusieurs unités structurales. Celles-ci incluent une région variable, laquelle détermine l'activité spécifique de la protéine, une petite région (IYPWM) et un homéodomaine. Celui-ci est composé de 60 acides aminés est similaire pour toutes ces protéines. La région amino-terminale de ces protéines commence souvent par MSSLYYXN et la région carboxy-terminale contient plusieurs acides aminés acides suggérant qu'elle pourrait agir comme domaine de transactivation. L'homéodomaine consiste en 4 hélices alpha (1-4), dont une (en noire) reconnaît et lie une séquence spécifique sur l'ADN des gènes cibles (van Oostveen et al., 1999).

Figure VI. Comparaison des séquences des protéines à homéodomaine des familles Otx et Pitx. Toutes les séquences comparées sont d'origine murine à l'exception de Pitx-3, qui a été isolé chez le rat. Le pourcentage d'identité est donné par rapport à la séquence de Pitx-1 en acides aminés (Drouin, 1998).

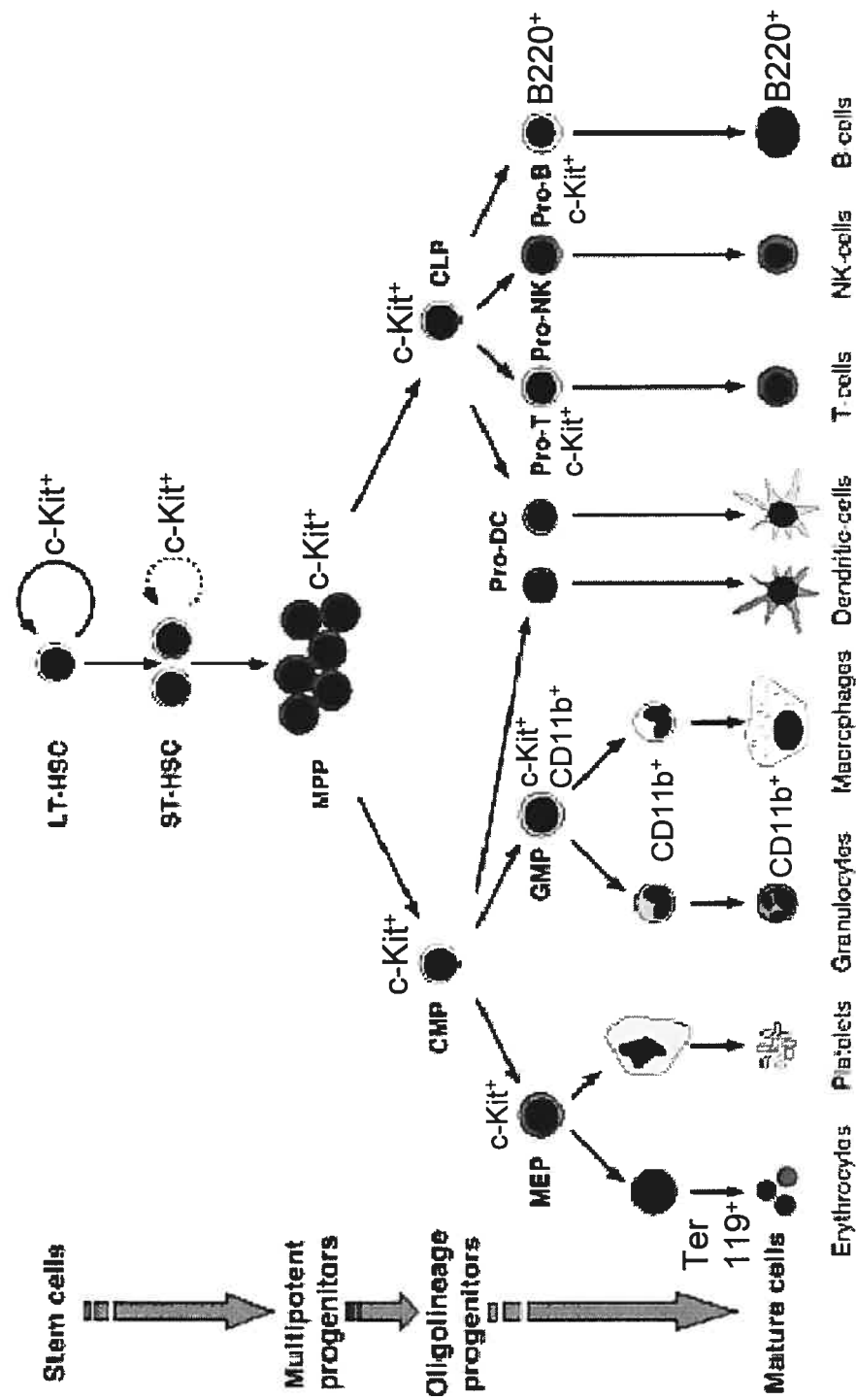


Figure 1

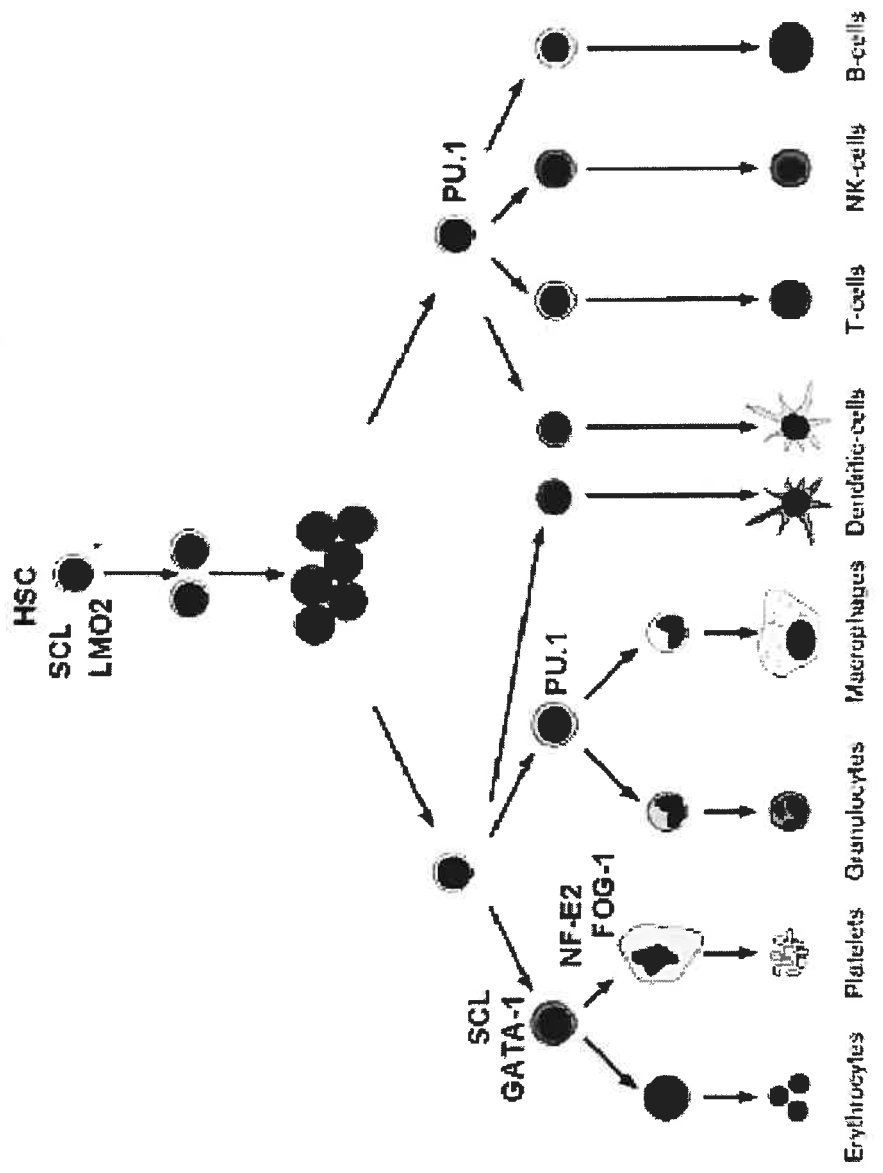


Figure II

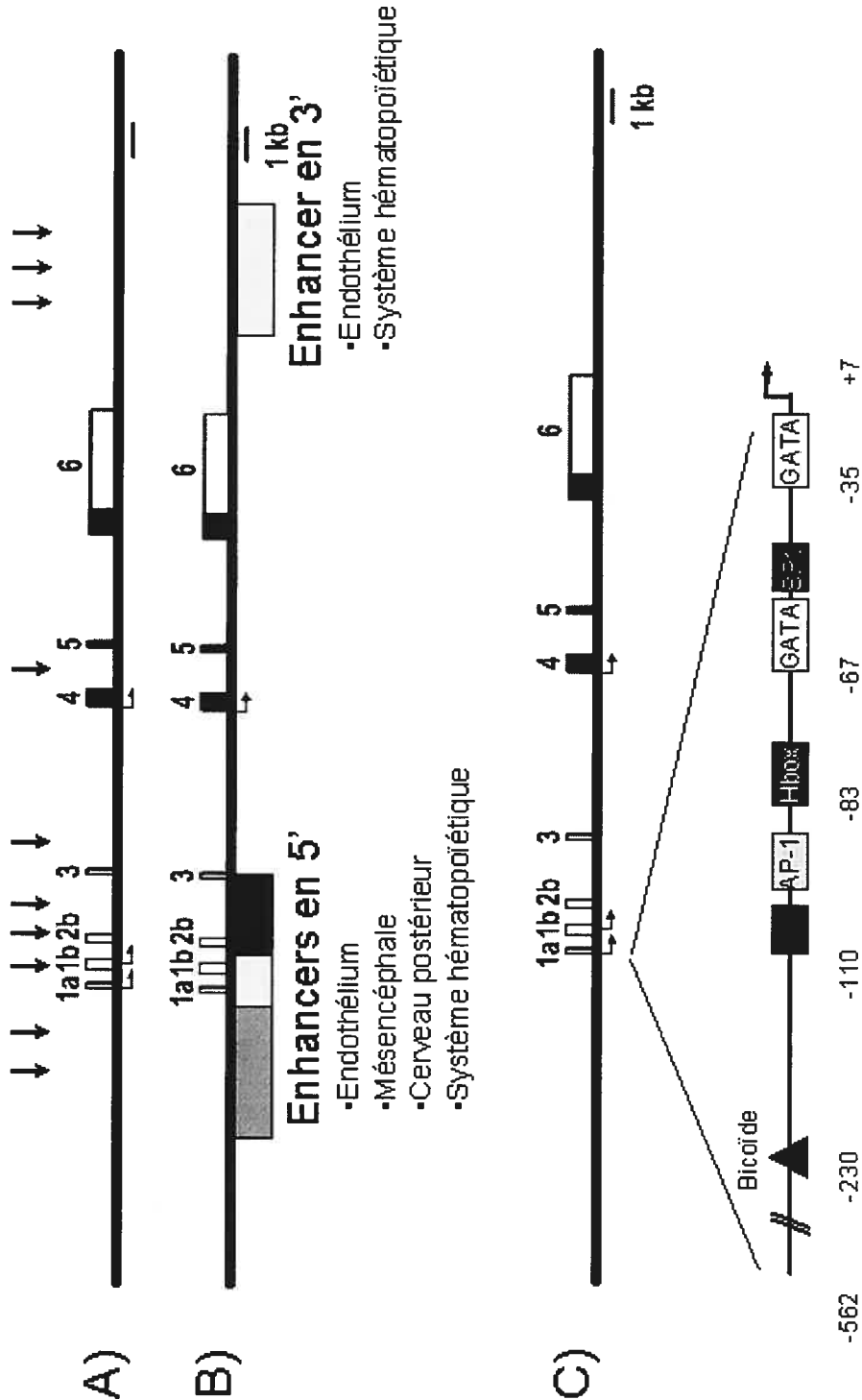


Figure III

Figure IV

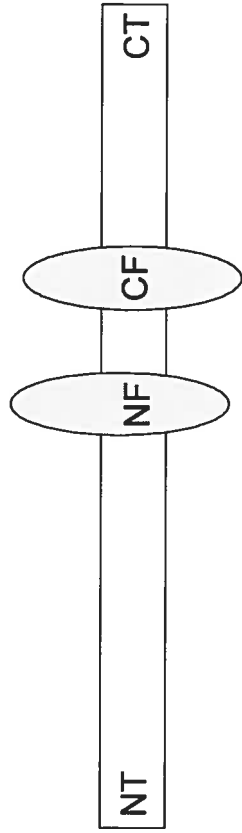


Figure V

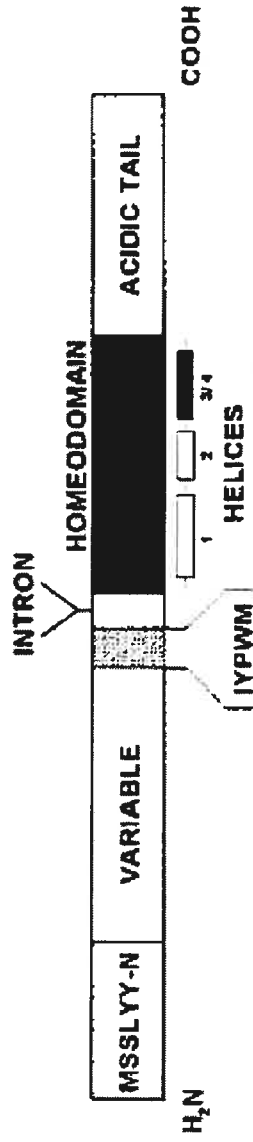
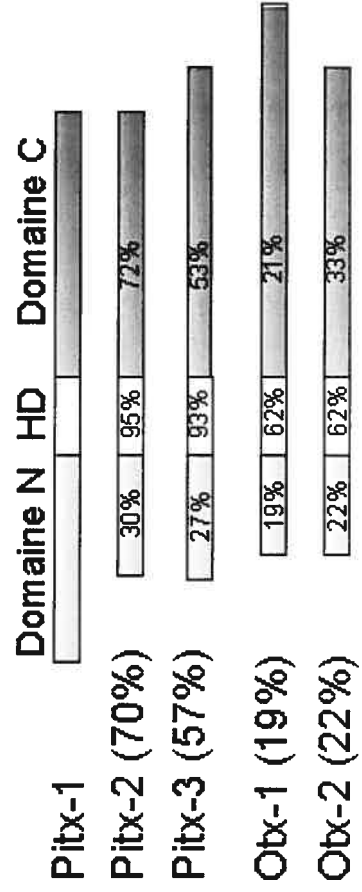


Figure VI



CHAPITRE 2

PRÉSENTATION DU MANUSCRIT

***Scf* is a direct transcriptional target of Otx1**

Virginie Sanguin-Gendreau^{*1} Richard Martin^{*2}, Mathieu Tremblay^{*2},
Cristina Magli[†] and Trang Hoang^{*1,2,#}

^{*}Laboratory of Hematopoiesis and Leukemia, Institute of Research in Immunovirology and Cancer, University of Montreal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7; [†]Institute of Biomedical Technologies, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 56124 Pisa, Italy; ¹Departments of Molecular Biology, Pharmacology and Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7; ²Department of Medicine, Division of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, Canada, H3A 1A3. # Author for correspondence (e-mail: trang.hoang@umontreal.ca)

Short title: SCL is a Otx1 target gene

Keywords: SCL, TAL1, Otx1, hematopoiesis, transcription

ABSTRACT

SCL, a basic helix-loop-helix stem cell leukemia transcription factor, is a master regulator of hematopoiesis shown to be essential for hematopoietic and erythroid cell development. We have previously shown that Otx1, a member of the bicoid homeodomain-containing proteins, is co-expressed with the SCL transcription factor in hematopoietic pluripotent and erythroid progenitor cells and Otx1-deficiency impairs the erythroid compartment in mice, associated with decreased SCL levels. In the present study, we provide molecular and functional evidence that SCL is a direct transcriptional target of Otx1. First, we show by chromatin immunoprecipitation that Otx1 and GATA-1 are specifically bound to the SCL proximal promoter in erythroid cells. Second, Otx-1 synergizes with GATA-1 to activate transcription from the SCL proximal promoter and this activity depends on the integrity of the proximal GATA site of the SCL promoter 1a. At the molecular level, we show that this synergy occurs via a physical interaction between Otx-1 and GATA-1 in erythroid cells, which maps to the homeodomain of Otx-1. Furthermore, a gain of function of Otx1 in primary hematopoietic cells gives rise to a 6-fold increase in endogenous SCL levels, an increase in TER119-positive erythroid cells and a decrease in the number of CD11b-positive myeloid cells. Finally, a gain of function of SCL rescues the erythroid deficiency in Otx1^{-/-} mice, consistent with the view that SCL operates downstream of Otx1. Taken together, our observations indicate that Otx1, GATA-1 and SCL operate within the same genetic pathway to specify the erythroid fate during hematopoiesis.

INTRODUCTION

SCL, a basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor, is a master regulator of hematopoiesis (reviewed in 39). During ontogeny, SCL is essential for the commitment of mesoderm to a hematopoietic fate. Loss of SCL is embryonic lethal by E9.5 due to the complete absence of blood cells (61,64) and *Scf*^{-/-} cells fail to contribute to primitive and definitive hematopoiesis in chimeras (56,60). Conversely, increasing SCL levels during development expands the hematopoietic and endothelial compartments at the expense of other mesoderm derived tissues (18,20,46,47). In adults, conditional knock-out experiments suggest that SCL is dispensable for hematopoietic stem cell function, but is required for erythroid and megakaryocytic differentiation (27,48).

Despite considerable effort aimed at identifying the regulatory elements governing the transcription of the *Scf* gene, the mechanisms controlling *Scf* expression remain largely unknown. Transcription of the *Scf* gene is initiated at two distinct sites and involves lineage specific promoters. The GATA-1-dependent promoter of exon 1a is active in erythroid and mast cells, whereas the promoter of exon 1b is active in mast, myeloid and T cells (3,4,7-10,37). Candidate enhancer or silencer elements were identified by mapping regions that are hypersensitive to Dnase I, to restriction endonucleases and by phylogenetic footprinting (6,10,12,21,23-25,40). When tested for their ability to drive the expression of the β -galactosidase reporter gene in transgenic mice, five separate *Scf* enhancers were shown to be active in specific subpopulations in which *Scf* is normally expressed (62,67). A 3' stem cell enhancer specifically directed the expression of the reporter gene to endothelium, hematopoietic stem cells and hematopoietic progenitors. Yet it failed to target TER119⁺ primitive and definitive erythroid cells, to rescue the lethal phenotype of *Scf*^{-/-} embryos and did not alter the expression of endogenous *Scf* when deleted from the *Scf* locus, suggesting that it may be redundant with other elements (22,25,63). Therefore,

although all the genetic information required for the proper expression pattern of *Scf* is contained within a sequence of 130 kb delimited by the neighboring *Sil* and *MAP17* genes, (66), we still do not know how *Scf* expression is initiated and how it is maintained during hematopoietic differentiation.

Recently, we have shown that a gain of function of SCL rescues the erythroid deficiency of *Otx1* knock-out mice (41). *Otx1* is a transcription factor related to the *Drosophila* gene *orthodenticle* (*OTD*) and contains a bicoid-like homeodomain (1). *Otx1*^{-/-} animals exhibit neurological, hormonal and sense organ defects (reviewed in 2). Furthermore, our analysis has revealed that *Otx1* null mice are also severely anemic due to a significant reduction in the number of erythroid progenitors (41). Within the hematopoietic system, *Otx1* is coexpressed with SCL in pluripotent progenitors and in the erythroid and megakaryocytic lineages (16,31,41). Since the expression of *Scf* is compromised in *Otx1*^{-/-} bone marrow, we hypothesized that the erythroid defects seen in *Otx1*^{-/-} mice resulted from reduced SCL function and showed that ectopic SCL expression rescues these erythroid deficiencies, strongly suggesting that SCL acts downstream of *Otx1*.

In the present study, we demonstrate that *Scf* is a direct target of *Otx1* in erythroid cells. Indeed, we find that the *Otx1* and GATA-1 transcription factors physically interact to cooperatively activate the *Scf* promoter and that both proteins occupy the *Scf* exon 1a promoter *in vivo* in erythroid cells. Furthermore, we show that *Otx1* induces endogenous *Scf* expression in primary erythroid cells. Finally, we provide evidence for a mechanism by which GATA-1 tethers *Otx1* to the -35 GATA site of *Scf* promoter 1a to drive its expression and to sustain an erythroid fate during hematopoiesis.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids constructs

Human *Scf* promoter 1a segments -562, -91 and -76/+7 were amplified and cloned into the HindIII and BglII sites of the pXP3 reporter (38). SCL-WT and SCL-MUT vectors were used as PCR templates to generate segments containing wild type, or an inactive -35 GATA site, respectively (3,4). -44/+7 constructs were obtained by excising the -562/-44 region of -562/+7 reporters, through the ligation of linearized vectors that were digested and blunted at HindIII and SstII sites. Human *Gata-1* was subcloned from the PECE vector into the pGEM4 vector (Promega, Madison, WI), for *in vitro* translations, using XbaI and Sall. *Gata-1* was also cloned into the p514 vector, a derivative of pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA), for increased expression in 293GPG cells, and into the pGEX2T vector (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), for the generation of N-terminal glutathione S-transferase (GST) chimeric proteins, using XhoI and EcoRI sites added during PCR. Expression vectors, GST and N-terminal maltose-binding protein (MBP) chimeric constructs for human Pitx1, Pitx2, Otx1 and Otx2 were generously provided by Dr Jacques Drouin (IRCM, Montreal, Canada). Otx1 was cloned into the pGEM4 vector, for *in vitro* translations, using BamHI and EcoRI sites adding during PCR. Otx1 (residues 1 to 354) and deletion mutants Otx1- Δ Nt (residues 35-354), Otx1- Δ Ct (residues 1 to 99), Otx1-HD (residues 35 to 99) and Otx1-Ct (residues 100 to 354) were cloned in frame with a N-terminal hemagglutinine epitope tag (HA) previously inserted in the Xba I and EcoRI sites of the pCDNA3.1(-) expression vector (Invitrogen, Burlington, ON), using EcoRI and BamHI added during PCR. A blunted NheI and cohesive BamHI fragment isolated from the pCDNA3.1(-) construct was used to subclone HA-Otx1 into the HpaI and BglII sites of the MSCVneo retroviral vector (28) and into the blunted EcoRI and BglII sites of a modified MSCV IRES GFP vector (34) in which the entire multicloning site, delimited by EcoRI and XhoI, was

replaced by GAATTAAGCTTGGTACCGAATTCAGATCTTGACTCGAG to include the following cloning sites: 5' HindIII, KpnI, EcoRI, BglII and XhoI. All constructs derived from PCR amplifications were verified through sequencing.

Luciferase assay

Promoter luciferase assays using NIH 3T3 cells were performed as previously described (38). MEL cells were transfected by electroporation. Exponentially growing MEL cells were concentrated at 1.5×10^6 ml⁻¹, combined with 14 µg of pGem4, 5 µg of reporter, and 1 µg of CMV-βgalactosidase, used as an internal control, and electroporated using a Bio-Rad apparatus (Mississauga, ON) at 960 µF and 300 mV. Cell lysates were prepared 16 hours after transfection, assayed for luciferase activity and normalised for βgalactosidase content.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Binding reactions consisted of 5 µl of *in vitro* translated proteins, 100 000 cpm of ³²P-labelled probes in 25 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 5 mM dithiothreitol (DTT), 35 mM KCl, 10% glycerol and 50 ng of poly(dIdC). Reaction was allowed to proceed for 40 minutes on ice. *In vitro* translated proteins were synthesized using the T7 polymerase and the TNT coupled wheat germ lysate system (Promega, Madison, WI). Where indicated, proteins were pre-incubated for 20 min on ice with 2 µg of a goat polyclonal anti-GATA-1 antibody (clone M-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a mouse monoclonal anti-HA antibody (Covance, Richmond, CA) or a 100 fold molar excess of unlabelled double stranded oligonucleotides added as a competitor. Protein-DNA complexes were resolved by 4% acrylamide gel electrophoresis (PAGE) in 0.5X TBE (Tris borate-EDTA) at 150V, at 4 °C. Gels were dried

and exposed to a PhosphorImager screen (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Probes were derived from *ScI* promoter 1a sequences. Bicoid (b.p. -240 to -217), 5' GATCCGAGGCCTTGGGATTAGAGATGGGGA; GATA WT (b.p. -50 to -20) 5'ACCCGCGGCAGTGCCTTATCTCTGCGGCGCA and GATA MUT (b.p. -50 to -20) 5' ACCCGCGGCAGTGCCTTATgTCTGCGGCGCA.

Chromatin immunoprecipitation, immunoprecipitation, western and pull-down assays

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed essentially as described previously (73). Briefly, formaldehyde cross-linked chromatin extracts from MEL cells constitutively expressing HA-Otx1 were first precleared with pansorbin[®] cells, then incubated overnight at 4°C with specific antibodies: 3 µg of rat monoclonal anti-GATA-1 (Clone N6, Santa Cruz), 5 µg of mouse monoclonal anti-HA (Covance) or an equivalent amount of species-matched control antibodies (anti-Rat or anti-Mouse IgG, Sigma, Oakville, ON). DNA-protein complexes were immunoprecipitated using pansorbin[®] cells and washed four times with 1 ml of IP buffer consisting of 20mM of Tris-HCL [pH 8.0], 137mM of NaCl, 1% NP-40, 10% glycerol, 1mM EDTA and 1mM PMSF. Crosslinks were reversed, DNA was cleared of RNA and proteins, then precipitated. The presence of specific promoter sequences was finally detected by PCR as described previously (35). PCR products were amplified for 32 cycles for the *ScI* promoter and for 28 cycles for the control *HPRT* promoter. Oligo sequences are listed in Table I. PCR products were loaded on 1.2% agarose gels, transferred on nylon membranes (Pall Corporation, Ann Arbor, MI), and hybridized with internal oligonucleotide probes. Membranes were exposed to a PhosphorImager screen and hybridization signals quantified using ImageQuant software (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences).

For *in vitro* coimmunoprecipitations, individually synthesized radiolabelled *in vitro* translated GATA-1 and HA-Otx1 proteins (described

above) were first combined for 30 minutes at 37°C. Next, 3 µg of rat monoclonal anti-GATA-1 (clone N6, Santa Cruz), 5 µg of mouse monoclonal anti-HA (Covance) or control anti-c-Myc antibodies was added along with 20 µl of Protein G Plus agarose beads (Calbiochem, San Diego, CA) in 400 µl of TNT buffer consisting of 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 2mM EDTA, 1% NP40 and 10% glycerol, supplemented with a cocktail of protease inhibitors: 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 100 µg ml⁻¹ pepstatin A, 10 µg ml⁻¹ aprotinin, 1 µg ml⁻¹ leupeptin, 1 µg ml⁻¹ DTT, 1 µg ml⁻¹ antipain and 1 µg ml⁻¹ chymostatin. The reaction was allowed to proceed for 4 hours at 4°C. The immune complexes bound to the Protein G beads were washed three times with TNT buffer and then resolved by SDS-PAGE. Gels were dried and ³⁵S-labelled proteins were exposed to a PhosphorImager screen.

In vivo coimmunoprecipitations were performed using 100 µg of 293GPG nuclear extracts expressing GATA-1 and HA-Otx1 or 1 mg of MEL HA-Otx1 cellular extracts cross-linked as for CHIP assays (α-GATA1) or untreated nuclear extracts (α-HA-Otx1). 293GPG cells expressing GATA-1 and HA-Otx1 were prepared by transfecting 10 µg of each expression vector by calcium phosphate coprecipitation. This cell line was chosen for their high efficiency of ectopic gene expression. 293GG cells were transfected one day after plating cells at 4×10⁶ per 100 mm culture dish. Nuclear extracts were prepared 48 hours later as described previously (29). Specific recognition of the protein complexes by antibodies was performed by adding 3 µg of rat monoclonal anti-GATA-1 (clone N6, Santa Cruz), 3 µg of goat polyclonal anti-GATA-1 (clone M20, Santa Cruz), 5 µg of mouse monoclonal anti-HA (Covance) or an equivalent amount of species-matched control antibodies (anti-Rat, anti-goat or anti-Mouse IgG, Sigma). Binding of the protein complexes was allowed to proceed overnight at 4°C in 1 ml of IP buffer, described above. Protein complexes were immunoprecipitated following an incubation with pansorbin[®] cells for 30 min at 4°C. Immune complexes bound to Pansorbin[®] cells were then washed

three times with 1 ml of IP buffer and protein complexes were eluted in Laemmli buffer for 15 minutes at room temperature. Crosslinked protein complexes derived from MEL HA-Otx1 cells were eluted in elution buffer consisting of 50 mM Tris-HCL [pH 8.0], 10 mM EDTA and 1% SDS. Crosslinks were reversed by heating overnight at 65°C. Samples were subjected to SDS-PAGE and transferred on PVDF membranes for western blotting with the antibodies listed below.

Antibodies used for immunoblotting were: rat monoclonal anti-GATA-1 (clone N6, Santa Cruz), mouse monoclonal anti-HA (Covance), rabbit polyclonal anti-GFP (Santa Cruz), mouse monoclonal anti-PTP 1D (BD Biosciences, San Diego, CA), peroxidase conjugated goat polyclonal anti-mouse and anti-rat antibodies (Calbiochem) and goat anti-rabbit conjugated HRP polyclonal antibody (Sigma). Proteins were visualized using ECL Plus (Amersham Biosciences).

GST-protein and MBP-protein purifications and pull-down assays were performed as described previously (38).

Cell cultures, growth factors and retroviral infections

NIH 3T3, 293GPG and MEL (C88) cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen). NIH 3T3 and 293GPG cells were passaged three times weekly. MEL cells were passaged every second day at 5×10^4 cells ml^{-1} .

Infection of primary hematopoietic cells was accomplished using high-titer, helper free, GP+E-86 packaging cell lines (42) that constitutively express HA-Otx1 constructs. GP+E cell lines were generated by infection with viral supernatants obtained from 293GPG packaging cells (52) and maintained as previously described (34). Prior to infection, fetal liver cells isolated from E13.5 C57 embryos were first depleted of TER119⁺ differentiated erythroid cells by immunomagnetic cell separation (Quiagen, Mississauga, ON, Canada) to enrich in hematopoietic precursors and to

increase infection efficiency. Depleted cells were then cocultured at 1×10^6 ml^{-1} for 60 hours on irradiated GP+E cell lines in IMDM supplemented with 15% inactivated FCS, 100 ng ml^{-1} SF, 100 ng ml^{-1} IL-11, 50 ng ml^{-1} Flt-3 (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ) and 2.5×10^{-4} monothioglycerol (Sigma). Media was changed every day. SF and IL-11 were derived from media conditioned by COS cells transfected with corresponding expression vectors and titrated against a recombinant source. MEL cells expressing HA-Otx1 were derived using concentrated 293GPG supernatant as described previously (35). MEL HA-Otx1 cells were selected and maintained in the presence of 1.2 mg ml^{-1} G418 (Invitrogen).

Flow cytometry

Cells were immunostained as previously described (43) using c-Kit-APC, TER119-PECy7 and/or CD11b-PE antibodies (BD biosciences, Mississauga, ON). Included was propidium iodide to detect dead cells. Analyses were performed on FACScalibur and LSRII flow cytometers (BD biosciences).

RT-PCR

Preparation of cDNA and specific PCR amplifications were performed as previously described (30,35). Samples were amplified for 26 cycles for *Scl*, *mGpa*, *Gata-1*, *β globin*, *CD11b*, *PU.1* and *c-Kit*, and for 24 cycles for *S16*. Oligo sequences are listed in Table I. PCR products were resolved on 1.2% agarose gels, transferred on nylon membranes, and hybridized with internal oligonucleotide probes as described for CHIP assays.

TABLE 1: Oligonucleotides used for RT-PCR and ChIP analysis

Gene	Sequence		
	Forward	Reverse	Internal
Pu.1	TCAGTCACCAGGTTTCCTACAT	GAAGTGGTACAGGGCAATCTTT	ACCTTGTCCTCCAGCCACCAG
mGpA	ATATGAATTCCTGGGAAGGATGCTTTGC	ATATGGATCCTCCACTGCAAGGAAAGG	GGAAGTTGCTTT CTTGAATA
GATA-1 ^a	GGAGACAGGATCTTCTGTAG	GATGCTCCACTTGACATGA	TTCAGGCATGTATTGCTATGCCT
CD11b	CAACTTCACGGCTTCAGAGA	AGAAGATGACCTGGGGATGA	TCAGTACCAGTCAACAACCT
β ^{me1a}	CTGACAGATGCTCTCTTGGG	CACAAACCCAGAAACAGACA	CCAAAGTGAAGGCCCATGGCAAGAA
S16 ^a	AGGAGCGATTTGCTGGTGTA	GCTACCAGGGCCTTTGAGATG	AAATTTATGCCATCCGACAGTC
HPRT	GGCCAGACTTTGTTGGATTTG	CACAGGACTAGAACACCTGTC	TGAGCGCAAAGTTGAATCTGC
hobx-1	AAACAACCCCATACGGCAT	CATGAAGATGTCAGGGTAGCGA	TATCCGGCCACTCCCGCGGAA
cKit	CAGATATGTGAACCAACTTCGC	CATTTATGAGCCTGTCGTACGT	TCCGTGACATTC AACGTTTACGTGA
SCL	TCCCCATATGAGATGGAGATTT	ATTGATGTACTTCATGGCAAGG	ATCTTCACCAACAGCCCGGGA
SCL-ChIP	TTGTTCTGTCCCCCTATAGAGTC	ATGGGGAAAGACGGAGGAAAC	AAATGAATCATTTGGCCCCATA
HPRT-ChIP	TGAGGCCAAAATAGAGGCTCA	TCCCAAGACCTTGCACTACC	TGTACAAAACTACAGAGCAG

RESULTS

Otx1 collaborates with GATA-1 to activate the exon 1a promoter of *Scf*.

As a first step in determining if *Scf* is a direct transcriptional target of Otx1, we assessed whether Otx1 can enhance the activity of the exon 1a promoter of *Scf*, which is the only known regulatory element required for the expression of *Scf* in erythroid cells. The 170 b.p. upstream of exon 1a is highly homologous across five species, namely in human, mouse, chick, pufferfish and zebrafish (21,21). The promoter is active in erythroid cells in transient transfections (4,9,10,37) and its activity is dependent on the -35 GATA site (4,9,10,37). In addition the human *Scf* promoter 1a harbors potential binding sites for members of the bicoid family (-230), homeodomain containing proteins (-83) and GATA transcription factors (-67 and -35) (4) (Fig. 1A). GATA-1, however, was able to activate promoter 1a by two-fold only, using an optimized luciferase reporter assay in heterologous NIH 3T3 cells (35,38) (Fig. 1B). Next, we examined the effect of Otx1, alone or in combination with GATA-1. Interestingly, whereas Otx1 alone had no effect, Otx1 activated promoter 1a in a dose dependent manner when combined with GATA-1, reaching 10-fold higher activity when compared to the basal promoter activity. In mammals, the bicoid family comprises two subfamilies, the first one comprises Otx1 and Otx2, and the second one Pitx1 and Pitx2 (15). As shown in Fig. 1B, both Otx1 and Otx2 but not Pitx1 nor Pitx2 were able to enhance GATA-1 transcriptional activity, demonstrating the specificity of the synergy between Otx family members and GATA-1 on the *Scf* promoter.

Otx1 and GATA-1 occupy the *Scf* promoter *in vivo*

To substantiate the importance of Otx1 and GATA-1 in regulating the expression of *Scf*, we sought to determine whether Otx1 and GATA-1 associate with the *Scf* promoter *in vivo*. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays (35) were performed using formaldehyde cross-linked

chromatin from murine erythroleukemia cells (MEL) constitutively expressing HA-tagged Otx1 (MEL HA-Otx1 cells). As shown in Fig. 1C, chromatin immunoprecipitated with anti-GATA-1 and anti-HA antibodies (Otx1) were enriched by 3 times in *Scf* promoter sequences (b.p. -720 to +20) compare to an equivalent amount of species-matched control antibodies (anti-rat or anti-mouse IgG), as revealed by specific PCR amplifications. In contrast, control sequences from the *HPRT* promoter were minimally enriched with these antibodies, a house-keeping gene not regulated by GATA-1 nor by Otx1. These results demonstrate that Otx1 and GATA-1 are physically associated to the *Scf* promoter in erythroid cells and establish an important role for these proteins in regulating the expression of SCL.

Activation of the *Scf* promoter without direct binding of Otx1.

To clarify the mechanism of cooperation between Otx1 and GATA-1, we performed sequential deletions of the *Scf* exon 1a promoter. Strikingly, removal of the bicoid, H-box and distal GATA site (-67) did not hinder the ability of Otx1 to collaborate with GATA-1 in NIH 3T3 cells (Fig. 2A, left panel). Consistently, the promoter deletion series showed similar activities when transfected in MEL cells (Fig. 2A, right panel), in which both GATA-1 and Otx1 are expressed (data not shown). Considering the ability of the proximal -44/+7 region to maintain promoter activity, we examined the requirement of the proximal -35 GATA site, which is conserved across 8 species (Fig. 2B) Interestingly, mutation of the -35 GATA motif, in the context of the full length (-562/+7) and proximal promoters, completely abolished their activities in both NIH 3T3 and MEL cells. Thus, these results indicate that the proximal region of *Scf* exon 1a promoter is sufficient to allow a synergistic activation by Otx1 and GATA-1 and this activity requires the integrity of the -35 GATA site.

Next, we investigated whether Otx1 and GATA-1 associate to the -44/+7 region. We therefore performed electrophoretic mobility shift assays

(EMSA) using a probe spanning the $-50/-20$ region together with *in vitro* translated proteins. As expected, *in vitro* translated GATA-1 binds to the -35 GATA motif (Fig. 2C) (lane 8), and this binding is specifically displaced by an unlabelled wild type competitor (lane 9) but not when the competitor is mutated at the -35 GATA motif (lane 10). Furthermore binding was supershifted by an anti-GATA-1 antibody (lane 11). These results are in agreement with previous reports describing the binding of GATA-1 to this promoter (4,9,10,37). In contrast to GATA-1, *in vitro* translated HA-Otx1 does not bind to the $-50/-20$ region (lane 4), consistent with the absence of known homeodomain-binding sequences, while efficiently binding a consensus bicoid sequence (lane 2) to activate transcription in transient assays (data not shown). Taken together, our results indicate that transcriptional activation of *Scf* exon 1a promoter by GATA-1 and OTX1 requires direct GATA-1 binding but not Otx1 binding to promoter sequences.

Direct interaction between GATA-1 and Otx1.

Our results are consistent with a mechanism by which the binding of GATA-1 to the -35 GATA may tether Otx1 to SCL proximal promoter sequences. We therefore sought to determine whether Otx1 physically interacts with GATA-1. First, we performed coimmunoprecipitations using radiolabelled *in vitro* translated proteins. Interestingly, the antibody against GATA-1 immunoprecipitated HA-Otx1 as well as GATA-1 (Fig. 3A). Conversely, the antibody against HA-Otx1 brought down GATA-1 and HA-Otx1, whereas a control antibody (c-myc) did not. These interactions were further confirmed using a pull-down assay, showing that immobilized GST-GATA-1 associates with *in vitro* translated Otx1 (Fig. 3B). To evaluate the specificity of the interaction between GATA-1 and Otx1, we performed pull down assays using immobilized MBP-Pitx1 and *in vitro* translated GATA-1. As shown in Figure 3B, the affinity of GATA-1 for Pitx1 is much weaker than for Otx1, indicating that the interaction between Otx1 and GATA-1 is highly specific. Immunoprecipitations were performed in the presence of ethidium

bromide to avoid bridging of proteins by contaminant DNA molecules. Thus, our results clearly demonstrate a direct interaction between GATA-1 and Otx1.

To ascertain the *in vivo* relevance of this interaction, coimmunoprecipitations were performed using nuclear extracts from 293 GPG cells expressing HA-Otx1 and GATA-1. As shown in Figure 3C, the anti-HA antibody immunoprecipitated GATA-1, and conversely, the anti-GATA-1 antibody immunoprecipitated HA-Otx1, therefore confirming that Otx1 and GATA-1 interact *in vivo*. Furthermore, in order to demonstrate that Otx1 and GATA-1 interact in an erythroid environment, we performed coimmunoprecipitations using MEL HA-Otx1 cells. We find that GATA-1 and HA-Otx1 are efficiently precipitated by antibodies directed against GATA-1 and against HA, but not by equivalent amounts of species-matched control antibodies (Fig. 3D). Together, these results confirm that Otx1 and GATA-1 interact *in vitro* and *in vivo* and consolidate the model by which a transcriptional complex containing Otx1 and GATA-1 is targeted to the proximal GATA site of the exon 1a promoter to enhance the expression of *Scl*.

Otx1 homeodomain is sufficient for an interaction with GATA-1.

Having confirmed a direct interaction between GATA-1 and Otx1, we next mapped the interaction domain of Otx1 using a pull-down assay. *In vitro* translated wild type Otx1 (WT), N-terminal (Δ NT) and C-terminal (Δ CT) deletion mutants efficiently bind immobilized GST-GATA-1, indicating that the N-terminal and C-terminal domains of Otx1 are not required for this interaction (Fig. 4A). In contrast, GATA-1 interaction is lost when the homeodomain is deleted together with the N-terminal domain (CT) and conversely, the homeodomain alone (HD) was sufficient for interaction with GATA-1. These results indicate that the homeodomain of Otx1 is necessary and sufficient to mediate the interaction with GATA-1.

CT, NT and HD domains of Otx1 are required for the synergy with GATA-1.

We next investigated which domains of Otx1 are required for the transcriptional collaboration with GATA-1. When tested for their ability to activate the $-44/+7$ region of promoter 1a in NIH 3T3 cells, all Otx1 deletion mutants failed to synergize with GATA-1, therefore indicating that the N-terminal, C-terminal and HD are independently required to activate the *Scf* promoter (Fig. 4B). Western blotting confirmed that all deletion mutants are expressed at similar levels in NIH 3T3 cells, with the exception of the C-terminal deletant (Δ CT) which is persistently expressed a lower levels (Fig. 4C), indicating that failure to activate transcription was not due to reduced expression. Furthermore, these mutants retain the ability to interact with GATA-1 (Fig. 4A), therefore excluding the possibility of protein misfolding. Thus, the transcriptional synergy between Otx1 and GATA-1 requires the integrity of the Otx1 protein.

Otx1 enhances *Scf* expression in primary hematopoietic cells

To provide *in vivo* evidence that *Scf* is a direct target of Otx1 in primary hematopoietic cells, we determined the effect of increased Otx1 levels in E13.5 fetal liver cells which were first depleted of differentiated TER119⁺ erythroid cells, and then infected with HA-tagged full length Otx1, deletion mutants or an empty MSCV IRES GFP vector. This bicistronic vector harbors a GFP (green fluorescent protein) gene downstream of an internal ribosome entry site (IRES) which allows for the isolation of HA-Otx1 expressing cells based on the expression of the fluorogenic protein GFP by flow cytometry. Thus, GFP⁺ cells were isolated 60 hours following the start of the infection and analyzed for the expression of *Scf* and for hematopoietic markers by RT-PCR. In 3 independent experiments, cells infected with wild type Otx1 exhibited on average 6-fold higher levels of *Scf*, when compared to cells infected with an empty vector (Fig. 5A-B). Moreover, Otx1 also induces an increase in a SCL target gene *glycophorin A* (*GpA*) (35),

consistent with an indirect effect of Otx1 through SCL. Finally, Otx1 increased the levels of several erythroid-specific genes, *GATA-1* and *β globin major*, and decreased myeloid-specific genes *PU.1* and *CD11b*. Interestingly, all Otx1 mutants failed to enhance the expression of *Scl*, which concurs with the results of our transient transfection studies (Fig. 4). Furthermore, these mutants had no significant effect on hematopoietic markers. All Otx1 mutant proteins were expressed in the stable retroviral producer lines used to infect fetal liver cells, with the exception of the C-terminal deletant (Δ CT) (Fig. 5). Despite the fact that the protein levels for the Δ NT and the homeodomain of Otx1 were lower, the CT domain showed an elevated level of expression, but was still inactive. Therefore we conclude that these domains are required for Otx1 function in hematopoietic cells. Moreover, all these domains are inactive in transient transfection further suggesting that the intact Otx1 protein is required.

Otx1 gain-of-function enhances erythroid and blocks myeloid differentiation

Molecular analysis of Otx1 infected cells revealed an up regulation of erythroid and a downregulation of myeloid markers, suggesting that Otx1 has positive and negative roles during erythroid and myeloid differentiation, respectively. In a complementary approach, we examined the distribution of hematopoietic populations by flow cytometry. Consistent with the molecular analysis, within the GFP⁺ Otx1-expressing cells, we find that the proportion of TER119⁺ differentiated erythroid cells increased from 3.1% to 24.0% (Fig.6A) and inversely, the proportion of CD11b⁺c-Kit⁻ differentiated myeloid cells dropped from 52.7% to 4.0% when compared to control (MOCK) (Fig. 6A). Interestingly, the population of CD11b⁻c-kit⁺ immature erythroid cells also increased from 21.9% to 45.7%. Importantly, the effects with Otx1 on hematopoietic populations were not observed using HA-Otx1 deletion mutant, thus reinforcing the importance of all Otx1 domains during hematopoiesis. In addition, results from a cytopsin confirm that cells infected

with Otx1 are mostly proerythroblast cells compared to control and to cells infected with Otx1 deletion mutant cells (Fig. 6B).

Taken together, our data provide *in vivo* evidence that Otx1 regulates the expression of *Scf* to favor erythroid differentiation and suggest that a downregulation of Otx1 is prerequisite to myeloid differentiation.

DISCUSSION

Scf is crucial for the generation of hematopoietic cells and for erythroid and megakaryocytic differentiation. Yet, the molecular mechanisms controlling *Scf* expression remain poorly understood. In this study, we show that Otx1, a bicoid-like homeodomain containing protein, collaborates with GATA-1 to enhance the transcription of *Scf* during erythroid differentiation.

Scf enhancers

Our understanding of the mechanisms controlling the tissue specific expression of *Scf* is revealing itself to be a daunting task. Using a systematic approach, several enhancers were shown to direct the expression of a reporter gene to subdomains of endogenous *Scf* expression in transgenic mice, including the central nervous system (CNS), endothelium and hematopoietic cells (22,25,62,63,67). However, further analysis has revealed higher levels of complexity. First, a 3' enhancer, enabled with the ability to target hematopoietic stem cells, progenitors and endothelium, can be deleted from the *Scf* locus without affecting the expression pattern of *Scf* (22). This suggests that the 3' enhancer is not required for the expression of *Scf* or that it may be redundant with other regulatory elements. Second, transcription factors that have been shown to regulate the -3.8 and 3' enhancers, namely GATA-2, Fli-1 and Elf-1, cannot solely account for the regulation of *Scf*, since the phenotype of *Scf*^{-/-} embryos is not reproduced by the loss of these transcription factors (22,25). Again, this may result from a redundancy between transcription factors or may point to the requirement of essential, yet unidentified cofactors that may possibly act without direct binding to DNA. Third, although several enhancers have been identified that direct the expression of a reporter gene to different domains of *Scf* expression, none have the ability to target TER119⁺ erythroid cells (63). This suggests that the combination of cis-elements required for the regulation of *Scf* transcription during the onset of

hematopoiesis and for hematopoietic differentiation differ. Finally, it is probable that the transcriptional complexes involved in *Scf* transcriptional regulation evolve over time and during differentiation, as no known regulator is coexpressed with SCL in all compartments (22). For example, putative regulators such as GATA-2, which is down-regulated during hematopoietic differentiation, may be replaced by GATA-1.

GATA-containing complexes

Of all known transcriptional regulatory elements, the promoter of exon 1a is the only region that is highly conserved across 5 species (21,25). Promoter 1a is active in erythroid cells and requires the -35 GATA site. We have confirmed the ability of GATA-1 to activate the promoter in transient transfections and have found that GATA-1 is bound to the *Scf* promoter 1a *in vivo*. Moreover, we have identified Otx1 as a novel cofactor of GATA-1 and transcriptional regulator of promoter 1a. Indeed, we find that Otx1 can synergistically activate the promoter in a dose dependent manner by physically interacting with GATA-1 at the -35 GATA site. GATA-1 is known to interact with multiple partners, including FOG, EKLF, LMO2 and CBP, and to activate erythroid specific genes, such as globin, heme biosynthetic enzymes and EPOR. The interaction between GATA-1 and FOG is especially important to GATA-1 function since a mutation that abolishes their interaction aborts terminal erythroid differentiation due to the deregulation of GATA-1 target genes. Whereas most GATA-1 partners modulate GATA-1 function by enhancing its specificity and stability of binding to DNA, FOG is believed to recruit additional factors (reviewed in 11). GATA-1 is also part of the "SCL-complex" along with LMO2, E2A and Ldb1. We have previously shown that this complex, present in erythroid (78) and immature T cells (26), can activate the transcription of *c-kit* (38) and *GpA* (35) genes. The relationship between these seemingly disparate complexes is poorly understood and is now further complicated by the identification of an interaction between GATA-1 and Otx1. It has been

suggested that GATA-1 containing complexes evolve during erythroid differentiation, influenced by the temporal expression of each factor and by the cross-inhibition of different complexes (11,55,65). Further experiments will be required to determine the effect of Otx1 on the function of known GATA-1-containing complexes.

Transcriptional activation by Otx1 without DNA-binding

Otx family members interact physically and collaborate with a variety of transcription factors containing LIM (49,70,79), forkhead (50) and bHLH-ZIP (44) domains. Similarly, closely related Pitx family members can interact and cooperate with LIM (5), POU (72), bHLH (57), nuclear receptor (71) and T-box (36) transcription factors. In all these reports, transcriptional activation requires the binding of the homeodomain of Otx or Pitx members, to a cognate binding sequence present in the target promoter. In sharp contrast, we show that Otx1 and GATA-1 can activate transcription, without the need for Otx1 to bind DNA. In support for this non-conventional mechanism, Poulin et al. (57) showed that in pituitary cells, the activity of the POMC promoter depends on the physical interaction between Pitx1 and NeuroD1/E2A heterodimers which bind DNA on distinct bicoid and E-box sites, respectively. Interestingly, this synergism can be reproduced using tandem E-box sites, but not bicoid multimers, thus demonstrating that Pitx1 can also function independently of DNA-binding.

The homeodomain of Otx1 is sufficient to bind GATA-1, but all domains of Otx1 are required for the activation of promoter 1a and for the upregulation of endogenous *Scf*. These results suggest that the N- and C-terminal domains of Otx1 are essential for the generation of a transcriptional initiation complex in erythroid cells, possibly by permitting interactions, directly or indirectly, with the basal transcriptional machinery and/or with distant enhancers. An interesting co-factor candidate is Ldb1, a ubiquitous adapter protein that interacts with different classes of transcription factors, involved in cell fate determination (reviewed in 45). Interestingly, Ldb-1

interacts and synergizes with Pitx1 (5) and its *Drosophila* homologue, Chip, binds bicoid and OTD to enhance transcription (70). Moreover, physical interactions between Ldb-1 and GATA-1 are required for the activation of the GpA promoter in erythroid cells (35) and Chip binding to the GATA-factor pannier that controls proneural patterning in *Drosophila* (58). Thus, the requirement of Ldb-1 binding in many biological processes which involve bicoid family members and GATA-1 raises the question whether Ldb-1 may be involved in the activation of *Scf* transcription by Otx-1 and GATA-1, possibly by serving as a bridging molecule between promoter 1a and distant enhancers through DNA-looping.

Role of Otx1 during hematopoiesis

Gain-of-function of Otx-1 in hematopoietic precursors enhanced erythroid and impeded myeloid differentiation. Can these biological effects be solely attributable to an increase in SCL function or is it possible that Otx-1 affects hematopoiesis in a SCL-independent manner? SCL function is central to erythropoiesis, as it mediates signals from the environment and acts as a nucleation factor for key transcription factors (39). SCL expression increases during erythroid differentiation (4,31) and enhances erythroid differentiation when overexpressed in the bone marrow (17,59,75). Conversely, inactivation of SCL impedes erythroid differentiation (4,27,48). We have recently shown that SCL acts downstream of Flk-1 signaling during primitive erythropoiesis (43) and downstream of EPOR signaling during definitive erythropoiesis to consolidate an erythroid fate by activating genes essential for survival and for differentiation (35). Therefore, considering the central role of SCL during erythropoiesis, we strongly believe that the increase in erythroid cells induced by Otx1 is mediated by enhanced SCL expression and function. In accordance, Otx-1 infected cells exhibit higher levels of GpA and c-kit, two direct target genes of SCL. In contrast, we consider that SCL-independent functions are probably involved in the drastic reduction of myeloid cells by Otx1. During myeloid

differentiation, SCL levels decrease (16,31) and SCL gain-of-function blocks myeloid differentiation in cell lines (13,31,69). However, varying SCL levels during adult hematopoiesis in primary cells has little effect on myeloid development (17,27,48,59). Hence, the ablation of myeloid cells by Otx-1 is most probably independent of SCL.

Role for a GATA/Otx1 complex in the CNS

Otx1 and Otx2 have been extensively studied for their roles in the developing CNS, governing the molecular mechanisms underlying induction, maintenance, regionalization, corticogenesis and axon connectivity (1). SCL, GATA-2 and GATA-3 are also widely expressed in neurons during brain development and in adults (19,51,77), yet the assessment of their functions has been hampered by the early lethality of null embryos (53,61,64,74). Considering that the expression patterns of *Scf* and GATA factors greatly overlaps in the CNS, is it possible that GATA factors regulate SCL expression in the brain through interaction with Otx factors? Interestingly, *Scf* promoter 1a directs the expression of a reporter gene to the midbrain in transgenic mice and a region spanning 7 kb upstream of exon 1a to exon 3 (-7E3) recapitulate endogenous *Scf* expression in midbrain, hindbrain and spinal cord (67). Strikingly, mutation of the -35 GATA site in the -7E3 reporter construct completely abolishes its expression, demonstrating the *in vivo* requirement for this site. A direct assessment of the necessity of the -35 GATA in erythroid cells has not yet been assessed *in vivo*.

GATA-2 and GATA-3 are implicated in the specification of rhombomere 4 (54), of serotonergic neurons (14,32,76) and of V2 interneurons (32,51,80), in regions that express SCL (68,77). Furthermore, GATA factors are expressed in regions known to require Otx function, such as the developing optic, otic and olfactory systems (1,19,33,51,53,76,80). Finally, the expression of SCL, GATA and Otx members at the zona limitans intrathalamica (boundary between dorsal and ventral thalamus) and at the

midbrain-hindbrain barrier (MHB) (1,77,80) may be indicative of a common function in brain regionalisation, a mechanism that relies on Otx function. Further colocalisation and conditional knock-outs experiments will be required in order to directly address possible interactions between SCL, GATA and Otx factors.

Taken together, our data indicate that during erythroid differentiation, Otx-1 expands and consolidates the erythroid fate by directly activating the transcription of *Scf* through collaboration with GATA-1 at the proximal GATA site of promoter 1a.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the National Cancer Institute of Canada (T.H.) and by studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (V.S.G and M.T.) and the National Science and Engineering Research Council and McGill University (R.M.).

REFERENCES

1. **Acampora, D., M. Gulisano, V. Broccoli, and A. Simeone.** 2001. Otx genes in brain morphogenesis. *Prog.Neurobiol.* 64:69-95.
2. **Acampora, D., S. Mazan, V. Avantaggiato, P. Barone, F. Tuorto, Y. Lallemand, P. Brulet, and A. Simeone.** 1996. Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the Otx1 gene. *Nat.Genet.* 14:218-222.
3. **Aplan, P. D., C. G. Begley, V. Bertness, M. Nussmeier, A. Ezquerra, J. Coligan, and I. R. Kirsch.** 1990. The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol.Cell Biol.* 10:6426-6435.
4. **Aplan, P. D., K. Nakahara, S. H. Orkin, and I. R. Kirsch.** 1992. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J.* 11:4073-4081.
5. **Bach, I., C. Carriere, H. P. Ostendorff, B. Andersen, and M. G. Rosenfeld.** 1997. A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* 11:1370-1380.
6. **Barton, L. M., B. Gottgens, M. Gering, J. G. R. Gilbert, D. Grafham, J. Rogers, D. Bentley, R. Patient, and A. R. Green.** 2001. Regulation of the stem cell leukemia (SCL) gene: A tale of two fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:6747-6752.
7. **Begley, C. G., L. Robb, S. Rockman, J. Visvader, E. O. Bockamp, Y. S. Chan, and A. R. Green.** 1994. Structure of the gene encoding the murine SCL protein. *Gene* 138:93-99.

8. **Bockamp, E. O., J. L. Fordham, B. Gottgens, A. M. Murrell, M. J. Sanchez, and A. R. Green.** 1998. Transcriptional regulation of the stem cell leukemia gene by PU.1 and Elf-1. *J.Biol.Chem.* 273:29032-29042.
9. **Bockamp, E. O., F. McLaughlin, B. Gottgens, A. M. Murrell, A. G. Elefanty, and A. R. Green.** 1997. Distinct mechanisms direct SCL/tal-1 expression in erythroid cells and CD34 positive primitive myeloid cells. *J.Biol.Chem.* 272:8781-8790.
10. **Bockamp, E. O., F. McLaughlin, A. M. Murrell, B. Gottgens, L. Robb, C. G. Begley, and A. R. Green.** 1995. Lineage-restricted regulation of the murine SCL/TAL-1 promoter. *Blood* 86:1502-1514.
11. **Cantor, A. B. and S. H. Orkin.** 2002. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21:3368-3376.
12. **Chapman, M. A., I. J. Donaldson, J. Gilbert, D. Grafham, J. Rogers, A. R. Green, and B. Gottgens.** 2004. Analysis of multiple genomic sequence alignments: A web resource, online tools, and lessons learned from analysis of mammalian SCL loci. *Genome Research* 14:313-318.
13. **Condorelli, G. L., A. Tocci, R. Botta, F. Facchiano, U. Testa, L. Vitelli, M. Valtieri, C. M. Croce, and C. Peschle.** 1997. Ectopic TAL-1/SCL expression in phenotypically normal or leukemic myeloid precursors: proliferative and antiapoptotic effects coupled with a differentiation blockade. *Mol.Cell Biol.* 17:2954-2969.
14. **Craven, S. E., K. C. Lim, W. Ye, J. D. Engel, F. de Sauvage, and A. Rosenthal.** 2004. Gata2 specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog. *Development* 131:1165-1173.

15. **Drouin, J., B. Lamolet, T. Lamonerie, C. Lanctot, and J. J. Tremblay.** 1998. The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Mol.Cell Endocrinol.* 140:31-36.
16. **Elefanty, A. G., C. G. Begley, L. Hartley, B. Papaevangeliou, and L. Robb.** 1999. SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* 94:3754-3763.
17. **Elwood, N. J., H. Zogos, D. S. Pereira, J. E. Dick, and C. G. Begley.** 1998. Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood* 91:3756-3765.
18. **Ema, M., P. Faloon, W. J. Zhang, M. Hirashima, T. Reid, W. L. Stanford, S. Orkin, K. Choi, and J. Rossant.** 2003. Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev.* 17:380-393.
19. **George, K. M., M. W. Leonard, M. E. Roth, K. H. Lieu, D. Kioussis, F. Grosveld, and J. D. Engel.** 1994. Embryonic Expression and Cloning of the Murine Gata-3 Gene. *Development* 120:2673-2686.
20. **Gering, M., A. R. Rodaway, B. Gottgens, R. K. Patient, and A. R. Green.** 1998. The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J.* 17:4029-4045.
21. **Gottgens, B., L. M. Barton, J. G. Gilbert, A. J. Bench, M. J. Sanchez, S. Bahn, S. Mistry, D. Grafham, A. McMurray, M. Vaudin, E. Amaya, D. R. Bentley, and A. R. Green.** 2000. Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers [see comments]. *Nat.Biotechnol.* 18:181-186.

22. **Gottgens, B., C. Broccardo, M. J. Sanchez, S. Deveaux, G. Murphy, J. R. Gothert, E. Kotsopoulou, S. Kinston, L. Delaney, S. Piltz, L. M. Barton, K. Knezevic, W. N. Erber, C. G. Begley, J. Frampton, and A. R. Green.** 2004. The scl +18/19 Stem Cell Enhancer Is Not Required for Hematopoiesis: Identification of a 5' Bifunctional Hematopoietic-Endothelial Enhancer Bound by Fli-1 and Elf-1. *Mol. Cell Biol.* 24:1870-1883.
23. **Gottgens, B., J. G. R. Gilbert, L. M. Barton, D. Grafham, J. Rogers, D. R. Bentley, and A. R. Green.** 2001. Long-range comparison of human and mouse SCL loci: Localized regions of sensitivity to restriction endonucleases correspond precisely with peaks of conserved noncoding sequences. *Genome Research* 11:87-97.
24. **Gottgens, B., F. McLaughlin, E. O. Bockamp, J. L. Fordham, C. G. Begley, K. Kosmopoulos, A. G. Elefanty, and A. R. Green.** 1997. Transcription of the SCL gene in erythroid and CD34 positive primitive myeloid cells is controlled by a complex network of lineage-restricted chromatin-dependent and chromatin-independent regulatory elements. *Oncogene* 15:2419-2428.
25. **Gottgens, B., A. Nastos, S. Kinston, S. Piltz, E. C. Delabesse, M. Stanley, M. J. Sanchez, A. Ciau-Uitz, R. Patient, and A. R. Green.** 2002. Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J.* 21:3039-3050.
26. **Grutz, G. G., K. Bucher, I. Lavenir, T. Larson, R. Larson, and T. H. Rabbitts.** 1998. The oncogenic T cell LIM-protein Lmo2 forms part of a DNA-binding complex specifically in immature T cells. *EMBO J.* 17:4594-4605.

27. **Hall, M. A., D. J. Curtis, D. Metcalf, A. G. Elefanty, K. Sourris, L. Robb, J. R. Gothert, S. M. Jane, and C. G. Begley.** 2003. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:992-997.
28. **Hawley, R. G., F. H. Lieu, A. Z. Fong, and T. S. Hawley.** 1994. Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther.* 1:136-138.
29. **Herblot, S., P. D. Aplan, and T. Hoang.** 2002. A gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol.Cell Biol.* 22.
30. **Herblot, S., A.-M. Steff, P. Hugo, P. D. Aplan, and T. Hoang.** 2000. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation : inhibition of E2A-HEB function and pre-Ta chain expression. *Nat.Immunol.* 1:138-144.
31. **Hoang, T., E. Paradis, G. Brady, F. Billia, K. Nakahara, N. N. Iscove, and I. R. Kirsch.** 1996. Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* 87:102-111.
32. **Karunaratne, A., M. Hargrave, A. Poh, and T. Yamada.** 2002. GATA proteins identify a novel ventral interneuron subclass in the developing chick spinal cord. *Dev.Biol.* 249:30-43.
33. **Kornhauser, J. M., M. W. Leonard, M. Yamamoto, J. H. LaVail, K. E. Mayo, and J. D. Engel.** 1994. Temporal and spatial changes in GATA transcription factor expression are coincident with development of the chicken optic tectum. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 23:100-110.
34. **Krosi, J., N. Beslu, N. Mayotte, R. K. Humphries, and G. Sauvageau.** 2003. The competitive nature of HOXB4-transduced

HSC is limited by PBX1: The generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity* 18:561-571.

35. **Lahlil, R., E. Lecuyer, S. Herblot, and T. Hoang.** 2004. SCL assembles a multifactorial complex that determines glycoporphin A expression. *Molecular and Cellular Biology* 24:1439-1452.
36. **Lamolet, B., A. M. Pulichino, T. Lamonerie, Y. Gauthier, T. Brue, A. Enjalbert, and J. Drouin.** 2001. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104:849-859.
37. **Lecointe, N., O. Bernard, K. Naert, V. Joulin, C. J. Larsen, P. H. Romeo, and D. Mathieu-Mahul.** 1994. GATA-and SP1-binding sites are required for the full activity of the tissue-specific promoter of the tal-1 gene. *Oncogene* 9:2623-2632.
38. **Lecuyer, E., S. Herblot, M. Saint-Denis, R. Martin, C. G. Begley, C. Porcher, S. H. Orkin, and T. Hoang.** 2002. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* 100:2430-2440.
39. **Lecuyer, E. and T. Hoang.** 2004. SCL: From the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Experimental Hematology* 32:11-24.
40. **Leroy-Viard, K., M. A. Vinit, N. Lecointe, D. Mathieu-Mahul, and P. H. Romeo.** 1994. Distinct DNase-I hypersensitive sites are associated with TAL-1 transcription in erythroid and T-cell lines. *Blood* 84:3819-3827.
41. **Levantini, E., A. Giorgetti, F. Cerisoli, E. Traggiai, A. Guidi, R. Martin, D. Acampora, P. D. Aplan, G. Keller, A. Simeone, N. N. Iscove, T. Hoang, and M. C. Magli.** 2003. Unsuspected role of the

brain morphogenetic gene *Otx1* in hematopoiesis.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100:10299-10303.

42. **Markowitz, D., S. Goff, and A. Bank.** 1988. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167:400-406.
43. **Martin, R., R. Lahlil, A. Damert, L. Miquerol, A. Nagy, G. Keller, and T. Hoang.** 2004. SCL interacts with VEGF to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development* 131:693-702.
44. **Martinez-Morales, J. R., V. Dolez, I. Rodrigo, R. Zaccarini, L. Leconte, P. Bovolenta, and S. Saule.** 2003. OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *J.Biol.Chem.* 278:21721-21731.
45. **Matthews, J. M. and J. E. Visvader.** 2003. LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. *EMBO Rep.* 4:1132-1137.
46. **Mead, P. E., A. E. Deconinck, T. L. Huber, S. H. Orkin, and L. I. Zon.** 2001. Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development* 128:2301-2308.
47. **Mead, P. E., C. M. Kelley, P. S. Hahn, O. Piedad, and L. I. Zon.** 1998. SCL specifies hematopoietic mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* 125:2611-2620.
48. **Mikkola, H. K., J. Klintman, H. Yang, H. Hock, T. M. Schlaeger, Y. Fujiwara, and S. H. Orkin.** 2003. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/*tal-1* gene. *Nature* 421:547-551.

49. **Mochizuki, T., A. A. Karavanov, P. E. Curtiss, K. T. Ault, N. Sugimoto, T. Watabe, K. Shiokawa, M. Jamrich, K. W. Y. Cho, I. B. Dawid, and M. Taira.** 2000. Xlim-1 and LIM domain binding protein 1 cooperate with various transcription factors in the regulation of the goosecoid promoter. *Developmental Biology* 224:470-485.
50. **Nakano, T., T. Murata, I. Matsuo, and S. Aizawa.** 2000. OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3 beta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267:64-70.
51. **Nardelli, J., D. Thiesson, Y. Fujiwara, F. Y. Tsai, and S. H. Orkin.** 1999. Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev.Biol.* 210:305-321.
52. **Ory, D. S., B. A. Neugeboren, and R. C. Mulligan.** 1996. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:11400-11406.
53. **Pandolfi, P. P., M. E. Roth, A. Karis, M. W. Leonard, E. Dzierzak, F. G. Grosveld, J. D. Engel, and M. H. Lindenbaum.** 1995. Targeted Disruption of the Gata3 Gene Causes Severe Abnormalities in the Nervous-System and in Fetal Liver Hematopoiesis. *Nature Genetics* 11:40-44.
54. **Pata, I., M. Studer, J. H. van Doorninck, J. Briscoe, S. Kuuse, J. D. Engel, F. Grosveld, and A. Karis.** 1999. The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. *Development* 126:5523-5531.
55. **Perry, C. and H. Soreq.** 2002. Transcriptional regulation of erythropoiesis. Fine tuning of combinatorial multi-domain elements. *Eur.J.Biochem.* 269:3607-3618.

56. **Porcher, C., W. Swat, K. Rockwell, Y. Fujiwara, F. W. Alt, and S. H. Orkin.** 1996. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86:47-57.
57. **Poulin, G., M. Lebel, M. Chamberland, F. W. Paradis, and J. Drouin.** 2000. Specific protein-protein interaction between basic helix-loop-helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol.Cell Biol.* 20:4826-4837.
58. **Ramain, P., R. Khechumian, K. Khechumian, N. Arbogast, C. Ackermann, and P. Heitzler.** 2000. Interactions between chip and the achaete/scute-daughterless heterodimers are required for pannier-driven proneural patterning. *Mol.Cell* 6:781-790.
59. **Ravet, E., D. Reynaud, M. Titeux, B. Izac, S. Fichelson, P. H. Romeo, A. Dubart-Kupperschmitt, and F. Pflumio.** 2004. Characterization of DNA-binding-dependent and -independent functions of SCL/TAL1 during human erythropoiesis. *Blood* 103:3326-3335.
60. **Robb, L., N. J. Elwood, A. G. Elefanty, F. Kontgen, R. Li, L. D. Barnett, and C. G. Begley.** 1996. The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* 15:4123-4129.
61. **Robb, L., I. Lyons, R. Li, L. Hartley, F. Kontgen, R. P. Harvey, D. Metcalf, and C. G. Begley.** 1995. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:7075-7079.
62. **Sanchez, M., B. Gottgens, A. M. Sinclair, M. Stanley, C. G. Begley, S. Hunter, and A. R. Green.** 1999. An SCL 3' enhancer

targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors. *Development* 126:3891-3904.

63. **Sanchez, M. J., E. O. Bockamp, J. Miller, L. Gambardella, and A. R. Green.** 2001. Selective rescue of early haematopoietic progenitors in *Scl(-/-)* mice by expressing *Scl* under the control of a stem cell enhancer. *Development* 128:4815-4827.
64. **Shivdasani, R. A., E. L. Mayer, and S. H. Orkin.** 1995. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein *tal-1/SCL*. *Nature* 373:432-434.
65. **Sieweke, M. H. and T. Graf.** 1998. A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8:545-551.
66. **Sinclair, A. M., A. J. Bench, A. J. Bloor, J. Li, B. Gottgens, M. L. Stanley, J. Miller, S. Piltz, S. Hunter, E. P. Nacheva, M. J. Sanchez, and A. R. Green.** 2002. Rescue of the lethal *scl(-/-)* phenotype by the human *SCL* locus. *Blood* 99:3931-3938.
67. **Sinclair, A. M., B. Gottgens, L. M. Barton, M. L. Stanley, L. Pardanaud, M. Klaine, M. Gering, S. Bahn, M. Sanchez, A. J. Bench, J. L. Fordham, E. Bockamp, and A. R. Green.** 1999. Distinct 5' *SCL* enhancers direct transcription to developing brain, spinal cord, and endothelium: neural expression is mediated by GATA factor binding sites. *Dev.Biol.* 209:128-142.
68. **Smith, E., M. Hargrave, T. Yamada, C. G. Begley, and M. H. Little.** 2002. Coexpression of *SCL* and *GATA3* in the V2 interneurons of the developing mouse spinal cord. *Dev.Dyn.* 224:231-237.
69. **Tanigawa, T., N. Nicola, G. A. McArthur, A. Strasser, and C. G. Begley.** 1995. Differential regulation of macrophage differentiation in response to leukemia inhibitory factor/oncostatin-M/interleukin-6: the

effect of enforced expression of the SCL transcription factor. *Blood* 85:379-390.

70. **Torigoi, E., I. M. Bennani-Baiti, C. Rosen, K. Gonzalez, P. Morcillo, M. Ptashne, and D. Dorsett.** 2000. Chip interacts with diverse homeodomain proteins and potentiates bicoid activity in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:2686-2691.
71. **Tremblay, J. J., C. G. Goodyer, and J. Drouin.** 2000. Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinology* 71:277-286.
72. **Tremblay, J. J., C. Lanctot, and J. Drouin.** 1998. The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol.Endocrinol.* 12:428-441.
73. **Tremblay, M., S. Herblot, E. Lecuyer, and T. Hoang.** 2003. Regulation of pTalpha Gene Expression by a Dosage of E2A, HEB, and SCL. *J.Biol.Chem.* 278:12680-12687.
74. **Tsai, F. Y., G. Keller, F. C. Kuo, M. Weiss, J. Chen, M. Rosenblatt, F. W. Alt, and S. H. Orkin.** 1994. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371:221-226.
75. **Valtieri, M., A. Tocci, M. Gabbianelli, L. Luchetti, B. Masella, L. Vitelli, R. Botta, U. Testa, G. L. Condorelli, and C. Peschle.** 1998. Enforced TAL-1 expression stimulates primitive, erythroid and megakaryocytic progenitors but blocks the granulopoietic differentiation program. *Cancer Res.* 58:562-569.
76. **van Doorninck, J. H., W. J. van Der, A. Karis, E. Goedknecht, J. D. Engel, M. Coesmans, M. Rutteman, F. Grosveld, and C. I. De**

- Zeeuw.** 1999. GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei. *J.Neurosci.* 19:RC12.
77. **Van Eekelen, J. A. M., C. K. Bradley, J. R. Gothert, L. Robb, A. G. Elefanty, C. G. Begley, and A. R. Harvey.** 2003. Expression pattern of the stem cell leukaemia gene in the CNS of the embryonic and adult mouse. *Neuroscience* 122:421-436.
78. **Wadman, I. A., H. Osada, G. G. Grutz, A. D. Agulnick, H. Westphal, A. Forster, and T. H. Rabbitts.** 1997. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16:3145-3157.
79. **Yamamoto, S., H. Hikasa, H. Ono, and M. Taira.** 2003. Molecular link in the sequential induction of the Spemann organizer: direct activation of the cerberus gene by Xlim-1, Xotx2, Mix.1, and Siamois, immediately downstream from Nodal and Wnt signaling. *Developmental Biology* 257:190-204.
80. **Zhou, Y., M. Yamamoto, and J. D. Engel.** 2000. GATA2 is required for the generation of V2 interneurons. *Development* 127:3829-3838.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Otx1 and GATA-1 transcription factors cooperatively activate and bind to the exon 1a promoter of *Scf*. (A) Schematic representation of the *Scf* promoter of exon 1a (b.p. -720/+20) showing potential binding sites. Arrows indicate the position and orientation of primers used for ChIP assays. (B) Otx1 and Otx2 specifically cooperate with GATA-1 to transactivate the *Scf* promoter 1a. NIH 3T3 cells were cotransfected with the *Scf* promoter construct (b.p. -562/+7) (1 μ g) together with expression vectors encoding GATA-1 (0.1 μ g) and a member of the bicoid family: Otx1 (black bars), Otx2 (gray bars), Pitx1 (open bars) or Pitx2 (hatched bars) (0.1 to 3 μ g), as shown. The plus (+) and minus (-) signs indicate inclusion or omission of specific expression vectors in the transfection mixtures, respectively. Results are shown as luciferase activity relative to the empty pXPIII reporter. (C) Otx1 and GATA-1 specifically associate with the *Scf* promoter *in vivo*. Fragmented chromatin extracts from MEL HA-Otx1 cells were subjected to immunoprecipitation with α -GATA-1, α -HA or species-matched control antibodies. 5-fold dilutions of immunoprecipitated samples were used for amplification with specific primers for the *Scf* promoter or the *HPRT* promoter, as a negative control. Input chromatin served as a positive control for PCR amplifications and represents 0.4% of the amount used in each immunoprecipitation. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, transferred onto nylon membranes, and hybridized with an internal oligonucleotide. (D) Fold enrichment of HA (Otx1) and GATA-1 antibodies for SCL and HPRT promoter compared to the species-matched control antibodies.

Fig. 2. Activation of the *Scf* promoter by Otx1 and GATA-1 without direct binding of Otx1. (A) The -44/+7 region of the *Scf* exon 1a promoter is sufficient for an activation by Otx1 and GATA-1. The different *Scf* promoter

constructs, as shown, were transfected in NIH 3T3 cells in the absence (open bars) or presence (solid bars) of expression vectors encoding Otx1 (2 μ g) and GATA-1 (0.1 μ g). MEL cells were also electroporated with these *Scf* reporters (5 μ g). Results are shown as luciferase activity relative to the empty pXP3 vector and are representative of two independent experiments for each cell type. Luciferase reporter activities were normalized to that of an internal control (CMV- β gal). (B) Alignment of the *Scf* proximal promoter of exon 1a determined using clustal X (1.83) multiple sequence alignment and Sea view software. Asterisk marks sequences conserved across 8 species. The arrow indicates the transcriptional start site. (C) GATA-1 but not Otx1 binds to the -50/-20 region of the *Scf* promoter. EMSA experiments were done using two oligonucleotide probes derived from the *Scf* promoter sequence, one covering the -230 bicoid site (bicoid) and the other the proximal GATA site at -35 (SCL-50/-20), and *in vitro*-translated HA-Otx1 or GATA-1 indicated by plus signs (+). An unprogrammed reticulocyte lysate (lanes 1 and 3), indicated by minus signs (-), were included as a negative control for binding. Where indicated, antibodies (α -GATA-1 or α -HA-Otx1) or 100-fold molar excess of unlabelled wild type competitor (-50/-20 WT) or mutant -35 GATA site competitor (-50/-20 GM) was added to the samples before the addition of the labeled probe. Asterisk points to the binding of Otx1 on the bicoid probe; filled arrowhead points to the binding of GATA-1 on the SCL-50/-20 probe; open arrowhead points to supershifted GATA-1.

Fig. 3. Otx1 and GATA-1 physically interact *in vitro* and *in vivo*. (A) Otx1 binds to GATA-1 *in vitro*. Coimmunoprecipitations were performed using radiolabelled *in vitro* translated GATA-1 and HA-Otx1 proteins and α -GATA-1, α -HA or control α -c-myc antibodies. Input represents 10% of the mixture that was subjected to immunoprecipitation. (B) Pull-down assays were performed with immobilized GST or GST-GATA-1 and radiolabelled *in vitro* translated Otx1, or with immobilized MBP or MBP-Pitx1 and radiolabelled GATA-1. Inputs represent 10% of the amount used in each sample. For

panels A and B, bound proteins were resolved on 10% SDS-PAGE and visualized by PhosphorImaging. (C) GATA-1 interacts with Otx1 *in vivo*. Nuclear extracts from 293GPG cells expressing GATA-1 and HA-Otx1 were immunoprecipitated using α -HA (lanes 2 and 7), α -GATA-1 (M20, lane 4; N6, lane 9) and species-matched control antibodies: mouse IgG (m IgG), lanes 3 and 8, goat IgG (g IgG), lane 5 and rat IgG (r IgG), lane 10. Immunoprecipitated proteins were resolved on 10% SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and revealed by Western blotting with α -GATA-1 (M20) (top panel) and α -HA (lower panel) antibodies. Arrowheads point to specific bands and asterisks indicate immunoglobulin heavy chains. Input represent 10% (10 μ g) of nuclear extracts prior to immunoprecipitation. (D) GATA-1 interacts with Otx1 in hematopoietic cells. Cross-linked nuclear extracts (α GATA-1) and untreated nuclear extracts (α HA-Otx1) from MEL HA-Otx1 cells were subjected to coimmunoprecipitations as in Figure 3C.

Fig. 4. Mapping of Otx1 domains required for interaction and synergy with GATA-1. (A) The Otx1 homeodomain (HD) is necessary and sufficient for GATA-1 interaction. Full-length HA-Otx1 and deletion mutants are shown: a N-terminal deletion (Δ NT), a C-terminal deletion (Δ CT), the C-terminus (CT) and the homeodomain (HD). A description of each construct is given in Materials and Methods. Pull down assays were performed as in Figure 3B with immobilized GST or GST-GATA-1 and each of the radiolabelled HA-Otx1 constructs. Inputs represent 10% of the amount used in each sample. (B) The homeodomain, N-terminal and C-terminal domains of Otx1 are required for transcriptional synergy with GATA-1. Luciferase assays were performed in NIH 3T3 cells as in Figure 1C, using the $-44/+7$ *Scf* exon 1a promoter, 0.1 μ g of GATA-1 and increasing amounts of HA-Otx1 expression vectors. Data are shown for 2 μ g of HA-Otx1, expressed as fold activation by Otx1 and GATA-1. Histogram represents the average \pm s.d. of 4 independent experiments. (C) Otx1 deletion mutants are expressed at similar levels, with the exception of Δ CT. HA-Otx1 constructs were

transfected into NIH 3T3 cells along with an empty MSCV IRES GFP vector which served as an internal control. Nuclear extracts (10 μ g) were prepared 48 hours later and analyzed by Western blot using α -HA and α -GFP antibodies.

Fig. 5. Otx1 induces endogenous *Scf* expression. (A) E13.5 fetal liver cells were depleted of TER119⁺ differentiated erythroid cells and infected with full-length HA-Otx1, deletion mutants or an empty MSCV IRES GFP vector. GFP⁺ cells were isolated by flow cytometry 60 hours after the start of infection and analyzed by semi-quantitative RT-PCR for erythroid-specific genes *Scf*, *glycophorin A (GPA)*, *GATA-1* and *β globin major*, myeloid-specific genes *PU.1* and *CD11b*, and a precursor gene *c-kit*. *S16* served as a control for the amount of cDNA in each sample. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, transferred onto nylon membranes, hybridized with an internal oligonucleotide and exposed to a PhosphorImager screen. Note that the increase in *Scf* was observed in 3 independent experiments. (B) Histogram illustrates the relative levels of gene expression in cells infected with full length Otx1 and deletion mutants, expressed as a ratio over *S16*, compared to that of cells infected with an empty MSCV vector, which was taken as 1. Data was quantified using Imagequant software. (C) Western blot analysis of Otx1 deletion mutants expression in GP+E-86 packaging cell lines used to infect fetal liver cells. Nuclear extracts (10 μ g for all constructs with the exception of CT, 5 μ g) were prepared and analyzed using an anti-HA antibody. PTP ID phosphatase served as a loading control. The asterisk indicates the specific band at the predicted molecular weight of the Otx1 homeodomain (HD).

Fig. 6. Otx1 enhances erythroid and impedes myeloid differentiation. (A) E13.5 fetal liver cells, infected with Otx1 and deletion mutants as described in Fig. 5, were gated on GFP expression and analyzed for erythroid (TER119), myeloid (CD11b) and immature (c-kit) populations by flow

cytometry, 60 hours following the start of infection. Dead cells that stain with propidium iodide were excluded from the analysis. Shown is the percentage of cells in each quadrant. (B) Cytospin of GFP⁺ cells isolated by flow cytometry 60 hours after the start of infection and revealed by Wright-Giesma stain.

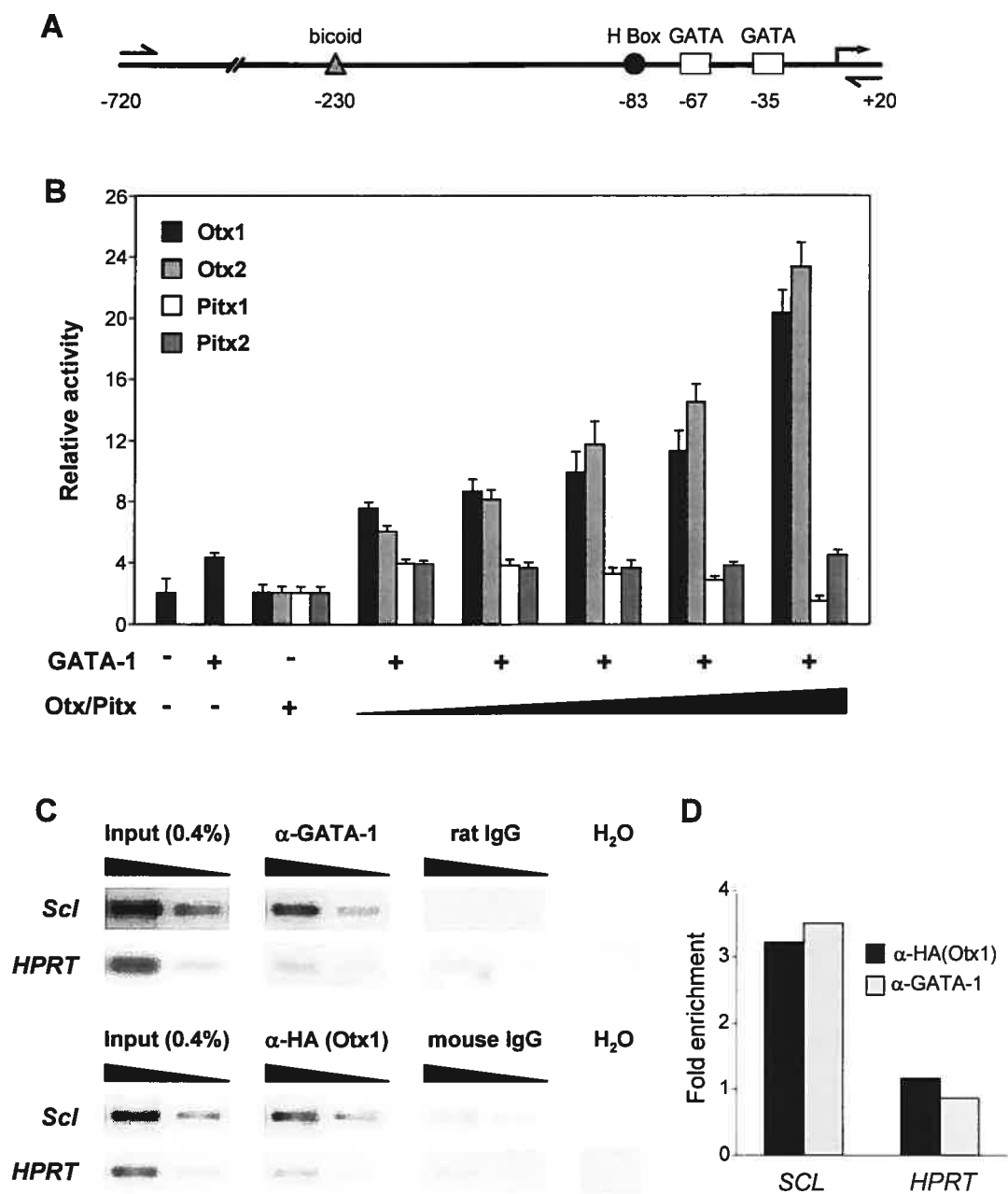


Figure 1

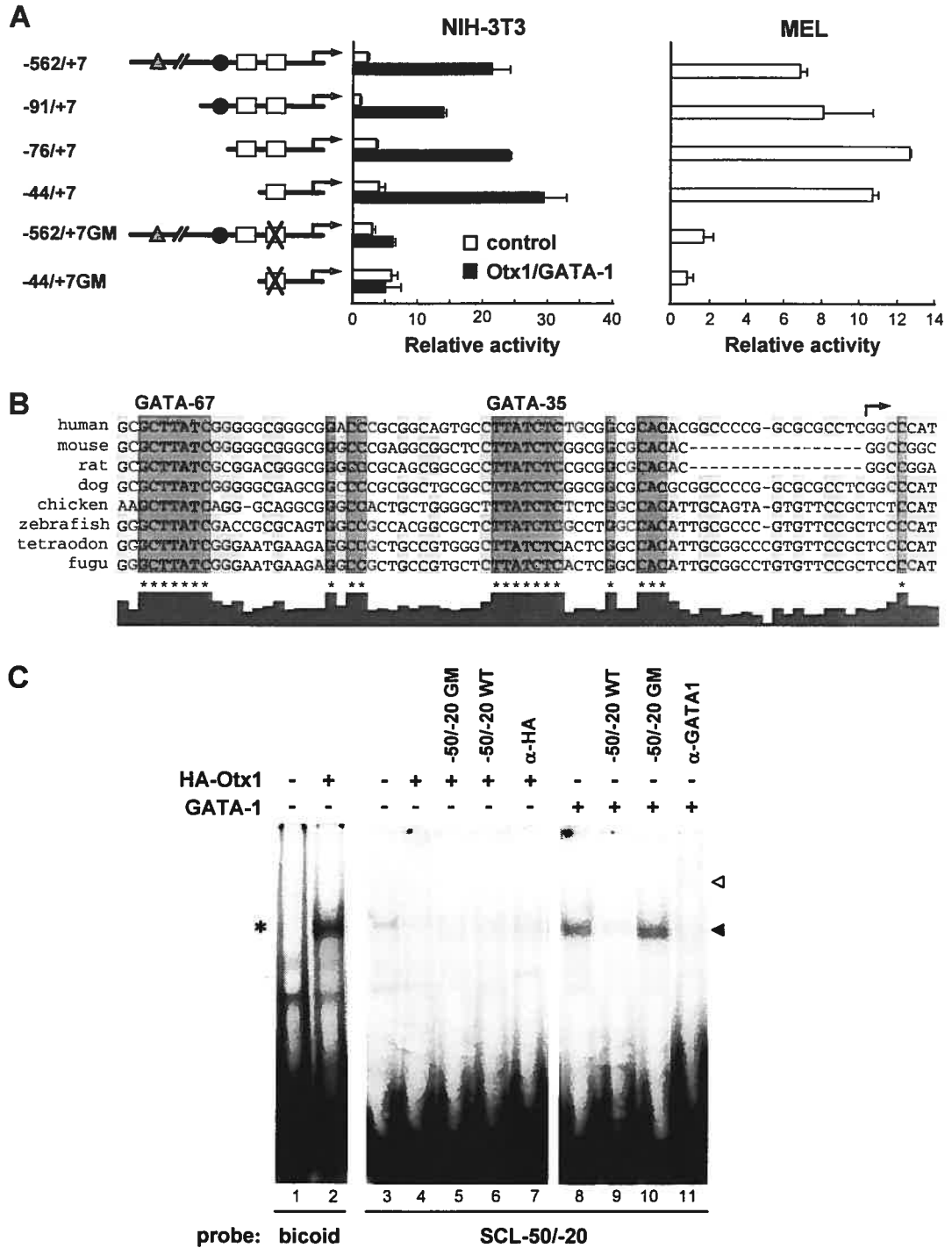


Figure 2

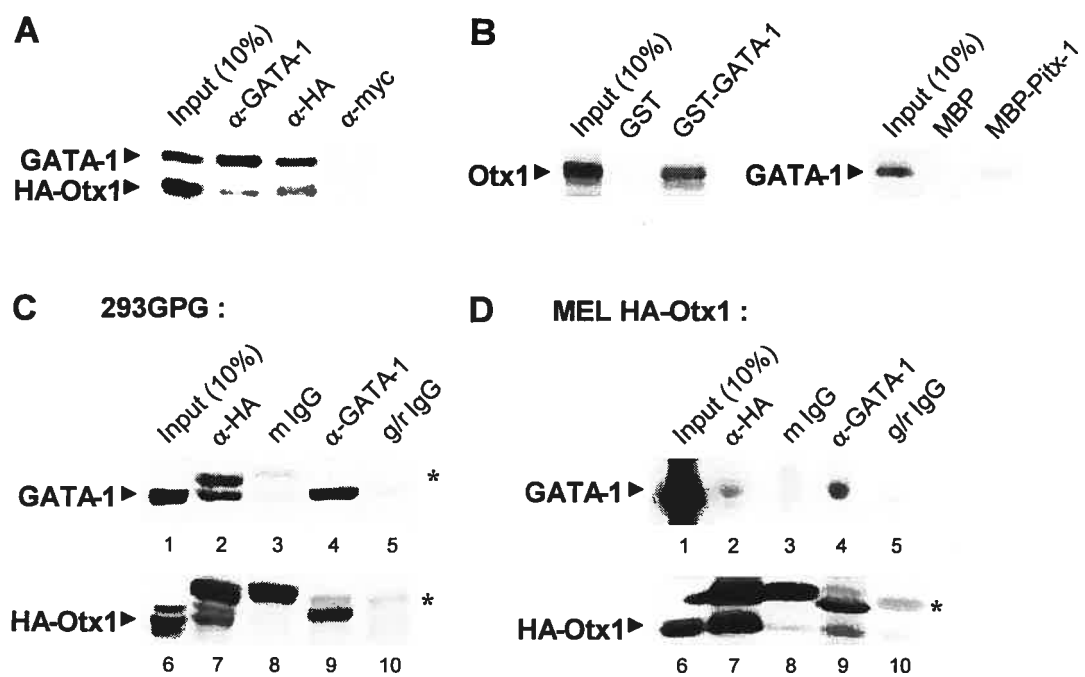
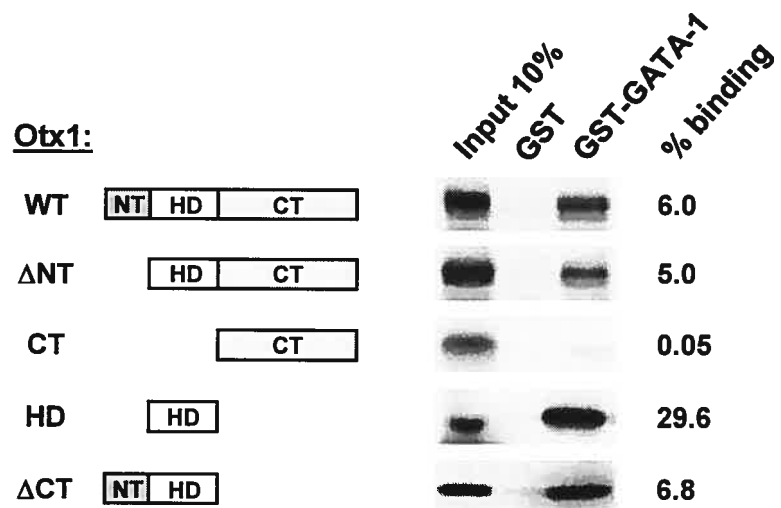
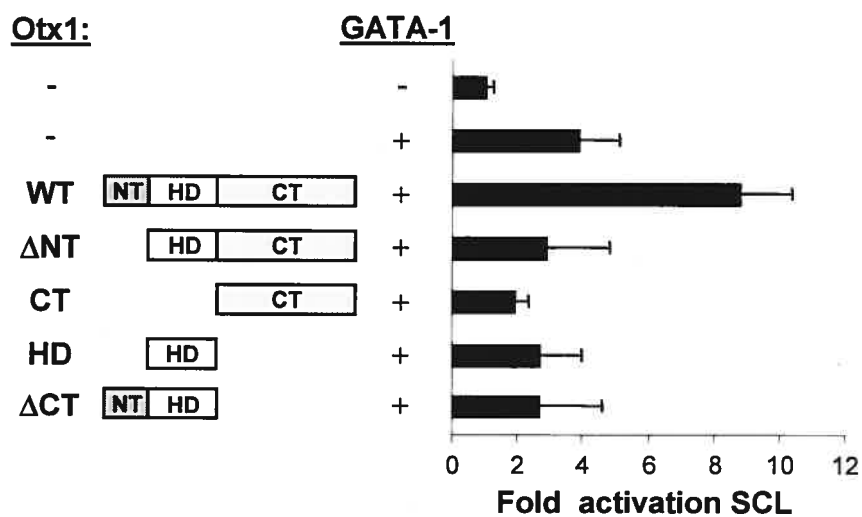
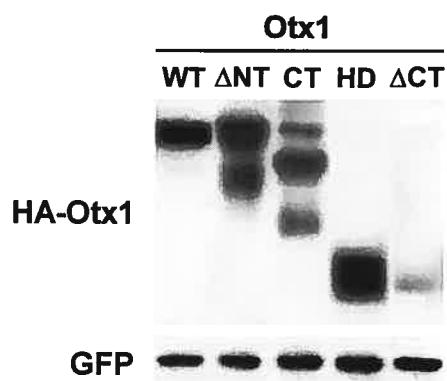
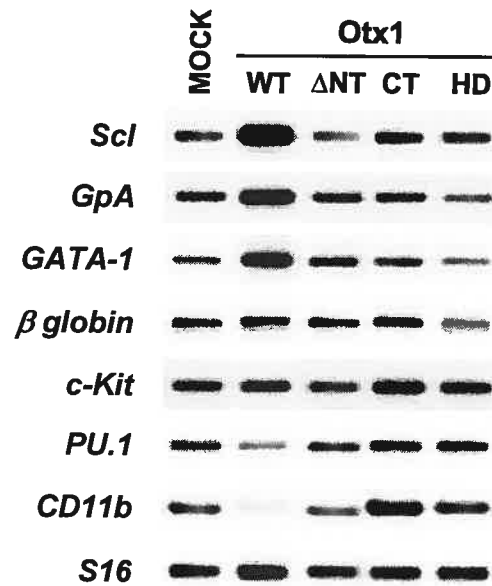
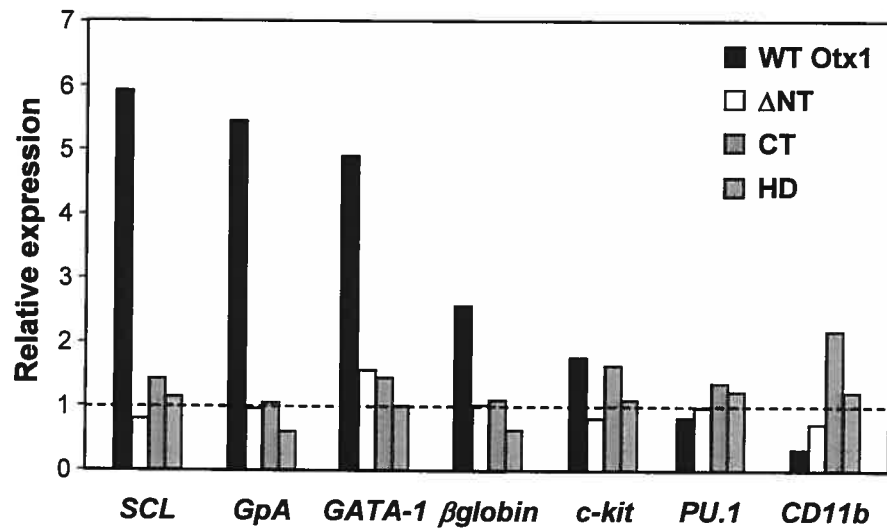
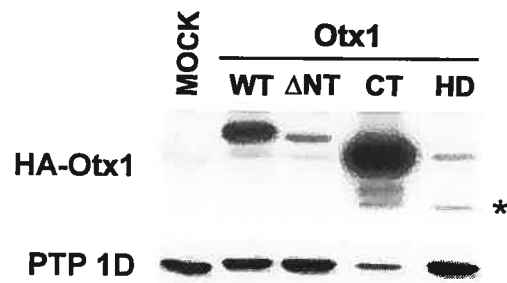


Figure 3

A**B****C****Figure 4**

A**B****C****Figure 5**

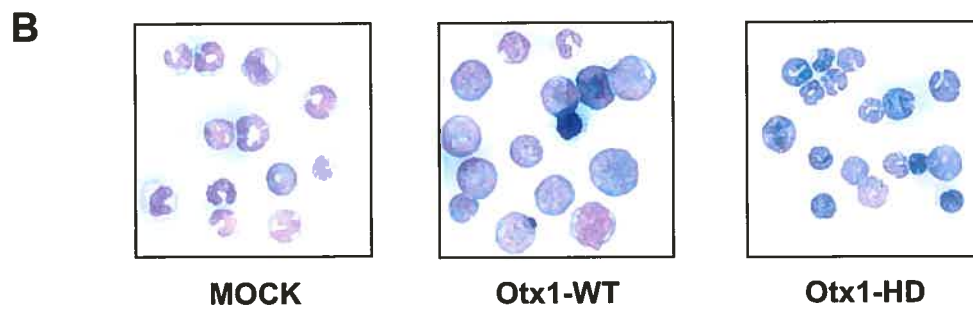
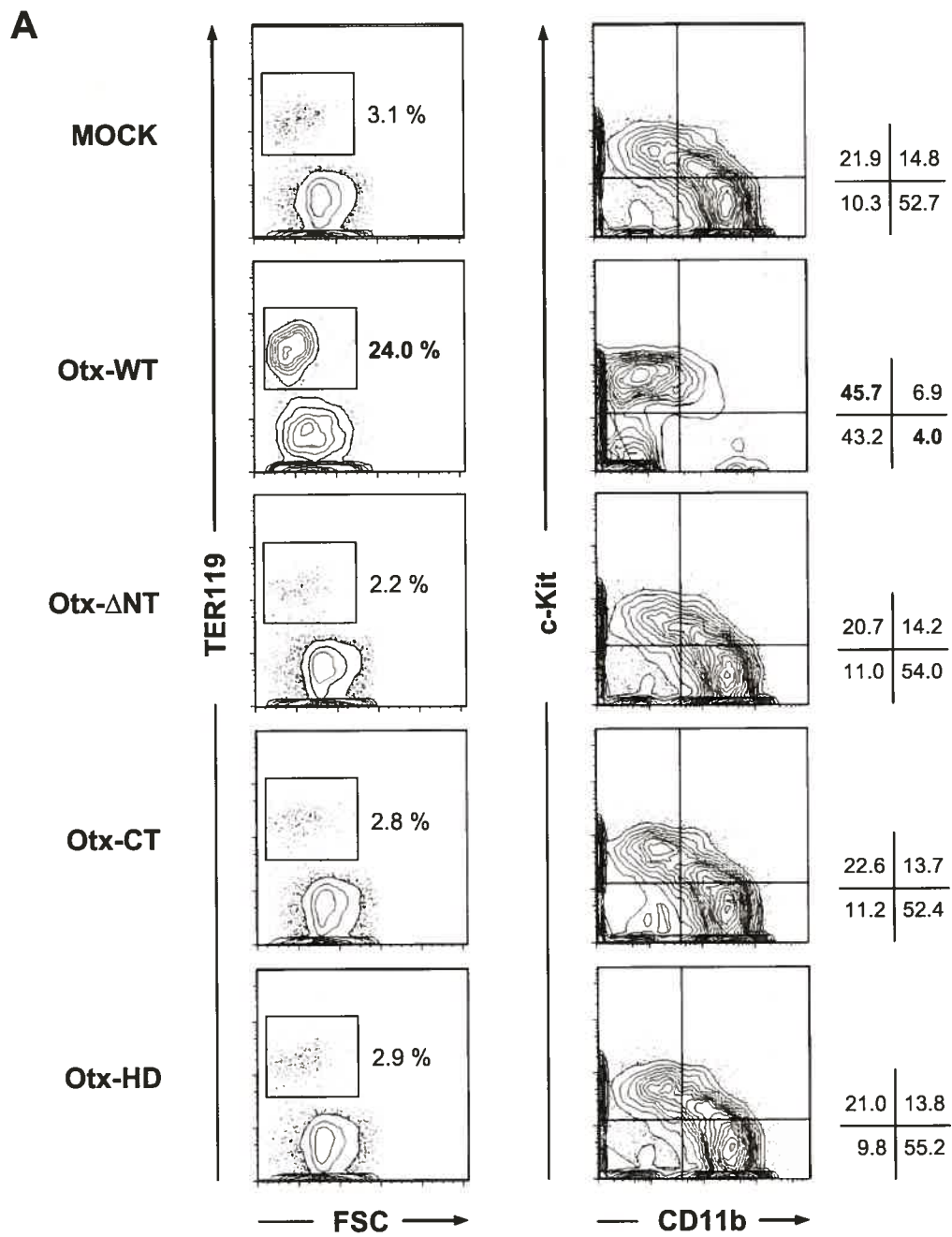


Figure 6

CHAPITRE 3

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

Malgré leur importance, les processus moléculaires qui contrôlent la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques ne sont toujours pas clairement définis. Parmi les régulateurs clés du développement hématopoïétique, on retrouve le facteur de transcription SCL. Son expression dans le système hématopoïétique est ciblée plus particulièrement dans les cellules souches, les progéniteurs multipotents et les lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire (Brady et al., 1995; Elefanty et al., 1999; Hoang et al., 1996; Pulford et al., 1995). Les études d'ablation génique de SCL ont révélé son rôle crucial dans l'établissement du système hématopoïétique, dans la formation de toutes les lignées hématopoïétiques et plus tardivement, dans la différenciation érythrocytaire et mégacaryocytaire (Porcher et al., 1999; Robb et al., 1996; Robb et al., 1995; Shivdasani et al., 1995; Hall et al., 2003; Mikkola et al., 2003). Étant donné son rôle clé dans l'hématopoïèse, il est capital de comprendre comment ce dernier est régulé.

Au cours de cette étude, nous suggérons que SCL est une cible directe d'Otx-1. Nos résultats supportent un modèle par lequel le complexe protéique formé par GATA-1 et Otx-1 lie le site GATA du promoteur proximal 1a de SCL. Cette interaction permet l'activation de l'expression de SCL et soutient la différenciation érythrocytaire durant l'hématopoïèse.

Cette étude est la première qui décrit un mécanisme de régulation qui implique un membre de la famille des facteurs de transcription à homéodomaine, Otx1, dans le système hématopoïétique.

Régulation transcriptionnelle de SCL

Étant donné le rôle déterminant de SCL à plusieurs niveaux dans la hiérarchie hématopoïétique, le contrôle de ce régulateur est particulièrement important à comprendre. Malgré les nombreuses études portant sur l'identification des éléments de régulation qui gouvernent l'expression de SCL, les mécanismes contrôlant sa transcription restent largement inconnus. Le gène SCL murin contient 7 exons distribués sur 20 Kb d'ADN et possède une structure intron/exon très similaire au gène humain. Deux promoteurs dans les exons alternatifs en 5' ont été identifiés dans les gènes humain et murin (Aplan et al., 1990; Begley et al., 1994; Bockamp et al., 1995; Bockamp et al., 1998; Bockamp et al., 1997; Lecointe et al., 1994), ainsi que 5 enhancers indépendants qui dirigent l'expression de SCL dans des domaines spécifiques (Sanchez et al., 1999; Sinclair et al., 1999; Gottgens et al., 2000). L'étude d'animaux transgéniques a permis d'identifier plusieurs éléments génétiques requis pour l'expression spécifique de SCL dans le compartiment hématopoïétique (Sanchez et al., 1999). Parmi ces éléments, on retrouve les promoteurs de l'exon 1a et 1b de SCL et deux enhancers; l'un en 3' (éléments +18/19 kb) et l'autre en 5' (éléments -3.8 kb) (Sanchez et al., 1999; Gottgens et al., 2004).

Ces deux enhancers dirigent l'expression de SCL dans l'endothélium et les progéniteurs hématopoïétiques. Par contre, des éléments de régulation supplémentaires semblent requis pour permettre l'expression de SCL dans les cellules érythrocytaires TER119+ primitives et définitives. Des analyses plus avancées ont montré que l'ablation génique des éléments de l'enhancer en 3' du locus SCL (+18/19 kb) n'altère pas l'expression endogène de SCL dans les cellules hématopoïétiques *in vivo*. De plus, la seule présence de cet enhancer comme élément de régulation n'est pas suffisante pour corriger le phénotype létal des embryons SCL^{-/-} suggérant soit qu'il n'est pas requis pour l'expression de SCL, soit qu'il est redondant avec d'autres éléments, tel que l'enhancer en 5' (-3.8 kb) (Sanchez et al., 1999; Gottgens et al., 2004). Ces deux enhancers semblent donc avoir des activités complémentaires pour diriger l'expression de SCL dans les

progéniteurs hématopoïétiques. Ils ne sont cependant pas suffisants pour diriger l'expression de SCL dans les cellules érythrocytaires en différenciation. Ceci suggère la présence d'éléments de régulation supplémentaires qui seraient requis pour la régulation de SCL dans les cellules hématopoïétiques en différenciation.

Parmi les éléments de régulation nécessaires pour l'expression spécifique de SCL dans le compartiment hématopoïétique, on retrouve les promoteurs de l'exon 1a et 1b (Sanchez et al., 1999). En transactivation transitoire, le promoteur de l'exon 1a est activé spécifiquement dans les cellules érythrocytaires et mastocytaires. Il est régulé principalement par le facteur de transcription GATA-1 (Aplan et al., 1990; Bockamp et al., 1995; Lecointe et al., 1994; Bockamp et al., 1998). Le promoteur de l'exon 1b, quant à lui, est activé dans les lignées mastocytaires, myéloïdes et les cellules T. Malgré cette activité spécifique en transfection transitoire, leur intégration dans la chromatine entraîne la suppression de l'activité du promoteur de l'exon 1a dans la lignée érythrocytaire ainsi que de celle du promoteur de l'exon 1b dans les lignées myéloïdes primitives (Bockamp et al., 1997). Ceci suggère l'existence d'éléments de régulation supplémentaires qui viennent contrer l'effet répressif de la chromatine. L'enhancer en 3' (+17/18 kb) du locus SCL semble agir comme un enhancer érythrocytaire puisqu'il augmente de 30 fois l'activité du promoteur de l'exon 1a en transfection stable dans les cellules érythrocytaires. De plus, l'analyse de la séquence de cet enhancer a montré la présence de plusieurs sites GATA. Cet enhancer pourrait donc être activé par GATA-1 dans les cellules érythrocytaires (Gottgens et al., 1997). Cependant, *in vivo* cet élément de régulation en lui-même n'est pas suffisant pour diriger l'expression de SCL dans ces cellules (Sanchez, 1999). Ainsi, le promoteur de l'exon 1a est jusqu'à présent le seul élément de régulation connu pour l'expression de SCL dans les cellules érythrocytaires.

L'étude de SCL dans le système nerveux central a aussi permis de montrer l'importance du promoteur de l'exon 1a comme région de régulation *in vivo*. Ces études de transgénèse ont indiqué que le promoteur de l'exon 1a est nécessaire et suffisant pour diriger l'expression de SCL dans le mésencéphale et le diencéphale de l'embryon en développement. De plus, la mutation du site GATA situé à 35 pb en amont du site d'initiation de la transcription abolit son expression dans le système nerveux central. En revanche, la mutation du site localisé à -67 pb n'affecte pas son expression normale dans la région postérieure du cerveau (Sinclair et al., 1999).

Ces nombreuses études démontrent le rôle essentiel du promoteur de l'exon 1a comme région de régulation au niveau du système hématopoïétique et du système nerveux central. De plus, ces données suggèrent aussi fortement que les facteurs GATA régulent l'expression de SCL dans ces compartiments. Par contre, l'indispensabilité du site GATA à -35 pb n'a pas encore été testée *in vivo* dans les cellules érythrocytaires.

De tous les éléments de régulation connus, le promoteur de l'exon 1a est la seule région qui est hautement conservée à travers 5 espèces (Gottgens et al., 2000; Gottgens et al., 2002). Cette homologie ainsi que l'importance de cette région de régulation, nous a amené à analyser les mécanismes moléculaires responsables de l'expression de SCL dans les cellules érythrocytaires. Nos résultats ont montré que SCL est une cible transcriptionnelle d'Otx-1 et de GATA-1. En effet, ceux-ci collaborent pour transactiver le promoteur SCL de l'exon 1a.

L'analyse des séquences du promoteur 1a à travers les espèces, des mammifères au poisson zèbre, a révélé une région de très grande homologie sur une distance de 170 pb en amont du site d'initiation de l'exon 1a. On y retrouve un site AP-1 (-101 pb), deux sites GATA (-35 et -67 pb) et deux séquences conservées CS1 et CS2 dont une contient une boîte HBOX (Gottgens et al., 2002). De plus, l'analyse de la séquence du promoteur 1a humain a permis d'identifier la présence d'un site SP1 (-61

pb) qui est également conservé chez la souris ainsi qu'un site bicoïde pouvant être potentiellement lié par des facteurs de transcription à homéodomaine, lequel n'est pas conservé chez la souris.

Pour identifier les motifs impliqués dans le mécanisme de coopération entre Otx1 et GATA-1, une série de délétion du promoteur humain de l'exon 1a a été effectuée. Nous avons également confirmé la capacité de GATA-1 à activer ce promoteur (Aplan et al., 1992b; Bockamp et al., 1995; Lecointe et al., 1994). Il est intéressant de remarquer que la délétion séquentielle des différents sites identifiés à l'exception du site GATA à -35 pb n'empêche pas la capacité d'Otx-1 à collaborer avec GATA-1 dans les cellules de fibroblastes. Des résultats similaires sont observés dans une lignée de cellules érythrocytaires MEL (Mouse ErythroLeukemia C88) montrant que seule la région comprenant le site GATA à -35 pb est aussi nécessaire à l'activité optimale du promoteur. Certains de ces motifs avaient précédemment été étudiés dans les cellules érythrocytaires (MEL F4N). Dans ce contexte, les sites AP-1, SP1 et GATA à -67 pb ne sont pas individuellement nécessaires pour l'activité du promoteur (Bockamp et al., 1995). Cependant, les sites SP1 et GATA à -67 pb semblent contribuer faiblement à l'activité du promoteur dans d'autres types de cellules érythrocytaires telles que les cellules K562 (Lecointe et al., 1994) et J2E (Bockamp et al., 1997). En accord avec nos résultats, ces différentes études démontrent sans ambiguïté que le site GATA à -35 pb est indispensable à l'activité complète du promoteur SCL 1a dans toutes les lignées érythrocytaires étudiées (Lecointe et al., 1994; Bockamp et al., 1995; Bockamp et al., 1997).

Ces données sont en accord avec les études de souris transgéniques énoncées précédemment, où le site GATA à -35 pb et non celui à -67 pb est critique pour l'expression de SCL dans le système nerveux central (Bockamp et al., 1995; Bockamp et al., 1997). Une étude chez le poulet démontre l'importance fonctionnelle d'un site GATA à -30 pb sur le promoteur du gène de la β globine, lequel ne contient pas de boîte

TATA, à l'instar de SCL. La liaison de GATA-1 permet alors de recruter des protéines de liaison TBP et du complexe d'initiation de la transcription. Ces résultats suggèrent que GATA-1 pourrait agir comme facteur de recrutement de la machinerie basale de transcription en absence de boîte TATA (Barton et al., 1993).

La région minimale de régulation que nous avons identifiée est quelque peu différente de celle observées par d'autres. Nos résultats dans les cellules NIH 3T3 et les cellules érythrocytaires MEL (C88) indiquent une région minimale qui se situe entre -44/+7 de l'exon 1a. D'autres études ont montré une région minimale de régulation de -187/+26 dans les cellules MEL (F4N) (Bockamp et al., 1995) et les cellules J2E (Bockamp et al., 1997) et de -122/+1 dans les cellules K562 (Lecoïnte et al., 1994). Cette différence en ce qui a trait à la région minimale de régulation dans les différentes lignées érythrocytaires pourrait refléter certaines variabilités dans le stade de différenciation et donc conséquemment impliquer des variations au niveau de l'expression des facteurs de transcription (Bockamp et al., 1997).

Notre étude a permis d'identifier une région minimale de régulation plus restreinte sur le promoteur de l'exon 1a, et démontre l'importance du site GATA à -35 pb. De plus, l'utilisation de cette région promotrice a permis de mieux caractériser le complexe transcriptionnel formé sur le promoteur.

Complexes transcriptionnels

Notre étude démontre un nouveau mécanisme de régulation impliquant Otx-1 comme régulateur transcriptionnel du promoteur de l'exon 1a et comme co-facteur de GATA-1. En effet, Otx-1 collabore avec GATA-1 pour activer le promoteur de façon dose dépendante, via une interaction directe avec ce dernier au site GATA à -35 pb. Nous avons montré qu'Otx-1 et GATA-1 sont physiquement associés au promoteur SCL dans les cellules érythrocytaires mais que seulement GATA-1 semble directement lier l'ADN.

Nous avons confirmé la capacité de GATA-1 à s'associer au motif GATA situé -35 pb (Aplan et al., 1992b; Bockamp et al., 1995; Lecointe et al., 1994). Contrairement à GATA-1, Otx-1 ne lie pas la région minimale -44/+7, ce qui est consistant avec l'absence de séquences connues pour la liaison de protéines à homéodomaine dans cette région. Ceci suggère un mécanisme par lequel la liaison de GATA-1 au site GATA à -35 pb pourrait amener Otx-1 à cette région minimale pour ensuite activer le promoteur. Nous avons consolidé notre modèle en montrant par différentes méthodes qu'Otx-1 et GATA-1 interagissaient directement. L'utilisation des différents domaines d'Otx-1 (Δ NT, Δ CT, CT et HD) en chromatographie d'affinité démontre que l'homéodomaine d'Otx-1 est nécessaire et suffisant pour médier l'interaction avec GATA-1. Par contre, l'intégrité de la protéine Otx-1 est requise pour conserver la synergie transcriptionnelle entre Otx-1 et GATA-1.

Le mécanisme que nous suggérons dans cette étude implique l'activation du promoteur SCL suite à la liaison du complexe GATA-1/Otx-1 sur le site GATA à -35 pb sans liaison directe d'Otx-1 sur le promoteur. Deux résultats renforcent l'idée que la liaison directe d'Otx-1 sur le promoteur n'est pas essentielle à l'activation de celui-ci. Premièrement, Otx-1 ne lie pas la région minimale de régulation -44/+7 *in vitro*. Deuxièmement, les deux sites potentiels pour la liaison d'une protéine à homéodomaine, soit le site bicoïde (-230) et Hbox (-83), ne semblent pas nécessaires à la synergie transcriptionnelle d'Otx-1 et GATA-1 en transactivation transitoire. Pour vérifier si Otx-1 se retrouve en complexe avec GATA-1 sur le site GATA à -35 pb, nous avons effectué des essais de retard de mobilité sur gel avec des extraits nucléaires de cellules érythrocytaires MEL sur-exprimant de façon stable HA-Otx-1 et de cellules hétérologues 293GPG sur-exprimant les protéines HA-Otx-1 et GATA-1 (données non-publiées). Dans les deux cas, les expériences de déplacement du complexe avec l'anticorps HA-Otx-1 se sont avérées négatives. L'instabilité du complexe protéique GATA-1/HA-Otx-1 durant l'électrophorèse est une cause possible

de l'absence d'HA-Otx-1 dans les complexes observés en retard de mobilité sur gel.

Cependant, nous avons confirmé par immunoprécipitation de la chromatine que GATA-1 et Otx-1 se retrouvent sur le promoteur *in vivo*. Par contre, la quantité de chromatine immunoprécipitée est légèrement plus faible pour Otx-1 lorsque comparée à GATA-1. Cette observation est compatible avec notre modèle qui suggère que la liaison d'Otx-1 à l'ADN n'est pas directe mais bien dépendante de son interaction avec GATA-1. Nous ne pouvons cependant pas rejeter la possibilité qu'Otx-1 puisse s'associer à une autre région sur le promoteur *in vivo*. En effet, Otx-1 peut aussi se lier *in vitro* au site bicoïde localisé à -230 pb du promoteur SCL. Cependant, la liaison d'Otx-1 à ce site ne semble pas essentielle à l'activation de SCL puisqu'en son absence, le promoteur est toujours actif. De plus, Otx-1 ne peut pas activer le promoteur seul. Ceci renforce l'idée que la liaison directe d'Otx-1 à l'ADN n'est pas suffisante et qu'il doit s'associer à GATA-1 pour activer le promoteur.

Plusieurs études impliquant des membres des sous-familles Otx et Pitx montrent que, même en présence d'une interaction avec un autre facteur de transcription, l'activation transcriptionnelle requiert leur liaison à un site bicoïde par l'homéodomaine (Mochizuki et al., 2000; Knoepfler et al., 1999; Torigoi et al., 2000; Yamamoto et al., 2003; Nakano et al., 2000; Martinez-Morales et al., 2003; Bach et al., 1997; Poulin et al., 2000; Tremblay et al., 2000; Tremblay et al., 1998; Lamolet et al., 2001). Dans les cellules hypophysaires, l'activité du promoteur de la Pro-Opiomelanocortine (POMC) dépend de l'interaction physique entre Pitx-1 et l'hétérodimère NeuroD1/E2A. Ces deux protéines lient respectivement un site bicoïde et une boîte E sur le promoteur (Poulin et al., 2000). Curieusement, cette collaboration peut être reproduite en utilisant des boîte E en tandem, mais pas un multimère de sites bicoïdes. Ces résultats démontrent que Pitx-1 peut aussi fonctionner indépendamment de sa liaison directe à l'ADN, ce qui supporte notre mécanisme.

Un autre point important est la spécificité de la collaboration entre les membres de la famille Otx et GATA-1. En effet, on observe qu'Otx-2, tout comme Otx-1, peut activer le promoteur en présence de GATA-1 mais que deux autres membres de la famille bicoïde, Pitx-1 et Pitx-2, en sont incapables. Bien que les membres de la sous-famille Pitx aient une spécificité de liaison à l'ADN *in vitro* semblable aux membres de la famille Otx, leur activité transcriptionnelle est bien différente (Drouin et al., 1998). Leur spécificité d'action semble dictée par leur interaction spécifique avec des co-facteurs. En chromatographie d'affinité, l'affinité de GATA-1 pour Pitx-1 est pratiquement imperceptible tandis qu'une grande spécificité d'interaction entre GATA-1 et Otx-1 est observée. La pertinence de cette interaction a été démontrée *in vivo* dans des cellules 293GPG sur-exprimant HA-Otx-1 et GATA-1. Des résultats similaires ont été observés dans les cellules érythrocytaires MEL qui sur-expriment HA-Otx-1 de façon stable. Ces différentes études démontrent donc l'importance fonctionnelle de la liaison entre GATA-1 et Otx1 dans notre modèle cellulaire où le promoteur est actif transcriptionnellement.

L'interaction entre Otx-1 et GATA-1 est médiée par l'homéodomaine d'Otx-1 qui est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec GATA-1. D'autres études impliquant des protéines à homéodomaine montrent aussi un rôle pour ce domaine comme domaine d'interaction protéique (Poulin et al., 2000; Durocher et al., 1997; Planque et al., 2001; Knoepfler et al., 1999; Ohneda et al., 2000). En effet, c'est aussi la région de l'homéodomaine de Pitx-1 qui est impliquée dans l'interaction avec E2A (Poulin et al., 2000). Une autre étude qui implique une protéine à homéodomaine, Nkx2-5 ainsi que la protéine à doigts de zinc GATA-4, montre que celles-ci interagissent directement via l'homéodomaine et le domaine C-terminal de Nkx2-5 pour activer le promoteur de l'ANF (Durocher et al., 1997). Cette étude sur les facteurs de transcription cardiaques représente un bon exemple d'interaction entre une protéine à homéodomaine et une protéine à doigts de zinc. Par contre, la liaison à l'ADN par les deux facteurs est nécessaire.

Dans notre cas, la liaison à l'ADN n'est pas requise et tous les domaines d'Otx-1 sont nécessaires pour activer complètement le promoteur SCL. Bien que l'interaction avec GATA-1 via l'homéodomaine soit essentielle, celle-ci n'est pas suffisante. Ceci suggère que l'intégrité de la protéine Otx-1 est requise pour l'activation du promoteur.

Il serait aussi intéressant de mieux caractériser la spécificité de l'interaction en ce qui concerne le facteur GATA-1. Par l'utilisation des différents domaines de GATA-1 (Δ NT, Δ CT, Δ CF et Δ NF) en chromatographie d'affinité, il serait possible de définir le ou les domaines d'interaction de GATA-1 avec Otx-1. Jusqu'à présent, il a été montré que le doigt de zinc en C-terminal (Δ CF) est important pour les interactions physiques avec d'autres facteurs de transcription comme Sp1 et PU.1 (Merika et Orkin, 1995). En ce qui concerne le doigt de zinc en N-terminal (Δ NF), celui-ci interagit directement avec le co-facteur transcriptionnel de GATA-1 appelé Friend of GATA -1 (FOG-1) (Fox et al., 1999). Il serait donc important de définir si ces mêmes domaines sont impliqués pour son interaction avec Otx-1.

L'étude des protéines Otx chez les oursins de mer a permis de trouver des domaines de transactivation dans les régions carboxy-terminale et amino-terminale (Mao et al., 1996; Chuang et al., 1996). Ces résultats suggèrent que les domaines amino- et carboxy-terminaux d'Otx-1 sont essentiels pour le recrutement du complexe d'initiation de la transcription dans les cellules érythrocytaires. Otx-1 pourrait possiblement médier, directement ou indirectement, des interactions protéiques avec la machinerie transcriptionnelle de base et des co-facteurs reliant des enhancers distants via la formation de complexes.

Les homéoprotéines sont connues pour fonctionner via la dimérisation de leur homéodomaine, avec des membres relativement proches ou alors par association avec d'autres facteurs de transcription (Lee et al., 1998; Zhang et al., 1997; Kakizawa et al., 1999; Mann and Affolter, 1998; Budhram-Mahadeo et al., 1998; Mailhos et al., 1998;

Zappavigna et al., 1994). Par exemple, Otx-2 interagit directement avec les membres de la famille LIM et Ldb pour activer la transcription de gènes cibles (Nakano et al., 2000; Yamamoto et al., 2003; Mochizuki et al., 2000). Parmi ces classes de protéines, on retrouve Ldb-1 et LMO2 qui sont exprimées dans les cellules érythrocytaires. Elles font parties d'un complexe transcriptionnel qui inclut SCL, E2A, GATA-1 et/ou GATA-2 pour permettre l'expression de la Glycophorine A (GpA) et du récepteur c-kit (Lecuyer et al., 2002; Lahlil et al., 2003). Dans ce complexe, l'interaction physique entre Ldb-1 et GATA-1 est requise pour l'activation du promoteur GpA dans les cellules érythrocytaires (Lahlil et al., 2003). Le fait que l'interaction de Ldb-1 dans plusieurs processus biologiques soit requise avec des membres de la famille bicoïde (Bach et al., 1997 ; Torigoi et al., 2000) et GATA-1 (Romain et al., 2000) amène la possibilité que Ldb-1 puisse être impliqué dans l'activation de SCL par GATA-1 et Otx-1. Ldb-1 étant une protéine qui joue un rôle d'adaptateur protéique ubiquitaire (Matthews et Visvader, 2003), elle pourrait servir de pont moléculaire entre des complexes associés au promoteur de l'exon 1a et des enhancers distants en formant une boucle avec l'ADN. Ldb-1 et LMO2 sont donc des candidats qui pourraient fort bien se retrouver au sein du complexe GATA-1/Otx-1. Cependant, ni Otx-1 ou Otx-2 ne semblent moduler l'activité du complexe SCL, lequel inclut GATA-1, Ldb-1 et LMO2 (Lecuyer et al., 2002, observations non publiées). Ces données suggèrent l'existence d'une hiérarchie transcriptionnelle plaçant Otx-1 en amont de SCL pour que ce dernier induise ses gènes cibles érythrocytaires. Le facteur GATA-1 se retrouve à plusieurs niveaux de cette hiérarchie et joue un rôle crucial comme partenaire à la fois d'Otx-1 et du complexe SCL.

Les cibles moléculaires d'Otx-1 et Otx-2

Contrairement à Otx-2, les analyses moléculaires concernant Otx-1 sont presque inexistantes. Seulement quelques études ont montré le rôle

transcriptionnel d'Otx-1. Ce dernier, tout comme Pitx-1, semble avoir un rôle dans la régulation des gènes des hormones hypophysaires. Ils incluent ceux de l'hormone de stimulation du follicule (β FSH), de l'hormone de lutéinisation (β LH) et de la sous-unité de la glycoprotéine alpha (α GSU), dont les séquences de régulation contiennent tous un site bicoïde (Acampora et al., 1998).

Plusieurs gènes cibles ont été identifiés comme étant activés ou réprimés par Otx-2. Ceux-ci se retrouvent dans 6 catégories : des protéines de liaison à l'actine et à la myosine, des molécules d'adhésion à la matrice extracellulaire, des protéases et des inhibiteurs de protéases, des protéines de liaison à l'ARN, des facteurs de transcription (le gène clock) et des protéines de sécrétion (GnRH, Lefty1, XAG, Mdkk1, Wnt5) (Boncinelli et Morgan, 2001; Finkelstein et Boncinelli, 1994; Simeone, 1998; Klein et Li, 1999; Morgan et al., 1999). De plus, pour le gène GnRH (gonadotropin-releasing hormone), l'activation de son promoteur est dépendante de la présence du site bicoïde (Kelley et al., 2000).

Otx-2 semble aussi avoir un rôle transcriptionnel dans les cellules RPE (retina pigment epithelium). En effet, Otx-2 se lie spécifiquement à un motif bicoïde qui est présent dans les régions promotrices de trois gènes cibles du facteur de transcription Mitf; QNR71 (melanosome glycoprotein), TRP-1 (tyrosinase-related proteins) et Tyr (melanogenic enzyme tyrosinase). Leur liaison à l'ADN ainsi que l'interaction entre Otx-2 et Mitf résulte en une activation coopérative de ces promoteurs (Martinez-Morales et al., 2003).

Avant notre étude, aucun gène cible des facteurs Otx n'avait été identifié dans le système hématopoïétique. Nous avons défini SCL comme un nouveau gène cible d'Otx-1 dans les cellules érythrocytaires. Contrairement aux mécanismes conventionnels qui impliquent une liaison à l'ADN par une protéine à homéodomaine, nous suggérons qu'Otx-1 active la transcription en absence de liaison directe à l'ADN. Cette activité se fait

plutôt par une interaction avec une protéine à doigts de zinc, qui elle s'associe directement à l'ADN.

Rôles d'Otx-1 dans l'hématopoïèse

Nous avons démontré précédemment une nouvelle fonction d'Otx-1 dans le système hématopoïétique. L'absence d'Otx-1 chez la souris cause une anémie sévère qui peut être corrigée par un gain de fonction de SCL (Levantini et al., 2003). Nos résultats nous ont amené à définir un mécanisme moléculaire par lequel SCL serait une cible directe d'Otx-1. Pour confirmer notre hypothèse, nous avons effectué un gain de fonction d'Otx-1 *in vivo* dans des précurseurs hématopoïétiques. Ainsi, l'analyse de l'expression de gènes hématopoïétiques par RT-PCR a révélé entre autre, une augmentation du niveau de SCL de six fois en présence d'Otx-1. Cette augmentation dans les cellules hématopoïétiques, renforce l'idée que SCL est une cible directe d'Otx-1. Otx-1 augmente de 5 fois l'expression de d'autres gènes érythrocytaires comme GATA-1 et la Glycophorine A. Par contre, l'expression du gène myéloïde CD11b est nettement diminuée en présence d'Otx-1.

L'analyse des populations cellulaires par cytométrie en flux confirme les effets observés par expression génique. En effet, nous observons une augmentation des cellules érythrocytaires TER 119⁺. De plus, le nombre de cellules exprimant le marqueur myéloïde CD11b diminue drastiquement. Ainsi, un gain de fonction d'Otx-1 favorise la lignée érythrocytaire au détriment de la lignée myéloïde. À l'inverse, une perte de fonction d'Otx-1 est associée avec une augmentation des niveaux de G-CSFR, un gène spécifique à la lignée granulocytaire, causant une augmentation des précurseurs granulocytaires (CFU-G) alors que les précurseurs érythrocytaires (CFU-E) sont diminués (Levantini et al., 2003). Nous proposons donc qu'Otx-1 serait un gène clé qui dirigerait le choix de lignée entre la branche érythrocytaire et myéloïde.

Les différents mutants de délétions d'Otx-1 n'ont pas le même effet qu'Otx-1 sur l'expression des gènes et les populations hématopoïétiques. Par conséquent, la protéine Otx-1 complète est nécessaire pour son rôle dans le système hématopoïétique.

Les fonctions de SCL sont centrales pour l'érythropoïèse. En effet, l'expression de SCL augmente avec la différenciation érythrocytaire (Aplan et al., 1992a; Hoang et al., 1996 ; Elwood et al., 1998; Valtieri et al., 1998; Ravet et al., 2004) et son inactivation empêche celle-ci (Aplan et al., 1992a; Hall et al., 2003; Mikkola et al., 2003). Considérant le rôle prépondérant de SCL durant l'érythropoïèse, nous croyons que l'effet d'Otx-1 dans le système hématopoïétique est médié par l'activation de SCL. L'augmentation de l'expression de la Glycophorine A, un gène cible de SCL (Lahlil et al., 2004), suggère que les effets observés proviendraient directement des niveaux élevés de SCL, qui spécifieraient la différenciation érythrocytaire. De plus, le rétablissement de la différenciation érythrocytaire des souris Otx-1^{-/-} par un gain de fonction de SCL confirme ce point (Levantini et al., 2003).

On ne peut pas exclure l'hypothèse que les effets biologiques observés soient également attribuables à des fonctions d'Otx-1 indépendantes de SCL. La réduction drastique des cellules myéloïdes par Otx-1 en est un exemple puisque la variation des niveaux de SCL durant l'hématopoïèse adulte provoque seulement un effet mineur sur le développement myéloïde (Elwood et al., 1998; Hall et al., 2003; Mikkola et al., 2003; Ravet et al., 2004). Durant la différenciation myéloïde, les niveaux de SCL diminuent (Hoang et al., 1996 ; Elefanty et al., 1999) et l'expression de SCL peut bloquer la différenciation myéloïde en culture cellulaire (Tanigawa et al., 1995; Hoang et al., 1996; Condorelli et al., 1997). Ceci suggère que l'effet substantiel provoqué par Otx-1 sur les cellules myéloïdes est probablement à la fois dépendant et indépendant de SCL. Ces différents résultats confirment qu'Otx-1 active l'expression de SCL et soutient la différenciation érythrocytaire durant l'hématopoïèse.

Certains facteurs de transcription agissent comme des régulateurs clés d'une lignée. Ils dirigent l'expression de gènes qui spécifient cette lignée et inhibent l'expression de gènes non-pertinents. Par exemple l'activation de l'expression de PU.1 dans la lignée érythrocytaire prévient la différenciation érythrocytaire et cause une érythroleucémie en favorisant la lignée myéloïde (Ben David et Bernstein, 1991). Par conséquent, une légère différence dans le dosage des facteurs de transcription est suffisante pour perturber l'équilibre et diriger la différenciation vers une lignée donnée. Plusieurs observations expérimentales suggèrent que la diversité cellulaire est générée à la fois par la collaboration et la compétition d'un réseau dynamique de facteurs de transcription dans la cellule. Une combinaison de facteurs de croissance et de cytokines qui proviennent de l'environnement sont également nécessaires (Hoang, 2004). Certaines observations suggèrent que les voies impliquant Notch et Wnt, qui déterminent l'asymétrie lors de la formation des axes durant le développement embryonnaire, semblent réutilisées chez l'adulte pour réguler le nombre de cellules souches hématopoïétiques et soutenir la diversification cellulaire dans le système hématopoïétique (Hoang, 2004). Otx-1, qui a un rôle au niveau de la détermination de l'axe antéro-postérieur chez l'embryon en développement, pourrait aussi avoir un rôle chez l'adulte pour spécifier un choix de lignée favorisant la différenciation érythrocytaire. Otx-1 pourrait donc agir sur la spécification de l'identité cellulaire hématopoïétique car celui-ci semble effectivement favoriser une différenciation érythrocytaire au détriment des cellules myéloïdes.

Nos résultats semblent indiquer qu'une augmentation du niveau d'Otx-1 dans le système hématopoïétique affecte la prolifération des cellules myéloïdes. Jusqu'à présent nous n'avons aucune indication qu'Otx-1 induit l'apoptose dans ces cellules. Il serait alors intéressant de vérifier quel est l'effet d'Otx-1 sur le cycle cellulaire et la prolifération de ces dernières. Pour ce faire, il serait possible de vérifier par cytométrie en flux

s'il y a une augmentation de l'apoptose par un marquage à l'annexine V dans les cellules myéloïdes. De plus, pour vérifier l'effet d'Otx-1 au niveau du cycle cellulaire et de la prolifération, des marquages de l'ADN au "Hoechst" et à la thymidine triciée pourraient aussi être effectués. En combinaison avec des marquages de lignées spécifiques (c-Kit, Ter119 et Cd11b), il serait possible de comparer l'effet prolifératif d'Otx-1 sur ces différentes populations.

Otx-1 vs Otx-2

Étant donné le phénotype hématopoïétique des souris Otx-1^{-/-}, nous nous sommes concentrés principalement sur Otx-1 (Levantini et al., 2003). Cependant, on observe qu'Otx-2, tout comme Otx-1, a la capacité de collaborer avec GATA-1 pour activer le promoteur de SCL. Les souris nulles pour Otx-1 et Otx-2 montrent un phénotype très divergent malgré leur grande homologie de séquence en acides aminés et leur patron d'expression similaire. En effet, les souris Otx-2^{-/-} meurent très tôt durant l'embryogenèse et aucune spécification de la plaque neurale antérieure n'est observée. Cette mort prématurée des embryons empêche l'analyse du rôle d'Otx-2 dans le système hématopoïétique. La différence de phénotype et le patron d'expression d'Otx-1 et d'Otx-2 nous amène à émettre deux hypothèses : (1) les propriétés fonctionnelles d'Otx-1 et d'Otx-2 se chevauchent et la différence de phénotype des mutants est due à une différence d'expression spatiale et temporelle; alternativement, (2) Otx-1 et Otx-2 ont des propriétés fonctionnelles uniques spécifiées par la divergence très limitée des acides aminés de leurs séquences. Pour distinguer ces 2 possibilités, le gène Otx-1 murin a été remplacé par le cDNA humain d'Otx-2 et vice versa. Les souris homozygotes possédant le cDNA d'Otx-2 à la place de celui d'Otx-1 montrent une correction des défauts épileptiques et de formation du cortex ainsi que de certains défauts sensoriels observés dans les souris Otx-1^{-/-}. Par contre, les défauts de formation du canal semi-

circulaire de l'oreille interne ne sont pas corrigés (Morsli et al., 1999; Acampora et Simeone, 1999). Les souris homozygotes dont le cDNA d'Otx-2 a été remplacé par celui d'Otx-1 survivent et montrent une spécialisation de la plaque neurale antérieure et une gastrulation normale. Par contre, ces souris sont incapables de rétablir l'identité du cerveau antérieur et du mésencéphale (Acampora et al., 1998). Ainsi, Otx-1 semble pouvoir rétablir la spécification de l'identité antérieure dans le cerveau précoce mais est incapable d'établir l'identité du neuroectoderme (Suda et al., 1999; Acampora et Simeone, 1999; Simeone et al., 2002; Puellas et al., 2003).

D'autres études montrent que l'expression d'Otx-1 sous le contrôle complet des régions de régulation d'Otx-2 a permis une régionalisation normale et la formation du cerveau antérieur et du mésencéphale dans ces souris. Ainsi, Otx-1 semble pouvoir remplacer la fonction d'Otx-2 dans ses fonctions même pour la régionalisation du neuroectoderme antérieur (Acampora et al., 2003). Ces études indiquent une équivalence fonctionnelle remarquable entre Otx-1 et Otx-2. L'interchangeabilité de ceux-ci indique que les différences de phénotypes observées viendraient d'une différence au niveau de leur contrôle transcriptionnel. Cette équivalence fonctionnelle dans le cerveau suggère qu'Otx-2 pourrait remplacer Otx-1 dans le système hématopoïétique et donc potentiellement être capable de restaurer le défaut anémique des souris *Otx-1^{-/-}*. Si tel est le cas, on pourrait aussi confirmer sa capacité à interagir avec GATA-1.

La famille de protéines orthodenticles incluant Otd (*Drosophila* orthodenticle) et les membres Otx ont des rôles très similaires dans le cerveau chez la mouche et la souris, respectivement. Pourtant, seulement l'homéodomaine est hautement conservé entre Otd et les membres Otx. En dehors de celui-ci, l'homologie est restreinte à quelques très petites séquences limitées. Ces protéines auraient donc divergé à travers l'évolution, leur permettant d'acquérir de nouvelles fonctions spécifiques. Les divergences proviendraient d'une modification au niveau du contrôle de l'expression génique, en établissant de nouveaux patrons d'expression.

Alternativement, l'apparition de nouveaux domaines permettrait ainsi de nouvelles interactions protéiques (Acampora et al., 2001). L'étude des gènes dans différents organismes apporte de bons indices pour les fonctions d'Otx chez les mammifères. Cependant, l'évolution et la duplication des gènes amènent de nouvelles fonctions à découvrir pour chaque protéine Otx, et ce, dans les différents compartiments dans lesquels elles sont exprimées. Les protéines Otx ont été très peu étudiées au niveau moléculaire et notre étude révèle de nouvelles propriétés d'Otx-1 qui sont différentes de celles observées chez la protéine Otd. Notre étude moléculaire montre la nécessité de l'homéodomaine ainsi que de tous les autres domaines d'Otx-1 apparus au cours de l'évolution.

Mécanisme dans le cerveau

Tel que mentionné précédemment, les rôles d'Otx-1 et d'Otx-2 ont été largement étudiés dans le système nerveux central (Acampora et al., 2001). SCL, GATA-2 et GATA-3 sont aussi exprimés dans les neurones pendant le développement du cerveau et chez l'adulte (George et al., 1994; Nardelli et al., 1999; Van Eekelen et al., 2003). Considérant que les patrons d'expression de SCL et des facteurs GATA se chevauchent dans le système nerveux central, est-ce que les facteurs GATA coopèrent avec Otx pour réguler l'expression de SCL dans le cerveau ? Un fait intéressant appuyant cette hypothèse est que la mutation du site GATA à -35 pb du promoteur de SCL abolit complètement son expression *in vivo* dans le système nerveux central (Sinclair et al., 1999). D'autres expériences de co-localisation et d'ablations géniques conditionnelles seraient donc requises pour adresser directement la possibilité d'une interaction entre les facteurs SCL, GATA et Otx dans le cerveau. Le nouveau mécanisme de régulation que nous proposons pourrait donc exister ailleurs que dans le système hématopoïétique.

Conclusion

Nos résultats indiquent que durant la différenciation hématopoïétique Otx-1 favorise et consolide le destin érythrocytaire en activant directement la transcription de SCL. Notre étude amène un nouveau mécanisme de régulation du promoteur de l'exon 1a dans les cellules érythrocytaires par une collaboration entre GATA-1 et Otx-1. Nous avons montré qu'Otx-1 active le promoteur de l'exon 1a par une interaction physique avec GATA-1 au site GATA à -35 pb du promoteur. De plus, notre étude a permis l'identification d'un nouveau régulateur transcriptionnel du promoteur 1a de SCL et un nouveau co-facteur de GATA-1.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Acampora,D., Annino,A., Puelles,E., Alfano,I., Tuorto,F., and Simeone,A. (2003). OTX1 compensates for OTX2 requirement in regionalisation of anterior neuroectoderm. *Gene Expr. Patterns.* 3, 497-501.

Acampora,D., Avantaggiato,V., Tuorto,F., Briata,P., Corte,G., and Simeone,A. (1998). Visceral endoderm-restricted translation of Otx1 mediates recovery of Otx2 requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation. *Development* 125, 5091-5104.

Acampora,D., Gulisano,M., Broccoli,V., and Simeone,A. (2001). Otx genes in brain morphogenesis. *Prog. Neurobiol.* 64, 69-95.

Acampora,D., Gulisano,M., and Simeone,A. (2000a). Genetic and molecular roles of Otx homeodomain proteins in head development. *Gene* 246, 23-35.

Acampora,D., Mazan,S., Avantaggiato,V., Barone,P., Tuorto,F., Lallemand,Y., Brulet,P., and Simeone,A. (1996). Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the Otx1 gene. *Nat. Genet.* 14, 218-222.

Acampora,D., Mazan,S., Lallemand,Y., Avantaggiato,V., Maury,M., Simeone,A., and Brulet,P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121, 3279-3290.

Acampora,D., Postiglione,M.P., Avantaggiato,V., Di Bonito,M., and Simeone,A. (2000b). The role of Otx and Otp genes in brain development. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 669-677.

Acampora,D. and Simeone,A. (1999). The TINS Lecture. Understanding the roles of Otx1 and Otx2 in the control of brain morphogenesis. *Trends Neurosci.* 22, 116-122.

Affolter, M., Schier, A., and Gehring, W.J. (1990). Homeodomain proteins and the regulation of gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 485-495.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.

Ang, S.L. (1996). The brain organization. *Nature* 380, 25-27.

Ang, S.L., Conlon, R.A., Jin, O., and Rossant, J. (1994). Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants. *Development* 120, 2979-2989.

Aplan, P.D., Begley, C.G., Bertness, V., Nussmeier, M., Ezquerra, A., Coligan, J., and Kirsch, I.R. (1990). The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol. Cell Biol.* 10, 6426-6435.

Aplan, P.D., Lombardi, D.P., Reaman, G.H., Sather, H.N., Hammond, G.D., and Kirsch, I.R. (1992a). Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79, 1327-1333.

Aplan, P.D., Nakahara, K., Orkin, S.H., and Kirsch, I.R. (1992b). The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J.* 11, 4073-4081.

Bach, I., Carriere, C., Ostendorff, H.P., Andersen, B., and Rosenfeld, M.G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and *Otx* homeodomain proteins. *Genes Dev.* 11, 1370-1380.

Baer, R. (1993). TAL1, TAL2 and LYL1: a family of basic helix-loop-helix proteins implicated in T cell acute leukaemia. *Semin. Cancer Biol.* 4, 341-347.

Barton,L.M., Gottgens,B., Gering,M., Gilbert,J.G.R., Grafham,D., Rogers,J., Bentley,D., Patient,R., and Green,A.R. (2001). Regulation of the stem cell leukemia (SCL) gene: A tale of two fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6747-6752.

Barton,L.M., Gottgens,B., and Green,A.R. (1999). The stem cell leukaemia (SCL) gene: a critical regulator of haemopoietic and vascular development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 1193-1207.

Barton,M.C., Madani,N., and Emerson,B.M. (1993). The erythroid protein cGATA-1 functions with a stage-specific factor to activate transcription of chromatin-assembled beta-globin genes. *Genes Dev.* 7, 1796-1809.

Begley,C.G., Aplan,P.D., Denning,S.M., Haynes,B.F., Waldmann,T.A., and Kirsch,I.R. (1989). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 10128-10132.

Begley,C.G. and Green,A.R. (1999). The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* 93, 2760-2770.

Begley,C.G., Robb,L., Rockman,S., Visvader,J., Bockamp,E.O., Chan,Y.S., and Green,A.R. (1994). Structure of the gene encoding the murine SCL protein. *Gene* 138, 93-99.

Begley,C.G., Visvader,J., Green,A.R., Aplan,P.D., Metcalf,D., Kirsch,I.R., and Gough,N.M. (1991). Molecular cloning and chromosomal localization of the murine homolog of the human helix-loop-helix gene SCL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 869-873.

Ben David,Y. and Bernstein,A. (1991). Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. *Cell* 66, 831-834.

Bernard,O., Azogui,O., Lecointe,N., Mugneret,F., Berger,R., Larsen,C.J., and Mathieu-Mahul,D. (1992). A third tal-1 promoter is specifically used in human T cell leukemias. *J. Exp. Med.* 176, 919-925.

Billeter,M., Qian,Y.Q., Otting,G., Muller,M., Gehring,W., and Wuthrich,K. (1993). Determination of the nuclear magnetic resonance solution structure of an Antennapedia homeodomain-DNA complex. *J. Mol. Biol.* 234, 1084-1093.

Bloor,A.J., Sanchez,M.J., Green,A.R., and Gottgens,B. (2002). The role of the stem cell leukemia (SCL) gene in hematopoietic and endothelial lineage specification. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 11, 195-206.

Bockamp,E.O., Fordham,J.L., Gottgens,B., Murrell,A.M., Sanchez,M.J., and Green,A.R. (1998). Transcriptional regulation of the stem cell leukemia gene by PU.1 and Elf-1. *J. Biol. Chem.* 273, 29032-29042.

Bockamp,E.O., McLaughlin,F., Gottgens,B., Murrell,A.M., Elefanty,A.G., and Green,A.R. (1997). Distinct mechanisms direct SCL/tal-1 expression in erythroid cells and CD34 positive primitive myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 272, 8781-8790.

Bockamp,E.O., McLaughlin,F., Murrell,A.M., Gottgens,B., Robb,L., Begley,C.G., and Green,A.R. (1995). Lineage-restricted regulation of the murine SCL/TAL-1 promoter. *Blood* 86, 1502-1514.

Boncinelli,E. and Morgan,R. (2001). Downstream of Otx2, or how to get a head. *Trends Genet.* 17, 633-636.

Brady,G., Billia,F., Knox,J., Hoang,T., Kirsch,I.R., Voura,E.B., Hawley,R.G., Cumming,R., Buchwald,M., and Siminovitch,K. (1995). Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells [published erratum appears in *Curr Biol* 1995 Oct 1;5(10):1201]. *Curr. Biol.* 5, 909-922.

Budhram-Mahadeo,V., Parker,M., and Latchman,D.S. (1998). POU transcription factors Brn-3a and Brn-3b interact with the estrogen receptor and differentially regulate transcriptional activity via an estrogen response element. *Mol. Cell Biol.* *18*, 1029-1041.

Cantor,A.B. and Orkin,S.H. (2001). Hematopoietic development: a balancing act. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 513-519.

Cantor,A.B. and Orkin,S.H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* *21*, 3368-3376.

Chapman,M.A., Donaldson,I.J., Gilbert,J., Grafham,D., Rogers,J., Green,A.R., and Gottgens,B. (2004). Analysis of multiple genomic sequence alignments: A web resource, online tools, and lessons learned from analysis of mammalian SCL loci. *Genome Research* *14*, 313-318.

Chapman,V.M., Keitz,B.T., Stephenson,D.A., Mullins,L.J., Moos,M., and Schachner,M. (1990). Linkage of a gene for neural cell adhesion molecule, L1 (CamL1) to the Rsvp region of the mouse X chromosome. *Genomics* *8*, 113-118.

Chetty,R., Dada,M.A., Boshoff,C.H., Comley,M.A., Biddolph,S.C., Schneider,J.W., Mason,D.Y., Pulford,K.A., and Gatter,K.C. (1997). TAL-1 protein expression in vascular lesions. *J. Pathol.* *181*, 311-315.

Choi,K., Kennedy,M., Kazarov,A., Papadimitriou,J.C., and Keller,G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* *125*, 725-732.

Chuang,C.K., Wikramanayake,A.H., Mao,C.A., Li,X., and Klein,W.H. (1996). Transient appearance of *Strongylocentrotus purpuratus* Otx in micromere nuclei: cytoplasmic retention of SpOtx possibly mediated through an alpha-actinin interaction. *Dev. Genet.* *19*, 231-237.

Condorelli,G.L., Tocci,A., Botta,R., Facchiano,F., Testa,U., Vitelli,L., Valtieri,M., Croce,C.M., and Peschle,C. (1997). Ectopic TAL-1/SCL expression in phenotypically normal or leukemic myeloid precursors: proliferative and antiapoptotic effects coupled with a differentiation blockade. *Mol. Cell Biol.* 17, 2954-2969.

Crispino,J.D., Lodish,M.B., MacKay,J.P., and Orkin,S.H. (1999). Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol. Cell* 3, 219-228.

Cross,M.A., Heyworth,C.M., Murrell,A.M., Bockamp,E.O., Dexter,T.M., and Green,A.R. (1994). Expression of lineage restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line. *Oncogene* 9, 3013-3016.

Desplan,C., Theis,J., and O'Farrell,P.H. (1988). The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* 54, 1081-1090.

Dessain,S. and McGinnis,W. (1991). Regulating the expression and function of homeotic genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, 275-282.

Drouin, J. La famille Ptx des facteurs de transcription à homéodomaine. *médecine/science* no 3, vol.14, 335-339. 3-14-1998.

Ref Type: Generic

Drouin,J., Lamolet,B., Lamonerie,T., Lanctot,C., and Tremblay,J.J. (1998). The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Mol. Cell Endocrinol.* 140, 31-36.

Duboule,D. and Morata,G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.* 10, 358-364.

Durocher,D., Charron,F., Warren,R., Schwartz,R.J., and Nemer,M. (1997). The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 16, 5687-5696.

Elefanty,A.G., Begley,C.G., Hartley,L., Papaevangeliou,B., and Robb,L. (1999). SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* 94, 3754-3763.

Elefanty,A.G., Begley,C.G., Metcalf,D., Barnett,L., Kontgen,F., and Robb,L. (1998). Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11897-11902.

Elwood,N.J., Green,A.R., Melder,A., Begley,C.G., and Nicola,N. (1994). The SCL protein displays cell-specific heterogeneity in size. *Leukemia* 8, 106-114.

Elwood,N.J., Zogos,H., Pereira,D.S., Dick,J.E., and Begley,C.G. (1998). Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood* 91, 3756-3765.

Ema,M., Faloon,P., Zhang,W.J., Hirashima,M., Reid,T., Stanford,W.L., Orkin,S., Choi,K., and Rossant,J. (2003). Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev.* 17, 380-393.

Finkelstein,R. and Boncinelli,E. (1994). From fly head to mammalian forebrain: the story of otd and Otx. *Trends Genet.* 10, 310-315.

Finkelstein,R., Smouse,D., Capaci,T.M., Spradling,A.C., and Perrimon,N. (1990). The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the Drosophila nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* 4, 1516-1527.

Fisher,R.C. and Scott,E.W. (1998). Role of PU.1 in hematopoiesis. *Stem Cells* 16, 25-37.

- Fordham,J.L., Gottgens,B., McLaughlin,F., and Green,A.R. (1999). Chromatin structure and transcriptional regulation of the stem cell leukaemia (SCL) gene in mast cells. *Leukemia* 13, 750-759.
- Fox,A.H., Liew,C., Holmes,M., Kowalski,K., Mackay,J., and Crossley,M. (1999). Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J.* 18, 2812-2822.
- Fujiwara,Y., Browne,C.P., Cunniff,K., Goff,S.C., and Orkin,S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 12355-12358.
- Fujiwara,Y., Chang,A.N., Williams,A.M., and Orkin,S.H. (2003). Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood* ..
- Furukawa,T., Morrow,E.M., and Cepko,C.L. (1997). Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91, 531-541.
- Gehring,W.J. (1985). Homeotic genes, the homeobox, and the spatial organization of the embryo. *Harvey Lect.* 81, 153-172.
- Gehring,W.J. (1992). The homeobox in perspective. *Trends Biochem. Sci.* 17, 277-280.
- Gehring,W.J. and Hiromi,Y. (1986). Homeotic genes and the homeobox. *Annu. Rev. Genet.* 20, 147-173.
- George,K.M., Leonard,M.W., Roth,M.E., Liew,K.H., Kioussis,D., Grosveld,F., and Engel,J.D. (1994). Embryonic Expression and Cloning of the Murine Gata-3 Gene. *Development* 120, 2673-2686.

Gering,M., Rodaway,A.R., Gottgens,B., Patient,R.K., and Green,A.R. (1998). The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J.* *17*, 4029-4045.

Goldfarb,A.N., Goueli,S., Mickelson,D., and Greenberg,J.M. (1992). T-cell acute lymphoblastic leukemia--the associated gene SCL/tal codes for a 42-Kd nuclear phosphoprotein. *Blood* *80*, 2858-2866.

Gottgens,B., Barton,L.M., Gilbert,J.G., Bench,A.J., Sanchez,M.J., Bahn,S., Mistry,S., Grafham,D., McMurray,A., Vaudin,M., Amaya,E., Bentley,D.R., and Green,A.R. (2000). Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers [see comments]. *Nat. Biotechnol.* *18*, 181-186.

Gottgens,B., Broccardo,C., Sanchez,M.J., Deveaux,S., Murphy,G., Gothert,J.R., Kotsopoulou,E., Kinston,S., Delaney,L., Piltz,S., Barton,L.M., Knezevic,K., Erber,W.N., Begley,C.G., Frampton,J., and Green,A.R. (2004). The scl +18/19 Stem Cell Enhancer Is Not Required for Hematopoiesis: Identification of a 5' Bifunctional Hematopoietic-Endothelial Enhancer Bound by Fli-1 and Elf-1. *Mol. Cell Biol.* *24*, 1870-1883.

Gottgens,B., Gilbert,J.G.R., Barton,L.M., Grafham,D., Rogers,J., Bentley,D.R., and Green,A.R. (2001). Long-range comparison of human and mouse SCL loci: Localized regions of sensitivity to restriction endonucleases correspond precisely with peaks of conserved noncoding sequences. *Genome Research* *11*, 87-97.

Gottgens,B., McLaughlin,F., Bockamp,E.O., Fordham,J.L., Begley,C.G., Kosmopoulos,K., Elefanty,A.G., and Green,A.R. (1997). Transcription of the SCL gene in erythroid and CD34 positive primitive myeloid cells is controlled by a complex network of lineage-restricted chromatin-dependent and chromatin-independent regulatory elements. *Oncogene* *15*, 2419-2428.

Gottgens,B., Nastos,A., Kinston,S., Piltz,S., Delabesse,E.C., Stanley,M., Sanchez,M.J., Ciau-Uitz,A., Patient,R., and Green,A.R. (2002). Establishing

the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J.* 21, 3039-3050.

Green,A.R., Lints,T., Visvader,J., Harvey,R., and Begley,C.G. (1992). SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain [published erratum appears in *Oncogene* 1992 Jul;7(7):1459]. *Oncogene* 7, 653-660.

Green,A.R., Salvaris,E., and Begley,C.G. (1991). Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. *Oncogene* 6, 475-479.

Hall,M.A., Curtis,D.J., Metcalf,D., Elefanty,A.G., Sourris,K., Robb,L., Gothert,J.R., Jane,S.M., and Begley,C.G. (2003). The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 992-997.

Hanes,S.D. and Brent,R. (1989). DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. *Cell* 57, 1275-1283.

Hanes,S.D. and Brent,R. (1991). A genetic model for interaction of the homeodomain recognition helix with DNA. *Science* 251, 426-430.

Harding,K., Wedeen,C., McGinnis,W., and Levine,M. (1985). Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila*. *Science* 229, 1236-1242.

Herblot,S., Aplan,P.D., and Hoang,T. (2002). A gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol. Cell Biol.* 22.

Herblot,S., Steff,A.-M., Hugo,P., Aplan,P.D., and Hoang,T. (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation : inhibition of E2A-HEB function and pre-Ta chain expression. *Nat. Immunol.* 1, 138-144.

Hoang, T. The origine of hematopoietic cell type diversity. 2004.

Ref Type: Generic

Hoang,T., Paradis,E., Brady,G., Billia,F., Nakahara,K., Iscove,N.N., and Kirsch,I.R. (1996). Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* 87, 102-111.

Holland,P.W., Holland,L.Z., Williams,N.A., and Holland,N.D. (1992). An amphioxus homeobox gene: sequence conservation, spatial expression during development and insights into vertebrate evolution. *Development* 116, 653-661.

Hsu,H.L., Cheng,J.T., Chen,Q., and Baer,R. (1991). Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.* 11, 3037-3042.

Hsu,H.L., Wadman,I., and Baer,R. (1994). Formation of in vivo complexes between the TAL1 and E2A polypeptides of leukemic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 3181-3185.

Iwasaki,H., Mizuno,S., Wells,R.A., Cantor,A.B., Watanabe,S., and Akashi,K. (2003). GATA-1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages. *Immunity.* 19, 451-462.

Kakizawa,T., Miyamoto,T., Ichikawa,K., Kaneko,A., Suzuki,S., Hara,M., Nagasawa,T., Takeda,T., Mori,J., Kumagai,M., and Hashizume,K. (1999). Functional interaction between Oct-1 and retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 19103-19108.

Kallianpur,A.R., Jordan,J.E., and Brandt,S.J. (1994). The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* 83, 1200-1208.

Kelley,C.G., Lavorgna,G., Clark,M.E., Boncinelli,E., and Mellon,P.L. (2000). The Otx2 homeoprotein regulates expression from the gonadotropin-releasing hormone proximal promoter. *Mol. Endocrinol.* 14, 1246-1256.

Kennedy,M., Firpo,M., Choi,K., Wall,C., Robertson,S., Kabrun,N., and Keller,G. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, 488-493.

Klein,W.H. and Li,X. (1999). Function and evolution of Otx proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 229-233.

Knoepfler,P.S., Bergstrom,D.A., Uetsuki,T., Dac-Korytko,I., Sun,Y.H., Wright,W.E., Tapscott,S.J., and Kamps,M.P. (1999). A conserved motif N-terminal to the DNA-binding domains of myogenic bHLH transcription factors mediates cooperative DNA binding with pbx-Meis1/Prep1. *Nucleic Acids Res.* 27, 3752-3761.

KrosI,G., He,G., Lefrancois,M., Charron,F., Romeo,P.H., Jolicoeur,P., Kirsch,I.R., Nemer,M., and Hoang,T. (1998). Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* 188, 439-450.

Lahlil,R., Lecuyer,E., Herblot,S., and Hoang,T. (2004). SCL assembles a multifactorial complex that determines glycoporphin A expression. *Molecular and Cellular Biology* 24, 1439-1452.

Lamolet,B., Pulichino,A.M., Lamonerie,T., Gauthier,Y., Brue,T., Enjalbert,A., and Drouin,J. (2001). A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104, 849-859.

Lamonerie,T., Tremblay,J.J., Lanctot,C., Therrien,M., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1996). Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor

involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev.* 10, 1284-1295.

Laverriere,A.C., MacNeill,C., Mueller,C., Poelmann,R.E., Burch,J.B., and Evans,T. (1994). GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* 269, 23177-23184.

Lecointe,N., Bernard,O., Naert,K., Joulin,V., Larsen,C.J., Romeo,P.H., and Mathieu-Mahul,D. (1994). GATA-and SP1-binding sites are required for the full activity of the tissue-specific promoter of the tal-1 gene. *Oncogene* 9, 2623-2632.

Lecuyer, E and Hoang, T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp.Hematol.* 2004.

Ref Type: In Press

Lecuyer,E., Herblot,S., Saint-Denis,M., Martin,R., Begley,C.G., Porcher,C., Orkin,S.H., and Hoang,T. (2002). The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* 100, 2430-2440.

Lee,J.E., Hollenberg,S.M., Snider,L., Turner,D.L., Lipnick,N., and Weintraub,H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.

Lee,Y., Shioi,T., Kasahara,H., Jobe,S.M., Wiese,R.J., Markham,B.E., and Izumo,S. (1998). The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol. Cell Biol.* 18, 3120-3129.

Leroy-Viard,K., Vinit,M.A., Lecointe,N., Mathieu-Mahul,D., and Romeo,P.H. (1994). Distinct DNase-I hypersensitive sites are associated with TAL-1 transcription in erythroid and T-cell lines. *Blood* 84, 3819-3827.

Levantini,E., Giorgetti,A., Cerisoli,F., Traggiai,E., Guidi,A., Martin,R., Acampora,D., Aplan,P.D., Keller,G., Simeone,A., Iscove,N.N., Hoang,T., and Magli,M.C. (2003). Unsuspected role of the brain morphogenetic gene *Otx1* in hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 10299-10303.

Liao,E.C., Paw,B.H., Oates,A.C., Pratt,S.J., Postlethwait,J.H., and Zon,L.I. (1998). *SCL/Tal-1* transcription factor acts downstream of *cloche* to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev.* *12*, 621-626.

Mailhos,C., Andre,S., Mollereau,B., Goriely,A., Hemmati-Brivanlou,A., and Desplan,C. (1998). *Drosophila* *Gooseoid* requires a conserved heptapeptide for repression of paired-class homeoprotein activators. *Development* *125*, 937-947.

Malicki,J., Schughart,K., and McGinnis,W. (1990). Mouse *Hox-2.2* specifies thoracic segmental identity in *Drosophila* embryos and larvae. *Cell* *63*, 961-967.

Mann,R.S. and Affolter,M. (1998). *Hox* proteins meet more partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *8*, 423-429.

Mao,C.A., Wikramanayake,A.H., Gan,L., Chuang,C.K., Summers,R.G., and Klein,W.H. (1996). Altering cell fates in sea urchin embryos by overexpressing *SpOtx*, an orthodenticle-related protein. *Development* *122*, 1489-1498.

Martin,D.I. and Orkin,S.H. (1990). Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor *GF-1/NF-E1/Eryf 1*. *Genes Dev.* *4*, 1886-1898.

Martin,R., Lahlil,R., Damert,A., Miquerol,L., Nagy,A., Keller,G., and Hoang,T. (2004). *SCL* interacts with *VEGF* to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development* *131*, 693-702.

- Martinez-Morales, J.R., Dolez, V., Rodrigo, I., Zaccarini, R., Leconte, L., Bovolenta, P., and Saule, S. (2003). OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 21721-21731.
- Massari, M.E. and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell Biol.* 20, 429-440.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., and Aizawa, S. (1995). Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev.* 9, 2646-2658.
- Matthews, J.M. and Visvader, J.E. (2003). LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. *EMBO Rep.* 4, 1132-1137
- McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A., and Gehring, W.J. (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403-408.
- McGinnis, W. and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J., and Maki, R.A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* 15, 5647-5658.
- Mead, P.E., Deconinck, A.E., Huber, T.L., Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2001). Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development* 128, 2301-2308.
- Mead, P.E., Kelley, C.M., Hahn, P.S., Piedad, O., and Zon, L.I. (1998). SCL specifies hematopoietic mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* 125, 2611-2620.

Merika,M. and Orkin,S.H. (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol. Cell Biol.* 15, 2437-2447.

Mikkola,H.K., Klintman,J., Yang,H., Hock,H., Schlaeger,T.M., Fujiwara,Y., and Orkin,S.H. (2003). Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* 421, 547-551.

Minegishi,N., Ohta,J., Yamagiwa,H., Suzuki,N., Kawauchi,S., Zhou,Y., Takahashi,S., Hayashi,N., Engel,J.D., and Yamamoto,M. (1999). The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood* 93, 4196-4207.

Mochizuki,T., Karavanov,A.A., Curtiss,P.E., Ault,K.T., Sugimoto,N., Watabe,T., Shiokawa,K., Jamrich,M., Cho,K.W.Y., Dawid,I.B., and Taira,M. (2000). Xlim-1 and LIM domain binding protein 1 cooperate with various transcription factors in the regulation of the gooseoid promoter. *Developmental Biology* 224, 470-485.

Morgan,R., Hooiveld,M.H., In der,R.P., and Durston,A.J. (1999). A conserved 30 base pair element in the Wnt-5a promoter is sufficient both to drive its' early embryonic expression and to mediate its' repression by otx2. *Mech. Dev.* 85, 97-102.

Morsli,H., Tuorto,F., Choo,D., Postiglione,M.P., Simeone,A., and Wu,D.K. (1999). Otx1 and Otx2 activities are required for the normal development of the mouse inner ear. *Development* 126, 2335-2343.

Mouthon,M.A., Bernard,O., Mitjavila,M.T., Romeo,P.H., Vainchenker,W., and Mathieu-Mahul,D. (1993). Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* 81, 647-655.

Murre,C., McCaw,P.S., and Baltimore,D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.

Nakano,T., Murata,T., Matsuo,I., and Aizawa,S. (2000). OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3 beta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267, 64-70.

Nardelli,J., Thiesson,D., Fujiwara,Y., Tsai,F.Y., and Orkin,S.H. (1999). Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev. Biol.* 210, 305-321.

Nichols,K.E., Crispino,J.D., Poncz,M., White,J.G., Orkin,S.H., Maris,J.M., and Weiss,M.J. (2000). Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat. Genet.* 24, 266-270.

Ohneda,K., Mirmira,R.G., Wang,J., Johnson,J.D., and German,M.S. (2000). The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol. Cell Biol.* 20, 900-911.

Ohneda,K. and Yamamoto,M. (2002). Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol.* 108, 237-245.

Omichinski,J.G., Clore,G.M., Schaad,O., Felsenfeld,G., Trainor,C., Appella,E., Stahl,S.J., and Gronenborn,A.M. (1993). NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science* 261, 438-446.

Orkin,S.H. (1992). GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80, 575-581.

Orkin,S.H. (1995). Hematopoiesis: how does it happen? *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 870-877.

Orkin,S.H. (1996). Development of the hematopoietic system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 597-602.

Orkin,S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 1, 57-64.

Orkin,S.H. and Zon,L.I. (2002). Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat. Immunol.* 3, 323-328.

Passegue,E., Jamieson,C.H., Ailles,L.E., and Weissman,I.L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 *Suppl 1:11842-9.*, 11842-11849.

Perry,C. and Soreq,H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis. Fine tuning of combinatorial multi-domain elements. *Eur. J. Biochem.* 269, 3607-3618.

Pevny,L., Lin,C.S., D'Agati,V., Simon,M.C., Orkin,S.H., and Costantini,F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 121, 163-172.

Pevny,L., Simon,M.C., Robertson,E., Klein,W.H., Tsai,S.F., D'Agati,V., Orkin,S.H., and Costantini,F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.

Planque,N., Leconte,L., Coquelle,F.M., Benkhelifa,S., Martin,P., Felder-Schmittbuhl,M.P., and Saule,S. (2001). Interaction of Maf transcription factors with Pax-6 results in synergistic activation of the glucagon promoter. *J. Biol. Chem.* 276, 35751-35760.

Porcher,C., Liao,E.C., Fujiwara,Y., Zon,L.I., and Orkin,S.H. (1999). Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* 126, 4603-4615.

Porcher,C., Swat,W., Rockwell,K., Fujiwara,Y., Alt,F.W., and Orkin,S.H. (1996). The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47-57.

Poulin,G., Lebel,M., Chamberland,M., Paradis,F.W., and Drouin,J. (2000). Specific protein-protein interaction between basic helix-loop-helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol. Cell Biol.* 20, 4826-4837.

Prasad,K.S. and Brandt,S.J. (1997). Target-dependent effect of phosphorylation on the DNA binding activity of the TAL1/SCL oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 272, 11457-11462.

Puelles,E., Acampora,D., Lacroix,E., Signore,M., Annino,A., Tuorto,F., Filosa,S., Corte,G., Wurst,W., Ang,S.L., and Simeone,A. (2003). Otx dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain. *Nat. Neurosci.* 6, 453-460.

Pulford,K., Lecoite,N., Leroy-Viard,K., Jones,M., Mathieu-Mahul,D., and Mason,D.Y. (1995). Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood* 85, 675-684.

Qian,Y.Q., Billeter,M., Otting,G., Muller,M., Gehring,W.J., and Wuthrich,K. (1989). The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59, 573-580.

Qian,Y.Q., Otting,G., Furukubo-Tokunaga,K., Affolter,M., Gehring,W.J., and Wuthrich,K. (1992). NMR structure determination reveals that the

homeodomain is connected through a flexible linker to the main body in the *Drosophila Antennapedia* protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 10738-10742.

Ramain,P., Khechumian,R., Khechumian,K., Arbogast,N., Ackermann,C., and Heitzler,P. (2000). Interactions between chip and the achaete/scute-daughterless heterodimers are required for pannier-driven proneural patterning. *Mol. Cell* **6**, 781-790.

Ramalho-Santos,M., Yoon,S., Matsuzaki,Y., Mulligan,R.C., and Melton,D.A. (2002). "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* **298**, 597-600.

Ravet,E., Reynaud,D., Titeux,M., Izac,B., Fichelson,S., Romeo,P.H., Dubart-Kupperschmitt,A., and Pflumio,F. (2004). Characterization of DNA-binding-dependent and -independent functions of SCL/TAL1 during human erythropoiesis. *Blood* **103**, 3326-3335.

Risau,W. and Flamme,I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**:73-91., 73-91.

Robb,L. and Begley,C.G. (1997). The SCL/TAL1 gene: roles in normal and malignant haematopoiesis. *Bioessays* **19**, 607-613.

Robb,L., Elwood,N.J., Elefanty,A.G., Kontgen,F., Li,R., Barnett,L.D., and Begley,C.G. (1996). The *scl* gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* **15**, 4123-4129.

Robb,L., Lyons,I., Li,R., Hartley,L., Kontgen,F., Harvey,R.P., Metcalf,D., and Begley,C.G. (1995). Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7075-7079.

Romeo,P.H. (1997). [Genetic control of hematopoiesis]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **191**, 105-111.

Russell,E.S. (1979). Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv. Genet.* 20, 357-459.

Sanchez,M., Gottgens,B., Sinclair,A.M., Stanley,M., Begley,C.G., Hunter,S., and Green,A.R. (1999). An SCL 3' enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors. *Development* 126, 3891-3904.

Scott,E.W., Simon,M.C., Anastasi,J., and Singh,H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-1577.

Scott,M.P., Tamkun,J.W., and Hartzell,G.W., III (1989). The structure and function of the homeodomain. *Biochim. Biophys. Acta* 989, 25-48.

Shivdasani,R.A., Fujiwara,Y., McDevitt,M.A., and Orkin,S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* 16, 3965-3973.

Shivdasani,R.A., Mayer,E.L., and Orkin,S.H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-434.

Shivdasani,R.A. and Orkin,S.H. (1996). The transcriptional control of hematopoiesis [see comments]. *Blood* 87, 4025-4039.

Simeone,A. (1998). *Otx1* and *Otx2* in the development and evolution of the mammalian brain. *EMBO J.* 17, 6790-6798.

Simeone,A., Acampora,D., Mallamaci,A., Stornaiuolo,A., D'Apice,M.R., Nigro,V., and Boncinelli,E. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 12, 2735-2747.

Simeone,A., Gulisano,M., Acampora,D., Stornaiuolo,A., Rambaldi,M., and Boncinelli,E. (1992). Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila* empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J.* 11, 2541-2550.

Simeone,A., Puelles,E., and Acampora,D. (2002). The Otx family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 409-415.

Simon,M.C., Pevny,L., Wiles,M.V., Keller,G., Costantini,F., and Orkin,S.H. (1992). Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 1, 92-98.

Sinclair,A.M., Gottgens,B., Barton,L.M., Stanley,M.L., Pardanaud,L., Klaine,M., Gering,M., Bahn,S., Sanchez,M., Bench,A.J., Fordham,J.L., Bockamp,E., and Green,A.R. (1999). Distinct 5' SCL enhancers direct transcription to developing brain, spinal cord, and endothelium: neural expression is mediated by GATA factor binding sites. *Dev. Biol.* 209, 128-142.

Spain,L.M., Guerriero,A., Kunjibettu,S., and Scott,E.W. (1999). T cell development in PU.1-deficient mice. *J. Immunol.* 163, 2681-2687.

Stainier,D.Y., Weinstein,B.M., Detrich,H.W., III, Zon,L.I., and Fishman,M.C. (1995). Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development* 121, 3141-3150.

Suda,Y., Nakabayashi,J., Matsuo,I., and Aizawa,S. (1999). Functional equivalency between Otx2 and Otx1 in development of the rostral head. *Development* 126, 743-757.

Tanigawa,T., Nicola,N., McArthur,G.A., Strasser,A., and Begley,C.G. (1995). Differential regulation of macrophage differentiation in response to leukemia inhibitory factor/oncostatin-M/interleukin-6: the effect of enforced expression of the SCL transcription factor. *Blood* 85, 379-390.

Ting,C.N., Olson,M.C., Barton,K.P., and Leiden,J.M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384, 474-478.

Torigoi,E., Bennani-Baiti,I.M., Rosen,C., Gonzalez,K., Morcillo,P., Ptashne,M., and Dorsett,D. (2000). Chip interacts with diverse homeodomain proteins and potentiates bicoid activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 2686-2691.

Treisman,J., Gonczy,P., Vashishtha,M., Harris,E., and Desplan,C. (1989). A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* 59, 553-562.

Tremblay,J.J., Goodyer,C.G., and Drouin,J. (2000). Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinology* 71, 277-286.

Tremblay,J.J., Lanctot,C., and Drouin,J. (1998). The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol. Endocrinol.* 12, 428-441.

Tsai,F.Y., Keller,G., Kuo,F.C., Weiss,M., Chen,J., Rosenblatt,M., Alt,F.W., and Orkin,S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.

Tsai,F.Y. and Orkin,S.H. (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 89, 3636-3643.

Tsang,A.P., Fujiwara,Y., Hom,D.B., and Orkin,S.H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev.* 12, 1176-1188.

Tsang,A.P., Visvader,J.E., Turner,C.A., Fujiwara,Y., Yu,C., Weiss,M.J., Crossley,M., and Orkin,S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 90, 109-119.

Valtieri,M., Tocci,A., Gabbianelli,M., Luchetti,L., Masella,B., Vitelli,L., Botta,R., Testa,U., Condorelli,G.L., and Peschle,C. (1998). Enforced TAL-1 expression stimulates primitive, erythroid and megakaryocytic progenitors but blocks the granulopoietic differentiation program. *Cancer Res.* 58, 562-569.

Van Eekelen,J.A.M., Bradley,C.K., Gothert,J.R., Robb,L., Elefanty,A.G., Begley,C.G., and Harvey,A.R. (2003). Expression pattern of the stem cell leukaemia gene in the CNS of the embryonic and adult mouse. *Neuroscience* 122, 421-436.

van Oostveen,J., Bijl,J., Raaphorst,F., Walboomers,J., and Meijer,C. (1999). The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* 13, 1675-1690.

Visvader,J., Begley,C.G., and Adams,J.M. (1991). Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene* 6, 187-194.

Visvader,J.E., Elefanty,A.G., Strasser,A., and Adams,J.M. (1992). GATA-1 but not SCL induces megakaryocytic differentiation in an early myeloid line. *EMBO J.* 11, 4557-4564.

Vyas,P., McDevitt,M.A., Cantor,A.B., Katz,S.G., Fujiwara,Y., and Orkin,S.H. (1999). Different sequence requirements for expression in erythroid and megakaryocytic cells within a regulatory element upstream of the GATA-1 gene. *Development* 126, 2799-2811.

Wadman,I.A., Hsu,H.L., Cobb,M.H., and Baer,R. (1994). The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene* 9, 3713-3716.

Warren,L.A. and Rothenberg,E.V. (2003). Regulatory coding of lymphoid lineage choice by hematopoietic transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 166-175.

Weintraub,H., Davis,R., Tapscott,S., Thayer,M., Krause,M., Benezra,R., Blackwell,T.K., Turner,D., Rupp,R., Hollenberg,S., and . (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251, 761-766.

Weiss,M.J., Keller,G., and Orkin,S.H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* 8, 1184-1197.

Weiss,M.J. and Orkin,S.H. (1995). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9623-9627.

Wilson,D.S., Sheng,G., Jun,S., and Desplan,C. (1996). Conservation and diversification in homeodomain-DNA interactions: a comparative genetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 6886-6891.

Wolberger,C., Vershon,A.K., Liu,B., Johnson,A.D., and Pabo,C.O. (1991). Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* 67, 517-528.

Xu,Z., Huang,S., Chang,L.S., Agulnick,A.D., and Brandt,S.J. (2003). Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol. Cell Biol.* 23, 7585-7599.

Yamamoto,S., Hikasa,H., Ono,H., and Taira,M. (2003). Molecular link in the sequential induction of the Spemann organizer: direct activation of the cerberus gene by Xlim-1, Xotx2, Mix.1, and Siamois, immediately downstream from Nodal and Wnt signaling. *Developmental Biology* 257, 190-204.

Zappavigna,V., Sartori,D., and Mavilio,F. (1994). Specificity of HOX protein function depends on DNA-protein and protein-protein interactions, both mediated by the homeo domain. *Genes Dev.* 8, 732-744.

Zhang,H., Hu,G., Wang,H., Sciavolino,P., Iler,N., Shen,M.M., and Abate-Shen,C. (1997). Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol. Cell Biol.* 17, 2920-2932.

Zhang,Y., Miki,T., Iwanaga,T., Koseki,Y., Okuno,M., Sunaga,Y., Ozaki,N., Yano,H., Koseki,H., and Seino,S. (2002). Identification, tissue expression, and functional characterization of Otx3, a novel member of the Otx family. *J. Biol. Chem.* 277, 28065-28069.

Zhu,J. and Emerson,S.G. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21, 3295-3313.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Dr Trang Hoang, qui a su bien m'orienter dans mon projet de recherche tout en me laissant une grande liberté pour apprendre par moi-même.

J'aimerais spécialement remercier Richard qui a été un excellent "coach" tout le long de ma maîtrise et sans qui l'aboutissement du "papier Otx" n'aurait certainement pas vu le jour de si tôt.

Je voudrais aussi remercier mon bon ami Mathieu avec qui j'ai commencé ma maîtrise et qui a toujours été là pour m'aider, m'écouter, m'encourager, me guider et même corriger mes travaux et mon mémoire.

Merci à tous mes amis du laboratoire avec qui ce fut un plaisir de travailler et de prendre des bières. Une aussi bonne ambiance de travail sera difficile à retrouver.

Je tiens à remercier Brigitte qui m'a bien orientée dans l'écriture de ce mémoire et qui m'a permis de déstresser en me trouvant un emploi juste à point pour la fin de ma maîtrise.

Je veux finalement remercier ma mère, mon père, mon chum et tous mes amis pour m'avoir encouragée, écoutée et supportée malgré mes bas et mes hauts durant toutes mes études.

