

Université de Montréal

**Impact de SRP72 sur le facteur de transcription ETV6  
dans la leucémie aiguë lymphoblastique**

par Claire Fuchs

Département de biochimie et médecine moléculaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise universitaire en sciences (M. Sc.)  
en Biochimie  
option Génomique humaine

juillet 2018

© Claire Fuchs, 2018

## Résumé

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est le cancer pédiatrique le plus répandu et demeure une cause importante de décès infantiles. Les mécanismes d'initiation de cette maladie génétique complexe restent toutefois à éclaircir. Chez 25 % des patients LAL, le gène *ETV6* est inactivé à la suite de la translocation t(12;21) et à la délétion subséquente de l'allèle résiduel. La perte de fonction d'*ETV6* pourrait donc être un événement à l'origine de la maladie.

*ETV6* est un répresseur transcriptionnel impliqué dans l'hématopoïèse et exprimé de façon ubiquitaire. Son action est dépendante de plusieurs gènes, mais peu d'entre eux sont connus. Par le biais d'un criblage shRNA à haut débit, nous avons identifié plusieurs modulateurs d'*ETV6*, particulièrement SRP72. Cette protéine joue un rôle dans la traduction via le complexe SRP qui est responsable de la translocation des peptides nouvellement formés du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique. Parallèlement, SRP72 serait également impliqué dans la transcription par sa liaison à la chromatine. De plus, la protéine SRP9, un autre membre du complexe SRP, et le corépresseur CBX3, modulant *ETV6* de façon analogue à SRP72, ont été identifiés comme étant liés à *ETV6* en spectrométrie de masse. Les points communs de ces protéines avec SRP72 suggèrent une interaction physique potentielle entre ces trois modulateurs et *ETV6*. Cette étude vise à caractériser l'impact de SRP72 sur la modulation d'*ETV6*.

Premièrement, nous avons montré que l'inhibition du complexe SRP n'affectait pas la répression transcriptionnelle par *ETV6* suggérant que l'effet de SRP72 est indépendant de la traduction. Ensuite, nous avons étudié la liaison de SRP72 avec le complexe transcriptionnel *ETV6* par co-immunoprécipitation. Les résultats suggèrent une absence d'interaction physique entre les modulateurs potentiels et *ETV6* proposant que l'action de SRP72 se fasse plutôt au niveau de la chromatine et impacte la liaison à l'ADN d'*ETV6*. D'autre part, nous avons montré que l'activité d'*ETV6* reste inchangée en l'absence de SRP9 soutenant que la modulation d'*ETV6* est indépendante du complexe SRP. L'identification de partenaires transcriptionnels d'*ETV6* et la caractérisation de leur impact fonctionnel permettront d'approfondir nos connaissances sur l'origine et la progression de la LLA.

**Mots-clés :** cancer pédiatrique, leucémie aiguë lymphoblastique, facteur de transcription *ETV6*, régulation transcriptionnelle, SRP72, complexe SRP, co-immunoprécipitation.

## Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer and is an important cause of childhood mortality. ALL is a complex genetic disease whose causes remain unclear. In 25% of ALL patients, the *ETV6* gene is inactivated due to t(12;21) translocation followed by deletion of the residual allele. Thus, *ETV6* loss of function might be a constitutive event in ALL development.

*ETV6* is a transcriptional repressor implicated in hematopoiesis and ubiquitously expressed. Its activity depends on several genes but only a few of them are known. We used a high throughput shRNA screen to identify potential *ETV6* modulators including *SRP72*. This protein plays a role in translation through the SRP complex, which is implicated in peptides translocation from cytoplasm to endoplasmic reticulum. Additionally, *SRP72* is potentially implicated in the transcription through its chromatin binding property. Moreover, *SRP9*, another member of the SRP complex, and *CBX3*, which modulate *ETV6* in a similar way to *SRP72*, have been shown by mass spectrometry to bind *ETV6*. The similarities between these two proteins and *SRP72* suggest a physical interaction between these three modulators and *ETV6*. The aim of this study is to characterize the impact of *SRP72* on *ETV6* modulation.

First, we showed that inhibition of the SRP complex doesn't affect transcriptional repression by *ETV6* suggesting that *SRP72* impacts independent from the translation pathway. Then, we investigated *SRP72* binding with the *ETV6* transcriptional complex using co-immunoprecipitation assays. The results suggest that there is no physical interaction between the potential modulators and *ETV6*, supporting that *SRP72* may rather have a role on chromatin and impacts *ETV6* DNA binding. Moreover, *ETV6* activity remains unchanged after *SRP9* silencing confirming that *ETV6* modulation is independent from the SRP complex. The identification of new transcriptional partners of *ETV6* and the characterization of their functional impact will shed light on the origin of ALL and its progression.

**Keywords:** pediatric cancer, acute lymphoblastic leukemia, *ETV6* transcription factor, transcriptional regulation, *SRP72*, SRP complex, co-immunoprecipitation.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. Les cancers pédiatriques.....	2
1.2. La leucémie.....	3
1.3. La leucémie aiguë lymphoblastique de cellules B précurseurs.....	5
1.3.1. Manifestations cliniques et traitement.....	5
1.3.2. Pronostic vital.....	6
1.3.3. Facteurs de risque.....	8
1.4. Les modifications génétiques dans la LAL.....	9
1.4.1. Le modèle en deux étapes.....	9
1.4.2. Altérations génétiques fréquentes.....	10
1.4.2.1. Translocations impliquant <i>ETV6</i> .....	13
1.4.2.2. La translocation t(12;21)(p13;q22).....	14
1.5. <i>ETV6</i> .....	16
1.5.1. Structure d' <i>ETV6</i> .....	16
1.5.2. Fonction d' <i>ETV6</i> .....	17
1.5.2.1. <i>ETV6</i> dans l'hématopoïèse.....	17
1.5.2.2. <i>ETV6</i> comme suppresseur de tumeur.....	18
1.5.3. <i>ETV6</i> dans la LAL.....	18
1.5.4. La régulation transcriptionnelle médiée par <i>ETV6</i> .....	19
1.5.4.1. Répression transcriptionnelle par <i>ETV6</i> .....	19
1.5.4.2. Les cibles d' <i>ETV6</i> .....	19
1.5.5. Modulation d' <i>ETV6</i> .....	20

1.5.5.1.	Localisation et régulation transcriptionnelle d' <i>ETV6</i> .....	20
1.5.5.2.	Régulation post-traductionnelle d' <i>ETV6</i> .....	20
1.6.	Hypothèse du projet .....	22
1.7.	Objectifs du projet.....	23
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....		24
2.1.	Mise en place des lignées cellulaires .....	25
2.1.1.	Culture cellulaire.....	25
2.1.1.1.	Cellules Reh.....	25
2.1.1.2.	Cellules HeLa.....	25
2.1.2.	Production de lentivirus .....	26
2.1.3.	Infection lentivirale .....	29
2.2.	Test à l'eeyarestatine I (ES1).....	29
2.2.1.	Approche expérimentale .....	29
2.2.2.	Traitement à l'ES1 .....	30
2.2.2.1.	Optimisation.....	30
2.2.2.2.	Protocoles finaux .....	31
2.2.3.	Épissage de XBP1.....	31
2.2.3.1.	Extraction d'ARN .....	31
2.2.3.2.	Transcription inverse .....	31
2.2.3.3.	Réaction de PCR.....	32
2.2.4.	Expression des cibles d' <i>ETV6</i> .....	33
2.3.	Co-immunoprécipitation.....	34
2.3.1.	Méthodes d'extraction protéique .....	34
2.3.1.1.	Extraction des protéines nucléaires.....	34
2.3.1.1.1.	Fraction cytoplasmique .....	34
2.3.1.1.2.	Fraction nucléaire.....	34
2.3.1.2.	Extraction des protéines totales .....	34
2.3.2.	Dosage des protéines.....	35
2.3.3.	Co-immunoprécipitation (Co-IP).....	35
2.3.4.	Immunobuvardage de type <i>Western</i> .....	37
2.3	Impact de SRP9.....	39

2.3.1. Répression du gène SRP9 par shRNA .....	39
2.3.2. Expression des cibles d'ETV6 .....	40
Chapitre 3 : Résultats .....	41
3.1. Résultats préliminaires.....	42
3.1.1. Identification de nouveaux modulateurs d'ETV6.....	42
3.1.2. Identification d'interactions protéiques directes avec ETV6.....	44
3.1.3. Données de patients .....	46
3.2. Expression d'ETV6 et ETV6-HA.....	47
3.3. Évaluation de l'indépendance du complexe SRP dans l'impact de SRP72 sur ETV6 .	
.....	50
3.3.1. Optimisation.....	51
3.3.2. Inhibition du complexe SRP avec 50µM d'ES1 .....	51
3.3.2.1. Efficacité du traitement à l'ES1 .....	51
3.3.2.2. Expression des cibles d'ETV6 .....	52
3.3.3. Inhibition du complexe SRP avec différentes doses d'ES1 .....	53
3.3.3.1. Efficacité du traitement à l'ES1 .....	53
3.3.3.2. Expression des cibles d'ETV6 .....	54
3.4. Étude de l'interaction physique entre SRP72 et ETV6.....	55
3.4.1. Optimisation dans les cellules HeLa.....	55
3.4.2. Validation dans les cellules Reh .....	56
3.5. Validation de l'impact de SRP9 sur l'action ETV6 par l'utilisation de shRNA .....	59
3.5.1. Choix des shRNA .....	59
3.5.2. Contrôle de l'efficacité des shRNA .....	60
3.5.3. Contrôle de l'expression des cibles d'ETV6 .....	60
Chapitre 4 : Discussion .....	62
4.1. SRP72, un nouveau modulateur d'ETV6.....	63
4.2. L'impact de SRP72 sur ETV6 est indépendant du complexe SRP.....	64
4.3. SRP72 ne semble pas former un complexe avec ETV6 .....	65
4.4. Proposition de modèles pour l'impact de SRP72 sur ETV6.....	67
4.4.1. Modèle A : SRP72 a un effet indirect sur ETV6 .....	67
4.4.2. Modèle B : SRP72 a un effet sur ETV6 par interaction directe.....	68

4.4.3.	Modèle C : SRP72 agit sur la production de la protéine ETV6.....	69
4.4.4.	Modèle D : SRP72 a un impact sur la chromatine permettant à ETV6 de se lier à l'ADN .....	69
Chapitre 5 : Conclusion et perspectives.....		71
Références.....		73
Annexes.....		81
Annexe A .....		82
Annexe B .....		85
Annexe C .....		86
Annexe D .....		87

## Liste des tableaux

Tableau I. Facteurs majeurs influençant le pronostic des enfants LAL.....	7
Tableau II. Principales altérations génétiques dans la LAL pré-B.....	12
Tableau III. Séquences des amorces de XBP1.....	32
Tableau IV. Paramètres de PCR utilisés pour chaque expérience. ....	32
Tableau V. Séquences des amorces utilisées pour la qPCR. ....	33
Tableau VI. Description des anticorps utilisés. ....	38
Tableau VII. Séquences des shRNA utilisés pour réprimer l'expression de SRP9. ....	39
Tableau VIII. Niveau de réexpression des cibles d'ETV6 après inhibition des gènes <i>AKIRIN1</i> , <i>COMMD9</i> , <i>DYRK4</i> , <i>JUNB</i> ou <i>SRP72</i> .....	44
Tableau IX. Analyse protéomique des protéines liées à ETV6. ....	45
Tableau X. Cibles potentielles d'ETV6 et leurs méthodes de validation. ....	82
Tableau XI. Expression relative des cibles d'ETV6 après répression de SRP72 et CBX3. ....	85

## Liste des figures

Figure 1. Distribution des nouveaux cas de cancer selon l'âge au Canada entre 2009 et 2013..	2
Figure 2. Schéma de l'hématopoïèse. ....	4
Figure 3. Distribution des types de leucémies au Canada entre 1992 et 2008.....	5
Figure 4. Évolution du taux de survie de patients LAL entre 1968 et 2009. ....	8
Figure 5. Modèle en deux étapes du développement de la LAL. ....	10
Figure 6. Illustration des différents partenaires de fusion d' <i>ETV6</i> . ....	13
Figure 7. Structure de la protéine de fusion <i>ETV6-RUNX1</i> . ....	14
Figure 8. Représentation schématique des domaines de la protéine <i>ETV6</i> et des exons correspondants. ....	17
Figure 9. Principe du système de production de lentivirus de troisième génération. ....	26
Figure 10. Plasmides de troisième génération utilisés pour la formation des lentivirus.....	27
Figure 11. Plasmides utilisés pour la surexpression d' <i>ETV6</i> et <i>ETV6-HA</i> .....	28
Figure 12. Représentation schématique de l'approche expérimentale.....	30
Figure 13. Principe de la co-immunoprécipitation. ....	36
Figure 14. Plasmides utilisés pour la répression de <i>SRP9</i> .....	40
Figure 15. Cartographie d'expression des cibles d' <i>ETV6</i> dans les échantillons shRNA.....	43
Figure 16. Données de notre cohorte de patients leucémiques.. ....	46
Figure 17. Expression relative d' <i>ETV6</i> (A) et <i>ETV6-HA</i> (B) dans les cellules Reh contrôlée par qPCR. ....	47
Figure 18. Expression relative d' <i>ETV6</i> (B) et <i>ETV6-HA</i> (C) dans les cellules Reh contrôlée par <i>Western</i> . ....	49
Figure 19. Expression relative d' <i>ETV6</i> (A) et <i>ETV6-HA</i> (B) dans les cellules HeLa contrôlée par qPCR. ....	50
Figure 20. Contrôle de l'épissage de <i>XBPI</i> sous différentes conditions de traitement à l'ES1.51	
Figure 21. Contrôle de l'épissage de <i>XBPI</i> après traitement à 50µM d'ES1. ....	52
Figure 22. Expression des cibles d' <i>ETV6</i> pour 50µM d'ES1. ....	53
Figure 23. Contrôle de l'épissage de <i>XBPI</i> après traitement à différentes doses d'ES1.....	54
Figure 24. Expression des cibles d' <i>ETV6</i> pour différentes doses d'ES1. ....	55
Figure 25. Co-IP d' <i>ETV6-HA</i> dans les cellules HeLa. ....	56

Figure 26. Co-IP d'ETV6-HA dans les cellules Reh. ....	58
Figure 27. Expression relative de <i>SRP9</i> pour chaque shRNA. ....	59
Figure 28. Expression relative de <i>SRP9</i> pour les deux meilleurs shRNA. ....	60
Figure 29. Expression des cibles d'ETV6 après inhibition de <i>SRP9</i> . ....	61
Figure 30. Structure du complexe SRP.....	66
Figure 31. Modèles expliquant l'impact de SRP72 sur ETV6.....	67
Figure 32. Résultats complémentaires de l'analyse au Bioanalyzer.....	86
Figure 33. Niveau d'expression d'ETV6 après inhibition de SRP72 dans les cellules Reh.....	87

## Liste des abréviations

ADNc : ADN complémentaire

BSA : *bovine serum albumin*, albumine de sérum bovin

CEB : *cytoplasm extraction buffer*, tampon d'extraction des protéines cytoplasmiques

ChIP-seq : *chromatin immuno-precipitation followed by sequencing*, immunoprécipitation de la chromatine suivie par séquençage

CSH-CT : cellule souche hématopoïétique à court terme

CSH-LT : cellule souche hématopoïétique à long terme

Co-IP : co-immunoprécipitation

DMSO : diméthylsulfoxyde

dNTP : désoxynucléotides triphosphate

DTT : dithiothreitol

ECL : *enhanced chemiluminescence*, chemiluminescence amplifiée

EMSA : *electrophoretic mobility shift assays*, retard sur gel

ES1: eeyarestatine I

ETS : *E26 Transformation-Specific*

FBS : *fetal bovine serum*, sérum fœtal bovin

FPKM : *Fragments per kilobase million*, fragments par million de kilobase

FRET : *Förster resonance energy transfer*, transfert d'énergie par résonance de type Förster

HLH : *helix-loop-helix domain*, domaine d'interaction protéique d'ETV6 en hélice-boucle-hélice (autre nom : PNT)

IN: *input*, ensemble des protéines avant co-immunoprécipitation

IP : immunoprécipitation

LAL : leucémie aiguë lymphoblastique

MRM : maladie résiduelle minimale

NEB: *nuclear extraction buffer*, tampon d'extraction des protéines nucléaires

NK : *natural killer*, tueur naturel

pb : paire de bases

PBS : *phosphate-buffered saline*, tampon phosphate salin

PCR : *polymerase chain reaction*, réaction en chaîne par polymérase

PGM : progéniteur granulocytaire-monocytaire  
Ph-like : *Philadelphia chromosome-like*, ressemblance au chromosome de Philadelphie  
PLC : progéniteur lymphoïde commun multipotent  
PMC : progéniteur myéloïde commun multipotent  
PME : progéniteur mégacaryocytaire-érythroïde  
PNT : *pointed domain* domaine d'interaction protéique d'ETV6 (autre nom : HLH)  
qPCR : *quantitative real-time PCR*, PCR quantitative en temps réel  
RIME : *Rapid immunoprecipitation mass spectrometry*, immunoprécipitation rapide de spectrométrie de masse  
RT-PCR : *reverse transcription PCR*, PCR par transcription inverse  
*shRNA* : *short hairpin RNA*, petits ARN en épingle à cheveux  
SRP : *signal recognition particule*, particule de reconnaissance du signal  
TBS: *tris-buffered saline*, solution saline de tampon Tris  
UN: *unbound*, protéines non capturées lors de la co-immunoprécipitation  
UPR : *unfolded protein response*, réponse de la cellule à l'accumulation de protéines mal repliées  
WT : *wild type*, phénotype sauvage  
XBP1u : XBP1 *unspliced*, transcrit non épissé de XBP1  
XBP1s : XBP1 *spliced*, transcrit épissé XBP1

## Remerciements

Je remercie en premier lieu mon directeur de recherche, le Dr Daniel Sinnett, de m'avoir fait confiance en me permettant de réaliser mon projet de maîtrise dans son laboratoire.

Je remercie tout particulièrement Benjamin sans qui mon projet n'aurait pas vu le jour. Je suis profondément reconnaissante de sa disponibilité et son soutien dans chaque étape du projet, de son talent pour expliquer simplement les concepts les plus complexes et finalement de la passion qu'il m'a transmise pour mon travail de recherche.

Un très grand merci à Pauline qui a grandement contribué au projet et m'a épaulée au quotidien. Je souligne principalement sa bonne humeur, sa patience et sa rigueur constante qui m'ont offert une formation de qualité.

Je remercie vivement Chantal pour sa disponibilité, son optimisme inébranlable et ses bonnes idées qui ont poussé mon projet plus loin. Merci à Sylvie pour ses nombreux conseils pratiques et sa joie de vivre dans le laboratoire. Merci à Manon pour son efficacité dans la prise des commandes qui fait le bonheur de tous. Un grand merci à Fida pour son aide très précieuse dans la rédaction de mon mémoire et son soutien moral dans la dernière ligne droite. Je remercie spécialement Anne-Marie pour nos discussions, scientifiques ou non, qui ont illuminé mes journées au laboratoire. Merci à Simon, pour sa disponibilité, son sens de l'humour et ses conseils précieux. Merci aux membres de l'équipe bioinformatique qui ont contribué de près ou de loin à mon projet. Merci à Jasmine et Alain pour la relecture de mes textes en anglais. Merci à Alexandre, Romain, Lucas, Thomas et Myriam pour les pauses lunch plus que divertissantes. Merci à Camille pour son aide à mon arrivée.

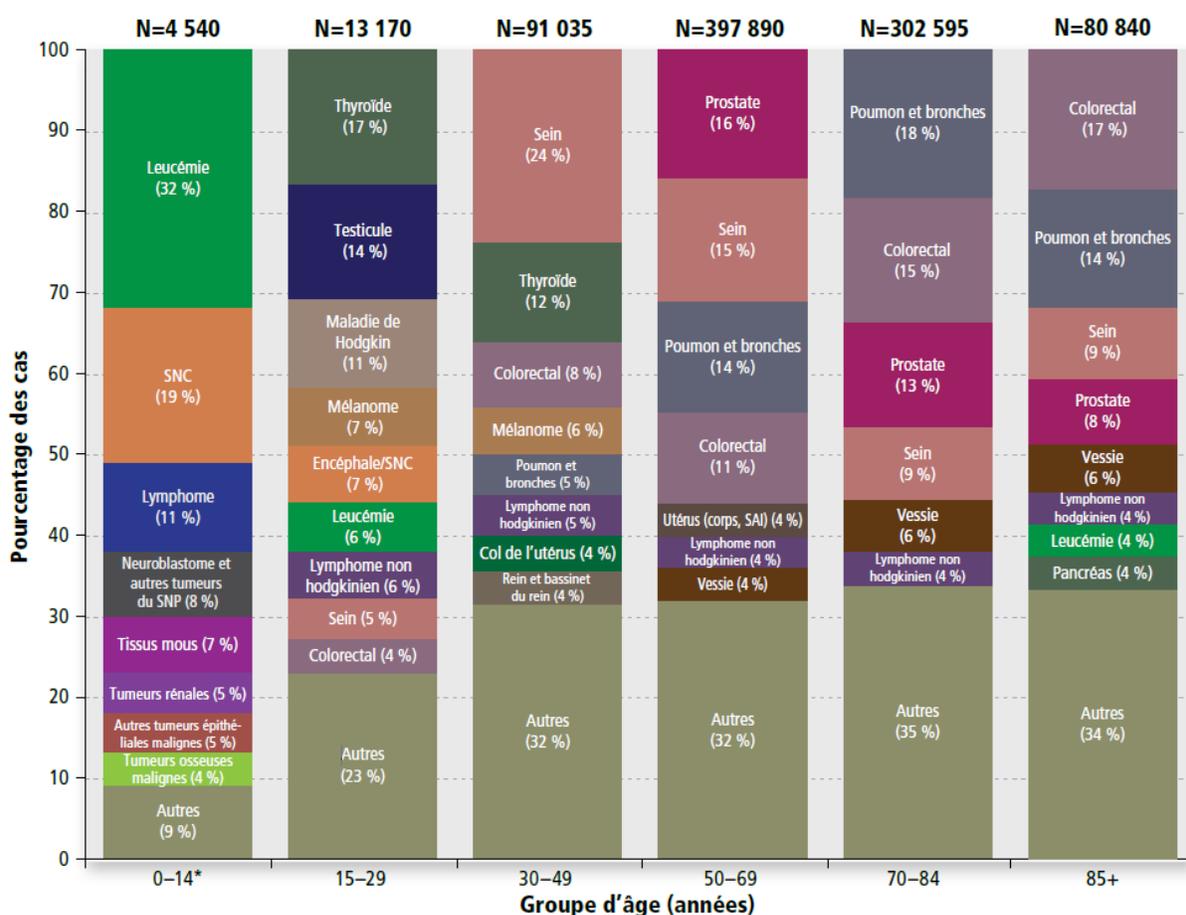
Je remercie le Dr Stéphane Gobeil du CHU de Québec-Université Laval pour sa contribution au projet.

Enfin, un immense merci à mes parents, à Louise, Éloi et Élodie qui ont partagé mes joies, m'ont soutenue sans relâche dans les périodes les plus difficiles et ce, malgré la distance.

# **Chapitre 1 : Introduction**

## 1.1. Les cancers pédiatriques

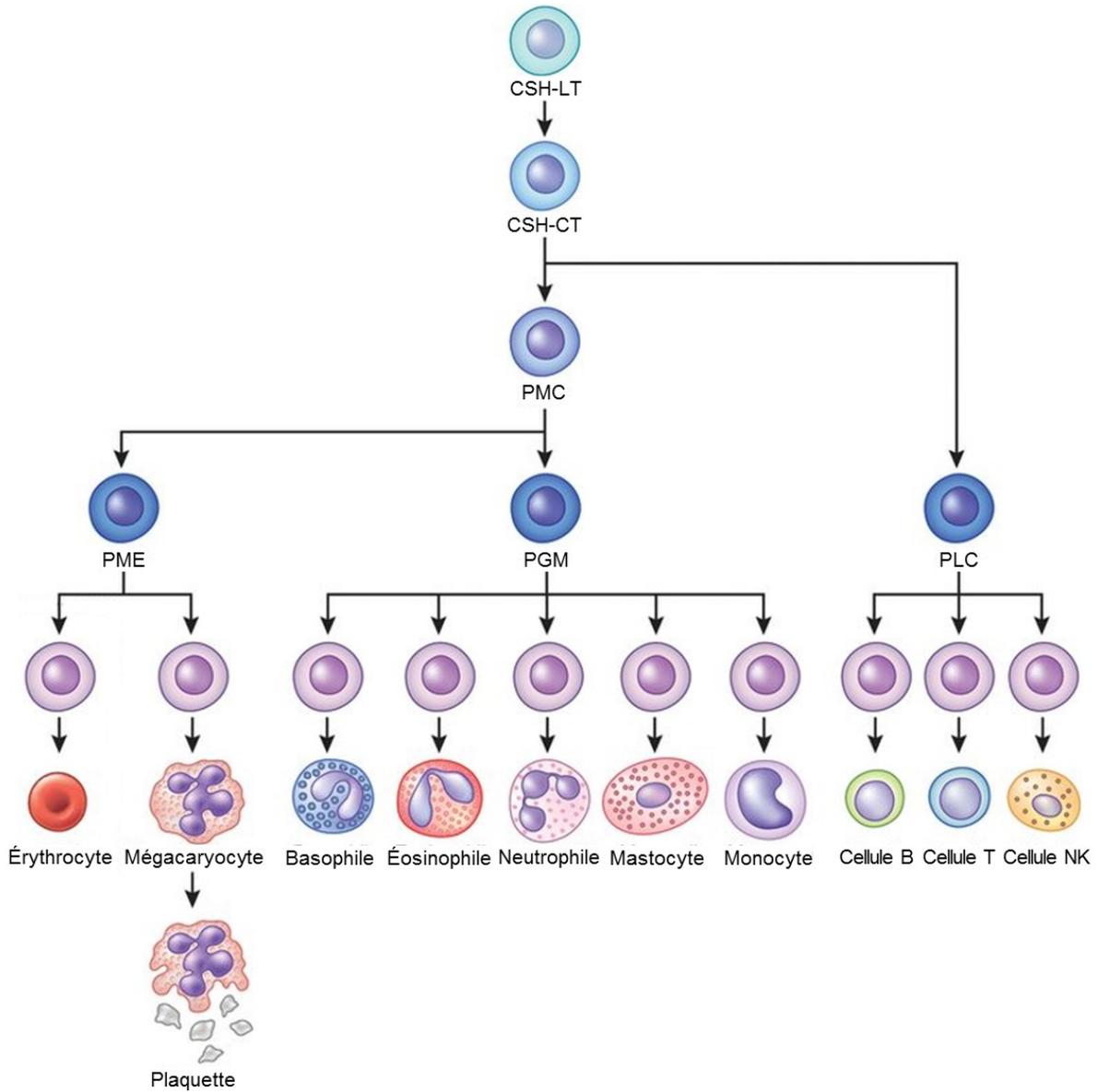
Selon les statistiques, près de la moitié des Canadiens seront touchés par le cancer au cours de leur vie et cette maladie est la principale cause de décès au Canada [1]. Le cancer pédiatrique représente moins de 1 % des nouveaux cas de cancer, toutes classes d'âges confondues. Les types de cancers observés sont très variables entre les enfants et les adultes (Figure 1) [1]. La leucémie est le cancer pédiatrique le plus fréquent, représentant 32 % des nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Le taux de survie après 5 ans chez l'enfant est de 83 %. Le cancer du cerveau et du système nerveux central (35 %) représente la principale cause de décès dû au cancer chez les enfants, suivie par la leucémie (25 %).



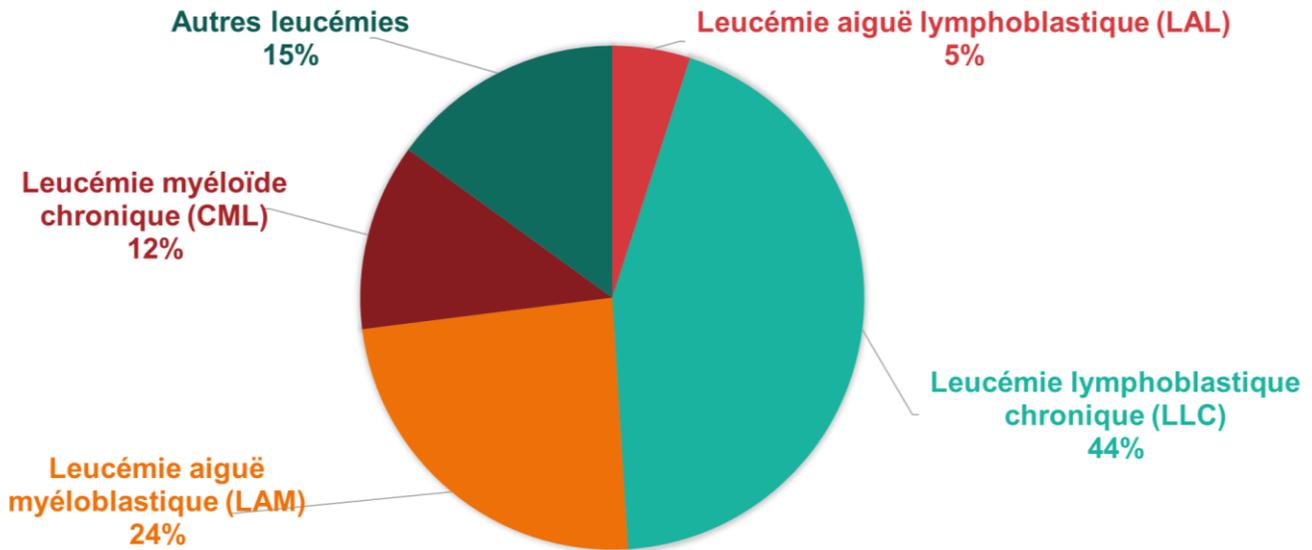
**Figure 1. Distribution des nouveaux cas de cancer selon l'âge au Canada entre 2009 et 2013.** \* Les cancers chez l'enfant (0 à 14 ans) sont classés selon la classification internationale des maladies de l'enfant (ICCC). Figure reproduite de *Statistiques canadiennes sur le cancer 2017* [1].

## 1.2. La leucémie

La leucémie est une maladie touchant le mécanisme de production des cellules du sang dans la moelle osseuse, c'est-à-dire l'hématopoïèse (Figure 2). Chez les individus sains, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en deux types cellulaires majeurs : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. Ensuite, les cellules myéloïdes progénitrices se différencient en globules rouges, plaquettes, granulocytes et monocytes et parallèlement, les cellules lymphoïdes précurseurs se différencient en lymphocytes B et T et en cellules *natural killer* (NK). Chez les patients leucémiques, l'hématopoïèse est interrompue, conduisant à une expansion clonale de cellules peu différenciées. Les leucémies sont divisées en deux grandes familles selon le type cellulaire atteint (myéloïdes ou lymphoïdes) et également selon la vitesse d'apparition des symptômes [2]. La leucémie aiguë est caractérisée par une accumulation rapide de cellules peu différenciées, appelées blastes, alors que la leucémie chronique, à évolution plus lente, implique des cellules plus matures. La leucémie lymphoblastique chronique est la plus fréquente au Canada (Figure 3) [3]. Les leucémies de type lymphoblastique peuvent affecter, soit les cellules T, soit les cellules B. La leucémie de type T est plus agressive, mais dans 85 % des cas la différenciation des cellules B est touchée [4]. Mes travaux ont porté sur la leucémie aiguë lymphoblastique de cellules B.



**Figure 2. Schéma de l'hématopoïèse.** CSH-LT : cellule souche hématopoïétique à long terme ; CSH-CT : cellule souche hématopoïétique à court terme ; PMC : progéniteur myéloïde commun multipotent ; PLC : progéniteur lymphoïde commun multipotent ; PME : progéniteur mégacaryocytaire-érythroïde ; PGM : progéniteur granulocytaire-monocytaire ; NK : *natural killer*. Figure adaptée de Sankaran et Weiss, 2015 [5].



**Figure 3. Distribution des types de leucémies au Canada entre 1992 et 2008.** Figure adaptée de *Statistiques canadiennes sur le cancer 2016* [3].

### **1.3. La leucémie aiguë lymphoblastique de cellules B précurseurs**

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est le sous-type de leucémie le plus répandu chez les enfants. Dans la majorité des LAL, un arrêt sélectif de la différenciation cellulaire est observé à un niveau précoce de la maturation des lymphocytes B, conduisant à une accumulation anormale de cellules B précurseurs (pré-B). En effet, la maturation des cellules B implique différents facteurs de transcription, tels que E2A, IKZF1, EBF1 et Pax5, qui sont inactivés chez les patients leucémiques [6, 7].

#### **1.3.1. Manifestations cliniques et traitement**

La LAL se manifeste premièrement par des anomalies du sang telles que l’anémie (faible taux de globules rouges), la thrombocytopénie (faible taux de plaquettes) et la leucopénie (faible taux de leucocytes) [8]. Cela engendre l’apparition d’autres symptômes comme de la fatigue, des maux de tête et des saignements. Des troubles musculosquelettiques sont également observés chez les enfants atteints.

Une fois le diagnostic confirmé, les patients LAL sont soumis à un traitement comportant traditionnellement 3 phases, dont l'intensité est adaptée en fonction du pronostic de guérison du patient (voir section 1.3.2). En effet, la dose minimale la plus efficace est administrée au patient pour limiter les effets secondaires du traitement. La première phase est l'induction. D'une durée de 4 à 6 semaines, elle vise à éradiquer les cellules leucémiques de la moelle osseuse du patient en utilisant un traitement de chimiothérapie composé généralement de glucocorticoïdes (prednisone, prednisolone ou dexaméthasone), de vincristine, d'asparaginase ou d'anthracyclines (doxorubicine ou daunorubicine) [9]. La deuxième étape, l'intensification, est délivrée une dizaine de jours après la phase d'induction et permet d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles. Ce deuxième temps, pendant lequel le patient subit un traitement plus intensif (forte dose de méthotrexate et d'asparaginase), dure entre 6 et 8 mois. Enfin, la maintenance est une période pouvant durer jusqu'à 2 ans pendant laquelle le patient suivra un traitement plus léger sur une base régulière pour prévenir la rechute. La chimiothérapie peut être combinée à de la radiothérapie et, pour les patients ayant un mauvais pronostic et ceux qui rechutent, à une greffe de moelle osseuse. L'utilisation de l'immunothérapie dans le traitement de la LAL, particulièrement les rechutes, est en élaboration. Principalement, les anticorps anti-CD19 sont utilisés pour activer les cellules T qui vont cibler et détruire les lymphoblastes B [10-12]. Cette alternative permettrait de limiter l'impact des effets secondaires parfois sévères des traitements actuels comme la nécrose des articulations, l'obésité, les problèmes cardiovasculaires et neuraux [13].

### **1.3.2. Pronostic vital**

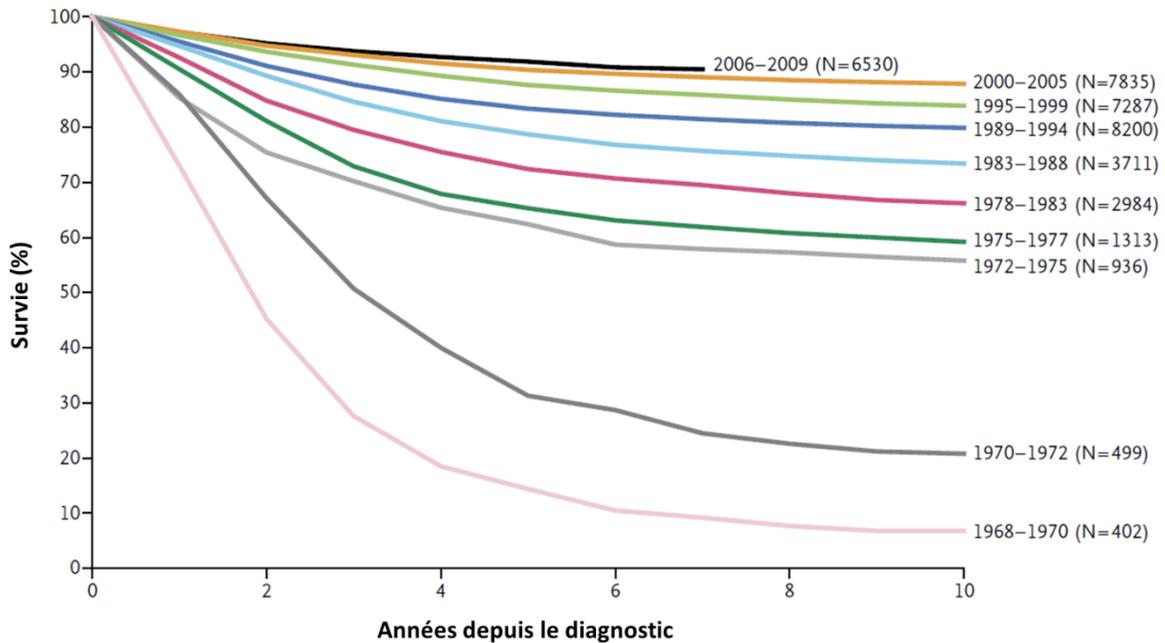
Différents facteurs cliniques et biologiques influencent le pronostic de guérison du patient, entre autres l'origine ethnique, l'âge, le taux de globules blancs au diagnostic, les malformations cytogénétiques observées et la qualité de la réponse au traitement (Tableau I) [13]. Différentes modifications génétiques pourraient aider à prévoir la réponse au traitement et le risque de rechute et sont appelées à être utilisées davantage lors du diagnostic [4, 14]. L'optimisation des traitements a permis d'améliorer le taux de guérison des patients LAL de près de 80 % au cours des 50 dernières années (Figure 4). Cependant, on peut compter près de 20 % des patients qui traversent une ou plusieurs rechutes dans les 5 années après le premier traitement [8]. Comme tous les cancers, la leucémie est génétiquement polyclonale au

diagnostic, c'est-à-dire que les cellules cancéreuses ne sont pas toutes génétiquement identiques entre elles, mais possèdent des altérations différentes. La rechute a lieu lorsqu'un ou plusieurs clones résistent au traitement et font réapparaître la maladie. Dans des cas plus rares, la rechute est due à une nouvelle altération génétique qui va donner naissance à une « nouvelle leucémie » [4, 13, 15].

**Tableau I. Facteurs majeurs influençant le pronostic des enfants LAL.**

VARIABLES	FACTEURS FAVORABLES	FACTEURS NON FAVORABLES
<b>Âge</b>	1 à 10 ans	< 1 an ou ≥ 10 ans
<b>Sexe</b>	Féminin	Masculin
<b>Race ou groupe ethnique</b>	Blanc, asiatique	Noir, amérindien, hispanique
<b>Compte initial de globules blancs</b>	< 50 000/mm <sup>3</sup>	≥ 50 000/mm <sup>3</sup>
<b>Immunophénotype</b>	Cellules B	Cellules T
<b>Caractéristiques cytogénétiques</b>	<i>ETV6-RUNX1</i> , hyperdiploïdie, trisomies favorables	<i>BCR-ABL1</i> , réarrangement de <i>MLL</i> , hypodiploïdie
<b>Caractéristiques génomiques</b>	Délétions d' <i>ERG</i>	Délétions ou mutations d' <i>IKZF1</i> , LAL Ph-like
<b>Réponse au traitement :</b>		
<b>Réponse après une semaine de traitement au glucocorticoïde</b>	Bonne réponse à la prednisone (< 1000 blastes/mm <sup>3</sup> )	Mauvaise réponse à la prednisone (≥ 1000 blastes/mm <sup>3</sup> )
<b>Blastes dans la moelle après 1-2 semaines de thérapie</b>	< 5 % de blastes au jour 8 ou 15	≥ 5 % de blastes au jour 8 ou 15
<b>MRM pendant ou après l'induction</b>	MRM < 0,01 % ou indétectable	Persistance de MRM ≥ 0,01 %
<b>MRM à 3-4 mois</b>	MRM < 0,01 % ou indétectable	Persistance de MRM ≥ 0,01 %

Ph-like : *Philadelphia chromosome-like* ; MRM : maladie résiduelle minimale. Tableau adapté de Hunger et Mullighan, 2015 [13]



**Figure 4. Évolution du taux de survie de patients LAL entre 1968 et 2009.** Patients des études *Children's Cancer Group* et *Children's Oncology Group*. Dans les années 70, moins de 10 % des patients étaient encore en vie 10 ans après le diagnostic alors que ce taux atteint 90 % après 2000. Figure adaptée de Hunger et Mullighan, 2015 [13].

### 1.3.3. Facteurs de risque

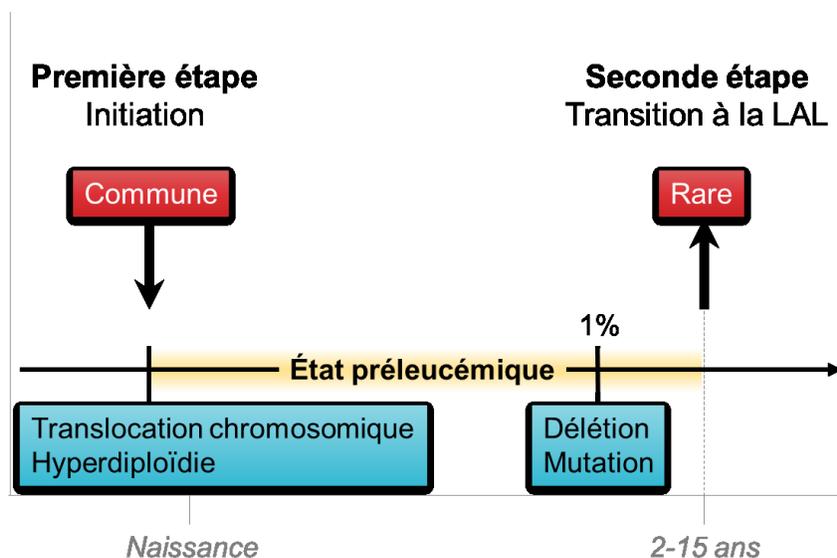
Les enfants étant moins soumis aux conditions environnementales que les adultes, peu de facteurs externes ont été associés à la leucémie pédiatrique. Quelques études épidémiologiques suggèrent que l'exposition aux radiations ionisantes (rayons X, radiothérapie) et à certains agents chimiques (pesticides, hydrocarbures) ainsi que la consommation d'alcool, de tabac et une mauvaise alimentation de la mère pendant la grossesse pourraient accroître le risque de leucémie aiguë [16]. D'autre part, deux modèles se joignent pour proposer que l'exposition aux infections et une réponse immunitaire anormale puissent avoir une incidence sur le risque de développer la leucémie [17]. Selon le premier modèle, un enfant qui ne serait pas suffisamment exposé aux infections communes aurait un réseau immunitaire insuffisant pouvant favoriser l'apparition de la LAL. La seconde proposition se base sur le modèle à deux étapes (voir section 1.4.1) et suggère qu'une réponse immunitaire anormale pourrait promouvoir

le second événement mutationnel qui est nécessaire au développement de la LAL. D'autre part, de nombreuses études à l'échelle du génome ont pu mettre en évidence des polymorphismes génétiques associés à un risque accru de leucémogénèse et à une mauvaise réponse au traitement, comme des mutations dans les gènes du métabolisme des carcinogènes ou du folate [18-21].

## **1.4. Les modifications génétiques dans la LAL**

### **1.4.1. Le modèle en deux étapes**

Étant donné l'âge précoce d'apparition de la maladie, une origine prénatale est envisagée. Certains réarrangements apparaissant *in utero* sont causatifs de la maladie comme la translocation t(4;11)(q21;q23) conduisant à la fusion KMT2A-AFF1 [22]. En revanche, des modifications génétiques additionnelles postnatales peuvent être requises chez certains patients pour le développement du cancer [23]. L'apparition de la maladie suit alors un modèle en deux étapes présenté à la Figure 5 [24]. C'est notamment le cas de la translocation t(12;21) fréquente dans la LAL (voir section 1.4.2.2). D'autre part, diverses altérations génétiques postnatales peuvent conduire à la leucémogénèse [25-27].



**Figure 5. Modèle en deux étapes du développement de la LAL.** L'apparition d'une modification génétique, telle qu'une translocation chromosomique ou hyperdiploïdie, lors du développement embryonnaire constitue la première étape d'initiation de la LAL. Il s'en suit une phase préleucémique asymptomatique. Dans certains cas, un deuxième événement, principalement une délétion ou une mutation ponctuelle, est nécessaire au développement complet de la maladie. Cette deuxième modification génétique, arrivant après la naissance, est beaucoup plus rare que la première et va déclencher l'apparition des symptômes. Figure adaptée de Greaves M., 2006 [24].

### 1.4.2. Altérations génétiques fréquentes

Les altérations génétiques pouvant conduire au développement de la LAL pré-B sont nombreuses : aneuploïdie, réarrangements chromosomiques, mutations ponctuelles (Tableau II) [4, 28].

Près de la moitié des patients sont porteurs d'une translocation chromosomique, la plus commune étant la translocation  $t(12;21)(p13;q22)$ . Exclusivement associée à la leucémie de type pré-B, elle est présente chez 20 % à 25 % des patients [29]. L'hyperdiploïdie est également fortement représentée avec 20 à 25 % des patients pédiatriques porteurs [30]. En revanche, chez l'adulte la fusion *BCR-ABL1*, aussi appelée chromosome de Philadelphie, est présente majoritairement [31] et les réarrangements de *KMT2A* sont retrouvés principalement chez les patients de moins de 1 an [32].

Les translocations chromosomiques retrouvées dans les maladies hématopoïétiques comme la LAL sont souvent équilibrées ou réciproques c'est-à-dire qu'aucun matériel génétique n'est gagné ou perdu [33]. Ce type de recombinaisons peut conduire à deux phénomènes distincts. Le premier est la dérégulation de l'expression d'un proto-oncogène par sa relocalisation dans une région active du génome. L'association avec un promoteur actif conduit à l'expression aberrante du gène recombiné, comme c'est le cas pour le facteur de transcription *TALI* chez des patients de LAL de cellules T ou pour le gène *CRLF2* dans la LAL pré-B [34, 35]. Le deuxième est la juxtaposition de deux gènes qui conduit à l'expression d'une protéine de fusion chimérique possédant des propriétés différentes de celles des protéines sauvages normalement codées par les gènes impliqués. Majoritairement, la transcription est dérégulée à la suite de la recombinaison d'un facteur de transcription. Par exemple, la translocation t(12;21) met en jeu les facteurs de transcription *ETV6* et *RUNX1*[29]. Parfois, des protéines kinases sont impliquées, comme *ABL1* qui est souvent touché par un réarrangement dans la LAL pré-B (Tableau II).

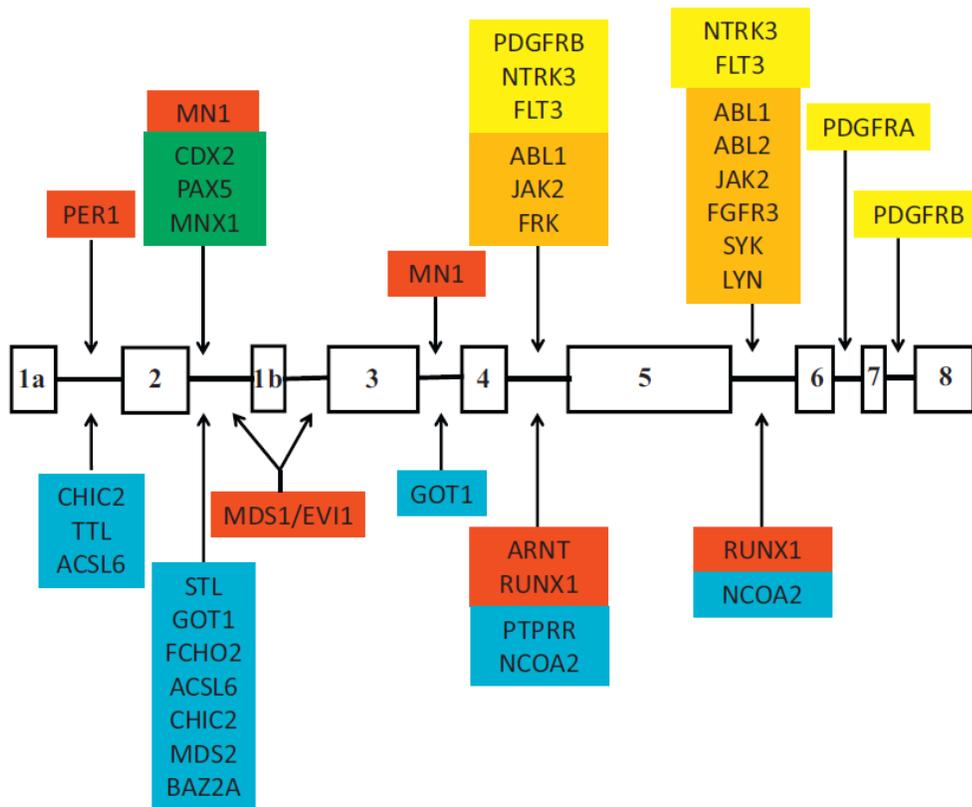
**Tableau II. Principales altérations génétiques dans la LAL pré-B.**

TYPE DE RÉARRANGEMENT	ALTÉRATIONS	FRÉQUENCE DANS LA LAL
<b>Aneuploïdie</b>		
Hyperdiploïdie (>50 chromosomes)		25 %
Hypodiploïdie (<44 chromosomes)	Haploïdie proche (24-31 chromosomes)	1-2 %
	Faible hypodiploïdie (32-39 chromosomes)	
<b>Translocations chromosomiques</b>		
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)</i>	20 %
t(1;19)(q23;p13.1)	<i>TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)</i>	4 %
t(17;19)(q22;p13)	<i>TCF3-HLF</i>	<0,5 %
<b>Réarrangements de <i>KMT2A</i> (MLL)</b>		5-6 %
t(1;11)(q21;q23)	<i>KMT2A-MLLT11</i>	
t(4;11)(q21;q23)	<i>KMT2A-AFF1 (AF4)</i>	
t(9;11)(p22;q23)	<i>KMT2A-MLLT3 (AF9)</i>	
t(10;11)(p12;q23)	<i>KMT2A-AF10</i>	
t(11;19)(q23;p13.3)	<i>KMT2A-ENL</i>	
t(9;22)(q34;q11.2)	<i>BCR-ABL1</i>	3-5 %
<b>Autre</b>		
iAMP21	Copies multiples de <i>RUNX1</i>	2 %
LAL associée à la trisomie 21	<i>P2RY8-CRLF2</i> , mutations dans <i>JAK2</i>	
Ph-like	<i>IGH-CRLF2, P2RY8-CRLF2</i>	7-8 %
	Réarrangements de <i>ABL1, ABL2, CSF1R, PDGFRB</i>	5-6 %
	Réarrangements de <i>JAK2</i> et <i>EPOR</i>	2 %
Délétion d' <i>ERG</i>		3 %

MLL : *mixed-lineage leukemia*; Ph-like : *Philadelphia chromosome-like*. Tableau adapté de Tasian *et al.*, 2015 [4].

### 1.4.2.1. Translocations impliquant *ETV6*

On recense aujourd'hui près de 50 translocations impliquant le gène *ETV6* et cela avec 30 partenaires de fusion différents (Figure 6) [36]. Ces remaniements ont un impact différent en fonction des domaines d'*ETV6* retrouvés dans la protéine de fusion [37]. Dans le cas où seul le domaine de répression serait impliqué, le partenaire de fusion est transformé en répresseur transcriptionnel ou, inversement, *ETV6* devient un activateur transcriptionnel. Si le domaine de répression et le domaine de liaison à l'ADN d'*ETV6* sont impliqués, la protéine chimérique dérégule à la fois l'activité d'*ETV6* et celle du partenaire de fusion. Enfin, si le promoteur d'*ETV6* est impliqué, l'expression dérégulée du partenaire de fusion ou d'un gène voisin peut contribuer à la leucémogénèse.

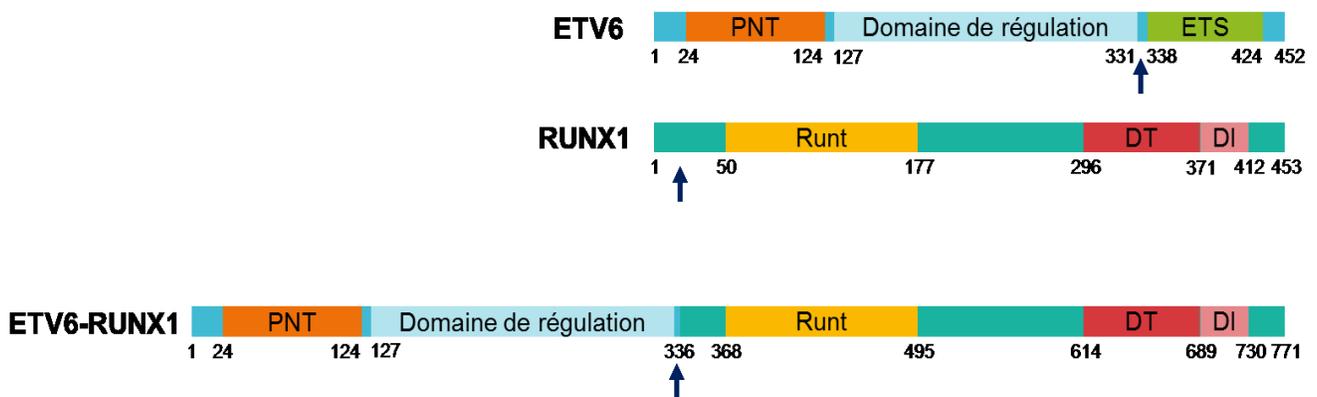


**Figure 6. Illustration des différents partenaires de fusion d'*ETV6*.** Les exons d'*ETV6* sont représentés par les boîtes blanches numérotées. Boîtes jaunes : gènes codants pour des récepteurs tyrosine-kinases ; boîtes orange : gènes codants pour des protéines tyrosine-kinases non réceptrices ; boîtes rouges : gènes codants pour des facteurs de transcription ; boîtes vertes : gènes homéotiques (*homeobox*); boîtes bleues : autres gènes. Figure reproduite de De Braekeleer et al., 2012 [36].

### 1.4.2.2. La translocation t(12;21)(p13;q22)

La translocation t(12;21)(p13;q22) est le réarrangement chromosomique le plus fréquemment retrouvé chez les patients LAL pré-B et représente 20-25 % des patients atteints. Elle est rare chez les patients LAL de cellules T et absente dans les leucémies myéloïdes. Lorsque retrouvée chez les patients, cette anomalie génétique est habituellement associée à un bon pronostic. Le remaniement conduit à la formation d'une protéine de fusion impliquant les gènes *ETV6* et *RUNX1*, deux facteurs de transcription clef dans l'hématopoïèse [29, 38-40].

La fusion est constituée du domaine de liaison à l'ADN de *RUNX1* ainsi que des domaines de modulation transcriptionnelle des deux protéines (Figure 7) [41]. Le domaine de liaison à l'ADN d'*ETV6* n'est pas retrouvé dans la protéine de fusion. La protéine chimérique se fixe donc sur les cibles de *RUNX1* normalement activées par ce dernier et dérégule leur expression en exerçant une activité de répresseur transcriptionnel via le recrutement de corépresseurs par la partie d'*ETV6* [42]. De plus, la fusion *ETV6-RUNX1*, via le processus d'hétérodimérisation, a un effet antagoniste sur les protéines sauvages empêchant la fonction de répresseur transcriptionnel d'*ETV6* [43]. La dérégulation de la transcription de gènes cibles de cette fusion nuirait au bon déroulement de l'hématopoïèse et contribuerait au développement de la leucémie.



**Figure 7. Structure de la protéine de fusion ETV6-RUNX1.** Le gène chimérique ETV6-RUNX1 contient d'une part le domaine d'interaction protéique (PNT, *pointed*) et le domaine de répression central d'*ETV6*, d'autre part le domaine Runt de liaison à l'ADN, le domaine de transactivation (DT) et le domaine inhibiteur (DI) de *RUNX1*. Le point de cassure est indiqué par une flèche. Les domaines protéiques sont illustrés avec leur position en acides aminés. Figure adaptée de Daly *et al.*, 2016 [44] et Zelent *et al.*, 2004 [41]

La translocation t(12;21) n'est pas suffisante pour induire la leucémie. Cependant, elle engendre une population de cellules préleucémiques ayant un potentiel accru de renouvellement et une plus grande résistance aux signaux proapoptotiques. [45, 46]. Il est proposé que la perte du second allèle d'ETV6 est un événement crucial menant à l'inactivation de ce locus et déclenchant l'apparition des symptômes (voir section 1.5.3).

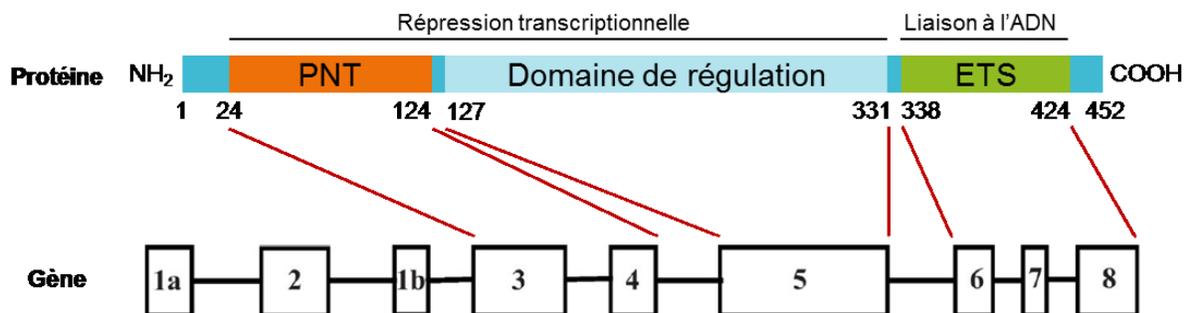
Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette prolifération anormale sont peu connus. Cependant, il a été démontré qu'ETV6-RUNX1 joue un rôle dans la voie de signalisation de TGF- $\beta$  qui est impliquée dans la réponse immunitaire. En se liant au régulateur transcriptionnel SMAD3, la protéine de fusion empêche ce dernier de se lier à ses promoteurs cibles et réguler la transcription de gènes impliqués dans la voie TGF- $\beta$  [47]. D'autre part, la protéine chimérique ETV6-RUNX1, via l'activation de RAC1, impacte la phosphorylation et donc la transcription du facteur STAT3 [48]. Il s'en suit l'activation du proto-oncogène MYC qui est impliqué dans le cycle cellulaire et l'apoptose [48]. ETV6-RUNX1 est également impliqué dans la voie du gène suppresseur de tumeur p53. L'expression de MDM2, un répresseur de p53, est favorisée par la protéine de fusion, ce qui entraîne une diminution de l'apoptose [49]. Enfin, la protéine de fusion ETV6-RUNX1 active la voie PI3K/AKT/mTOR, qui est impliquée dans la synthèse protéique, la prolifération et la survie cellulaire [50]. De plus, l'effet dominant négatif de la protéine de fusion sur les protéines sauvages compromet le rôle de suppresseur de tumeur d'ETV6 (voir section 1.5.2.2) et le bon déroulement de l'hématopoïèse [43]. L'ensemble de ces dérèglements causés par la protéine de fusion compromet l'expression de gènes importants, aussi bien dans la prolifération et la survie cellulaire que dans l'hématopoïèse et joue certainement un rôle crucial dans le développement de la LAL.

## 1.5. ETV6

### 1.5.1. Structure d'ETV6

Le facteur de transcription ETV6 a été identifié pour la première fois en 1994 dans une recombinaison chromosomique avec PDGFR $\beta$  chez un patient atteint de leucémie myéloblastique [51]. ETV6 (*ETS variant 6*) fait partie de la famille des facteurs de transcription ETS (*E26 Transformation-Specific*). Ce groupe, comprenant 29 protéines, représente une des plus grandes familles de régulateurs transcriptionnels signaux-dépendants exprimés dans différents tissus. Ces régulateurs peuvent être qualifiés de proto-oncogènes à cause de leur implication dans diverses voies de la prolifération cellulaire et de la différenciation [52]. Les membres de la famille ETS partagent tous un domaine de 85 acides aminés, appelé domaine ETS, permettant l'interaction avec l'ADN. Le domaine ETS se lie à l'ADN sur une région de 12 à 15pb, mais reconnaît spécifiquement une séquence d'une dizaine de nucléotides qui varie selon les classes de facteurs ETS mais qui comprend toujours le motif 5'-GGA(A/T)-3' [53]. ETV6 reconnaît particulièrement le motif 5'-CCCGGAAGT-3'. Le domaine ETS possède une structure caractéristique constituée de 3 hélices  $\alpha$  et 4 feuillets  $\beta$ . Contrairement à la plupart des facteurs ETS, ETV6 agit comme un répresseur de la transcription [54].

Situé sur la bande p13.1 du chromosome 12, le gène *ETV6* s'étend sur près de 250kb et est divisé en 8 exons [55]. Le gène présente deux codons d'initiations (codon 1 et codon 43) codants pour deux isoformes protéiques de 452 et 409 acides aminés [55]. La forme tronquée possède les différents domaines fonctionnels, mais elle est moins fréquente que la forme longue. ETV6 est une protéine nucléaire constituée de trois domaines majeurs (Figure 8) [36, 44]. Le domaine N-terminal, PNT, aussi appelé HLH en raison de sa structure en hélice-boucle-hélice (*helix-loop-helix*), est formé par les exons 3 et 4. La fonction de PNT est propre à chaque facteur ETS. Dans le cas d'ETV6 il est impliqué dans l'homo- et l'hétérodimérisation de la protéine et est nécessaire à sa localisation dans le noyau. Le domaine ETS C-terminal, correspondant aux exons 6 à 8, assure la liaison à l'ADN de la protéine. Enfin, ETV6 présente un domaine central de régulation codé par l'exon 5 qui est capable de recruter des corépresseurs.



**Figure 8. Représentation schématique des domaines de la protéine ETV6 et des exons correspondants.** Les domaines sont illustrés avec leur position en acides aminés. Les exons correspondants à chaque domaine sont indiqués par les boîtes blanches numérotées. La forme longue d'ETV6 est traduite à partir du codon 1a. 1b représente le codon initiateur alternatif. PNT : *pointed* ; ETS : *E26 Transformation-Specific*. Figure adaptée de Daly *et al.*, 2017 [44] et De Braekeleer *et al.*, 2012 [36 2].

## 1.5.2. Fonction d'ETV6

### 1.5.2.1. ETV6 dans l'hématopoïèse

Le facteur de transcription ETV6 joue un rôle important dans le développement embryonnaire et la régulation hématopoïétique. L'étude de souris *ETV6-knock-out* a révélé des anomalies lors de l'angiogenèse conduisant à la mort des embryons [56]. D'autre part, des défauts dans la différenciation des cellules sanguines dans la moelle osseuse ont été observés après délétion d'*ETV6* dans plusieurs modèles, mettant en évidence l'impact d'ETV6 dans le développement et la survie des cellules hématopoïétiques [57, 58]. L'étude de *knock-out* conditionnels d'*ETV6* chez les souris a pu confirmer l'importance d'ETV6 dans le maintien des cellules souches de la moelle osseuse [59]. De plus, bien qu'ETV6 semble jouer un rôle plus important dans la différenciation myéloïde que lymphoïde, il contribue au maintien des cellules lymphoblastiques en assurant l'autorenouvellement des lymphocytes précurseurs [38]. Ces études soutiennent qu'ETV6 est une protéine essentielle au développement normal des cellules hématopoïétiques.

### 1.5.2.2. ETV6 comme suppresseur de tumeur

Plusieurs caractéristiques d'un suppresseur de tumeur ont été mises en évidence avec ETV6. En effet, la surexpression d'ETV6 dans les cellules en culture ralentit leur prolifération à la suite d'une interruption du cycle cellulaire en G1 [60]. D'autre part, son activité de répresseur transcriptionnel lui permet de réguler la prolifération cellulaire induite par le proto-oncogène Ras dans des cellules en culture [60, 61]. ETV6 limite également la prolifération induite par l'interleukine-3 [62]. De plus, il a été démontré qu'ETV6 est capable d'augmenter l'apoptose [62]. L'importance d'ETV6 dans la régulation de la prolifération cellulaire associée à son rôle crucial dans l'hématopoïèse (voir section 1.5.2.1) montre comment son inactivation peut conduire à la leucémogénèse.

### 1.5.3. ETV6 dans la LAL

Comme nous l'avons vu précédemment (voir section 1.4.1), et pour certains cas, la LAL pourrait être initiée par une première modification génétique et un deuxième événement serait nécessaire au développement de la maladie. Une étude menée par Andreasson *et al.* révèle que des souris exprimant la protéine de fusion ETV6-RUNX1 ne développent pas la leucémie [63]. Cela suggère la nécessité d'un deuxième événement pour que la maladie se développe. Des études chez des jumeaux monozygotes porteurs de la t(12;21) et ayant développé la maladie à 9 ans d'intervalle soutiennent cette théorie [64]. De plus, la prévalence de la translocation est environ 100 fois plus élevée dans la population que le risque d'être atteint de leucémie, soutenant que la fusion ETV6-RUNX1 n'est pas suffisante pour induire la LAL [65].

Plusieurs événements complémentaires peuvent survenir, mais la délétion de l'allèle *ETV6* normal résiduel (5, 7) est observée dans environ 70 % des cas de t(12;21) [66, 67]. De plus, quand il n'est pas perdu, le gène résiduel n'exprime plus la protéine ETV6 [66]. La prévalence de cette délétion suggère un avantage sélectif de la perte d'*ETV6*, potentiellement dû à sa fonction tumeur-suppresseur (voir section 1.5.2.2) ou à sa capacité à réduire l'activité de la protéine chimérique après dimérisation [68, 69]. La fréquence de la translocation t(12;21) associée à la perte de l'allèle résiduel suggère que la perte de fonction d'*ETV6* est un événement important dans le processus de leucémogénèse.

## 1.5.4. La régulation transcriptionnelle médiée par ETV6

### 1.5.4.1. Répression transcriptionnelle par ETV6

La répression transcriptionnelle par ETV6 est modulée par l'homodimérisation et par l'interaction avec différents partenaires, dont les autres membres de la famille ETS [68, 70]. Le domaine central assiste la répression en recrutant des corépresseurs tels que N-Cor; mSin3 et SMRT interagissant avec des histones déacétylases (HDAC) [71, 72]. L'activité des HDAC sur les gènes cibles d'ETV6 induirait leur répression transcriptionnelle. D'autre part, l'activité répressive d'ETV6 est exercée par le domaine PNT qui interagit avec le répresseur transcriptionnel L3MBTL1 responsable de la compaction de la chromatine [73]. En plus de se lier directement à ses gènes cibles, ETV6 peut agir comme corépresseur. Il a été démontré que le facteur de transcription STAT3 peut se lier au domaine PNT d'ETV6 qui va ainsi induire la répression des cibles de STAT3 après recrutement des HDAC [74]. Un effet similaire serait observé avec le facteur de transcription IRF8 (ICSBP) [75].

### 1.5.4.2. Les cibles d'ETV6

Il a été démontré que le gène *MMP3* est réprimé de manière directe par ETV6. Cette répression pourrait expliquer l'effet d'ETV6 observé sur le proto-oncogène Ras (voir section 1.5.2.2) [61]. ETV6 est capable de se lier à l'un des promoteurs de Bcl-X<sub>L</sub> et de moduler son expression. Bcl-X<sub>L</sub> est un gène anti-apoptotique, ce qui complète les observations de l'impact d'ETV6 sur l'apoptose (voir section 1.5.2.2) [76]. Plus récemment, des analyses à l'échelle du génome ont permis de mettre en évidence de nouvelles cibles potentielles d'ETV6 qui sont présentées dans l'Annexe A, Tableau X [77-79]. Le séquençage de l'ARN de cellules exprimant ETV6 ou ETV6ΔETS a permis d'identifier plusieurs gènes potentiellement impactés par le domaine ETS d'*ETV6* [77]. Après validation par qPCR et par immunoprécipitation de la chromatine 4 nouvelles cibles directes d'ETV6 ont été mises en évidence : *CLIC5*, *BIRC7*, *ANGPTL2* et *WBPIL*. Il a été démontré que l'isoforme de *CLIC5*, *CLIC5A*, est capable de réduire l'apoptose médiée par les lysosomes [77]. La répression de *CLIC5* par ETV6 soutient donc son caractère de suppresseur de tumeur. Par ailleurs, ETV6 semble inhiber l'activation de différents gènes de manière indirecte en impactant leurs modulateurs, en particulier l'oncogène Fli-1 impliqué dans l'hématopoïèse [80, 81]. Une

expérience de co-immunoprécipitation de la chromatine a permis d'identifier *SLCO2B1* comme gènes cibles d'ETV6 [82]. Une répression significative de ce gène est observée après surexpression d'*ETV6*, confirmant une modulation transcriptionnelle par ETV6. Cependant, il n'a pas été confirmé si cet impact est direct ou indirect.

## **1.5.5. Modulation d'ETV6**

### **1.5.5.1. Localisation et régulation transcriptionnelle d'ETV6**

ETV6 est un facteur de transcription exprimé de façon ubiquitaire [51, 56]. Il est situé principalement dans le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire située entre les acides aminés 332 et 452 [83]. La régulation de la transcription d'ETV6 n'a pas beaucoup été étudiée et peu de ses modulateurs sont connus. À la suite d'une expérience dans un modèle murin, il a été démontré que PAX6 aurait un effet sur l'activation transcriptionnelle d'ETV6. [84]. D'autre part, STAT3, qui fait partie des cibles d'ETV6, est aussi capable d'activer la transcription de ce dernier, créant une boucle d'autorégulation [74].

### **1.5.5.2. Régulation post-traductionnelle d'ETV6**

Grâce à la méthode du double hybride dans la levure, Chakrabarti *et al.* ont démontré une interaction entre l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, UBC9, et le domaine PNT d'ETV6 [85]. UBC9 permet le recrutement de SUMO-1 responsable de la sumoylation de la lysine 99 d'ETV6 [86]. Cette modification post-traductionnelle d'ETV6 impacte sa localisation dans la cellule (ETV6 est conduit dans des petits compartiments nucléaires ou est envoyé dans le cytoplasme) influençant ainsi son activité de répresseur transcriptionnel qui s'effectue dans le noyau [86, 87]. La sumoylation de la lysine 11 supportée par PIAS3 a également été mise en évidence [88]. Cette modification a pour conséquence d'inhiber l'activité répressive d'ETV6 en empêchant sa liaison à l'ADN. En parallèle, PIAS3 serait capable de favoriser la répression causée par ETV6 par une voie indépendante de la sumoylation [88]. L'activité d'ETV6 est également modulée à la suite de sa phosphorylation. La sérine 257 est ciblée par la phosphorylation par la kinase p38 induisant une diminution de la répression transcriptionnelle par ETV6 [89]. La kinase v-SRC réprime également l'action d'ETV6 par sa délocalisation du

noyau vers le cytoplasme, tout comme UBC9 [90]. Cependant, aucun résidu n'a été identifié comme étant phosphorylé par v-SRC, suggérant un impact indirect.

## 1.6. Hypothèse du projet

Le répresseur transcriptionnel ETV6, impliqué dans l'hématopoïèse, est inactivé chez la majorité des patients LAL à la suite de la translocation t(12;21) et à la délétion de l'allèle résiduel. La perte de fonction d'*ETV6* serait impliquée dans la tumorigenèse de ces patients. Nous proposons que la modulation de l'activité d'ETV6 contribue à la leucémogénèse de l'enfant.

Afin d'identifier de nouveaux modulateurs d'ETV6, nous avons effectué un criblage shRNA à l'échelle du génome [91]. Cette expérience a permis d'identifier de nouveaux partenaires capables de moduler l'activité d'ETV6, dont SRP72, un membre du complexe SRP, responsable de la translocation des protéines nouvellement traduites du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique [92, 93]. Nous avons donc proposé que SRP72, une protéine dont l'implication reste inconnue dans la leucémie, jouerait un rôle dans la régulation de l'expression d'un grand nombre de cibles d'ETV6, via la modulation de ce dernier. Parallèlement, SRP72 serait également impliqué dans la transcription via sa liaison avec la chromatine [94 10].

D'autre part, une analyse par spectrométrie de masse réalisée dans notre laboratoire a permis d'identifier des partenaires d'ETV6. Cette étude a mis en évidence une interaction entre ETV6 et les protéines SRP9, membre du complexe SRP [92], et CBX3 qui module l'expression des cibles d'ETV6 de façon analogue à SRP72. Ces deux partenaires, SRP9 et CBX3, présentent des points communs avec SRP72, laissant supposer qu'elles ont une voie d'action commune pour moduler ETV6.

## **1.7. Objectifs du projet**

L'objectif de cette étude est de caractériser l'impact de SRP72 sur la modulation de l'activité d'ETV6. Pour cela, trois sous-objectifs ont été définis :

1. Tester si la fonction de SRP72 sur ETV6 est indépendante du complexe SRP et de ce fait de la traduction.
2. Déterminer si ETV6 interagit physiquement avec SRP72, CBX3 et SRP9.
3. Déterminer l'influence de SRP9 sur l'activité d'ETV6 en contrôlant l'expression des cibles d'ETV6 en présence et en l'absence de SRP9.

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

## **2.1. Mise en place des lignées cellulaires**

### **2.1.1. Culture cellulaire**

#### **2.1.1.1. Cellules Reh**

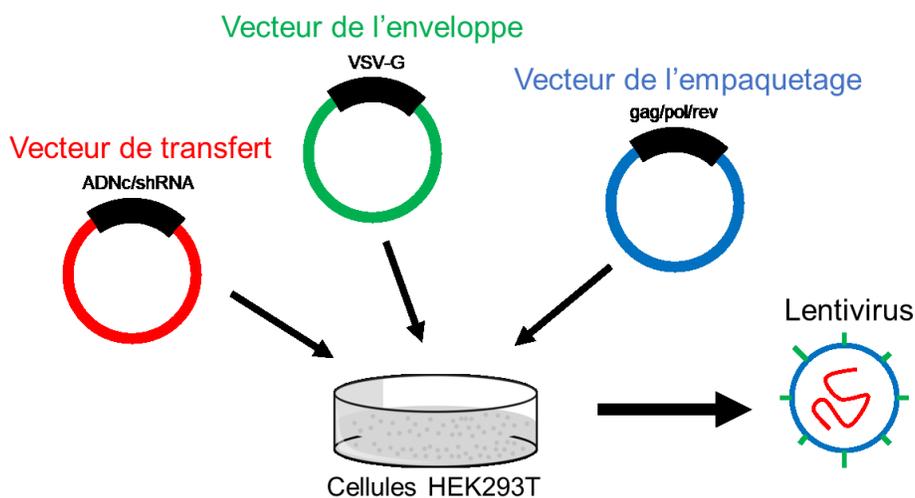
La lignée cellulaire Reh provient d'un patient atteint de leucémie aiguë lymphoblastique porteur de la translocation t(12;21) et d'une délétion de l'allèle ETV6 résiduel (ATCC®, CRL-8286™). Cette lignée est donc caractérisée, entre autres, par une inactivation complète d'ETV6. Les cellules Reh ont été cultivées en suspension dans du milieu RPMI (Wisent Inc) complétement par 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) (Wisent Inc) et en présence d'antibiotiques (solution de pénicilline/streptomycine (Wisent Inc) 1X). Les cellules infectées sont sélectionnées à la puromycine (1 µg/mL).

#### **2.1.1.2. Cellules HeLa**

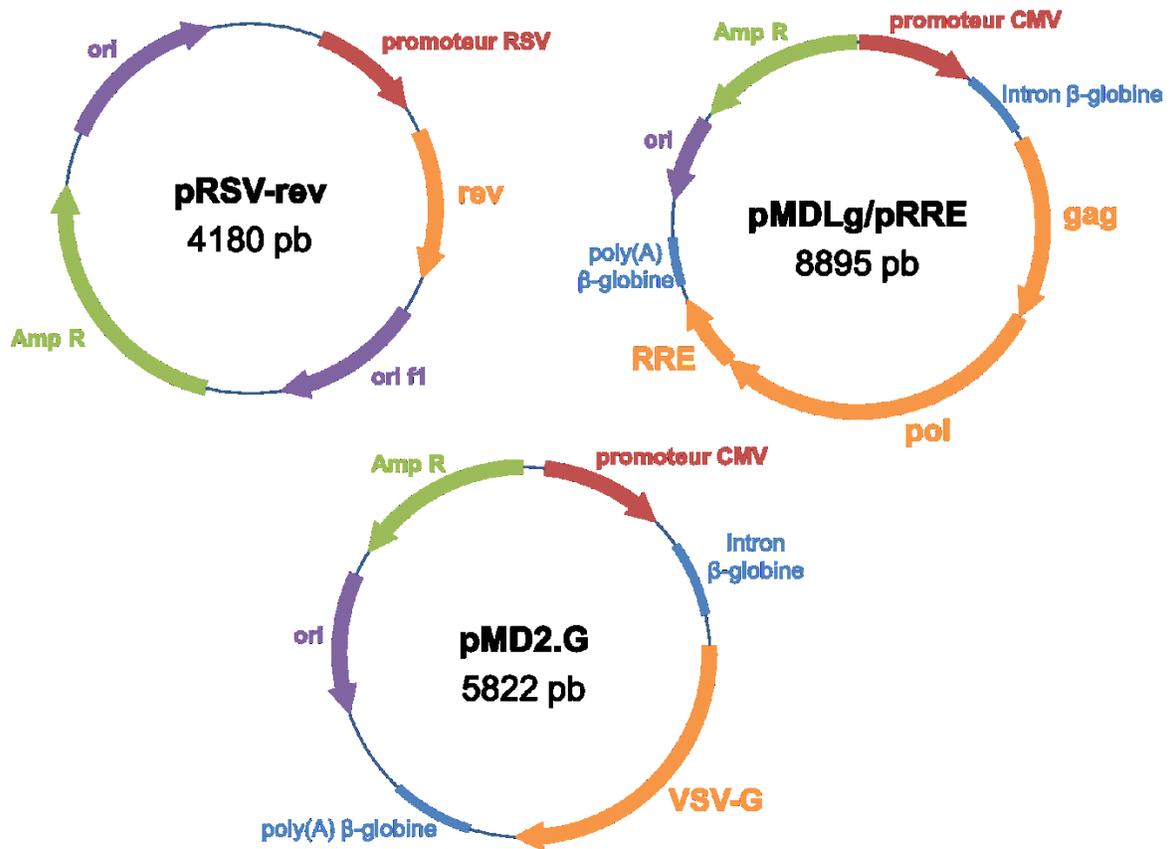
Les cellules adhérentes de lignée HeLa, originaires de cancer du col de l'utérus (ATCC®, CCL-2™), ont été maintenues dans du milieu DMEM (Wisent Inc) complétement par 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) (Wisent Inc) en présence d'antibiotiques (solution de pénicilline/streptomycine (Wisent Inc) 1X). Lors de leur passage, les cellules sont lavées avec du Tampon Phosphate Salin (PBS) et décollées à la trypsine (solution 0.05% trypsine et 0.53mM EDTA, Wisent Inc). Les cellules infectées sont sélectionnées à la puromycine (1 µg/mL).

## 2.1.2. Production de lentivirus

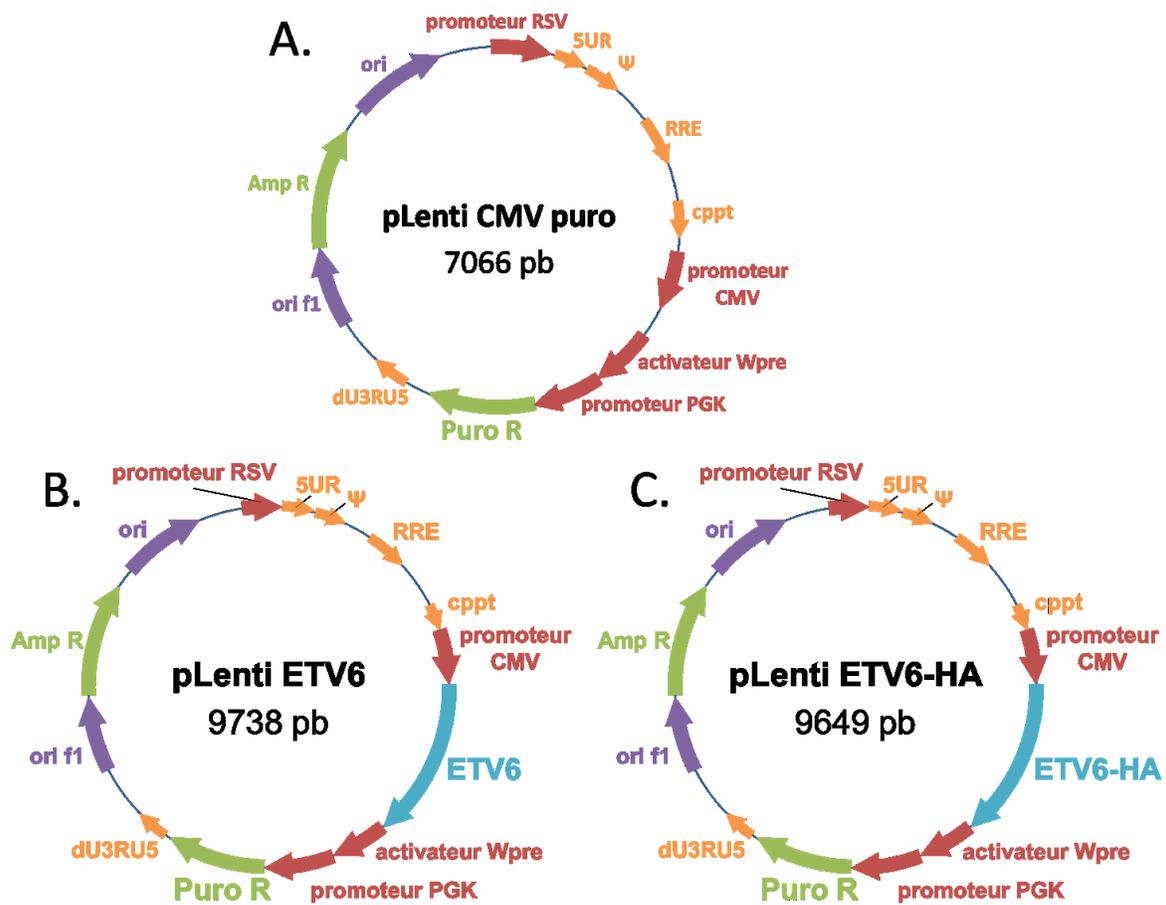
Les virus ont été produits en utilisant un système lentiviral de troisième génération (Figure 9). Les vecteurs de la capsid virale (2643ng pRSV-Rev et 6609ng pMDLg), de l'enveloppe virale (3436ng pMD2.G) (Figure 10) et le plasmide d'intérêt (3965ng pLenti/pLenti\_ETV6/pLenti\_ETV6-HA) (Figure 11) ont été incubés 45 minutes avec 36 $\mu$ L de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) diluée dans du milieu Opti-MEM™ (Gibco™) pour former des complexes de transfection. Ils ont ensuite été ajoutés à 8,0x10<sup>6</sup> cellules HEK293T en culture dans du milieu RPMI. Les virus ont été relâchés dans le milieu de culture, il n'a donc pas été nécessaire de lyser les cellules. 10mL de virus ont été récoltés 48h après la transfection, puis stockés à -80°C.



**Figure 9. Principe du système de production de lentivirus de troisième génération.** Des vecteurs de protéines virales (en vert et bleu) sont utilisés pour emballer le plasmide de transfert (en rouge) par transfection dans des cellules HEK293T.



**Figure 10. Plasmides de troisième génération utilisés pour la formation des lentivirus.** Rev, gag et pol sont impliquées dans l’empaquetage du virus, VSV-G forme l’enveloppe et RRE sert au transfert du virus vers l’extérieur du noyau.



**Figure 11. Plasmides utilisés pour la surexpression d'ETV6 et ETV6-HA.** (A) Plasmide contrôle. (B) Vecteur permettant d'induire la surexpression d'ETV6. (C) Vecteur permettant d'induire la surexpression d'ETV6-HA. L'étiquette -HA associée à ETV6 comprend 3x la séquence du peptide HA : 5' TATGATGTGCCGGATTATGCG 3'. Les plasmides ont été construits dans le laboratoire du Dr Daniel Sinnett.

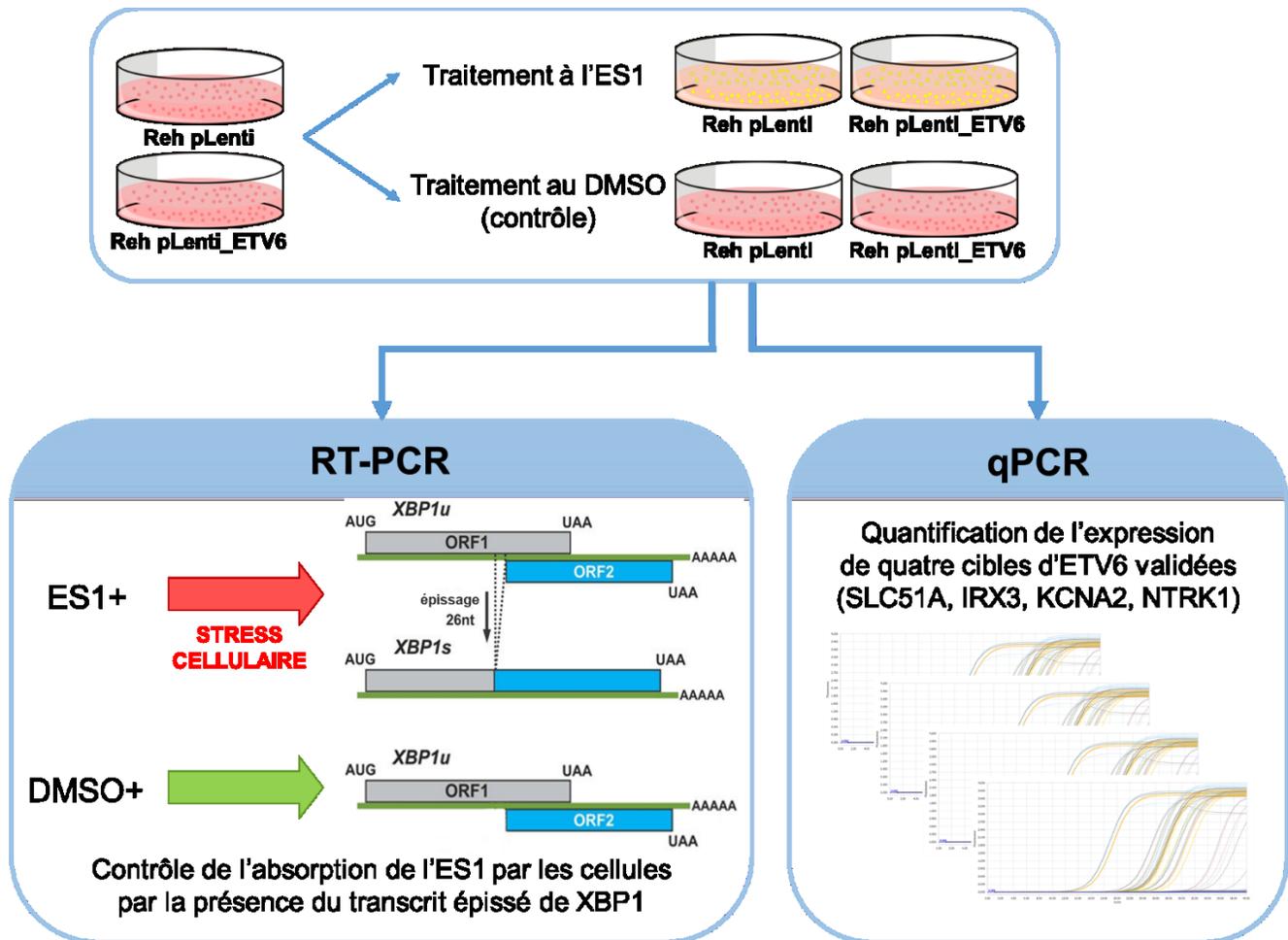
### **2.1.3. Infection lentivirale**

Les lignées cellulaires pLenti, pLenti\_ETV6 et pLenti\_ETV6-HA ont été obtenues par double infection des lignées Reh et HeLa. La première infection a été réalisée sur  $0,5 \times 10^6$  cellules dans du milieu contenant  $5 \mu\text{g/mL}$  de polybrène. Après 24 heures, le milieu a été remplacé par du milieu sans polybrène. Les cellules infectées ont été sélectionnées à la puromycine (Wisent Inc) après 48h. Le même protocole a été suivi pour la seconde infection en utilisant  $0,5 \times 10^6$  cellules issues de la première infection. Toutes les infections ont été réalisées avec une dilution 1/2 de virus. La seconde infection dans les cellules Reh a en parallèle été réalisée avec une dilution 1/5 de virus, car la viabilité des cellules était altérée avec une dilution 1/2. Les cellules simples infectées et doubles infectées ont été utilisées pour l'acquisition des résultats. L'expression d'ETV6 et d'ETV6-HA dans les cellules a été contrôlée par qPCR et immunobuvardage de type Western.

## **2.2. Test à l'eyarestatine I (ES1)**

### **2.2.1. Approche expérimentale**

L'approche expérimentale est représentée dans la Figure 12. La molécule ES1 permet d'inhiber le transport des protéines par le complexe SRP vers le réticulum endoplasmique [95, 96]. Les cellules sont, dans un premier temps, traitées à l'ES1 et parallèlement au DMSO (contrôle négatif). Le stress cellulaire déclenché par le traitement à l'ES1 induit l'épissage du transcrit du gène XBP1 [97]. L'efficacité du traitement est évaluée en contrôlant l'épissage de XBP1 par RT-PCR. L'expression de quatre cibles d'ETV6 est contrôlée par qPCR. Les cibles SLC51A, IRX3, KCNA2 et NTRK1 ont été choisies, car elles ont été validées à plusieurs reprises (Annexe A, Tableau X) et, en plus, leur expression est modulée de façon significative en l'absence de SRP72 (voir section 3.1.1).



**Figure 12. Représentation schématique de l'approche expérimentale.** Figure de l'épissage adaptée de Nagashima Y. et al., 2011 [98].

## 2.2.2. Traitement à l'ES1

La poudre d'ES1 (Sigma-Aldrich) a préalablement été diluée dans du DMSO (Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 5mg/mL (8000µM).

### 2.2.2.1. Optimisation

Afin d'évaluer l'impact du traitement sur les cellules, une première expérience a été réalisée sur les cellules Reh.  $3,0 \times 10^6$  cellules ont été traitées avec différentes doses de solution d'ES1 (20µM, 10µM, 5µM et 1µM) pendant 4 heures ou 6 heures. Un contrôle négatif au DMSO est réalisé avec une quantité équivalente à la condition ES1. Les cellules récoltées après le

traitement sont culotées et stockées à -80°C après refroidissement rapide dans l'azote liquide (« *snap freezing* »).

#### **2.2.2.2. Protocoles finaux**

Les Reh pLenti et Reh pLenti\_ETV6 ont d'abord été traitées avec 50µM d'ES1 pendant 6 heures. Dans une seconde expérience, le traitement a été réalisé avec différentes doses d'ES1 : 50µM, 35µM, 20µM et 5µM pendant 6 heures. Le contrôle au DMSO a été réalisé avec une quantité équivalente à la condition ES1. Chaque expérience sur les Reh pLenti et Reh pLenti\_ETV6 ont été réalisées en deux répliquas biologiques.

### **2.2.3. Épissage de XBP1**

#### **2.2.3.1. Extraction d'ARN**

L'ARN est extrait à partir des culots cellulaires à l'aide du RNeasy® Mini kit (QIAGEN®) selon le protocole de la compagnie. Pour le traitement du dernier réplica, l'ARN a été extrait des cellules à l'aide du kit ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega) en suivant le protocole fourni par la compagnie.

#### **2.2.3.2. Transcription inverse**

Dans un premier temps, l'ARN est incubé à 65°C pendant 5 minutes en présence de 0,5mM de dNTP (Roche) et 25ng/µL d'oligo dT (Invitrogen™). Ensuite, l'ADN complémentaire (ADNc) a été obtenu par réaction de rétrotranscription en ajoutant les réactifs suivants : 0,01M de dithiothreitol (DTT) (Invitrogen™), 2U/µL de RNaseOUT™ (Invitrogen™), 10U/µL M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™), tampon 1X (250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen™). Le mélange a été incubé à 37°C pendant 50 minutes puis à 70°C pendant 15 minutes. Pour le traitement du dernier réplica, les transcriptions inverses ont été réalisées en une seule étape avec le mélange iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad) selon le protocole fourni par la compagnie.

### 2.2.3.3. Réaction de PCR

La réaction de PCR a été faite à partir de 100ng d'ADNc en utilisant le mélange pour KOD Hot Start DNA Polymerase (Millipore) (tampon KOD 1X, 1,5mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2mM dNTP, 0,3μM amorces sens et antisens de XBP1 (Tableau III), 0,02U/μL enzyme KOD). Les conditions de PCR utilisées sont décrites dans le Tableau IV. La migration des échantillons a été faite sur gel d'agarose (2 % à 3 %) en utilisant le colorant GelRed™ (Biotium), le tampon de dissociation Orange DNA Loading Dye (Thermo Scientific™) et l'échelle O'RangeRuler 20bp DNA Ladder (Thermo Scientific™). Pour le premier réplica, le contrôle de l'épissage de XBP1 a également été validé par une analyse sur micropuces (2100 Bioanalyzer, Agilent).

**Tableau III. Séquences des amorces de XBP1.**

NOM	SÉQUENCE SENS	SÉQUENCE ANTISENS
<b>XBP1-RT0</b>	ACAGCGCTTGGGGATGGATG	TGACTGGGTCCAAGTTGTCC
<b>XBP1-RT1</b>	CCTGGTTGCTGAAGAGGAGG	GGCTGGTAAGGAACTGGGTC

Les amorces RT0 ont été utilisées pour l'expérience d'optimisation. Les amorces RT1 ont été utilisées pour les expériences finales.

**Tableau IV. Paramètres de PCR utilisés pour chaque expérience.**

CYCLES		OPTIMISATION	EXPÉRIENCE FINALE 1 (une dose d'ES1)	EXPÉRIENCE FINALE 2 (plusieurs doses d'ES1)
<b>Activation</b>		2 minutes à 95°C	2 minutes à 95°C	2 minutes à 95°C
<b>Dénaturation</b>	X 35	20 secondes à 95°C	20 secondes à 95°C	20 secondes à 95°C
<b>Hybridation</b>		10 secondes à 63°C	5 secondes à 62°C	10 secondes à 68°C
<b>Extension</b>		10 secondes à 70°C	10 secondes à 70°C	5 secondes à 70°C

## 2.2.4. Expression des cibles d'ETV6

Une seconde transcription inverse a été réalisée en suivant les protocoles précédemment décrits (2.2.3.2). L'ADNc obtenu a été dilué 1/5 dans de l'eau distillée puis amplifié par la méthode de qPCR sur l'appareil ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems™). L'amplification a été réalisée à partir de 5µL d'ADNc, 0,2µM d'amorces sens et antisens (Tableau V) et 1X de SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™). Le LightCycler® 96 System (Roche) et le fluorophore par le SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) ont été utilisés pour le dernier réplica. Les paramètres de qPCR utilisés sont : 1 cycle de 10 minutes à 95°C et 40 cycles de 15 secondes à 95°C puis 1 minute à 60°C. Chaque réaction de qPCR a été réalisée en triplicata technique. Le niveau d'expression de chaque gène a été normalisé par l'expression du gène de référence GAPDH. Les niveaux d'expression ont ensuite été analysés suivant la méthode de Livak ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) [99] en employant la condition Reh pLenti + DMSO comme calibre.

**Tableau V. Séquences des amorces utilisées pour la qPCR.**

CIBLE	SÉQUENCE SENS	SÉQUENCE ANTISENS
GAPDH <sup>1</sup>	GATCATCAGCAATGCCTC	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA
ETV6 <sup>2</sup>	TGAACCACATCATGGTCTCTG	CGTAATCCCAAAGCAGTCTACA
NTRK1 <sup>1</sup>	CACATCGTGCGCTTCTTCG	CAGCTTGGCATTAGGTCCA
KCNA2 <sup>1</sup>	CACGTCTCTGGTCAGCCAAG	CTCAGGGTGCTGCTACTGG
SLC51A <sup>1</sup>	GGGCATCATTTCCCGTCAAG	CGTTGGCCAAGACTGAGAAG
IRX3 <sup>1</sup>	GAAGGCGGAACAGATCGCT	GAGAGCCGATAAGACCAGGG

1. IDT® ; 2. Invitrogen™

## **2.3. Co-immunoprécipitation**

### **2.3.1. Méthodes d'extraction protéique**

#### **2.3.1.1. Extraction des protéines nucléaires**

##### *2.3.1.1.1. Fraction cytoplasmique*

Les culots cellulaires ont été dissociés dans du tampon CEB (10mM HEPES pH 7,5, 10mM KCl et Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem®) 1X). Les échantillons ont ensuite été incubés sur glace pendant 15 minutes. 0,05 % de NP-40 a été ajouté, puis le mélange a été centrifugé à 1100g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant contenant la fraction protéique cytoplasmique, a été récolté. Les noyaux des cellules se trouvent dans le culot et sont encore intacts à cette étape-ci. La fraction cytoplasmique n'a pas été utilisée pour nos expériences.

##### *2.3.1.1.2. Fraction nucléaire*

Les noyaux ont été lavés avec du CEB puis dissociés dans du tampon NEB (20mM HEPES pH 7,5, 50mM KCl, 300mM NaCl, 5 % glycérol, 0,05 % NP-40 et Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem®) 1X). Les échantillons ont été incubés à 4°C avec rotation pendant 1 heure. Après centrifugation à 10 000g à 4°C pendant 3 minutes, le surnageant contenant les protéines nucléaires a été récolté.

#### **2.3.1.2. Extraction des protéines totales**

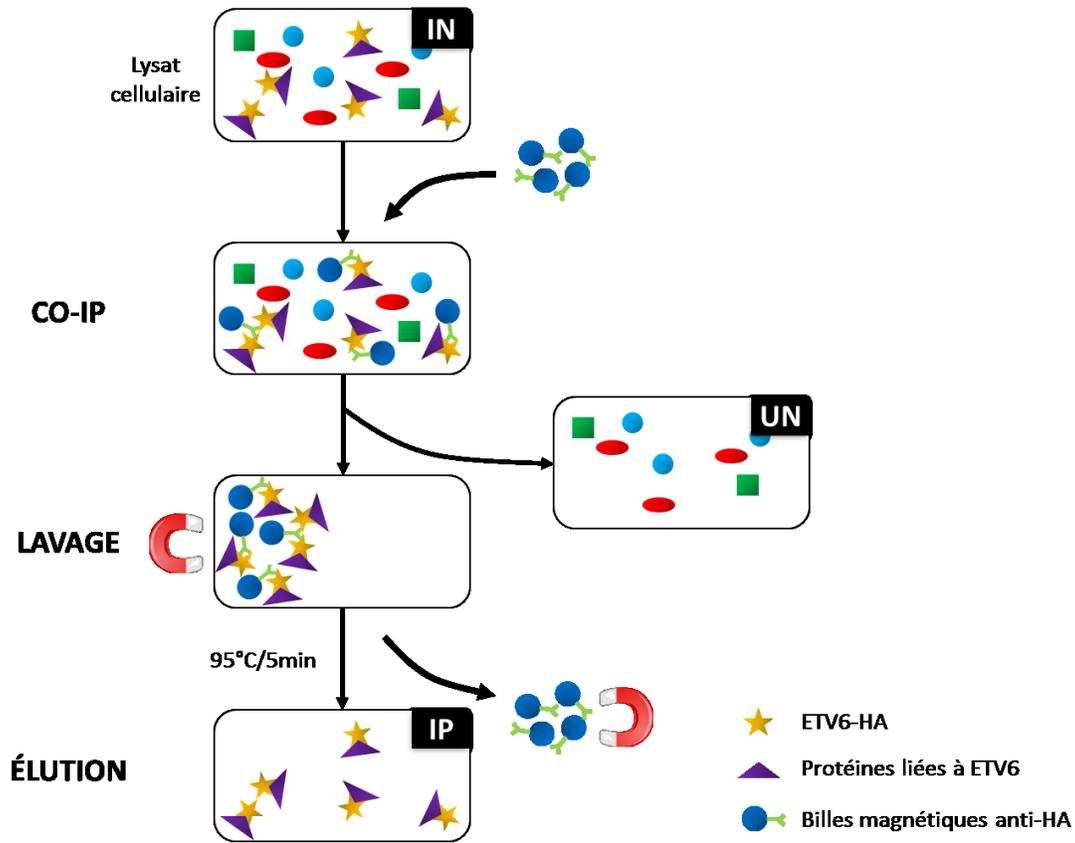
Les culots cellulaires sont dissociés dans du tampon RIPA (50mM Tris-HCl pH8,0, 150mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % NaDeoxy, 0,1 % SDS et Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem®) 1X). Les cellules ont ensuite été passées plusieurs fois dans une aiguille 21G pour assurer une lyse complète. Après incubation sur glace pendant 30 minutes, les échantillons ont été centrifugés à 16 000g à 4°C pendant 5 minutes pour récupérer les protéines.

### **2.3.2. Dosage des protéines**

Les protéines ont été dosées selon la méthode de Lowry [100] avec le DC™ Protein Assay Kit (Bio-Rad) en suivant le protocole de la compagnie. Le standard a été fait à partir de BSA. Tous les échantillons ont été réalisés en triplicata. Entre 50µg et 100µg de protéines sont conservés pour analyse, le reste est utilisé pour la réaction de Co-IP.

### **2.3.3. Co-immunoprécipitation (Co-IP)**

Le principe de Co-IP est illustré dans la Figure 13. Les billes magnétiques anti-HA (Pierce™; Thermo Scientific™) ont été lavées deux fois au TBS-Tween. Les échantillons (fraction IN) ont été ajoutés aux billes et le mélange a été incubé avec rotation à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, le surnageant (fraction UN) est séparé des billes à l'aide d'un portoir magnétique et est conservé pour analyse. Les billes sont ensuite lavées une fois dans du tampon RIPA froid, puis quatre fois dans du PBS froid. Pour l'élution des protéines d'intérêt, les billes ont été diluées dans une solution de tampon Laemmli (Bio-Rad) + β-mercaptoethanol et PBS (1:1) puis chauffées à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons ont été placés sur un portoir magnétique pour récolter les protéines d'intérêt dénaturées qui ont été détachées des billes lors du chauffage (fraction IP).



**Figure 13. Principe de la co-immunoprécipitation.** Des échantillons protéiques de cellules HeLa et Reh surexprimant ETV6-HA et ETV6 (contrôle) ont été utilisés. Des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-HA sont ajoutées aux protéines. Les billes capturent ETV6-HA et ses partenaires de liaison puis sont récoltées grâce à un aimant. Dans les échantillons contrôles ETV6, les billes qui reconnaissent l'étiquette -HA ne vont rien capturer. L'éluion permet d'enlever les protéines d'intérêt des billes. Les différentes fractions (IN: fraction *input*, ensemble des protéines extraites des échantillons avant Co-IP ; UN : fraction *unbound*, protéines de la fraction de lavages non capturées par la Co-IP ; IP : fraction co-immunoprécipitée) sont analysées par *Western*. RUVBL1 et KAP1 sont utilisés comme contrôles positifs, car ils ont précédemment été validés comme étant liés à ETV6 par Co-IP [101, 102].

### **2.3.4. Immunobuvardage de type *Western***

Les échantillons IN et UN ont été dilués dans 1X de solution tampon Laemmli (Bio-Rad) +  $\beta$ -mercaptoethanol et chauffés à 95°C pendant 5 minutes. L'échantillon IP ayant déjà été chauffé au préalable n'a pas été chauffé à nouveau. Les échantillons IP, IN et UN sont déposés sur gel 10 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ (Bio-Rad) et sur gel 12 % de polyacrylamide (35,5:1) et SDS. Les protéines ont migré à 120V et ont été transférées sur membranes de PVDF à 4°C pendant une nuit. Les membranes ont été bloquées pendant 1 heure dans une solution de 5 % de lait, 0,05 % de Tween-20 et TBS 1X. Les membranes ont été incubées 1 heure avec l'anticorps primaire puis 1 heure avec l'anticorps secondaire à température ambiante. Les anticorps et les dilutions utilisées sont décrits dans le Tableau VI. Les protéines d'intérêt sont ensuite révélées à l'aide du tampon ECL Pierce™ (Thermo Scientific™) en suivant le protocole de la compagnie.

**Tableau VI. Description des anticorps utilisés.**

**A.**

PROTÉINE CIBLE				
NOM	POIDS MOLÉCULAIRE	ISOTYPE	DILUTION	COMPAGNIE
<b>GAPDH</b>	37 kDa	Souris IgG1	1/10000	Invitrogen™
<b>ETV6</b>	53 kDa / 63 kDa	Souris IgG1	1/1000	Abcam®
<b>RUVBL1</b>	50 kDa	Chèvre IgG	1/100	SCBT®
<b>KAP1</b>	110 kDa	Lapin IgG	1/1000	Abcam®
<b>SRP72</b>	72 kDa	Lapin IgG	1/5000	Abcam®
<b>SRP9</b>	9 kDa	Lapin IgG	1/250	Proteintech®
<b>CBX3</b>	21 kDa	Lapin IgG	1/250	Abcam®

**B.**

CIBLE	LUMINESCENCE	DILUTION	COMPAGNIE
<b>Souris IgG</b>	HRP	1/5000	SCBT®
<b>Lapin IgG</b>	HRP	1/5000	SCBT®
<b>Chèvre IgG</b>	HRP	1/5000	Abcam®

(A) Description des anticorps primaires. (B) Description des anticorps secondaires. Les anticorps sont dilués dans le tampon de blocage (5 % lait, 0,05 % Tween-20 dilué dans TBS 1X).

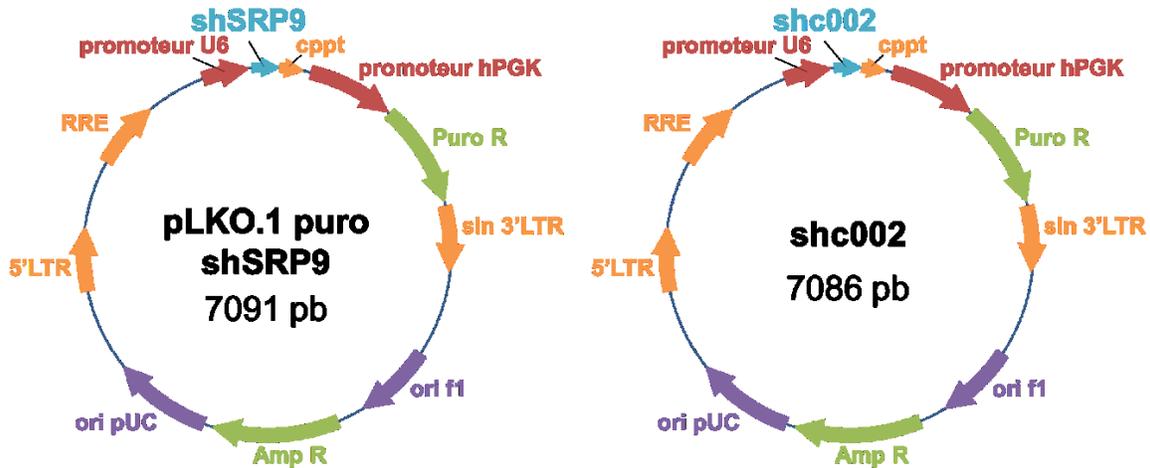
## 2.4 Impact de SRP9

### 2.4.1. Répression du gène SRP9 par shRNA

Le gène SRP9 a été réprimé de manière stable dans les cellules Reh grâce à la méthode des petits ARN en épingle à cheveux (shRNA) [103]. Les séquences des shRNA utilisés sont présentées dans le Tableau VII. Les plasmides (Figure 14) ont été fournis par le laboratoire du Dr Stéphane Gobeil (CHU de Québec-Université Laval) sous forme de culture bactérienne. Les plasmides ont été purifiés à l'aide du kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN®) en suivant le protocole de la compagnie. Des virus ont été produits par transfection tel que décrit précédemment avec les quantités diminuées à 1/9. Ensuite, les cellules Reh ont été infectées une fois en suivant le protocole de la section 2.1.3 et sélectionnées à la puromycine. L'expression de SRP9 a été contrôlée par qPCR.

**Tableau VII. Séquences des shRNA utilisés pour réprimer l'expression de SRP9.**

NOM	SÉQUENCE	CIBLE
TRCN0000075048	GCAGCAGTTATTTGAGTGTAT	SRP9
TRCN0000075049	CGACTTATGGTAGCCAAGGAA	SRP9
TRCN0000075050	GATGGGAACTTGTGTGTTAAA	SRP9
TRCN0000075051	ACAGTCAACTAATGCGACTTA	SRP9
TRCN0000075052	CCCGCAATGTTACCATGGAAA	SRP9
shRNA contrôle	CAACAAGATGAAGAGCACCAA	Aucune



**Figure 14. Plasmides utilisés pour la répression de SRP9.** (A) Cinq plasmides de différents shRNA ciblant SRP9 ont été utilisés. (B) Le plasmide shc002, contenant un shRNA qui n'a pas de cible dans les mammifères, a été utilisé comme contrôle.

#### 2.4.2. Expression des cibles d'ETV6

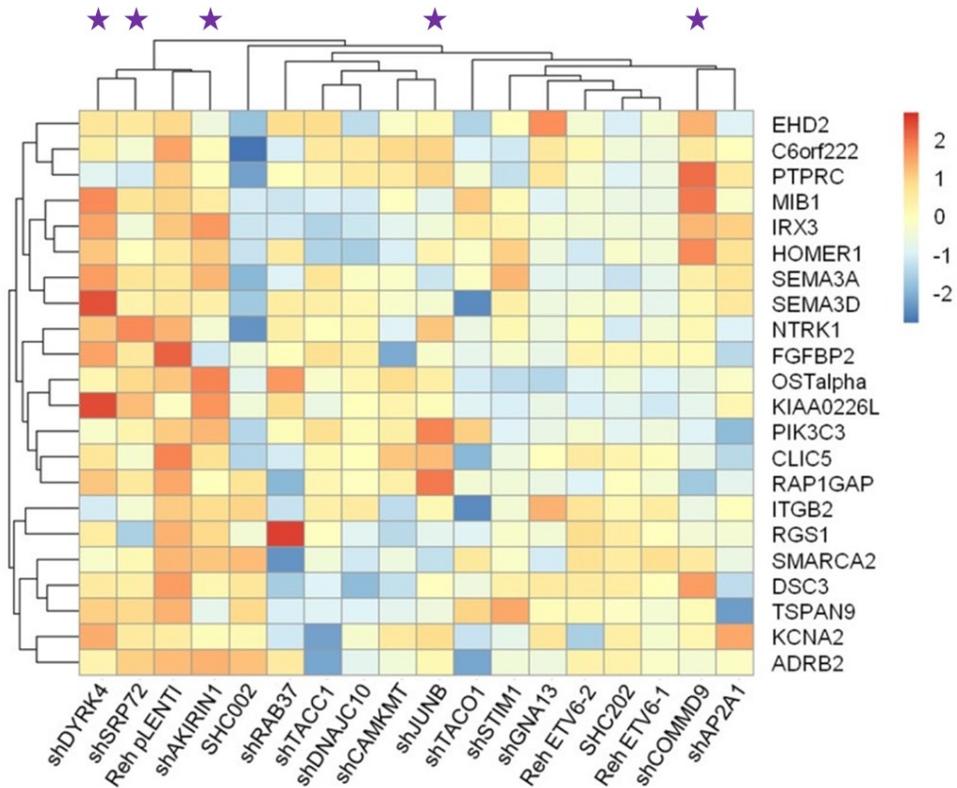
L'ARN cellulaire a été extrait à l'aide du kit ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega) en suivant le protocole fourni par la compagnie. Le mélange iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad) a été utilisé pour réaliser la transcription inverse en suivant le protocole de la compagnie. Une qPCR est réalisée sur l'appareil LightCycler® 96 System (Roche) à partir des réactifs suivants : 5µL ADNc (dilué 1/5), 0,2µM amorces sens et antisens (Tableau V) et SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) 1X. Les paramètres de qPCR utilisés sont : 1 cycle de 10 minutes à 95°C et 40 cycles de 15 secondes à 95°C puis 1 minute à 60°C. Chaque réaction de qPCR a été réalisée en triplicata technique. Le niveau d'expression de chaque gène a été normalisé par l'expression de GAPDH, puis les niveaux d'expression ont été analysés suivant la méthode de Livak ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) [99] en employant la condition Reh shc002 comme calibre.

## **Chapitre 3 : Résultats**

## 3.1. Résultats préliminaires

### 3.1.1. Identification de nouveaux modulateurs d'ETV6

Pour identifier de nouveaux modulateurs d'ETV6, notre laboratoire a réalisé un criblage shRNA à l'échelle du génome [91]. Cette expérience a permis d'identifier 5 gènes qui, une fois réprimés dans les cellules ETV6<sup>+/+</sup>, induisent la réexpression d'un grand nombre de cibles normalement réprimées par ETV6 (Figure 15) : *AKIRIN1*, *COMMD9*, *DYRK4*, *JUNB* et *SRP72* (identifiés par des étoiles). En particulier, nous avons démontré que la répression de *DYRK4* et *SRP72* provoque la réexpression de 82 % des cibles d'ETV6 (Tableau VIII). Ces gènes seraient donc impliqués dans l'activité répressive d'ETV6, d'où leur rôle potentiel dans la leucémogénèse. Le criblage shRNA a également mis en évidence CBX3 qui induit une modulation analogue à *SRP72*, suggérant une interaction entre ces deux modulateurs (Annexe B, Tableau XI).



**Figure 15. Cartographie d'expression des cibles d'ETV6 dans les échantillons shRNA.** [91] Les cibles d'ETV6 (n=22) sont classées en lignes. Les échantillons shRNA (n=13, échantillons significatifs) et les échantillons contrôles sont représentés en colonne. Les niveaux normalisés de l'expression des cibles sont représentés par un dégradé de couleur : rouge pour les cibles les plus exprimées et bleu pour les cibles les moins exprimées. Les étoiles indiquent les 5 gènes pour lesquels la réexpression des cibles est la plus forte.

**Tableau VIII. Niveau de réexpression des cibles d'ETV6 après inhibition des gènes *AKIRIN1*, *COMMD9*, *DYRK4*, *JUNB* ou *SRP72*. [91]**

shRNA	CIBLES RÉEXPRIMÉES (%)	VALEUR-P
shAKIRIN1	77	0,006691317
shCOMMD9	55	0,012839581
shDYRK4	82	0,002811612
shJUNB	68	0,022273174
shSRP72	82	0,005637823

La valeur p est calculée par un test de Student par comparaison avec les échantillons contrôles (shc002 et shc202). shAKIRIN1 : TRCN0000134954 ; shCOMMD9 : TRCN0000167758 ; shDYRK4 : TRCN0000197116 ; shJUNB : TRCN0000014943 ; shSRP72 : TRCN0000151445.

### **3.1.2. Identification d'interactions protéiques directes avec ETV6**

Pour mieux comprendre le rôle d'ETV6 et de ses partenaires dans l'initiation de LAL, notre laboratoire s'est penché sur la caractérisation des interactions entre ETV6 et ses protéines associées en réalisant une Co-IP suivie d'une analyse par spectrométrie de masse. Ces expériences ont révélé une interaction nucléaire entre ETV6 et SRP9, un autre membre du complexe SRP (Tableau IX) . De plus, CBX3, identifié lors du criblage shRNA, est également potentiellement lié à ETV6.

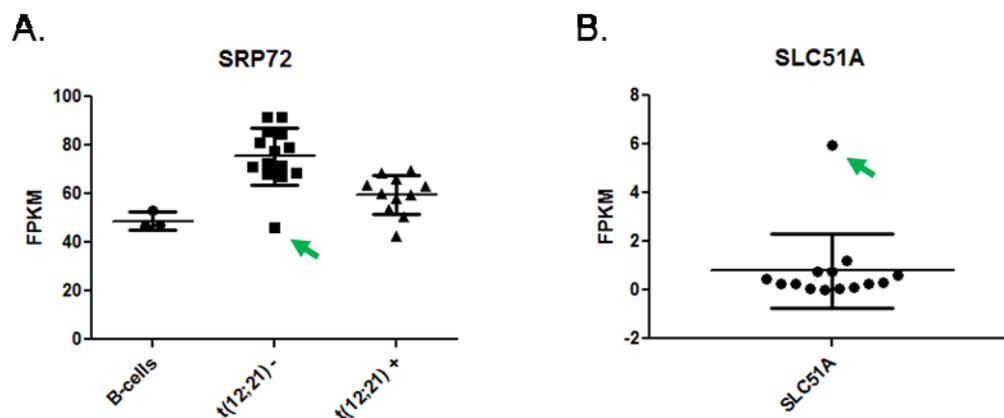
**Tableau IX. Analyse protéomique des protéines liées à ETV6. [91]**

CATÉGORIE	GÈNE	POIDS MOLÉCULAIRE	Compte de peptide unique exclusif			
			Reh ETV6		Reh ETV6-HA	
			CYTOPLASME	NOYAU	CYTOPLASME	NOYAU
<b>Interaction nucléaire</b>	RUNX1	50 kDa	0	0	0	12
	MKI67	359 kDa	1	0	0	7
	RUVBL2	51 kDa	0	0	0	4
	SRP9	10 kDa	0	0	0	3
	DIMT1	35 kDa	0	0	0	3
	ESCO2	68 kDa	0	0	0	3
	FMR1	66 kDa	2	0	1	3
	SMARCA4	189 kDa	0	0	0	3
	UTP3	55 kDa	1	0	0	2
	CBFB	10 kDa	0	0	0	2
	RBM14	69 kDa	0	0	0	2
	LP1	15 kDa	0	0	0	2
	CBX3	21 kDa	0	0	0	2
	HMGN4	10 kDa	0	0	0	2
	CDCA5	8 kDa	0	0	0	2
	RASAL3	104 kDa	0	0	1	2
	WDR36	99 kDa	0	0	0	2
	SLC25A5	33 kDa	0	0	0	2
	RPS29	7 kDa	0	0	0	2
	RUVBL1	30 kDa	0	0	1	2
CDCA7	51 kDa	0	0	0	2	
<b>Interaction cytosolique</b>	SLAIN2	45 kDa	0	0	3	0
	WWP2	86 kDa	0	0	2	0
	TTN	3014 kDa	0	4	2	0
<b>Appât</b>	ETV6	53 kDa	0	0	8	7

Une co-immunoprécipitation a été réalisée sur les extraits protéiques cytoplasmiques et nucléaires de cellules Reh pCCL\_ETV6-HA et Reh pCCL\_ETV6 (contrôle négatif). Les échantillons ont ensuite été soumis à une analyse par spectrométrie de masse.

### 3.1.3. Données de patients

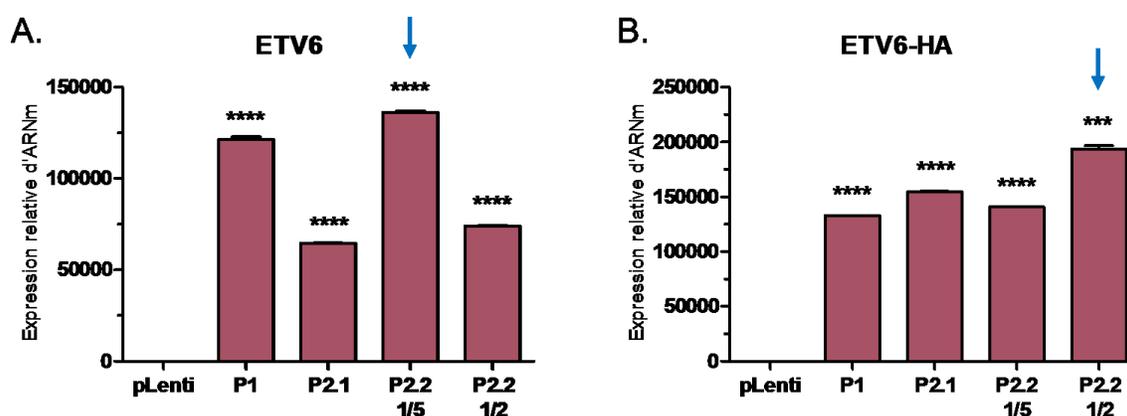
Les données collectées lors du criblage shRNA ont montré un fort impact de la protéine SRP72 sur l'activité d'ETV6. De plus, SRP9, une protéine appartenant au même complexe SRP, a été retrouvée comme étant liée à ETV6 dans l'analyse par spectrométrie de masse. À la suite de ces résultats, notre équipe a souhaité évaluer l'impact clinique de *SRP72* dans la leucémie de l'enfant. Pour ce faire, son expression a été examinée au sein de notre cohorte de patients leucémiques. Pour un patient, l'expression de *SRP72* est significativement plus basse (Figure 16 A) et l'expression de *SLC51A*, cible d'ETV6, est augmentée pour ce même patient (Figure 16 B). Cela suggère une corrélation entre la présence de SRP72 et l'expression de SLC51A impliquant potentiellement ETV6.



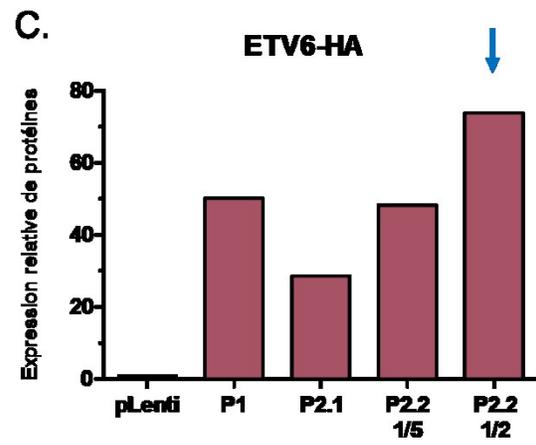
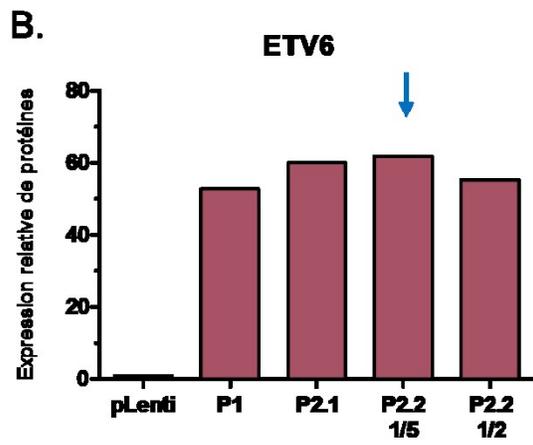
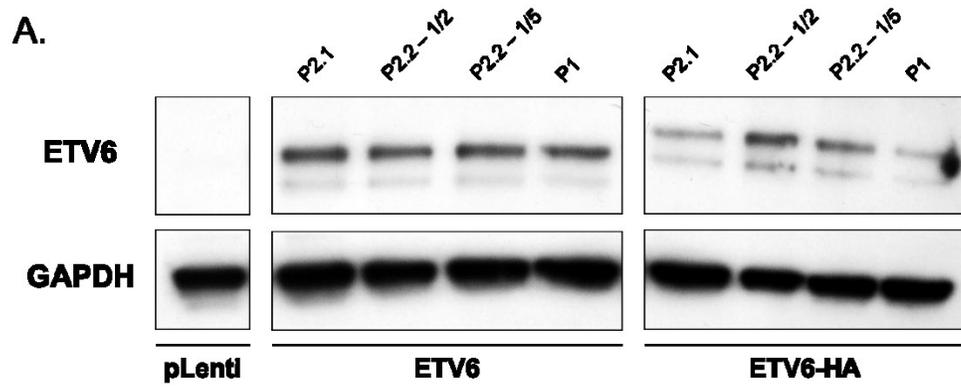
**Figure 16. Données de notre cohorte de patients leucémiques.** [91] (A) Expression relative de SRP72. (B) Expression relative de SLC51A, cible d'ETV6. Les flèches indiquent le même patient. FPKM : *Fragments per kilobase million*.

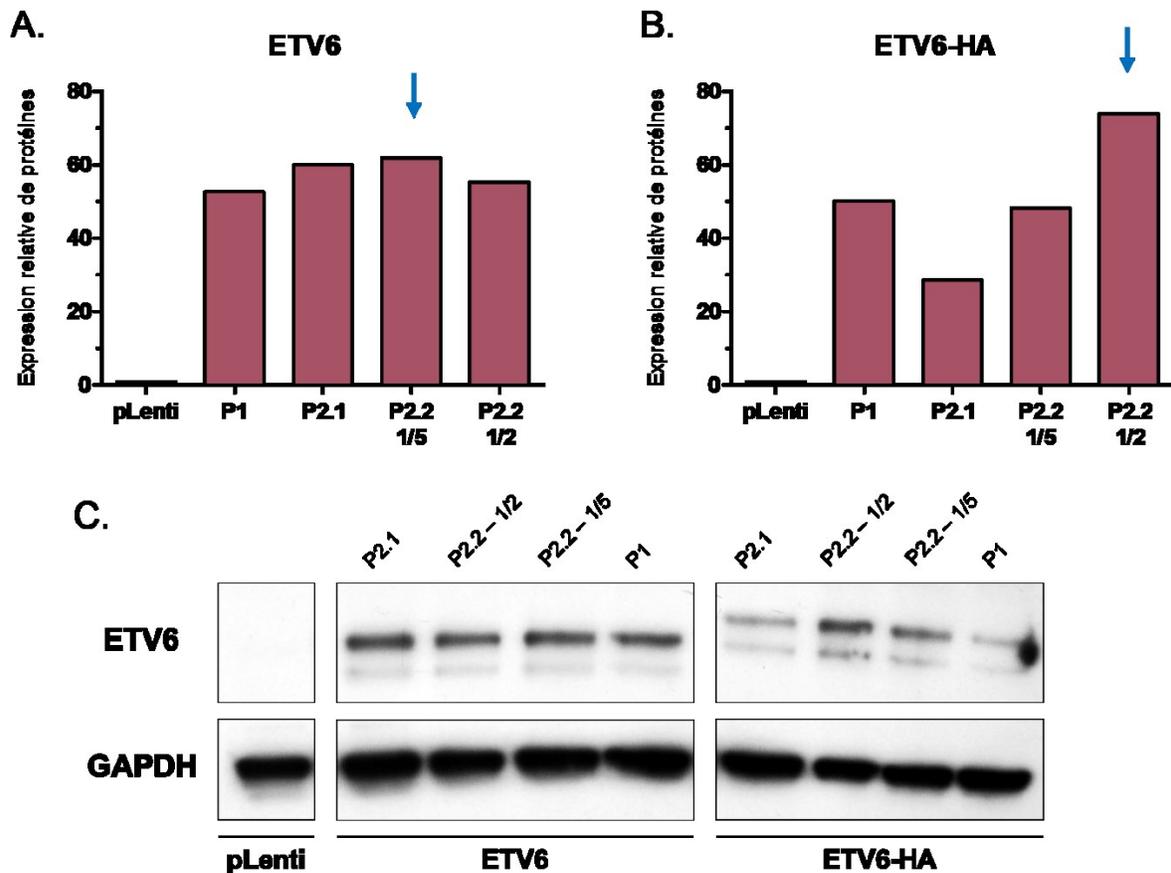
### 3.2. Expression d'ETV6 et ETV6-HA

Des infections lentivirales dans les cellules Reh et HeLa nous ont permis de surexprimer *ETV6* et *ETV6*-HA de façon stable. La surexpression du transcrit et la traduction de la protéine ont été vérifiées par qPCR (Figure 17 et Figure 19) et par immunobuvardage de type *Western* (Figure 18). Nous avons conservé les infections les plus efficaces (désignées par des flèches sur les Figure 17 à 19) pour la suite des expériences.

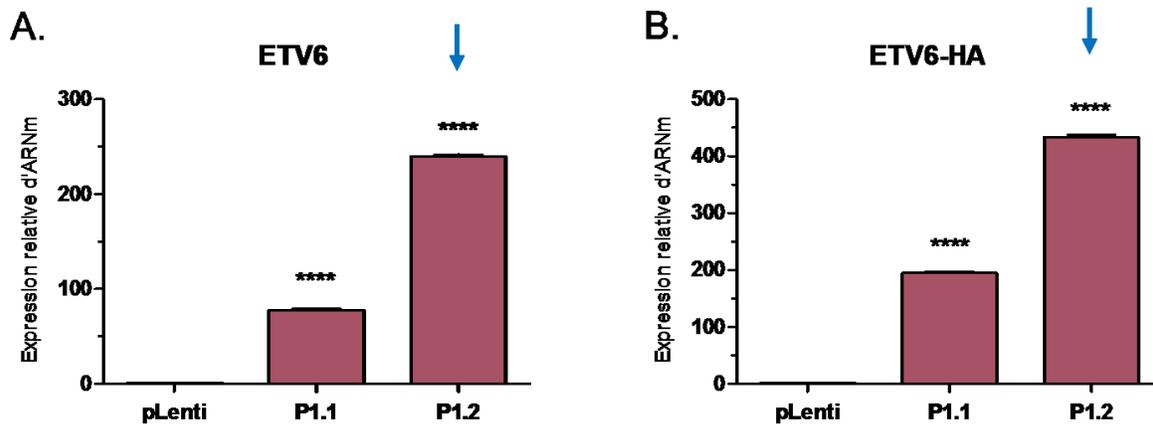


**Figure 17. Expression relative d'ETV6 (A) et ETV6-HA (B) dans les cellules Reh contrôlée par qPCR.** P1 : premier réplica biologique, simple infecté ; P2.1 : deuxième réplica biologique, simple infecté ; P2.2 1/5 : deuxième réplica biologique, double infecté 1/5 ; P2.2 1/2 : deuxième réplica biologique, double infecté 1/2. Les valeurs p ont été calculées avec le test-t de Student par comparaison avec l'échantillon pLenti (n=3). Les meilleurs niveaux de surexpression sont indiqués par une flèche.





**Figure 18. Expression relative d'*ETV6* (A) et *ETV6*-HA (B) dans les cellules Reh contrôlée par *Western*. P1 : premier réplica biologique, simple infecté ; P2.1 : deuxième réplica biologique, simple infecté ; P2.2 1/5 : deuxième réplica biologique, double infecté 1/5 ; P2.2 1/2 : deuxième réplica biologique, double infecté 1/2. Le niveau d'expression d'*ETV6* est calculé relativement à l'expression de GAPDH (C). Les meilleurs niveaux de surexpression sont indiqués par une flèche.**



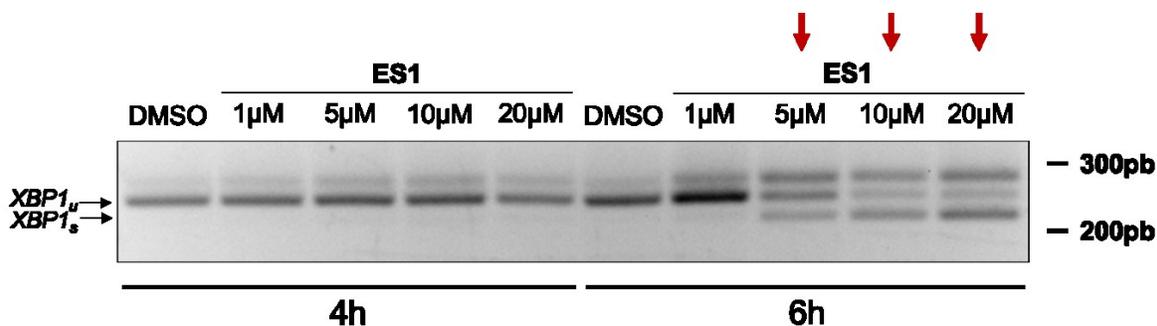
**Figure 19. Expression relative d'*ETV6* (A) et *ETV6*-HA (B) dans les cellules HeLa contrôlée par qPCR.** P1.1 : simple infection ; P1.2 : double infection. Les valeurs p ont été calculées avec le test-t de Student par comparaison avec l'échantillon pLenti (n=3). Les meilleurs niveaux de surexpression sont indiqués par une flèche.

### 3.3. Évaluation de l'indépendance du complexe SRP dans l'impact de SRP72 sur ETV6

SRP72 est un membre du complexe SRP, responsable de la translocation des peptides néoformés du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique [93]. Afin de tester si l'impact de SRP72 sur ETV6 est indépendant de cette voie traductionnelle, nous avons contrôlé l'activité d'ETV6 après inhibition de la fonction du complexe SRP. Pour ce faire, nous avons utilisé l'inhibiteur ES1 qui empêche la translocation des protéines entre le complexe SRP et le translocon de la membrane du réticulum endoplasmique [96]. Le traitement à l'ES1 déclenche un stress cellulaire (UPR) qui provoque un épissage de 26 nucléotides du transcrite de *XBPI* (*XBPI<sub>s</sub>*) [97]. La présence de *XBPI<sub>s</sub>* nous a permis d'évaluer l'efficacité du traitement. Ensuite, nous avons évalué la capacité d'ETV6 à réprimer ses gènes cibles en présence d'ES1 en analysant l'expression de 4 cibles (*SLC51A*, *IRX3*, *KCNA2* et *NTRK1*) par qPCR. Si tel est le cas, nous devrions observer une répression des cibles par ETV6 en condition contrôle qui est maintenue en présence d'ES1.

### 3.3.1. Optimisation

Afin d'optimiser les conditions expérimentales, plusieurs doses et différentes durées de traitement à l'ESI ont été testées sur les cellules Reh WT. Nous avons ensuite contrôlé l'épissage du transcrit de *XBPI*, induit par l'absorption d'ES1. Enfin, l'efficacité du traitement a été mesurée en suivant l'apparition d'une bande supplémentaire à environ 215pb indiquant la présence du transcrit épissé *XBPI<sub>s</sub>*. Ce dernier est observé uniquement dans les traitements à 5µM, 10µM et 20µM d'ES1 pendant 6 heures (conditions annotées par des flèches) (Figure 20). Ce résultat suggère qu'un traitement de 6 heures est nécessaire et que le traitement est seulement efficace pour 5µM d'ES1 et plus.

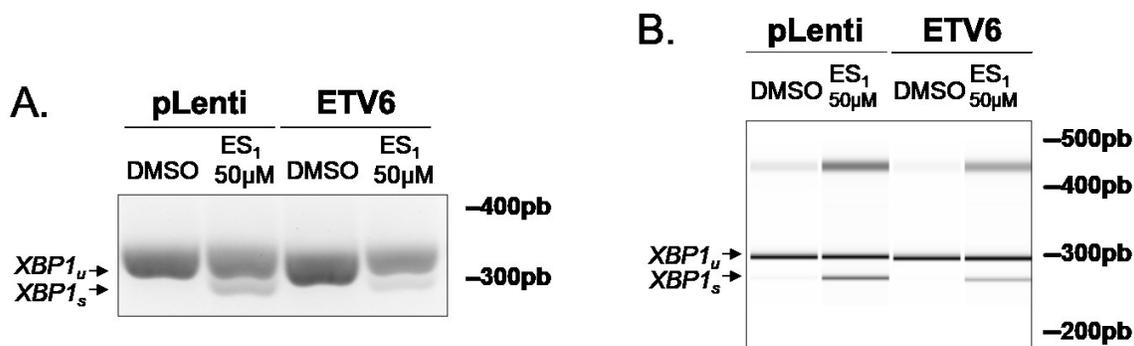


**Figure 20. Contrôle de l'épissage de *XBPI* sous différentes conditions de traitement à l'ESI.** Les cellules Reh WT ont été traitées avec différentes doses d'ES1 ou au DMSO (contrôle) pendant 4 heures ou 6 heures. L'amplification RT-PCR a été réalisée avec les amorces RT0. Les tailles attendues des transcrits sont : 241pb pour *XBPI<sub>u</sub>* et 215pb pour *XBPI<sub>s</sub>*. Les flèches indiquent les conditions de traitement pour lesquelles l'épissage du transcrit de *XBPI* (*XBPI<sub>s</sub>*) est observé.

### 3.3.2. Inhibition du complexe SRP avec 50µM d'ES1

#### 3.3.2.1. Efficacité du traitement à l'ESI

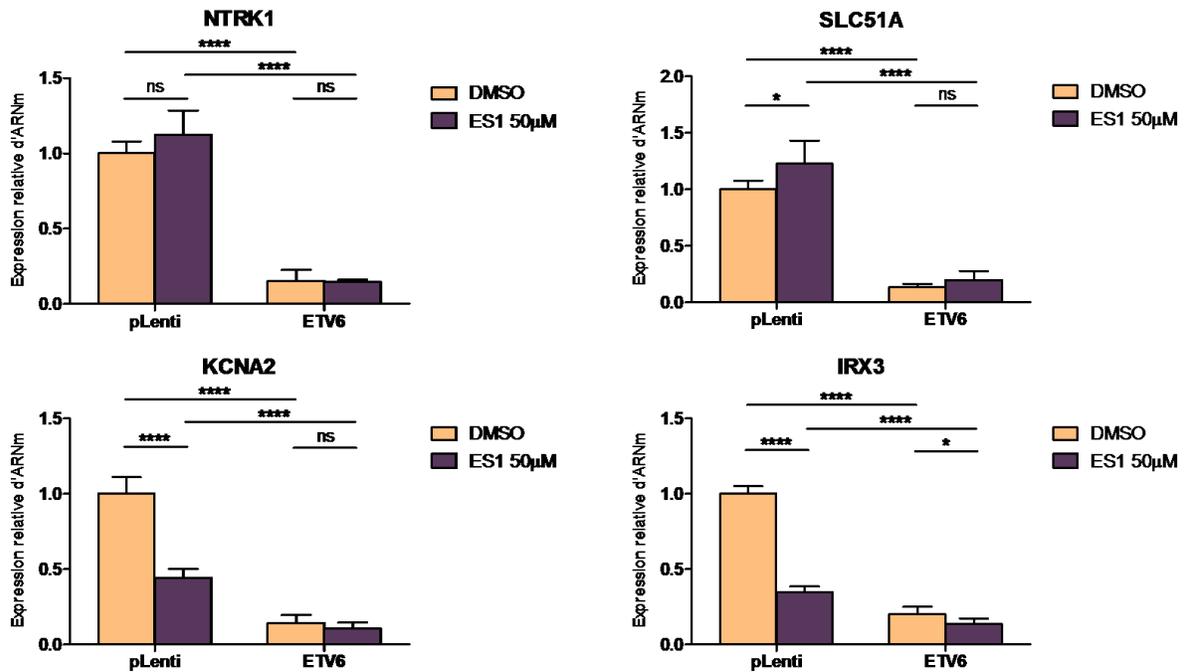
Afin de contrôler le rôle répresseur d'ETV6, une première expérience sur les cellules Reh pLenti et Reh ETV6 a été réalisée en présence d'ES1. Nous avons montré que le traitement à l'ESI est également efficace dans les cellules Reh modifiées pLenti et ETV6 (Figure 21).



**Figure 21. Contrôle de l'épissage de *XBP1* après traitement à 50µM d'ES1.** Les cellules Reh pLenti et Reh pLenti\_ETV6 ont été traitées avec 50µM d'ES1 ou au DMSO (contrôle) pendant 6 heures. L'amplification RT-PCR a été réalisée avec les amorces RT1. Les tailles attendues des transcrits sont : 306pb pour *XBP1<sub>u</sub>* et 280pb pour *XBP1<sub>s</sub>*. (A) La RT-PCR est visualisée sur gel d'agarose à 2 %. (B) La RT-PCR est visualisée sur micropuces (Bioanalyzer) (Annexe B, Figure 32). L'épissage de *XBP1* (*XBP1<sub>s</sub>*) est observé en condition ES1 avec les deux techniques de visualisation pour les échantillons pLenti et ETV6.

### 3.3.2.2. Expression des cibles d'ETV6

L'expression de *NTRK1*, *SLC51A*, *KCNA2* et *IRX3*, cibles d'ETV6, a été analysée par qPCR dans le but de contrôler l'activité de ce répresseur transcriptionnel après inhibition du complexe SRP. Les cibles sont réprimées comme attendu en présence d'ETV6 par rapport à la condition pLenti (contrôle sans ETV6) (Figure 22). La répression est maintenue en présence d'ES1 pour les échantillons ETV6 par rapport aux pLenti et ce, pour chacune des cibles. Une diminution de l'expression de *KCNA2* et *IRX3* est observée après traitement à l'ES1 pour les échantillons pLenti. Cependant, cette variation indépendante d'ETV6 ne contredit pas notre hypothèse qui est que la fonction d'ETV6 n'est pas altérée lors de l'inhibition du complexe SRP par l'ES1.

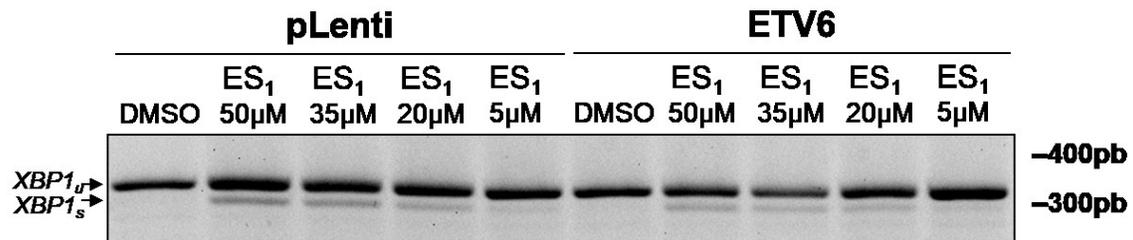


**Figure 22. Expression des cibles d'ETV6 pour 50µM d'ES1.** Le niveau d'expression a été contrôlé par qPCR. Les valeurs p ont été calculées avec le test-t de Student. L'expérience comprend deux répliques biologiques pour chaque condition (n=6).

### 3.3.3. Inhibition du complexe SRP avec différentes doses d'ES1

#### 3.3.3.1. Efficacité du traitement à l'ES1

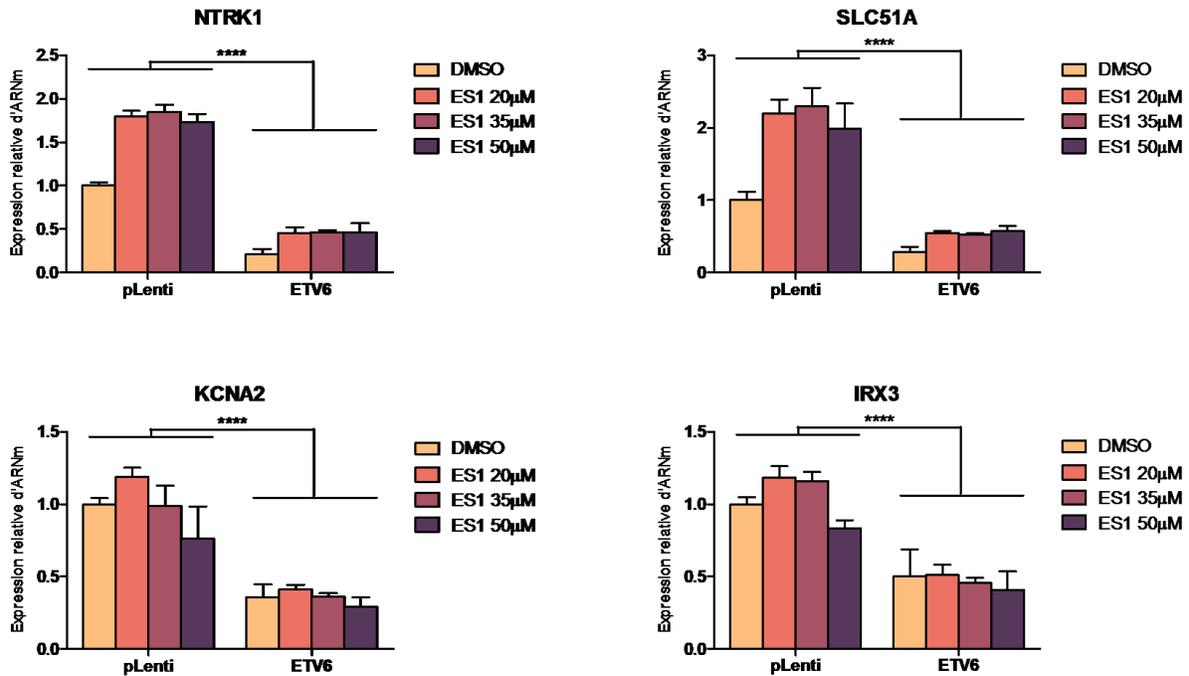
Afin de confirmer les résultats obtenus après 50µM de traitement à l'ES1, nous avons réalisé une nouvelle expérience avec des doses différentes d'ES1. Le traitement est efficace pour les conditions 50µM, 35µM et 20µM d'ES1 tel que démontré par la présence de la forme épissée *XBPI<sub>s</sub>* (Figure 23). Le traitement à 5µM est moins efficace.



**Figure 23. Contrôle de l'épissage de *XBPI* après traitement à différentes doses d'ES1.** Les cellules Reh pLenti et Reh pLenti\_ETV6 ont été traitées avec différentes doses d'ES1 ou au DMSO (contrôle) pendant 6 heures. L'amplification RT-PCR a été réalisée avec les amorces RT1. Les tailles attendues des transcrits sont : 306pb pour *XBPI<sub>u</sub>* et 280pb pour *XBPI<sub>s</sub>*. L'épissage de *XBPI* (*XBPI<sub>s</sub>*) est observé en condition ES1 20μM, 35μM et 50μM pour les échantillons pLenti et ETV6.

### 3.3.3.2. Expression des cibles d'ETV6

L'expression des 4 cibles d'ETV6 a été analysée par qPCR pour les trois doses d'ES1 les plus efficaces (50μM, 35μM et 20μM). La répression est encore une fois observée en condition DMSO (Figure 24). De plus, ETV6 est toujours capable de réprimer ses cibles en présence d'ES1. Pour les échantillons Reh ETV6, nous avons observé que la dose d'ES1 utilisée n'a pas d'influence sur le niveau d'expression des cibles et donc sur l'action d'ETV6. Ces résultats confirment qu'ETV6 agit indépendamment du complexe SRP.



**Figure 24. Expression des cibles d'ETV6 pour différentes doses d'ES1.** Le niveau d'expression a été contrôlé par qPCR. La valeur p a été calculée avec le test-t de Student par comparaison entre les échantillons pLenti et ETV6. L'expérience comprend deux répliquas biologiques pour chaque condition (n=6).

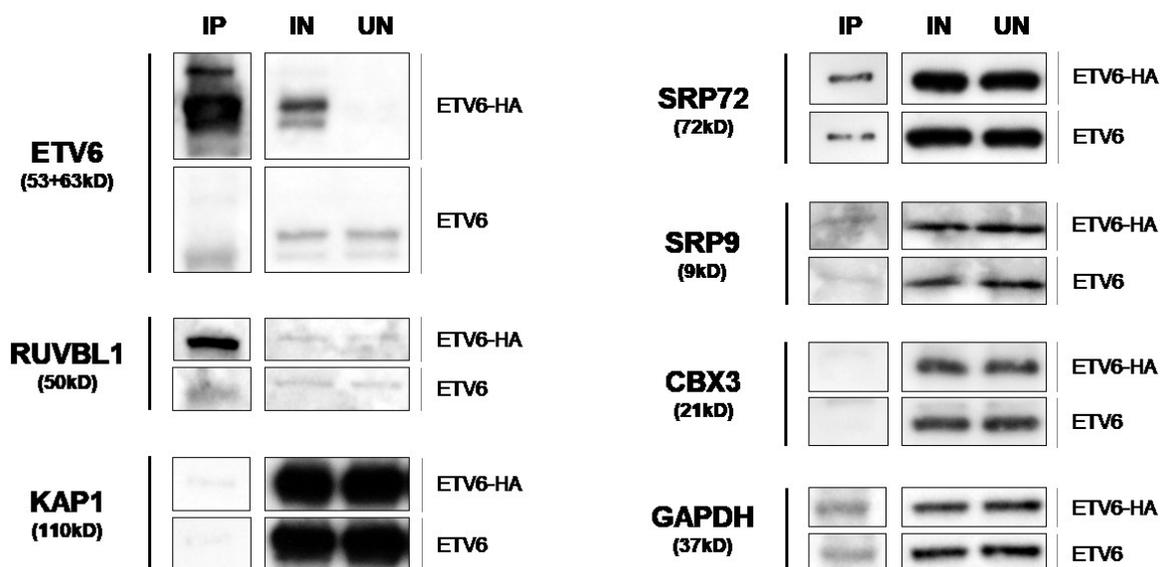
### 3.4. Étude de l'interaction physique entre SRP72 et ETV6

Comme la nature de l'interaction entre SRP72 et ETV6 est inconnue, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'interaction physique directe entre ces deux protéines. De plus, au vu des points communs que présentent SRP9 et CBX3 avec SRP72, nous supposons que ces protéines font partie d'un même complexe pour impacter ETV6. Les interactions de ces protéines avec ETV6 ont été étudiées par Co-IP.

#### 3.4.1. Optimisation dans les cellules HeLa

Les cellules HeLa ont précédemment été utilisées dans notre laboratoire pour réaliser des Co-IP d'ETV6 [101] et sont donc utilisées dans un premier temps pour nos expériences. L'enrichissement d'ETV6-HA dans la fraction IP et son absence dans la fraction UN indique que notre protéine d'intérêt a bien été immunoprécipitée (Figure 25). Le contrôle

positif RUVBL1 est présent dans l'IP d'ETV6-HA comme attendu confirmant une liaison avec ETV6. SRP72, SRP9 et CBX3 ne sont pas enrichis dans la fraction IP d'ETV6-HA. Cela suggère que ces protéines n'ont pas d'interaction physique directe avec ETV6 dans les cellules HeLa.



**Figure 25. Co-IP d'ETV6-HA dans les cellules HeLa.** La Co-IP a été réalisée à partir d'extraits protéiques totaux de cellules HeLa ETV6-HA et HeLa ETV6 (contrôle). Des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-HA ont été utilisées pour capturer ETV6-HA et ses partenaires de liaison. Une élution par chauffage a été réalisée avant d'analyser les fractions protéiques immunoprécipitées (IP), initiales (IN) et non capturées (UN) par immunobuvardage de type *Western*. Dans les échantillons contrôles ETV6, les billes qui reconnaissent l'étiquette -HA ne vont rien capturer, on s'attend donc à ne pas observer de protéine dans la fraction IP d'ETV6. RUVBL1 et KAP1 sont utilisés comme contrôles positifs, car ils ont précédemment été validés comme étant liés à ETV6 par Co-IP [101]. GAPDH est utilisé comme contrôle négatif.

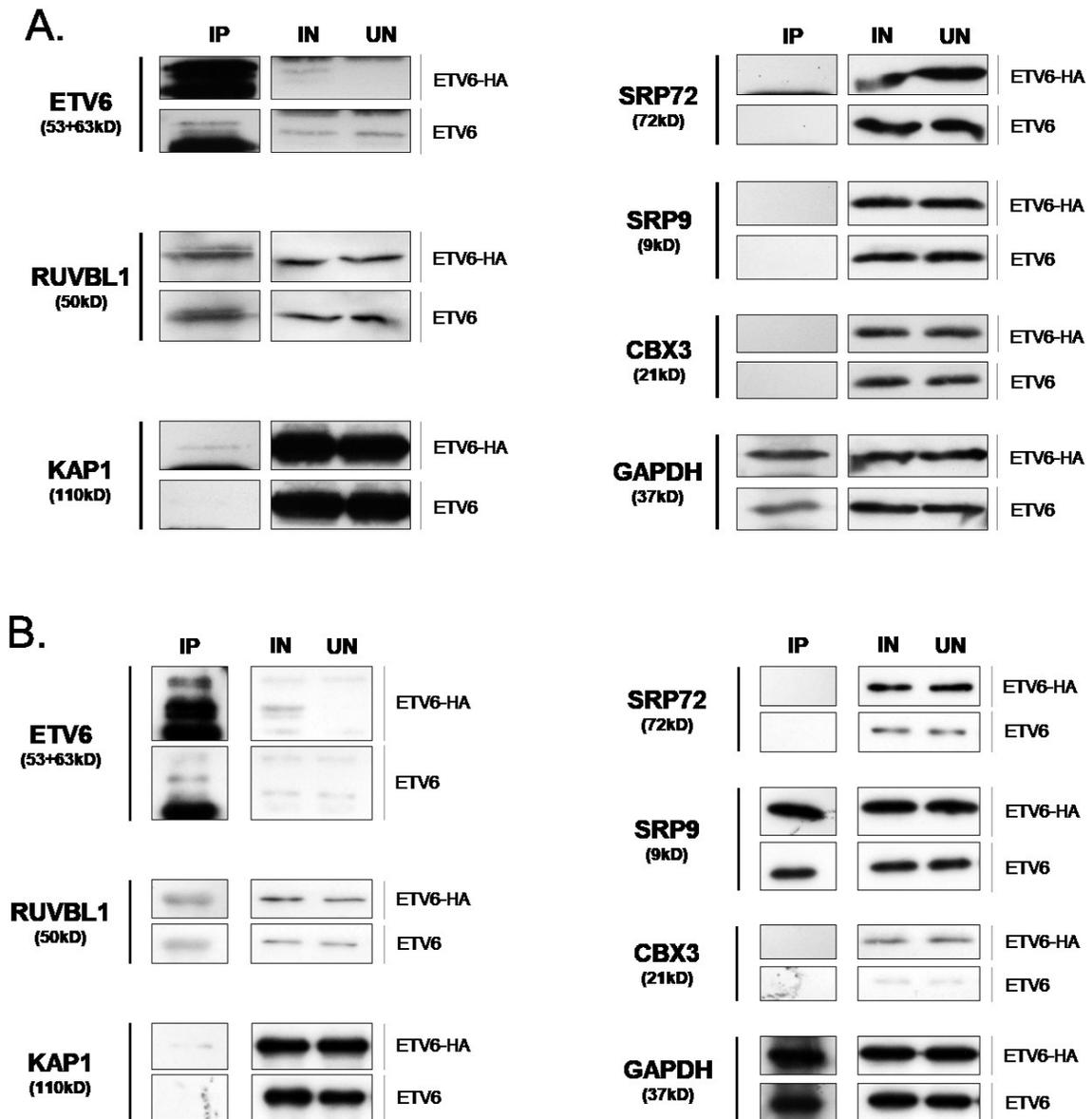
### 3.4.2. Validation dans les cellules Reh

Afin de valider les résultats obtenus dans la lignée cellulaire HeLa, nous avons opté pour une lignée cellulaire caractérisant davantage la leucémie aiguë lymphoblastique pour la suite de cette étude. Nous avons ainsi utilisé des cellules LAL, Reh. Tel qu'attendu, nous observons un enrichissement d'ETV6-HA dans la fraction IP (Figure 26 A). L'absence de SRP72, SRP9 et CBX3 dans l'IP suggère que ces protéines ne sont pas liées à ETV6. Cependant, comme les

contrôles positifs sont faiblement enrichis, les conditions d'expérimentations restent à optimiser afin de confirmer les résultats obtenus.

Par ailleurs, une identification des partenaires d'ETV6 a précédemment été réalisée dans notre laboratoire par analyse par spectrométrie de masse. La réaction de Co-IP préalable à cette analyse avait été réalisée à partir d'échantillons de protéines nucléaires. Nous avons donc utilisé ce protocole d'extraction protéique pour réaliser une seconde Co-IP dans les cellules Reh et valider ces résultats. Nous observons encore une fois un enrichissement d'ETV6-HA (Figure 26 B). Cependant, comme précédemment, les conditions d'expérimentations restent à optimiser en raison des contrôles positifs peu enrichis.

L'analyse par Co-IP dans les Reh, à la fois sur les protéines totales et les protéines nucléaires, suggère qu'il n'y a pas d'interaction physique entre SRP72, CBX3, SRP9 et ETV6. Cependant, ces résultats restent à confirmer.



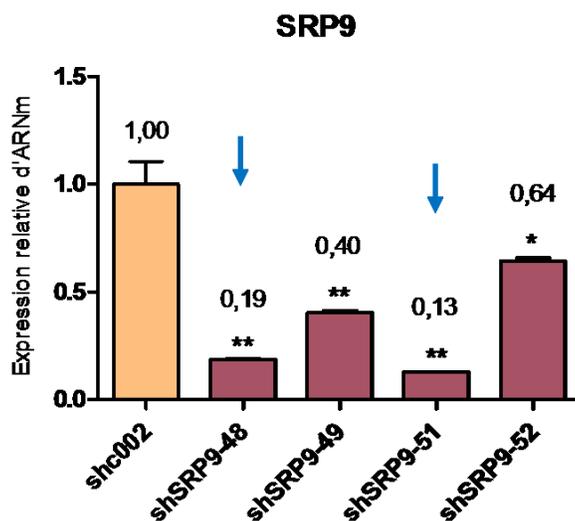
**Figure 26. Co-IP d'ETV6-HA dans les cellules Reh.** Les Co-IP ont été réalisées à partir d'extraits protéiques totaux (A) et nucléaires (B) de cellules Reh ETV6-HA et Reh ETV6 (contrôle). Une élution par chauffage a été réalisée avant d'analyser les fractions protéiques immunoprécipitées (IP), initiales (IN) et non capturées (UN) par immunobuvardage de type *Western*.

### 3.5. Validation de l'impact de SRP9 sur l'action ETV6 par l'utilisation de shRNA

SRP72 a été identifié comme modulateur d'ETV6 dans le criblage shRNA et SRP9 a été retrouvé dans l'analyse de spectrométrie de masse comme étant lié à ETV6. Étant donné que *SRP9* n'a pas été identifié dans le criblage shRNA, nous avons voulu vérifier son impact sur les cibles d'ETV6 en le réprimant de manière stable dans les cellules Reh. Ensuite, nous avons regardé l'influence de sa répression sur l'activité d'ETV6 en contrôlant l'expression de quatre de ses cibles transcriptionnelles (*SLC51A*, *IRX3*, *KCNA2* et *NTRK1*). Si SRP9 a un impact sur l'action répressive d'ETV6, les cibles seront réexprimées après son inhibition dans les cellules ETV6<sup>+/+</sup>.

#### 3.5.1. Choix des shRNA

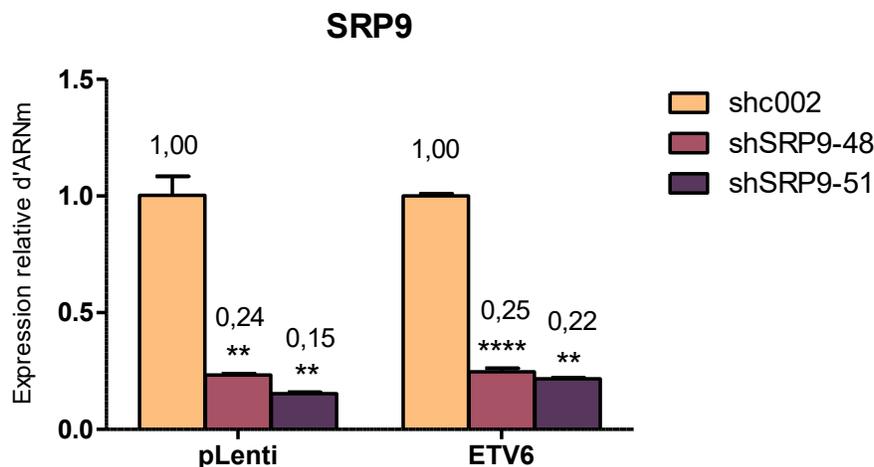
Nous avons initialement utilisé 4 shRNA pour étudier l'impact de la répression de *SRP9* dans les cellules Reh. La répression la plus forte du gène *SRP9* a été observée avec les shRNA 48 et 51 (indiqué par des flèches sur la Figure 27). Nous avons donc utilisé ces deux clones pour la suite de nos expériences.



**Figure 27. Expression relative de *SRP9* pour chaque shRNA.** Les shRNA ont été exprimés dans les Reh par infection lentivirale. Le niveau d'expression a été contrôlé par qPCR. La valeur p a été calculée avec le test-t de Student par comparaison entre les échantillons shc002 (shRNA contrôle) et chaque shSRP9.

### 3.5.2. Contrôle de l'efficacité des shRNA

Afin d'étudier l'expression des cibles d'ETV6 en l'absence de SRP9, les deux shRNA choisis pour leur efficacité (48 et 51) ont été utilisés pour réprimer *SRP9* dans les Reh pLenti et Reh ETV6. Nos résultats ont montré que le niveau d'expression de *SRP9* diminue à la suite des infections par les shRNA confirmant leur efficacité (Figure 28).

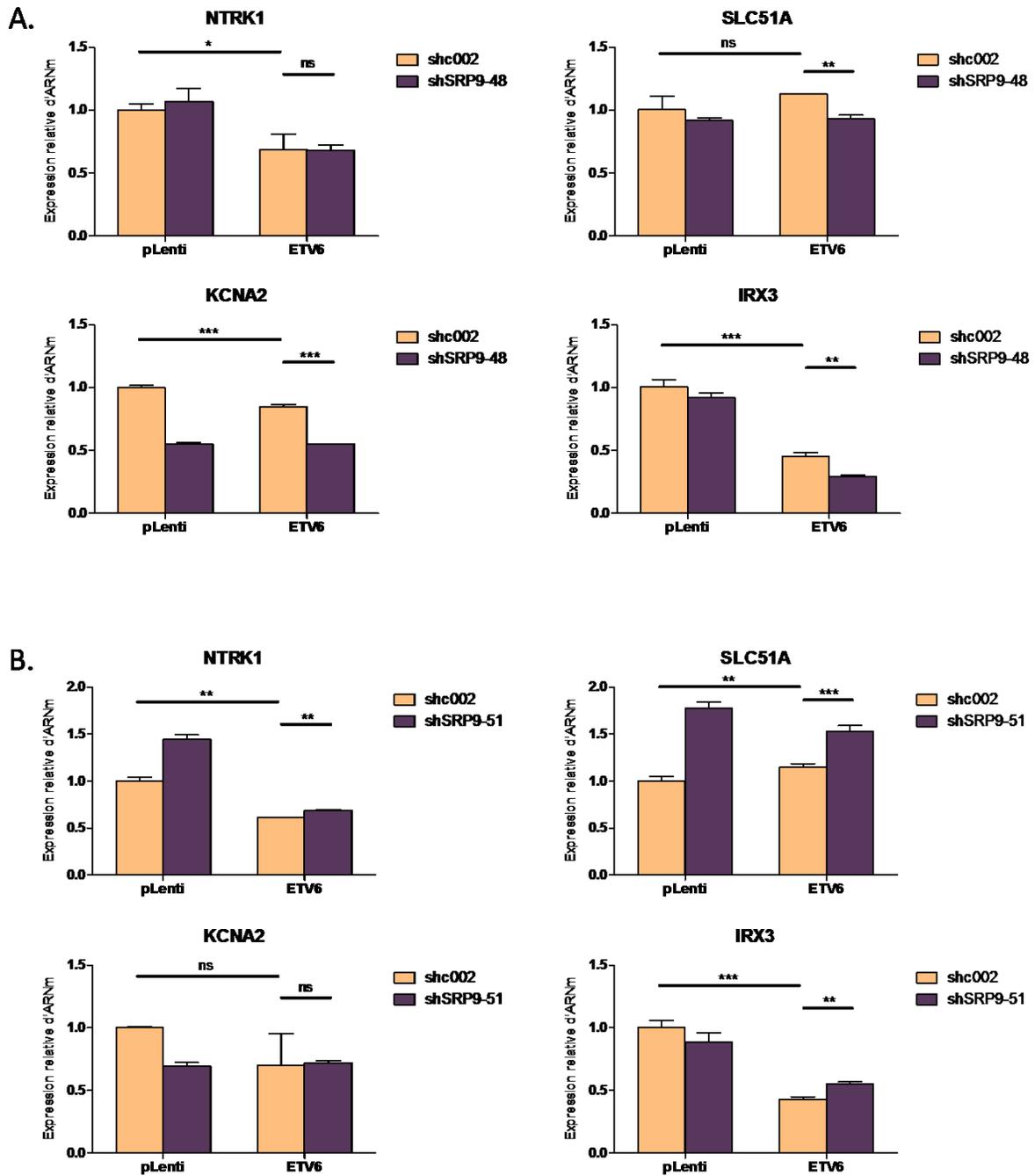


**Figure 28. Expression relative de *SRP9* pour les deux meilleurs shRNA.** Les shRNA ont été exprimés dans les Reh pLenti et Reh ETV6 par infection lentivirale. Le niveau d'expression a été contrôlé par qPCR. La valeur p a été calculée avec le test-t de Student par comparaison entre les échantillons shc002 (shRNA contrôle) et chaque shSRP9 pour chacun des groupes (pLenti et ETV6).

### 3.5.3. Contrôle de l'expression des cibles d'ETV6

À la suite de l'intégration des shSRP9 dans les cellules Reh pLenti et Reh ETV6, le niveau d'expression des 4 cibles d'ETV6 a été mesuré. Les cibles sont effectivement réprimées en présence d'ETV6, indépendamment du shSRP9, sauf pour *SLC51A* (condition shc002, Figure 29 A). Nous avons également remarqué qu'aucune des cibles n'est réexprimée après inhibition de *SRP9* dans les Reh ETV6. Cela suggère que l'action répressive d'ETV6 est indépendante de SRP9. Avec le shSRP-51, on observe une réexpression significative de *NTRK1*, *SLC51A* et *IRX3* en condition ETV6 (Figure 29 B). Cependant, comme le niveau de réexpression n'atteint pas celui sans ETV6 (pLenti), cette observation ne contredit pas les résultats obtenus avec le shSRP-48. Les conditions d'expérimentations restent à optimiser pour

valider ces résultats d'autant plus que la répression de *SLC51A* n'est pas observée dans la condition ETV6+shc002.



**Figure 29. Expression des cibles d'ETV6 après inhibition de *SRP9*.** Le gène *SRP9* est inhibé avec le shSRP9-48 (A) ou le shSRP9-51 (B). Le niveau d'expression a été contrôlé par qPCR. Les valeurs p ont été calculées avec le test-t de Student (n=3).

## **Chapitre 4 : Discussion**

## 4.1. SRP72, un nouveau modulateur d'ETV6

Dans mon projet, l'impact de SRP72, à titre de modulateur de l'activité d'ETV6, a été caractérisé. Avant mes travaux, peu de choses étaient connues sur la régulation de l'activité d'ETV6 et du rôle de SRP72 dans la leucémie. La majorité des modulateurs d'ETV6 ont un effet important mais restreint à un petit nombre de cibles, suggérant qu'ETV6 fait appel à différents mécanismes de régulation. SRP72, une protéine appartenant au complexe SRP, est quant à lui responsable de la régulation d'un grand nombre de cibles d'ETV6 selon la validation du criblage à haut débit. De plus, l'expression de plusieurs cibles d'ETV6 (*C6orf222*, *CLIC5*, *DSC3*, *IRX3*, *KCNA2*, *NTRK1*, *PIK3C3*, *SLC51A*, *TSPAN9*) a été contrôlée dans des cellules ETV6<sup>-/-</sup> après répression de *SRP72* [91]. L'expression des cibles n'est pas modulée en l'absence de SRP72 par rapport à la condition contrôle suggérant que l'action de SRP72 sur ces cibles implique ETV6. D'autre part, l'étude de l'impact de SRP72 dans notre cohorte de patients leucémiques a révélé un lien entre une diminution de l'activité de SRP72 et la surexpression de *SLC51A*, cible d'ETV6. Cela renforce l'hypothèse du rôle potentiel de SRP72 dans la modulation d'ETV6.

Par ailleurs, il est probable que seuls les modulateurs ayant un impact généralisé sur ETV6 et sur son réseau de régulation puissent être associés à certaines maladies hématologiques. A cet égard, des mutations dans *SRP72* ont été associées à des cas d'aplasie et de myélodysplasie familiale, des maladies de la moelle osseuse pouvant évoluer en leucémie aiguë myéloblastique [104]. Ces mutations affectent la liaison de SRP72 à l'ARN 7SL et aux autres protéines du complexe SRP compromettant la bonne formation et localisation cellulaire de ce dernier. En effet, des mutations dans *SRP72* induites *in vitro*, avaient déjà montré une altération dans l'assemblage du complexe et son accumulation dans le noyau cellulaire [105]. Des mutations dans *ETV6* sont également associées à ce type de maladie [106]. *SRP72* semble donc jouer un rôle dans la leucémogénèse probablement via la modulation de l'activité d'ETV6. Si les mutations dans *SRP72* caractérisées par Kirwan *et al.* [104] perturbent l'activité d'ETV6, la réexpression de certaines de ses cibles pourrait induire la maladie. La répression de ces cibles à un niveau normal serait un traitement envisageable.

D'autre part, l'analyse par spectrométrie de masse a révélé une liaison entre ETV6 et SRP9, une autre protéine du complexe SRP. Ce résultat suggère une interaction entre SRP72 et SRP9 pour moduler ETV6. L'expression des quatre cibles d'ETV6 étudiées est modulée par SRP72 mais ne l'est pas par SRP9. Cela suggère que les deux protéines sont impliquées dans des voies différentes. Cependant il n'est pas exclu que d'autres cibles soient influées à la fois par SRP9 et par SRP72. D'autre part, SRP9 pourrait exercer une action indirecte sur les cibles d'ETV6 via la modulation de SRP72.

## **4.2. L'impact de SRP72 sur ETV6 est indépendant du complexe SRP**

SRP72 est connu comme étant impliqué dans la traduction à travers le complexe protéique SRP [93, 105]. Ce complexe, composé de 6 protéines et d'un ARN 7SL, se lie au ribosome et assure la translocation des peptides naissants du cytoplasme vers le translocon du réticulum endoplasmique. En utilisant l'ES1, un inhibiteur de SRP, nous avons montré que l'impact de SRP72 sur ETV6 est indépendant de ce complexe et donc de la traduction. Ces observations vont de pair avec une étude montrant que SRP72 est capable de se lier à la chromatine via l'histone H4 indépendamment du complexe SRP [94]. La protéine pourrait également interagir avec l'histone H1 [107]. De plus, des tests à la luciférase ont montré que SRP72 agit comme activateur transcriptionnel [94]. En se liant à l'histone H4, SRP72 décondenserait la chromatine et favoriserait ainsi l'expression de ses cibles, potentiellement ETV6 ou un de ses partenaires. Un séquençage d'ARN dans les cellules SRP72<sup>+/+</sup> et SRP72<sup>-/-</sup> permettrait d'évaluer la fonction transcriptionnelle de SRP72 et d'identifier ses cibles. Nous pourrions alors voir si SRP72 a un effet sur l'expression d'un modulateur connu d'ETV6. D'autre part, les mutations dans SRP72 caractérisées par Kirwan *et al.* sont situées dans le domaine d'activation transcriptionnelle potentiel [94, 104] et pourraient moduler l'action de SRP72 sur ETV6 chez les patients myélodysplasiques. Les différents éléments discutés soutiennent le fait que, en plus de son rôle connu dans la traduction, SRP72 joue également un rôle dans la transcription en modulant l'expression des cibles d'ETV6.

L'ES1 inhibe le transfert des peptides naissant du ribosome vers le réticulum endoplasmique. C'est l'action de SRP qui est touché et non le complexe en tant que tel. En inhibant directement la formation du complexe, par exemple par mutagenèse du fragment d'ARN 7SL [108] ou en réprimant la synthèse de la sous unité SRP54 nécessaire à sa structure [109], on pourrait inactiver SRP directement et potentiellement observer un impact différent sur l'expression des cibles d'ETV6 de celui obtenu.

### **4.3. SRP72 ne semble pas former un complexe avec ETV6**

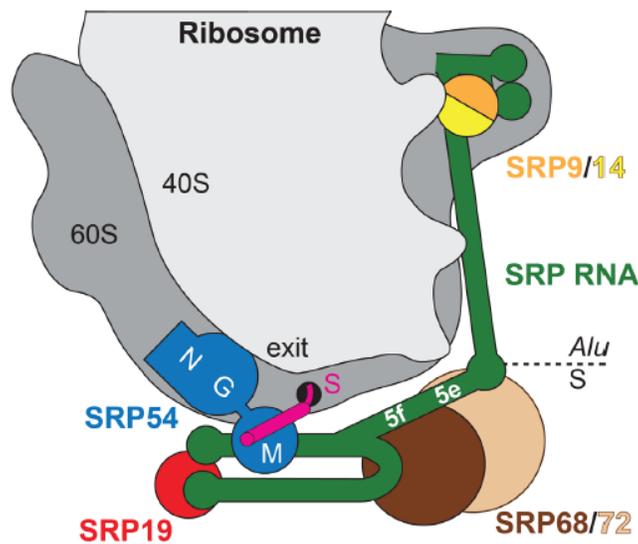
L'interaction entre SRP72 et ETV6 étant indépendante du complexe SRP, elle impliquerait un autre réseau de protéines partenaires. Nous avons observé que la répression de *CBX3*, comme *SRP72*, mène à une dérégulation de gènes ciblés par ETV6. Ceci suggère leur appartenance à la même voie de signalisation et par conséquent leur éventuel partenariat pour moduler l'action d'ETV6. De plus, SRP9 a été identifié comme étant lié à ETV6 par spectrométrie de masse et est membre du complexe SRP. Il pourrait donc également agir en partenariat avec SRP72. Nos expériences de Co-IP démontrent cependant l'absence d'interaction entre ETV6 et SRP72, SRP9 ou CBX3 dans la lignée cellulaire HeLa. Ces résultats restent à confirmer dans la lignée leucémique Reh où les conditions d'expérimentations sont encore à optimiser.

Par ailleurs, la faible surexpression de nos deux contrôles positifs, RUVBL1 et KAP1, dans les cellules Reh est inattendue. En effet, il a été démontré que RUVBL1 peut se lier à ETV6 au moins dans les HeLa et les Reh [101]. La liaison avec KAP1 n'a pas été observée dans les HeLa mais dans différentes lignées cellulaires, dont Reh [101, 102]. Il est donc possible que la liaison entre KAP1 et ETV6 soit très faible ou absente des HeLa. La protéine ETV6 étant capable de se lier à ETV6-RUNX1 [69], l'enrichissement de la fusion observé dans l'IP a été utilisé comme contrôle positif. Sur la base des résultats obtenus, deux hypothèses peuvent être débattues :

1. Il n'y a pas d'interaction physique entre ETV6 et ses modulateurs dans les cellules Reh. Considérant les études démontrant la liaison de SRP72 à la chromatine et son rôle d'activateur transcriptionnel [94, 107], SRP72 pourrait moduler ETV6 indirectement en lui permettant de se lier à l'ADN. A cela s'ajoute le fait que certains gènes, en l'occurrence CBX3, sont impliqués dans la modulation de la chromatine et

jouerait un rôle dans la répression transcriptionnelle [110]. Ces gènes pourraient donc agir, non pas en partenariat, mais en alternance avec SRP72 pour moduler ETV6.

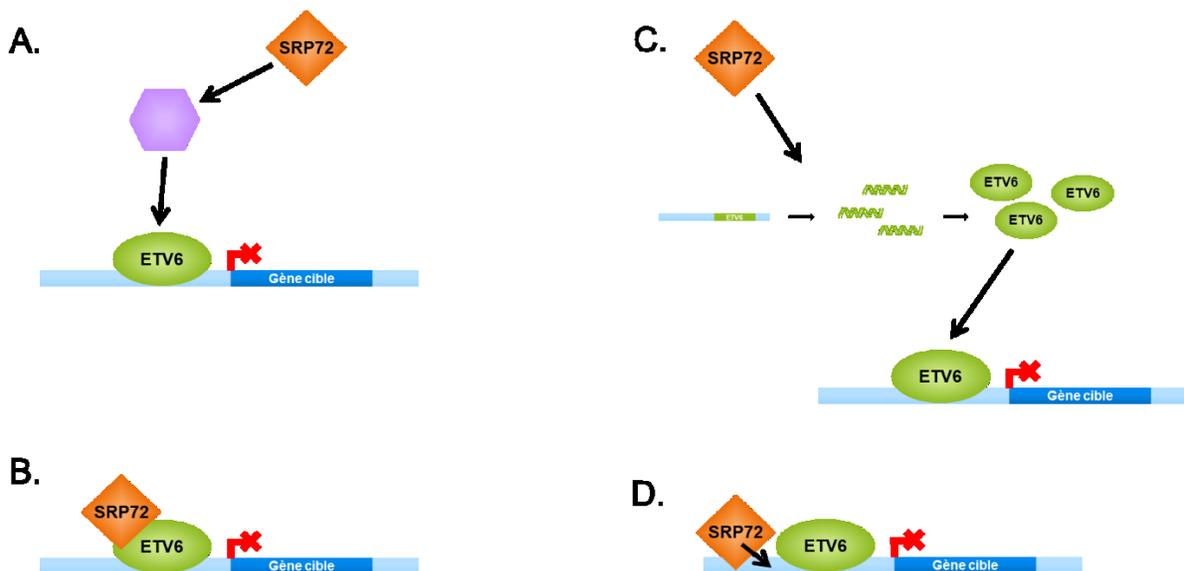
- Il y a une interaction physique entre ETV6 et ses modulateurs dans les cellules Reh, mais un problème technique nous a empêchés de mettre en évidence une telle liaison. Il est possible que l'interaction ETV6/partenaires soit très fragile et donc difficile à capturer par Co-IP. À cet égard, les protéines SRP72 et SRP9 sont liées à l'ARN 7SL de SRP assurant l'intégrité du complexe (Figure 30) [108, 111, 112]. Ces observations laissent supposer que, dans le contexte de l'interaction avec ETV6, les protéines forment un complexe supporté par un ARN rendant l'interaction fragile. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions rajouter un inhibiteur de la RNase lors de l'extraction des complexes par Co-IP. La méthode de retard sur gel (EMSA) permettrait également d'identifier une éventuelle interaction protéine-ARN [113]. D'autre part, pour stabiliser une interaction protéique fragile, la technique de réticulation (*crosslinking*) pourrait être utilisée afin de stabiliser les liaisons [114].



**Figure 30. Structure du complexe SRP.** Le schéma permet de visualiser la liaison entre l'ARN 7SL (en vert) et le dimère SRP68-SRP72 (en brun) d'une part, et le dimère SRP9-SRP14 (en jaune) d'autre part. Figure adaptée de Becker *et al.* 2017 [112].

## 4.4. Proposition de modèles pour l'impact de SRP72 sur ETV6

Quatre hypothèses sont proposées pour expliquer l'impact de SRP72 sur la modulation de l'activité d'ETV6.



**Figure 31. Modèles expliquant l'impact de SRP72 sur ETV6.** (A) SRP72 impacte ETV6 via une autre protéine ou un autre complexe. (B) SRP72 est lié directement à ETV6. (C) SRP72 impacte le niveau d'expression d'ETV6. (D) SRP72 agit sur la liaison entre ETV6 et la chromatine.

### 4.4.1. Modèle A : SRP72 a un effet indirect sur ETV6

SRP72 agit sur une protéine ou un complexe protéique intermédiaire qui va à son tour moduler ETV6. Il peut également s'agir de plusieurs intermédiaires. Nous avons démontré que cet intermédiaire n'est pas le complexe SRP. SRP72 pourrait agir sur cet intermédiaire en régulant son expression ou en modulant son activité via dimérisation par exemple.

Ce modèle reste difficile à vérifier étant donné que l'intermédiaire potentiel est inconnu. Cependant, on s'attend à le retrouver parmi les modulateurs connus d'ETV6 identifiés lors du criblage shRNA. Seulement les modulateurs avec deux shRNA ont été conservés dans la validation du criblage. En revanche, plusieurs gènes, dont le membre du complexe SRP *SRP14*, ont été révélés avec seulement un shRNA, mais n'ont pas été testés sur les cibles d'ETV6. Il serait possible que l'intermédiaire inconnu soit présent dans cette liste. Il serait donc intéressant

de contrôler si SRP14 a un effet sur les cibles d'ETV6 car il pourrait agir en partenariat avec SRP72.

D'autre part, le modulateur influé par SRP72 pourrait être retrouvé dans l'analyse par spectrométrie de masse. Cependant, l'extraction protéique réalisée lors de cette étude n'a pas permis d'analyser les protéines qui sont associées à ETV6 uniquement au niveau de la chromatine. De plus, la Co-IP préalable à l'analyse par spectrométrie de masse est peu efficace sur les complexes protéiques formés exclusivement sur l'ADN en raison de leur faible abondance [115]. Des méthodes alternatives plus efficaces qui stabilisent les liaisons peuvent être envisagées, comme le RIME [116, 117]. Étant donné que SRP72 se lie à la chromatine et impacterait ETV6 par cette voie, il serait pertinent d'analyser les liaisons protéiques associées à la chromatine. La comparaison de ces résultats avec les données du criblage shRNA permettrait de se concentrer sur les corépresseurs d'ETV6 et d'exclure les protéines qui ont seulement un effet sur sa liaison chromatinienne.

Enfin, l'activité transcriptionnelle d'ETV6 est également modulée par la sumoylation [86-88] et la phosphorylation [89, 90] (voir section 1.5.5.2). L'intermédiaire entre SRP72 et ETV6 pourrait agir par une de ces voies, par exemple en modulant l'expression de UBC9 [86] ou PIAS3 [88] des protéines impliquées dans la sumoylation d'ETV6.

#### **4.4.2. Modèle B : SRP72 a un effet sur ETV6 par interaction directe**

Les résultats de l'analyse par spectrométrie de masse suggèrent qu'il n'y a pas de liaison physique directe entre SRP72 et ETV6. Les résultats obtenus à la suite de l'expérience de Co-IP vont également dans ce sens. Plusieurs expériences alternatives peuvent être réalisées pour valider l'absence d'interaction entre ETV6 et SRP72. Le FRET, pour *Förster resonance energy transfer*, est une technique utilisant la microscopie à fluorescence pour identifier des interactions directes (< 10nm) entre protéines [118]. Le principe est basé sur les longueurs d'onde d'émission et d'excitation des fluorophores couplées aux protéines d'intérêts. Lorsque le fluorophore de la première protéine (dans notre cas ETV6) est excité, il émet une lumière capable d'exciter un fluorophore différent associé à la seconde protéine (dans notre cas SRP72) si elle se situe à moins de 10nm. La détection du fluorophore associé à SRP72 suggère que les protéines sont liées. Une autre alternative est la méthode du double hybride dans la levure [119]. Cette

technique utilise la protéine GAL4 composée d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine activateur, tous deux nécessaires à son activité. Deux hybrides peuvent être créés en fusionnant ETV6 avec le premier domaine de GAL4 et SRP72 avec le second domaine. Si les protéines sont liées, nous observerons une activité transcriptionnelle de GAL4 à la suite du rapprochement de ses deux domaines.

#### **4.4.3. Modèle C : SRP72 agit sur la production de la protéine ETV6**

Cette hypothèse a été vérifiée précédemment dans notre laboratoire et il s'avère que le niveau d'expression d'ETV6 reste inchangé après inhibition de SRP72 dans les cellules en culture (Annexe D, Figure 33).

#### **4.4.4. Modèle D : SRP72 a un impact sur la chromatine permettant à ETV6 de se lier à l'ADN**

Notre étude a révélé l'indépendance du complexe SRP dans l'activité d'ETV6 ainsi que l'absence d'interaction physique entre SRP72 et ETV6 soutenant ce modèle. De plus, l'hypothèse est soutenue par les données de la littérature qui suggèrent que SRP72 est capable de se lier à la chromatine indépendamment du complexe SRP [94, 107]. Les expériences de validation sur SRP9 ont montré d'une part que cette protéine n'est pas liée à ETV6 et d'autre part qu'elle ne module pas son activité transcriptionnelle. Ces résultats vont dans le sens du modèle D en excluant encore une fois le complexe SRP de la régulation d'ETV6. Par ailleurs, nous avons vu que des mutations dans SRP72 altèrent son interaction avec les protéines du complexe SRP d'une part et que le dimère SRP68-SRP72 se fixe à l'histone H4 d'autre part. Il se pourrait que dans l'étude de Kirwan *et al.* [104], les maladies soient induites par un défaut de fixation de SRP72 à l'histone H4 à la suite de l'apparition de mutations compromettant la formation du dimère SRP68-SRP72 nécessaire à la liaison à la chromatine. L'implication d'ETV6 dans ce processus reste à démontrer. Enfin, SRP68-SRP72 aurait un rôle d'activateur transcriptionnel [104]. SRP68, probablement en dimère avec SRP72, active l'expression de NF1, un gène muté dans un cas de rechutes sévères [120] et de patients LAL pré-B à haut-risque [121], suggérant une implication dans la persévérance de la maladie.

Même si d'autres expériences sont requises pour éliminer l'hypothèse d'une interaction directe entre SRP72 et ETV6 (modèle B), l'ensemble des résultats, associés aux données de la littérature, sont en faveur d'un impact indirect via la modulation de la chromatine (modèle D). Une analyse ChIP-seq sur les histones, avant et après inhibition de SRP72 permettrait de valider si ce dernier a bien un impact sur le remodelage de la chromatine. Cette méthode a déjà été utilisée notamment sur l'acétylation et la méthylation des histones responsables du réarrangement chromatinien [122-124]. Cette expérience montrerait également si les régions influées par SRP72 correspondent à la liaison à l'ADN d'ETV6 et quelles seraient les cibles modulées. Si tel est le cas, ce modèle serait davantage plausible car la chromatine décondensée par SRP72 est accessible aux facteurs de transcription tels qu'ETV6. D'autre part, la répression de SRP72 dans les cellules ETV6<sup>-/-</sup> n'a pas eu d'impact significatif sur les cibles suggérant que sa modulation est bien dépendante d'ETV6 [91].

## **Chapitre 5 : Conclusion et perspectives**

*ETV6* est inactivé chez une grande proportion de patients atteints de leucémie pédiatrique suggérant un rôle important de ce gène dans la leucémogenèse. Mon projet de maîtrise a permis de caractériser davantage les interactions entre *ETV6* et *SRP72*, un ses partenaires. Cette protéine est impliquée dans la translocation des peptides vers le réticulum endoplasmique via le complexe SRP. Avant ce projet, le rôle de *SRP72* dans la tumorigenèse était inconnu. Nous avons pu démontrer que l'impact de *SRP72* sur *ETV6* est indépendant de son rôle connu dans la traduction via SRP, mais passerait plutôt par une voie transcriptionnelle en se liant à la chromatine. D'autre part, *SRP72* ne semble pas interagir directement avec *ETV6* supportant l'hypothèse que *SRP72* a une action sur la chromatine qui empêcherait potentiellement *ETV6* de se lier à l'ADN. D'autre part, l'étude de l'impact de *SRP9*, membre du complexe SRP, sur *ETV6* a démontré que leurs activités sont indépendantes. Cela soutient le fait que la modulation d'*ETV6* par *SRP72* est indépendante du complexe SRP.

Pour aller plus loin dans la caractérisation de l'impact de *SRP72* sur l'activité d'*ETV6*, plusieurs expériences sont envisageables. Il est possible que *SRP72* soit nécessaire à la liaison à l'ADN d'*ETV6*. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions réaliser une immunoprécipitation de la chromatine de la région d'ADN liée par *ETV6* en l'absence de *SRP72*. D'autre part, des mutations dans *SRP72* ont été identifiées dans des cas d'aplasie et myélodysplasie familiale. En reproduisant ces mutations par une approche de type CRISPR, nous pourrions tester si elles ont un effet sur l'activité d'*ETV6*. Ces mutations pourraient être le second événement nécessaire au développement de la leucémie.

De nombreux événements et modifications génétiques jouent un rôle dans l'initiation de la LAL pédiatrique impliquant la présence de différents acteurs, particulièrement *ETV6*. L'étude précise d'un de ses régulateurs, *SRP72*, permet de mieux comprendre les processus moléculaires de la maladie et d'éclaircir notre compréhension du mécanisme inducteur de la leucémie chez les patients porteur de la translocation t(12;21) pour ainsi ouvrir la porte à de nouveaux traitements adaptés pour ces patients.

## **Références**

1. Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, *Statistiques canadiennes sur le cancer 2017*. 2017, Société canadienne du cancer: Toronto, ON
2. Yarbro, C., D. Wujcik, and B. Holmes-Gobel, *Cancer Nursing: Principles and Practice*. 7th Edition ed. 2011: Jones and Bartlett Publishers.
3. Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, *Statistiques canadiennes sur le cancer 2016*. 2016, Société canadienne du cancer: Toronto, ON.
4. Tasian, S.K., M.L. Loh, and S.P. Hunger, *Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy*. *Cancer*, 2015. **121**(20): p. 3577-90.
5. Sankaran, V.G. and M.J. Weiss, *Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies*. *Nat Med*, 2015. **21**(3): p. 221-30.
6. Mandel, E.M. and R. Grosschedl, *Transcription control of early B cell differentiation*. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(2): p. 161-7.
7. Mullighan, C.G., et al., *Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia*. *Nature*, 2007. **446**(7137): p. 758-64.
8. Rose-Inman, H. and D. Kuehl, *Acute leukemia*. *Emerg Med Clin North Am*, 2014. **32**(3): p. 579-96.
9. Pui, C.H. and W.E. Evans, *Treatment of acute lymphoblastic leukemia*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(2): p. 166-78.
10. Loffler, A., et al., *A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes*. *Blood*, 2000. **95**(6): p. 2098-103.
11. Portell, C.A. and A.S. Advani, *Novel targeted therapies in acute lymphoblastic leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2014. **55**(4): p. 737-48.
12. Topp, M.S., et al., *Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL*. *Blood*, 2012. **120**(26): p. 5185-7.
13. Hunger, S.P. and C.G. Mullighan, *Acute Lymphoblastic Leukemia in Children*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(16): p. 1541-52.
14. Alphamatzidou, M., et al., *ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): The spectrum of clonal heterogeneity and its impact on prognosis*. *Cancer Genet*, 2018. **224-225**: p. 1-11.
15. Greaves, M., *Leukaemia 'firsts' in cancer research and treatment*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(3): p. 163-72.
16. Belson, M., B. Kingsley, and A. Holmes, *Risk factors for acute leukemia in children: a review*. *Environ Health Perspect*, 2007. **115**(1): p. 138-45.
17. Greaves, M., *A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia*. *Nat Rev Cancer*, 2018.
18. Sinnott, D., M. Krajcinovic, and D. Labuda, *Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2000. **38**(5-6): p. 447-62.
19. Sinnott, D., et al., *La leucémie de l'enfant Une maladie génétique ! M/S*, 2007. **23**: p. 968-974.
20. Sherborne, A.L., et al., *Rationale for an international consortium to study inherited genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2011. **96**(7): p. 1049-54.
21. Moriyama, T., M.V. Relling, and J.J. Yang, *Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2015. **125**(26): p. 3988-95.

22. Gill Super, H.J., et al., *Clonal, nonconstitutional rearrangements of the MLL gene in infant twins with acute lymphoblastic leukemia: in utero chromosome rearrangement of 11q23*. Blood, 1994. **83**(3): p. 641-4.
23. Greaves, M.F., et al., *Leukemia in twins: lessons in natural history*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2321-33.
24. Greaves, M., *Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(3): p. 193-203.
25. Wang, Q., et al., *Braf Mutations Initiate the Development of Rat Gliomas Induced by Postnatal Exposure to N-Ethyl-N-Nitrosourea*. Am J Pathol, 2016. **186**(10): p. 2569-76.
26. Wiemels, J.L., et al., *Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 15101-6.
27. Chang, P., et al., *FLT3 mutation incidence and timing of origin in a population case series of pediatric leukemia*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 513.
28. Hakeem, A., et al., *Prognostification of ALL by Cytogenetics*. Indian J Hematol Blood Transfus, 2015. **31**(3): p. 322-31.
29. Golub, T.R., et al., *Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4917-21.
30. Paulsson, K., *High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia: Chromosomal gains as the main driver event*. Mol Cell Oncol, 2016. **3**(1): p. e1064555.
31. Maurer, J., et al., *Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction*. Lancet, 1991. **337**(8749): p. 1055-8.
32. Meyer, C., et al., *The MLL recombinome of acute leukemias in 2013*. Leukemia, 2013. **27**(11): p. 2165-76.
33. Rowley, J.D., *The critical role of chromosome translocations in human leukemias*. Annu Rev Genet, 1998. **32**: p. 495-519.
34. Chen, Q., et al., *Coding sequences of the tal-1 gene are disrupted by chromosome translocation in human T cell leukemia*. J Exp Med, 1990. **172**(5): p. 1403-8.
35. Russell, L.J., et al., *Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2009. **114**(13): p. 2688-98.
36. De Braekeleer, E., et al., *ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review*. Leuk Res, 2012. **36**(8): p. 945-61.
37. Rasighaemi, P. and A.C. Ward, *ETV6 and ETV7: Siblings in hematopoiesis and its disruption in disease*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. **116**: p. 106-115.
38. Wang, L.C., et al., *The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2392-402.
39. Chen, M.J., et al., *Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 887-91.
40. Sun, W. and J.R. Downing, *Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3565-72.
41. Zelent, A., M. Greaves, and T. Enver, *Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4275-83.

42. Hiebert, S.W., et al., *The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1349-55.
43. Gunji, H., et al., *TEL/AML1 shows dominant-negative effects over TEL as well as AML1*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(2): p. 623-30.
44. Daly, M.E., *Transcription factor defects causing platelet disorders*. Blood Rev, 2017. **31**(1): p. 1-10.
45. Tsuzuki, S., et al., *Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8443-8.
46. Morrow, M., et al., *TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3890-6.
47. Ford, A.M., et al., *The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF-beta pathway in early B lineage progenitor cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(4): p. 826-36.
48. Mangolini, M., et al., *STAT3 mediates oncogenic addiction to TEL-AML1 in t(12;21) acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2013. **122**(4): p. 542-9.
49. Kaindl, U., et al., *Blocking ETV6/RUNX1-induced MDM2 overexpression by Nutlin-3 reactivates p53 signaling in childhood leukemia*. Leukemia, 2014. **28**(3): p. 600-8.
50. Fuka, G., et al., *Silencing of ETV6/RUNX1 abrogates PI3K/AKT/mTOR signaling and impairs reconstitution of leukemia in xenografts*. Leukemia, 2012. **26**(5): p. 927-33.
51. Golub, T.R., et al., *Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation*. Cell, 1994. **77**(2): p. 307-16.
52. Kar, A. and A. Gutierrez-Hartmann, *Molecular mechanisms of ETS transcription factor-mediated tumorigenesis*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013. **48**(6): p. 522-43.
53. Hollenhorst, P.C., L.P. McIntosh, and B.J. Graves, *Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 437-71.
54. Mavrothalassitis, G. and J. Ghysdael, *Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6524-32.
55. Baens, M., et al., *Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6*. Genome Res, 1996. **6**(5): p. 404-13.
56. Wang, L.C., et al., *Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL*. EMBO J, 1997. **16**(14): p. 4374-83.
57. Rasighaemi, P., et al., *ETV6 (TEL1) regulates embryonic hematopoiesis in zebrafish*. Haematologica, 2015. **100**(1): p. 23-31.
58. Ciau-Uitz, A., et al., *Tel1/ETV6 specifies blood stem cells through the agency of VEGF signaling*. Dev Cell, 2010. **18**(4): p. 569-78.
59. Hock, H., et al., *Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival*. Genes Dev, 2004. **18**(19): p. 2336-41.
60. Rompaey, L.V., et al., *Tel induces a G1 arrest and suppresses Ras-induced transformation*. Oncogene, 2000. **19**(46): p. 5244-50.
61. Fenrick, R., et al., *TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(16): p. 5828-39.
62. Yamagata, T., et al., *TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(2): p. 517-26.

63. Andreasson, P., et al., *The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001. **130**(2): p. 93-104.
64. Wiemels, J.L., et al., *Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero*. *Blood*, 1999. **94**(3): p. 1057-62.
65. Mori, H., et al., *Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(12): p. 8242-7.
66. Patel, N., et al., *Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia*. *Br J Haematol*, 2003. **122**(1): p. 94-8.
67. Romana, S.P., et al., *Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21)*. *Leukemia*, 1996. **10**(1): p. 167-70.
68. Lopez, R.G., et al., *TEL is a sequence-specific transcriptional repressor*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(42): p. 30132-8.
69. McLean, T.W., et al., *TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1996. **88**(11): p. 4252-8.
70. Green, S.M., et al., *DNA binding by the ETS protein TEL (ETV6) is regulated by autoinhibition and self-association*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(24): p. 18496-504.
71. Chakrabarti, S.R. and G. Nucifora, *The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **264**(3): p. 871-7.
72. Guidez, F., et al., *Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein*. *Blood*, 2000. **96**(7): p. 2557-61.
73. Bocconi, P., et al., *The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6)*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(17): p. 15412-20.
74. Schick, N., et al., *TEL/ETV6 is a signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)-induced repressor of Stat3 activity*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(37): p. 38787-96.
75. Kuwata, T., et al., *Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(21): p. 7439-48.
76. Irvin, B.J., et al., *TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(47): p. 46378-86.
77. Neveu, B., et al., *CLIC5: a novel ETV6 target gene in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2016. **101**(12): p. 1534-1543.
78. Neveu, B., et al., *Genome wide mapping of ETV6 binding sites in pre-B leukemic cells*. *Scientific Reports*, Soumis.
79. Boily, G., et al., *Identification of transcripts modulated by ETV6 expression*. *Br J Haematol*, 2007. **136**(1): p. 48-62.
80. Kwiatkowski, B.A., et al., *The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(28): p. 17525-30.
81. Fears, S., et al., *Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(5): p. 1949-54.
82. Lagacé, K., *Identification de nouvelles cibles transcriptionnelles d'ETV6, un facteur de transcription fréquemment altéré dans la leucémie aiguë lymphoblastique*, in

- Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine. 2014, Université de Montréal.
83. Park, H., et al., *Identification of the nuclear localization motif in the ETV6 (TEL) protein*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006. **167**(2): p. 117-21.
  84. Chauhan, B.K., et al., *Identification of genes downstream of Pax6 in the mouse lens using cDNA microarrays*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(13): p. 11539-48.
  85. Chakrabarti, S.R., et al., *Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(13): p. 7467-72.
  86. Chakrabarti, S.R., et al., *Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(24): p. 13281-5.
  87. Wood, L.D., et al., *Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(6): p. 3257-62.
  88. Roukens, M.G., et al., *Identification of a new site of sumoylation on Tel (ETV6) uncovers a PIAS-dependent mode of regulating Tel function*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(7): p. 2342-57.
  89. Arai, H., et al., *Functional regulation of TEL by p38-induced phosphorylation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **299**(1): p. 116-25.
  90. Lopez, R.G., C. Carron, and J. Ghysdael, *v-SRC specifically regulates the nucleocytoplasmic delocalization of the major isoform of TEL (ETV6)*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(42): p. 41316-25.
  91. Neveu, B., et al., *High throughput functional screening of ETV6 transcriptional activity*. Cet article sera soumis à *Genome Biology*, En préparation.
  92. Doudna, J.A. and R.T. Batey, *Structural insights into the signal recognition particle*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 539-57.
  93. Keenan, R.J., et al., *The signal recognition particle*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 755-75.
  94. Li, J., et al., *A novel histone H4 arginine 3 methylation-sensitive histone H4 binding activity and transcriptional regulatory function for signal recognition particle subunits SRP68 and SRP72*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(48): p. 40641-51.
  95. Kalies, K.-U. and K. Römisch, *Inhibitors of Protein Translocation Across the ER Membrane*. *Traffic*, 2015: p. 1027-1038.
  96. Cross, B.C.S., et al., *Eeyarestatin I inhibits Sec61-mediated protein translocation at the endoplasmic reticulum*. *Journal of Cell Science*, 2009. **122**: p. 4393-4400.
  97. Mckibbin, C., et al., *Inhibition of protein translocation at the endoplasmic reticulum promotes activation of the unfolded protein response*. *Biochemical Journal*, 2012. **442**: p. 639-648.
  98. Nagashima, Y., et al., *Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor*. *Sci Rep*, 2011. **1**: p. 29.
  99. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-2ΔΔCt</sup> Method*. *Methods*, 2001. **25**: p. 402-408.
  100. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, 1951. **193**: p. 265-275.

101. Gioia, R., et al., *ETV6/TEL Plays a Key Role in KAP1/TRIM28-Dependant DNA Damage Response in Acute Lymphoblastic Leukemia*. Cet article sera soumis à Leukemia, en préparation.
102. Nakamura, Y., et al., *TEL/ETV6 binds to corepressor KAP1 via the HLH domain*. Int J Hematol, 2006. **84**(4): p. 377-80.
103. Paddison, P.J., et al., *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*. Genes & development, 2002. **16**: p. 948-958.
104. Kirwan, M., et al., *Exome sequencing identifies autosomal-dominant SRP72 mutations associated with familial aplasia and myelodysplasia*. Am J Hum Genet, 2012. **90**(5): p. 888-92.
105. van Nues, R.W., et al., *Roles for Srp72p in assembly, nuclear export and function of the signal recognition particle*. RNA Biology, 2014. **5**(2): p. 73-83.
106. Babushok, D.V., M. Bessler, and T.S. Olson, *Genetic predisposition to myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children and young adults*. Leuk Lymphoma, 2016. **57**(3): p. 520-36.
107. Kalashnikova, A.A., et al., *Linker histone H1.0 interacts with an extensive network of proteins found in the nucleolus*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(7): p. 4026-35.
108. Yin, J., et al., *Identification of the RNA binding regions of SRP68/72 and SRP72 by systematic mutagenesis of human SRP RNA*. RNA Biol, 2007. **4**(3): p. 154-9.
109. Menichelli, E., et al., *Protein-induced conformational changes of RNA during the assembly of human signal recognition particle*. J Mol Biol, 2007. **367**(1): p. 187-203.
110. Mishima, Y., et al., *Nucleosome compaction facilitates HP1gamma binding to methylated H3K9*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(21): p. 10200-12.
111. Berger, A., et al., *Direct binding of the Alu binding protein dimer SRP9/14 to 40S ribosomal subunits promotes stress granule formation and is regulated by Alu RNA*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(17): p. 11203-17.
112. Becker, M.M., et al., *Structures of human SRP72 complexes provide insights into SRP RNA remodeling and ribosome interaction*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(1): p. 470-481.
113. Re, A., et al., *RNA-protein interactions: an overview*. Methods Mol Biol, 2014. **1097**: p. 491-521.
114. Sakato, M., *Crosslinking methods purification and analysis of crosslinked dynein products*. Methods Cell Biol, 2009. **91**: p. 161-71.
115. Lambert, J.P., K. Baetz, and D. Figeys, *Of proteins and DNA--proteomic role in the field of chromatin research*. Mol Biosyst, 2010. **6**(1): p. 30-7.
116. Mohammed, H., et al., *Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins (RIME) for analysis of chromatin complexes*. Nat Protoc, 2016. **11**(2): p. 316-26.
117. Guillen-Ahlers, H., et al., *Advanced methods for the analysis of chromatin-associated proteins*. Physiol Genomics, 2014. **46**(13): p. 441-7.
118. Pietraszewska-Bogiel, A. and T.W. Gadella, *FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology*. J Microsc, 2011. **241**(2): p. 111-8.
119. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
120. Griffith, M., et al., *Comprehensive genomic analysis reveals FLT3 activation and a therapeutic strategy for a patient with relapsed adult B-lymphoblastic leukemia*. Exp Hematol, 2016. **44**(7): p. 603-13.

121. Reshmi, S.C., et al., *Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: a study from the Children's Oncology Group*. *Blood*, 2017. **129**(25): p. 3352-3361.
122. Chabbert, C.D., et al., *A high-throughput ChIP-Seq for large-scale chromatin studies*. *Mol Syst Biol*, 2015. **11**(1): p. 777.
123. Kurdistani, S.K., S. Tavazoie, and M. Grunstein, *Mapping global histone acetylation patterns to gene expression*. *Cell*, 2004. **117**(6): p. 721-33.
124. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. *Cell*, 2007. **129**(4): p. 823-37.

## **Annexes**

## Annexe A

**Tableau X. Cibles potentielles d'ETV6 et leurs méthodes de validation.**

CIBLES	Analyse sur micropuces [79]	Séquençage d'ARN [77]	Séquençage d'ARN ciblé [77]	ChIP-seq [78]	qPCR [78, 79]	Réexpression dans les patients LAL [77, 79]
ABCA1		X				
ABCA9		X				X
ABCC3	X					
ABHD3		X				X
ABHD4		X				
ADRB2		X	X	X		
AKR1C1	X				X	
AKR1C3	X				X	
ANGPTL2		X		X		X
ANXA4	X				X	
APBA1	X					
ASB9	X					
ATP1A3		X				
BIRC7		X				X
C11orf8	X					
C20orf197		X				
C3	X					
C6orf222		X	X	X	X	X
CAMKK2	X					
CASP4		X				
CD82				X		
CDK14		X		X		
CERKL		X				
CLIC3	X					
CLIC5		X	X	X	X	X
CNN2		X				
CROT	X					
CRSP2	X					
CTSC		X				
DDIT4L		X				
DHCR7	X					
DKFZP586A0522	X					
DSC3		X	X	X	X	
DSC9				X		
DTR	X					
EHD2		X	X	X		
EST1051	X					
EST1383	X					
EST2140	X					
EST635	X					
ETV6				X		
FAM132B		X				X
FAM19A1						X
FARP1						X
FDFT1	X					
FGFBP2		X	X	X		
FHL1	X					
FHL1	X					
FLRT3	X					
FRK		X				X
G6PD	X					
GABARAPLI	X					
GAS7		X				
HAP1		X				X
HBEGF	X					
HMGCS1		X				
HNRNPA1P37		X				
HOMER1		X	X	X		
HSD17B7	X					
ID11	X					
IFNGR1		X				
IGSF10		X				X
IKZF2		X				

IL18	X				X	X
IL8		X				
IMPA2	X					
IRX3		X	X	X	X	X
ITGA4		X		X		
ITGB2		X	X	X		
KBTBD4	X					
KCNA2		X	X	X	X	X
KCNAB2	X					
KCNJ16		X				
KCNJ2		X				
KCTD7	X					
KIAA0226L		X	X	X		
KLHL30		X		X		X
KRT9		X		X		
LCP1		X				
LDLR	X					
LGALS1		X				
LIM2	X					
LIMA1		X				
LINC00158		X				
LINC01221				X		
LPIN1	X					
LRMP		X				
LRRC4		X				X
LUM	X				X	X
MAG11		X		X		
MCTP2				X		
MEX3B		X				
MGC4829	X					
MIB1		X	X	X		
MIR155HG		X				
MSR1	X					
MTHFD2L		X				
MTRF1	X					
MYL9	X					
MYLK				X		
MYOCD		X				X
NABP1		X				
NDFIP2		X		X		X
NINJ2	X					
NKAIN4						
NRP1						
NT5DC1		X				
NTRK1		X	X	X	X	X
NUDT6	X					
NUDT6	X					
OASL	X					
OSR2		X				
PDE1A				X		
PECR	X					
PEG10		X				
PIK3C3		X	X	X	X	X
PIK3CG		X				
PIM1		X				X
PLAC8	X					
PPM1F				X		
PPP2R2B	X					
PPP3CC	X					
PRPF31				X		
PTGER4	X				X	X
PTP4A1		X				
PTPN14		X				
PTPRC		X	X	X		
PTPRE				X		
RAP1GAP		X	X	X		
RAP1GAP2				X		
RCOR1		X				
RGS1		X	X	X		
ROBO1		X				
RRAS	X				X	
SC4MOL	X					
SEC14L1	X					
SEMA3A		X	X	X		

SEMA3D		X	X	X		
SH3RF3				X		
SIRPA		X				
SLC12A3	X					
SLC17A7		X				
SLC38A6	X					
SLC51A		X	X	X	X	X
SLC7A11		X				X
SLIT2		X		X		
SMARCA2		X	X	X		
SMURF1	X					
SOCS2				X		
SOHLH2		X				
SOX11		X				
SPRY2		X		X		
SPTBN2		X				
SQLE	X					
STX1B						
THEM2	X					
TJP1				X		
TP53	X				X	X
TRAC		X				
TRDV2		X				
TREX1	X					
TRIM16	X					
TSPAN9		X	X	X	X	X
TTC15	X					
TTC16		X				
UNC13A		X				
VPREB3				X		
VPS13B		X				
WBP1L		X		X		X
ZNF297B	X					
ZNF618		X		X		
ZNF81	X					

ChIP-seq : séquençage de l'immunoprécipitation de la chromatine ; qPCR : PCR quantitative en temps réel ; LAL : leucémie aiguë lymphoblastique

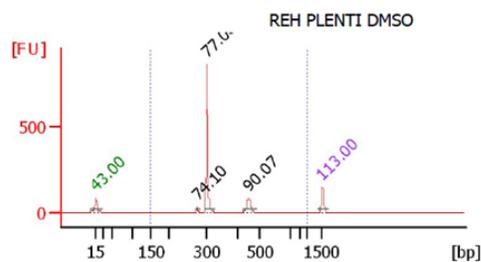
## Annexe B

Tableau XI. Expression relative des cibles d'ETV6 après répression de SRP72 et CBX3. [91]

Cible d'ETV6	shSRP72	shCBX3
<b>FGFBP2</b>	2,53344469	0,03421425
<b>SLC51A</b>	10,9355353	-5,16085895
<b>IRX3</b>	0,93474065	6,01319992
<b>NTRK1</b>	12,5780839	-0,05349998
<b>MIB1</b>	6,47843282	-0,72439677
<b>SEMA3A</b>	7,76350586	7,42686158
<b>C6orf222</b>	0,86852298	1,58005138
<b>DSC3</b>	-0,433693	-3,06677966
<b>EHD2</b>	4,38758005	2,77898924
<b>PIK3C3</b>	3,20964223	0,7752941
<b>CLIC5</b>	0,14427439	0,00755583
<b>SEMA3D</b>	3,02163152	0,05607204
<b>PTPRC</b>	0,50230279	10,8369721
<b>HOMER1</b>	1,46429946	2,19012532
<b>RAP1GAP</b>	0,44526567	-2,91215668
<b>RGS1</b>	-1,27438773	3,38386629
<b>KIAA0226L</b>	11,4368677	-1,86759971
<b>TSPAN9</b>	0,93817711	-4,07943427
<b>ITGB2</b>	-1,99800694	1,33035172
<b>SMARCA2</b>	-2,1552166	-4,2429169
<b>ADRB2</b>	0,34942506	-0,65344953
<b>KCNA2</b>	0,48191676	-0,58906827

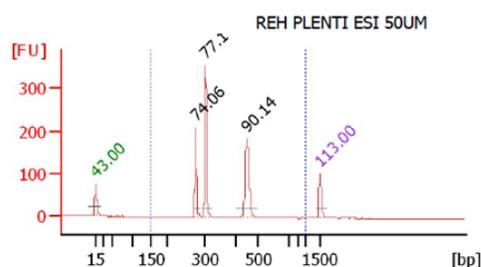
shSRP72 : TRCN0000151445 ; shCBX3 : TRCN0000364151. Le niveau d'expression relatif de chaque cible est calculé par rapport aux échantillons contrôles et corrigé avec la déviation standard des contrôles. 3 cibles (en orange) sont réexprimées de manière significative (>1) après inhibition de SRP72 et de CBX3.

## Annexe C



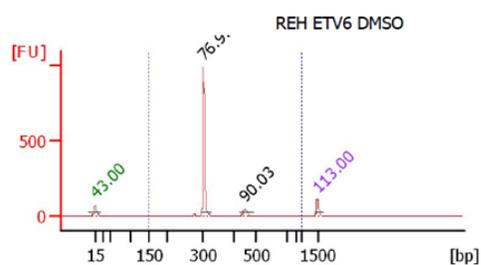
Peak table for sample 9 : REH PLENTI DMSO

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/ $\mu$ l]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4.20	424.2	Lower Marker
2	276	0.38	2.1	
3	303	13.78	69.0	
4	453	2.43	8.1	
5	1,500	2.10	2.1	Upper Marker



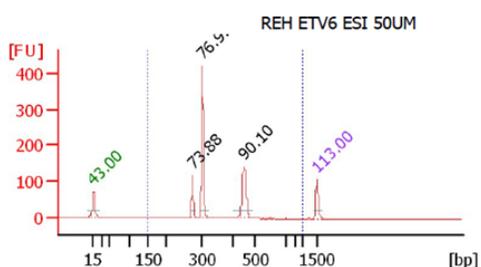
Peak table for sample 10 : REH PLENTI ESI 50UM

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/ $\mu$ l]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4.20	424.2	Lower Marker
2	275	4.27	23.5	
3	303	7.63	38.1	
4	454	7.24	24.2	
5	1,500	2.10	2.1	Upper Marker



Peak table for sample 11 : REH ETV6 DMSO

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/ $\mu$ l]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4.20	424.2	Lower Marker
2	301	20.63	104.0	
3	452	1.68	5.6	
4	1,500	2.10	2.1	Upper Marker

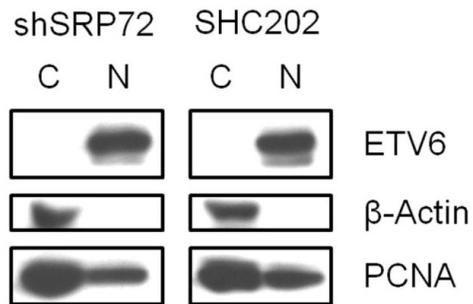


Peak table for sample 12 : REH ETV6 ESI 50UM

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/ $\mu$ l]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4.20	424.2	Lower Marker
2	274	2.37	13.1	
3	301	8.88	44.8	
4	453	5.65	18.9	
5	1,500	2.10	2.1	Upper Marker

**Figure 32. Résultats complémentaires de l'analyse au Bioanalyzer.** Les cellules Reh pLenti et Reh pLenti\_ETV6 ont été traitées avec 50 $\mu$ M d'ESI ou au DMSO (contrôle) pendant 6 heures. L'amplification RT-PCR a été réalisée avec les amorces RT1. Les tailles attendues des transcrits sont : 306pb pour *XBPI<sub>u</sub>* et 280pb pour *XBPI<sub>s</sub>*.

## Annexe D



**Figure 33. Niveau d'expression d'ETV6 après inhibition de SRP72 dans les cellules Reh.** [91] L'expression d'ETV6 n'est pas affectée par l'inhibition de SRP72.