

Université de Montréal

Étude des interactions protéiques impliquant NPM-MLF1 dans la  
leucémie myéloïde aiguë.

**Par**  
**Patricia Jacinthe**

Programme de Biologie Moléculaire  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en Biologie Moléculaire

Décembre, 2008

©, Patricia Jacinthe, 2008



Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé:

Étude des interactions protéiques impliquant NPM-MLF1 dans la  
leucémie myéloïde aiguë.

Présenté par:  
Patricia Jacinthe

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Dindial Ramotar  
Président-rapporteur

Dr Éric Milot  
Directeur de recherche

Dr. Éric Rassart  
Membre du jury

## Résumé en français

Différentes translocations génomiques sont fréquemment associées à l'apparition de leucémies myéloïdes aiguës (LMA). Ces translocations génomiques résultent de l'assemblage de deux gènes conduisant à la production d'une protéine de fusion. C'est le cas de la translocation t (3; 5) (q25.1; q34) impliquant le suppresseur tumoral NPM et l'oncogène MLF1 donnant naissance à la protéine de fusion NPM-MLF1. Généralement, les gènes impliqués dans ces translocations contrôlent la croissance cellulaire, la différenciation ou la survie cellulaire. Cependant, pour NPM-MLF1 les causes du gain ou de la perte de fonction associée à la translocation demeurent inconnues car nous ne savons pas comment cette translocation peut favoriser ou participer à l'avènement de la LMA. Le but de ce travail est d'analyser le rôle de NPM-MLF1 dans le cancer et d'examiner comment son activité contribue à la leucémie en faisant des études d'interactions protéine/protéine. En effet, l'étude de la fonction d'une protéine implique souvent de connaître ses partenaires d'interactions. Pour ce faire, la technique de double hybride dans la souche de levure AH109 a été utilisée. Tout d'abord, les ADN complémentaires (ADNc) de *MLF1*, *NPM1* et de *NPM-MLF1*, *MLF1-Like* (une partie de *MLF1* de l'acide aminé 94 à 157) normaux et mutés du domaine MTG8-Like constitué des acides aminés (a.a.) 151 à 164 de *MLF1* (excepté NPM) ont été clonés dans un vecteur d'expression de levure pGBKT7. Les ADNc de *GFI-1*, *mSin3A*, *PLZF*, *HDAC1* et *HDAC3* ont été clonés dans le plasmide pGADT7 de façon à créer des protéines de fusion synthétiques avec le domaine de liaison à l'ADN et de trans-activation de la protéine GAL4. Le plasmide pGBKT7 possède un gène TRP1 et pGADT7 un gène LEU2 qui permettent la sélection des clones insérés dans la levure. Aussi, le pGBKT7 a un épitope c-myc et pGADT7 un épitope HA qui permet de voir l'expression des protéines par buvardage de type Western. Après la transformation des levures les interactions protéine/protéine ont été observées en vérifiant l'expression des gènes rapporteurs HIS3, LacZ, MEL1, ADE2 de la levure en utilisant des milieux de sélection YPD/-Leu/-Trp, YPD/-Leu/-Trp/-His, YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/+ X-Gal, YPD/-Leu/-Trp/+ X- $\alpha$ -Gal.

Ensuite, les interactions trouvées par double-hybride ont été vérifiées dans les cellules érythroleucémiques K562 par immuno-précipitation (IP) de protéines suivies de buvardages Westerns avec les anticorps appropriés. NPM-MLF1, MLF1, MTG8, MLF1-Like surexprimés dans les cellules K562 ont été clonés dans le plasmide pOZ-FH-N. pOZ-FH-N possède un récepteur IL-2 qui permet de sélectionner les cellules qui l'expriment ainsi qu'un tag Flag-HA qui permet de voir l'expression des protéines par buvardage-Western. Les résultats du double-hybride suggèrent une interaction faible de NPM-MLF1 avec HDAC1, HDAC3 et mSin3A ainsi qu'une interaction qui semble plus évidente entre NPM-MLF1 et PLZF, GFI-1. NPM interagit avec GFI-1 et mSin3A. Aussi, MLF1 et MLF1-Like interagissent avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF mais pas avec mSin3A. Les IP suggèrent que NPM-MLF1 interagit avec HDAC1, HDAC3, mSin3A et PLZF. MLF1 et MLF1-Like interagissent avec HDAC1, HDAC3 et mSin3A. L'interaction de NPM-MLF1 avec GFI-1, MLF1 et MLF1-Like avec PLZF et GFI-1 n'a pas encore été vérifiée par IP. Ainsi, nos observations permettent de suggérer que NPM-MLF1, MLF1 et NPM pourraient jouer un rôle dans la transcription et la régulation de l'expression de certains gènes importants dans l'hématopoïèse et une variété de processus cellulaires parce qu'ils interagissent avec différents corépresseurs. En déterminant les partenaires protéiques de MLF1, NPM et NPM-MLF1, leurs fonctions et comment NPM-MLF1 influence et modifie le fonctionnement cellulaire normal; il sera possible de renverser le processus de LMA favorisé par la t (3; 5) NPM-MLF1 par la technologie d'interférence à l'ARN.

**Mots clés: leucémie myéloïde aiguë, Clonage, immuno-précipitation (IP), double-hybride, translocation t (3; 5) (q25.1; q 34), NPM-MLF1, interactions protéine/protéine, levure AH109, cellules érythroleucémiques K562.**

## Abstract

Different genomic translocations are frequently associated with the development of acute myeloid leukemia (AML). Genomic translocations can result in the fusion of two genes leading to the formation of a fusion protein. This is the case of the T (3; 5) (q25.1; q34) translocation that implicates the tumour suppressor NPM1 and the oncogene MLF1, giving rise to the fusion protein NPM-MLF1. Generally the genes implicated in these translocations control cell growth, differentiation and survival. However, for NPM-MLF1 the reasons behind the gain or loss of function associated with the translocation are still unknown as we still ignore how this translocation can enhance or take part in the AML development. The goal of my master degree project was to analyse in part the role of NPM-MLF1 in cancer and to examine how its activity can contribute in leukemia through protein/protein interaction assays. The usual study of a protein function implicates the investigation of interacting partners. For this purpose, we used the yeast AH109 to conduct a two-hybrid screen assay. The MLF1, MLF1-Like (amino acid 94 to 157 of MLF1), NPM1 and NPM-MLF1 cDNAs, normal and mutated in the MTG8-Like domain from the amino acid (a.a.) 151 to 164 of MLF1 (with the exception of NPM1) were cloned into the yeast expression vector pGBKT7. The GFI-1, mSin3A, PLZF, HDAC1 and HDA3 cDNAs were cloned into the vector pGADT7. These clones were developed to create synthetic fusion proteins with the DNA binding or trans-activation domain(s) of the protein Gal4. The pGBKT7 vector contains the TRP1 gene and the pGADT7 the LEU2 gene. These genes were used for the selection of the yeast clones transformed with the plasmids mentioned above. In addition, the pGBKT7 vector has c-myc-tag and the PGADT7 vector the HA-tag allowing the assessment of protein expression through Western Blot analysis. After yeast transformation, the protein/protein interaction were studied while verifying the expression of the reporter genes HIS, LacZ, MEL1, ADE while using the following selective medias YPD/-Leu/-Trp, YPD/-Leu/-Trp/-His, YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/+ X-Gal, YPD/-Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal. The

interactions determined by the two-hybrid screening were verified in the erythroleukemic cells K562 using immuno-precipitation (IP) of the proteins followed by western blot using the appropriate antibodies. To achieve this, NPM-MLF1, MLF1, ETO, MLF1-Like cDNAs were cloned into the pOZ-FH-N vector that possess an IL2 receptor, which allows the selection of the positive transformed clones in the cell and a Flag-HA tag that permit the verification of protein expression through Western-blot. The two-hybrid screen results suggest that NPM-MLF1 interacts with HDAC1, HDAC3, PLZF, GFI and mSin3A. NPM interacts with GFI-1 and mSin3A. This has not been yet verified using the IP method. As in the case of MLF1, MLF1-Like interacts with HDAC1, HDAC3, GFI-1 and PLZF. However, no interaction was observed with Sin3A. The IP experiments suggest that NPM-MLF1 interacts with HDAC1, HDAC3, mSin3A and PLZF. MLF1 and MLF1-Like interact with HDAC1, HDAC3 and mSin3A. The interaction of NPM-MLF1 with GFI1 as well as MLF1 and MLF1-Like with PLZF and GFI-1 are not yet verified by IP. Therefore, our observations led to the suggestion that NPM-MLF1, MLF1 and NPM can play a role in the transcription and the regulation of the expression of certain genes that are important for hematopoiesis and a variety through the determination of the protein partners of MLF1, NPM and NPM-MLF1, their functions and how NPM-MLF1 influence/modify the normal cellular function, and by focusing on this study, it might become possible to reverse the AML process that is by the t(3;5) NPM-MLF1 while using the RNA interference technology.

**Key words: acute leukaemia myéloïde, Cloning, immuno-precipitation (IP), Two-hybrid, translocation t (3; 5) (q25.1; q 34), NPM-MLF1, interactions protein/protein, yeast AH109, erythroleukemic cells K562.**

## Table des matières

<b>Résumé en français .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>xii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>xii</b>
<b>Liste des sigles et des abréviations.....</b>	<b>xvi</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xix</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 La leucémie.....</b>	<b>21</b>
1.1.1 L'hématopoïèse .....	22
1.1.2 Le syndrome de myélodysplasie (SDM).....	24
1.1.3 Les différents groupes de LMA.....	24
1.1.4 Principales caractéristiques des LMA .....	25
1.1.5 Les facteurs impliqués dans la production des cellules anormales dans les LMA .....	25
<b>1.2 Nucléophosmine (NPM) .....</b>	<b>29</b>
1.2.1 Localisation cellulaire de NPM.....	29
1.2.2 Expression de NPM.....	30
1.2.3 Phosphorylation de NPM .....	30
1.2.4 Fonctions cellulaires de NPM .....	30
1.2.5 Rôle de NPM dans la régulation du cycle cellulaire .....	31
1.2.6 Les mutations dans NPM.....	32
1.2.7 NPM et le cancer .....	33
<b>1.3 Myeloid leukemia facteur 1 (MLF1).....</b>	<b>33</b>

1.3.1 Les sites d'expression.....	34
1.3.2 Localisation de MLF1 .....	34
1.3.3 Fonctions de MLF1 .....	34
<b>1.4 La protéine de fusion NPM-MLF1 .....</b>	<b>37</b>
1.4.1 Localisation cellulaire de NPM-MLF1 .....	38
1.4.2 La structure de NPM-MLF1 et variabilité dans le point de cassure.....	38
1.4.3 Faible pourcentage d'association de NPM-MLF1 à la LMA/SDM .....	40
1.4.4 Induction de l'apoptose par NPM-MLF1 .....	41
1.4.5 Implication de NPM-MLF1 dans la transformation maligne des cellules. 41	
<b>1.5 GFI-1 (growth factor independant 1) ou zinc- finger transcriptional factor</b> .....	<b>43</b>
1.5.1 Types cellulaires exprimant GFI-1 .....	43
1.5.2 Fonctions de GFI-1 dans les cellules hématopoïétiques.....	43
1.5.3 Rôle de GFI-1 le développement des cellules lymphoïdes et myéloïdes ....	44
1.5.4 Rôle de GFI-1 dans le développement des neutrophiles .....	44
1.5.5 Rôle de GFI-1 dans le fonctionnement des CSHs .....	44
1.5.6 Rôle de GFI-1 dans l'hématopoïèse et le cycle cellulaire .....	45
1.5.7 Liaison de GFI-1 à l'ADN et répression de la transcription .....	46
<b>1.6 Promyelotic leukemia zinc finger (PLZF) .....</b>	<b>47</b>
1.6.1 Sites d'expression de PLZF et Localisation de PLZF .....	47
1.6.2 Fonctions générales de PLZF .....	48
1.6.3 Régulation de la transcription par PLZF .....	48
1.6.4 Suppression de la croissance par PLZF.....	48
1.6.5 Rôle de PLZF dans la prolifération cellulaire .....	49
1.6.6 Les protéines avec lesquelles PLZF interagissent.....	49
<b>1.7 La protéine mSin3A.....</b>	<b>49</b>
1.7.1 mSin3A composante principale d'un complexe corépresseur.....	49
1.7.2 Certaines fonctions cellulaires de mSin3A .....	50
1.7.3 Le complexe mSin3A/HDACs joue un rôle dans l'activation de p53.....	50
<b>1.8 Les histones déacétylases (HDACs).....</b>	<b>51</b>

1.8.1 Différents types d' HDACs chez les mammifères .....	52
1.8.2 Implication des HDACs dans la carcinogénèse.....	53
1.8.3 Rôles des HDACs dans le cycle cellulaire .....	53
<b>1.9 La protéine MTG8</b> .....	54
1.9.1 Expression de la protéine.....	54
1.9.2 Interaction de MTG8 et répression de la transcription.....	55
1.10 La protéine de fusion AML1-MTG8 .....	56
1.10.1 Caractéristiques générales d' AML1-MTG8, AML1 et MTG8 .....	56
<b>1.11 Présentation du projet</b> .....	58
1.11.1 Séquences d'homologie de MTG8 dans MLF1 et NPM-MLF1 .....	58
1.11.2 Hypothèse de recherche.....	58
1.11.3 But et objectifs.....	58
<b>2. Matériel et méthodes</b> .....	60
2.1 Clonage .....	61
2.2 Réaction PCR.....	63
2.3 Électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose .....	64
2.4 Digestion de l'ADN .....	65
2.5 Extraction d'ADN sur gel d'agarose .....	66
2.6 Déphosphorylation.....	66
2.7 Ligation de l'ADNc avec le plasmide. ....	66
2.8 Transformation bactérienne. ....	66
2.9 Sélection des clones ou des plasmides qui portent un insert. ....	67
2.10 Séquençage et analyse de séquençage. ....	68
2.11 La mutagénèse dirigée .....	68
2.11.1 Mutagénèse dirigé pour délaiter les 12 a.a. qui constituent le domaine MTG8-Like dans MLF1, MTG8 et NPM-MLF1 .....	69
2.12 Le principe du double-hybride.....	70
2.12.1 La technique du double hybride. ....	70
2.12.2 Préparation et transfection de la souche de levure AH109.....	71

2.13	Vérification de l'expression des protéines cibles. ....	75
2.13.1	Extractions de protéines des levures.....	76
2.13.2	Le Western-blot.....	76
2.14	Immunoprécipitation (IP). ....	79
2.14.1	Transfection des cellules K562 à l'aide des cellules Phoenix A.....	80
2.14.3	Infection des cellules K562.....	82
2.14.4	Sélection des cellules K562 qui contiennent le gène d'intérêt dans le plasmide pOZ-FH-N.....	82
2.14.5	Extraction des protéines des cellules K562.....	83
2.15	Immunoprécipitation.....	83
2.15.1	Les IP inverses.....	84
<b>3.</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>86</b>
3.1	Clonage de plusieurs ADNc dans différents plasmides.....	87
3.2	Délétion du domaine MTG8-Like dans MLF1, NPM-MLF1 et MTG8 clonés dans pGBKT7 et pOZ-FH-N. ....	90
3.3	Expression des protéines cibles lors du double-hybride par buvardage de type Western. ....	92
3.4	Analyse des interactions protéine/protéine de MLF1 trouvées lors du double-hybride. ....	103
3.5	Analyse des interactions protéine/protéine de NPM-MLF1 trouvé lors du double-hybride. ....	104
3.6	Analyse des interactions protéines/protéines de NPM trouvées lors du double-hybride. ....	105
3.7	Analyse des interactions protéine/protéine de MLF1-Like trouvées lors du double-hybride. ....	105
3.8	Les résultats obtenus par la technique d'Immunoprécipitation.....	117
<b>4.</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>130</b>
4.1	Comment le gain ou la perte de fonction de NPM et MLF1 peut-il contribuer à la leucémie? .....	131

4.2 L'expression des protéines étudiées dans la levure. ....	132
4.3 Second double-hybride réalisé afin de voir si les interactions protéines/protéines trouvées dans MLF1, NPM-MLF1 et MLF1-Like sont dues la présente du domaine MTG8-Like. ....	133
4.4 Un mécanisme de répression dû à des interactions protéines/protéines forte est soupçonné chez la levure. ....	133
4.5 Difficultés rencontrées au court des IP dues à la qualité des anticorps. ....	122
4.6 Partenaires d'interactions de NPM et fonction biologique. ....	134
4.7 Partenaires d'interactions de NPM-MLF1 et fonction biologique. ....	136
4.8 Partenaires d'interactions de MLF1 et de MLF1-Like ainsi que leur fonction biologique. ....	137
4.9 Fonctions dans lesquelles NPM-MLF1, NPM et MLF1 pourraient être impliqué selon les protéines avec lesquelles elles interagissent. ....	140
4.10 Conclusion .....	142
<b>5. Références .....</b>	<b>144</b>

## Liste des tableaux

<b>Introduction</b> .....	20
<b>Tableau I</b> : Il y a une variabilité dans les points de cassures qui produit la t (3; 5) mais, le point de cassure le plus souvent retrouvé est (q25.1; q34).....	40
<b>2. Matériel et méthodes</b> .....	60
<b>Tableau II</b> : liste des plasmides et des ADNc qui ont été clonés dans ce plasmide ainsi que les amorces utilisés pour faire les clonages. ....	63
<b>Tableau III</b> : Liste des plasmides et des ADNc avec leurs sites de restrictions enzymatique utilisés pour les clonages. ....	64
<b>Tableau IV</b> : les oligonucléotides utilisés pour les mutagénèses dirigées et le non d'ADNc pour lequel elle a été synthétisée.....	68
<b>Tableau V</b> : liste des protéines étudiées et les anticorps primaires et secondaire utilisés pour leur détection. ....	78
<b>3. Résultats</b> .....	86
<b>Tableau VI</b> : liste des ADNc qui ont été clonés et les plasmides dans lesquels ils ont été clonés afin de vérifier des interactions protéines/protéines par la technique de double-hybride et par co-IP.....	90
<b>Tableau VII</b> : Résultats du double-hybride réalisé pour NPM-MLF1 et NPM-MLF1.O. M afin de voir s'il interagir avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF, mSin3A. ....	107
<b>Tableau VIII</b> : Résultats du double-hybride réalisé pour MLF-1 et MLF1.O.M afin de voir s'ils interagissent avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF, mSin3A. ....	109
<b>Tableau IX</b> : Résultats du double-hybride réalisé pour NPM afin de voir s'il interagir avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF, mSin3A. ....	111
<b>Tableau X</b> : Résultats du double-hybride réalisé pour MLF1-Like afin de voir s'il interagir avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF, mSin3A.....	113

**Tableau XI :** Résultats du double-hybride réalisé pour MTG8 et MTG8-out-MTG8-Like afin de voir s'ils interagissent avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF, mSin3A.  
..... 115

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Représentation schématique de l'hématopoïèse définitive.....	22
<b>Figure 2:</b> Exemple de changements displasiques impliquant trois lignées dans la moelle osseuse.....	28
<b>Figure 3:</b> Pourcentage de mutations et translocations chromosomiques impliquées dans les LMA. ....	29
<b>Figure 4:</b> Les différents domaines fonctionnels de NPM régulant plusieurs fonctions cellulaires. ....	29
<b>Figure 5 :</b> Mouvement de MLF1 dans la cellule et rôle nucléaire. ....	36
<b>Figure 6:</b> Représentation schématique de NPM, NPM-MLF1, MLF1. ....	38
<b>Figure 7:</b> Caractéristiques structurales de GFI-1 et GFI-1b.....	43
<b>Figure 8 :</b> l'implication de GFI-1 dans plusieurs étapes de l'hématopoïèse.....	46
<b>Figure 9 :</b> Caractéristiques structurales de la protéine PLZF.....	47
<b>Figure 10 :</b> Représentation de la forme hétérochromatine (la chromatine condensée) et la forme euchromatine (la chromatine décondensée).....	52
<b>Figure 11:</b> caractéristique structurale de MTG8 et les protéines avec lesquelles il interagit .....	55
<b>Figure 12 :</b> mécanisme par lequel AML1-MTG8 peut réprimer la transcription .....	57
<b>Figure 13:</b> caractéristiques des différents plasmides utilisés pour cloner les différentes ADNc. ....	62
<b>Figure 14 :</b> mécanisme moléculairement qui se produit dans la levure.....	72
<b>Figure 16 :</b> criblage de différents clones sur gel d'agarose 1 % après digestion enzymatique .....	88
<b>Figure 17:</b> Résultats du criblage par PCR sur gel agarose 1% afin d'obtenir des clones. ....	89
<b>Figure 18:</b> gel d'agarose 1.5 % réalisé afin de vérifier si le domaine MTG8-Like a été enlevé dans MLF1, NPM-MLF1, MTG8.....	91

<b>Figure 19</b> A) et B): l'expression des protéines, NPM-MLF1, MLF1, NPM, MLF1-Like, MTG8, p53, Lamine, Apn1 (CLT +) ainsi que MTG8-out -MTG8-Like, NPM-MLF1-out-MTG8-Like et MLF1-out-MTG8-Like,.....	94
<b>Figure 20</b> : A) et B) : l'expression des protéines HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF et mSin3A .....	96
<b>Figure 21</b> : A) B) C) les différents milieux de sélections YPD et les résultats obtenus pour certains échantillon .....	101
<b>Figure 22</b> : vérification de l'expression de protéines telles que MLF1-Like, NPM-MLF1, MTG8 et MLF1 après l'infection des cellules.....	117
<b>Figure 23</b> : résultats de l'IP fait pour le Mock, MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like MTG8 afin de voir s'ils interagissent avec HDAC3.....	118
<b>Figure 24</b> : résultats de l'IP fait pour le Mock, MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like MTG8.....	121
<b>Figure 25</b> : résultats de l'IP inverse en (A) et en (B) IP normale fait pour le Mock, MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like et MTG8.....	124
<b>Figure 26</b> : résultats des IP avec l'anticorps anti-HA pour détecter le Mock, MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like et MTG8 dans les échantillons d'IP.....	125
<b>Figure 27</b> : résumé de tous les interactions protéines/protéines trouvées par la technique du double-hybride et par co-IP. ....	129

## Liste des sigles et des abréviations

a.a:	Acide aminé
ATG :	Méthionine
3AT :	3-amino-1-2-4-triazole
Ac :	Acétylés
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNi:	Interférence à l'ARN
ARF:	« Alternative reading frame »
ALCL:	« Anaplastic large cell lymphoma »
ALK:	« Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase »
AML1:	« acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene »
BCL-6:	« B-cell CLL/lymphoma 6 »
°C:	Celsius
CSHs :	Cellules souches hématopoïétiques
CHs :	Cellules hématopoïétiques
CLP :	Cellules lymphoïdes progéniteurs
CMP :	Cellules myéloïdes progéniteurs
CKII :	Caséine kinase II
CDK :	Kinases cyclin-dépendantes
CEBP $\alpha$ :	« CAAT/enhancer Binding protéine alpha »
CBP:	« cofactor binding protein »
Cbfa2:	« Core-binding factor, alpha 2 subunit »
CSN3/COP1:	« COP9 signalosome complexe subunit 3 constitutive photomorphogenesis protein 1 homologue »
DMEM:	« Dulbecco's modified Eagle's medium »
DMSO:	Diméthyle sulfoxyde
DNMTs:	ADN méthyltransférase
dNTP:	désoxy adénine tri-phosphate
DREF:	« DNA replication-related element binding factor »
EPO :	Érythropoïétine
ER-a :	Récepteur alpha d'œstrogène
Ets-1:	« E26 avian leukemia oncogene 1 »
Fc :	« forme courte »
Fl :	« forme longue »
FAB:	Franco-américano-britannique
FBS:	Sérum de fœtus bovin
FLT3:	« fms-related tyrosine kinase 3 »
FOG:	« Friend of GATA »
GFI-1:	« growth factor independant 1 »

GATA:	«GATA-sequence conforming to the consensus [T/A (GATA) A/G] in globin gene ».
HDACs:	histones déacéthylases
HB-EGF:	« heparin-binding EGF-like growth factor »
HATs:	Histones acéthyltransférases
HRP:	« HorseRadish Peroxidase »
IL:	Interleukine
IP:	Immuno-précipitation
IPTG:	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
ITD:	« interne tenderm duplication »
KDa:	Kilo Dalton
LAL:	Leucémie aiguë lymphoblastique
LMA:	Leucémie myéloïde aiguë
Lam	Lamine protéine
Lam/T:	Lamine/ Large T
LAP:	Leucémie aiguë promyélocytaire
M:	Molaire
mM:	Millimolaire
ml:	Millilitre(s)
mg:	Miligramme (s)
Manp:	« MLF1 associated nuclear protein »
Madm:	« MLF1 adaptator molécule »
MLF1:	« Myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1 » humain
MPPs:	Progéniteurs multipotants
MBP:	« methyl CpG-binding domains protein »
MIBP1:	« c-myc intron-binding protein 1 »
MTGR1:	« Myeloid transforming gene related protein-1 »
MTG16:	« Myeloid transforming gene chromosome 16 »
MTG8:	« myeloid transforming gene chromosome 8 »
MW:	« Molecular Weigth »
Min :	Minute(s)
MLF1.O.M:	MLF1 sans le domaine MTG8-Like
MLL:	« mixed lineage leukemia-like protein (MLL) gene »
MTG8.O.M:	MTG8 sans le domaine MTG8-Like
MafB:	« maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B »
Mlf1IP/KLIP1:	« Mlf1 interacting protein/KSHV latent nuclear antigen interacting protein »
NAD:	«Nicotinamide adénine dinucléotide »
NPM (B23):	Nucléophosmine
NPM-MLF1.O.M:	NPM-MLF1 sans le domaine MTG8-Like
N-II kinase:	Nucléaire kinase II
NLS:	« Nuclear localisation signal »
Pax5:	« paired box gene 5 »
PBS:	« Phosphate-buffered saline »

PCR:	« Polymerase chain reaction »
pb:	Paires de bases
P.M:	Maqueur de poids moléculaire protéique
PLZF:	« Promyelotic leukemia zinc finger »
PLK:	Polo-like kinase
P53/T	La protéine p53 avec la protéine Large T
RAR $\alpha$ :	« Retinoic acid receptor, alpha »
Runx1:	« runt-related transcription factor 1 (Acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene) »
SDM:	Syndrome de myélodysplasie
SD-LMA:	Syndrome de Down-Leucémie myéloïde aiguë
SD-AMKL:	Syndrome de Down-acute mégacaryocytaire leucémie
SDS:	Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE:	« Sulfate dodécyl sodium polyacrylamid gel electrophoresis »
sec:	Seconde(s)
SSDNA :	ADN de sperme de saumon
SMRT:	« silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor »
SNAG :	« Gamma-soluble NSFattachment protein »
TG:	Tris-glycine
TSA:	Trichostatin A
TP:	Température de la pièce
T :	Large T protéine
Tbet:	« T-cell-specific T-box transcription factor T-bet »
TKD:	« tyrosine kinase domaine »
$\mu$ g:	Microgramme(s)
$\mu$ l:	Microlitre(s)
UV:	Ultra-violet
USF1:	« upstream transcription factor 1 »
WT1:	« Wilms tumor 1 »
YPDA:	« yeast extract peptone dextrose and Adenine »
YPD:	« yeast extract peptone dextrose »

## **Remerciements**

J'aimerais remercier Dieu de m'avoir donné l'opportunité de faire cette maîtrise. Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de recherche Dr Éric Milot pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir confié ce projet de recherche. Merci spécialement à Dre Stefania Bottardi ainsi qu'à tous les membres du laboratoire pour leurs contributions dans la réalisation de mon projet.

Je remercie également Pierre-Charles Natascha, Bah Ramatoulaye, Koué Marie-Ève, Agbato Ingrid, Dulièpre Ernest, Zakaria Chadi, Eiyimo Math Sandrine et Joseph Marjolaine pour l'aide qu'ils m'ont apportée durant la rédaction de mon mémoire.

Je tiens à remercier mes parents Gérard Ernest Jacinthe et Ivana Constant ainsi que mes frères et sœurs Miller, Marielle, Sherlie et Guerda Jacinthe pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de mes études.

## **Contributions**

Merci au Dr Dindial Ramotar et les membres de son laboratoire pour leurs aides lors du double-hybride. Merci à Julie Ross pour le clonage de NPM-MLF1, MFL1 et MLF1-Like dans pGBKT7. Merci au Dr. El Bachir Affar pour son aide lors des IP. Merci à Vincent Bourgoïn et Adriana Orimoto pour leur assistance.

## **1. Introduction**

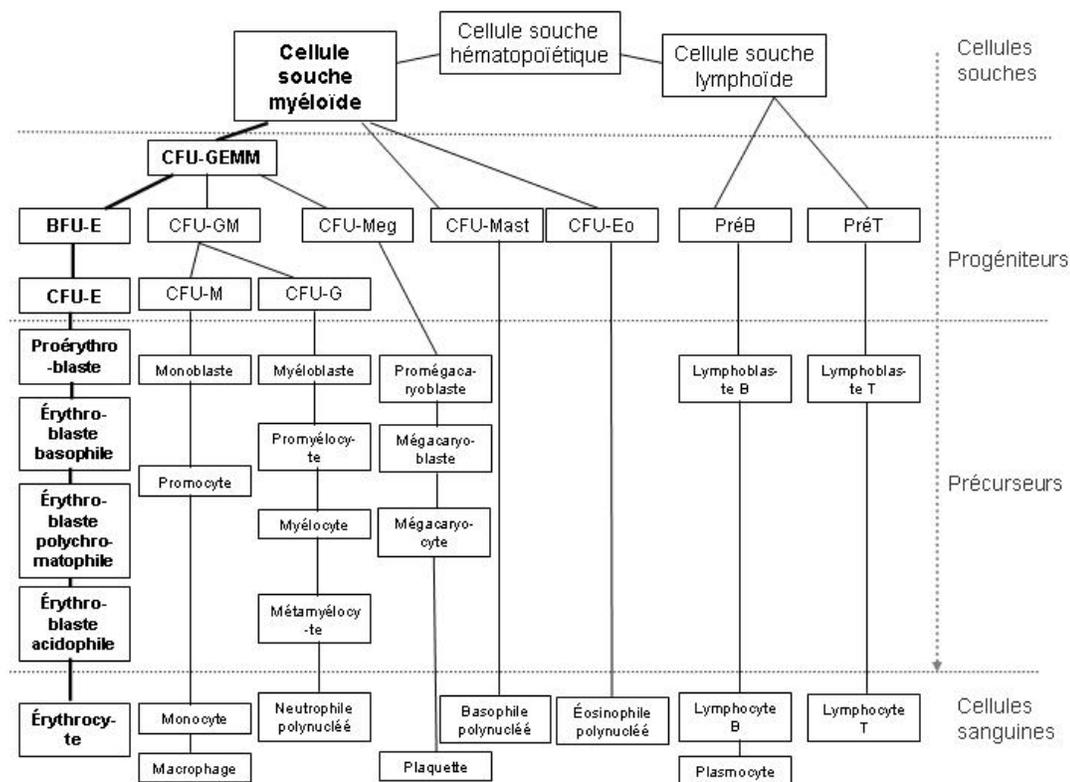
Le cancer est une maladie complexe qui peut impliquer plusieurs gènes. Avant les années 70, certains scientifiques pensaient que le cancer était causé uniquement par l'environnement. De nos jours, il est bien documenté que le cancer est causé par les interactions entre les gènes et l'environnement (Perera, 1997). En effet, l'exposition de certains gènes à des produits génotoxiques (présents dans l'environnement) favorise les dommages dans l'ADN. De façon générale, les lésions dans l'ADN sont reconnues, corrigées et éliminées. Dans le cas contraire, il y a apparition de mutations. Si ces mutations se trouvent dans les gènes suppresseurs de tumeur tel que p53, la probabilité de développer un cancer est très élevée (Perera, 1997). Il y a plusieurs types de cancer qui peuvent apparaître dans différents organes. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à un type de cancer qui a été découvert par Rudolf Virchow en 1847 qu'on nomme **leucémie**.

### **1.1 La leucémie**

La leucémie est un cancer dont le siège est la moëlle osseuse. Les leucémies sont en fait un ensemble de cancers affectant les cellules sanguines. Le sang est constitué de plusieurs sortes de cellules dont les leucocytes et les érythrocytes. Lors de la leucémie, les précurseurs des leucocytes se multiplient de façon anormale dans la moelle osseuse. La prolifération anormale observée dans la moëlle osseuse est due à l'acquisition de mutations dans les gènes des progéniteurs hématopoïétiques et à un défaut de fonction des facteurs de transcription; causant en plus d'une prolifération excessive, une différenciation inappropriée et un avantage de survie aux cellules souches hématopoïétiques (CSHs) mutées (Kurokawa and Hirai, 2003). Ce qui perturbe la production des érythrocytes, des globules blancs normaux et des plaquettes sanguines. Suite à cette perturbation, la maladie va apparaître lorsqu'il y a un envahissement du sang par des globules blancs anormaux. Ainsi, la leucémie est caractérisée par une prolifération anormale et exagérée de précurseurs des leucocytes bloqués lors de leur différenciation qui finissent par envahir complètement la moelle osseuse puis le sang ([fr.wikipedia.org/wiki/](http://fr.wikipedia.org/wiki/)). De ce fait, dans la moelle osseuse, il y a une quantité excessive de cellules immatures (progéniteurs), alors que dans le sang, il y a

une diminution de cellules sanguines matures lors de l'hématopoïèse. Ce phénomène cause une insuffisance hématopoïétique.

### 1.1.1 L'hématopoïèse



(Bourgoin, 2005)

**Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse définitive.**

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui régulent et assurent le remplacement continu des différentes cellules sanguines et du système immunitaire à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) (Duan and Horwitz, 2005). Les CSHs sont capables d'auto-renouvellement et elles peuvent se différencier en une variété de progéniteurs hématopoïétiques qui vont ensuite donner différentes lignées cellulaires pour produire des cellules sanguines matures (Orkin and Zon, 2002). En effet, durant l'hématopoïèse (voir figure 1), une CSH de la moelle osseuse peut donner deux grandes catégories de cellules, les cellules lymphoïdes progénitrices

(CLP) et les cellules myéloïdes progénitrices (CMP). Les cellules lymphoïdes vont donner les lymphocytes B et T, et les cellules myéloïdes vont donner les globules rouges, les polynucléaires (neutrophiles éosinophiles et basophiles), les monocytes et les mégacaryocytes. Donc, l'hématopoïèse peut être pré-établie à partir de multiples étapes commençant par une CSH et en finissant par la production de cellules du sang mature peu ou pas prolifératives (Duan and Horwitz, 2005). Les différentes étapes de l'hématopoïèse comprenant l'auto-renouvellement, la spécialisation en lignées cellulaire et la différenciation terminale, sont contrôlés par des facteurs de transcription spécifique (Orkin and Zon, 2002).

**Note:** La différenciation cellulaire est l'ensemble des processus qui aboutissent à la formation d'une cellule spécialisée. Chaque type de cellule différenciée exprime un programme génétique particulier qui est activé pendant la différenciation. Aussi, les cellules matures sont des cellules différenciées et les cellules immatures sont indifférenciées. En général, les cellules matures ne se multiplient pas beaucoup mais expriment de multiples récepteurs de cytokines ([fr.wikipedia.org/wiki/](http://fr.wikipedia.org/wiki/)).

La complexité des interactions entre les cellules hématopoïétiques (CHs) et les composants du micro-environnement sont loin d'être totalement connues. On sait que les cellules du stroma (fibroblastes, cellules endothéliales, adipocytes) produisent la majorité des molécules nécessaires au développement des cellules hématopoïétiques. Plusieurs facteurs de transcription tels que: GATA1-2-3, PU.1, FOG-1, MafB, Runx1, Cbfa2/AML1, CEBP $\alpha$ , Tbet, Pax5 et Ikaros régulent l'hématopoïèse (Duan and Horwitz, 2005; Orkin, 2000). Parmi les facteurs de transcription essentiels à l'érythropoïèse, les facteurs GATA-1, GATA-2 et SCL jouent un rôle de premier plan (Orkin, 2000). S'il y a une mutation dans l'un de ces facteurs de transcription, il peut y avoir un défaut dans l'hématopoïèse conduisant dans certains cas au syndrome de myélodysplasie (SDM).

### **1.1.2 Le syndrome de myélodysplasie (SDM)**

Les SDM sont un groupe de désordres clonaux hématopoïétiques définis par une morphologie anormale apparente dans de multiples lignées de cellules sanguines de la moelle osseuse, se traduisant par une déficience progressive de l'hématopoïèse, des cytopénies, des désordres qualitatifs des cellules sanguines et éventuellement à une transformation en LMA (Dunbar CE, 1995; Hofmann and Koefler, 2005; Mufti et al., 2003). Dans cette maladie, une prolifération inappropriée des CSHs empêche la production des cellules lymphoïdes. Durant le stade précoce de la maladie, les cellules souches meurent par apoptose conduisant à une hématopoïèse inefficace. Généralement, cette mort cellulaire peut être empêchée par une augmentation de la prolifération de cellules souches oligoclonales hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Catenacci and Schiller, 2005). Cependant, la moelle osseuse est généralement hypercellulaire, et il y a augmentation de l'apoptose malgré un accroissement de la prolifération cellulaire dans la moelle osseuse (Greenberg, 1998; Mehta and Hoffbrand, 2003; Munker et al., 2000). Aussi, cette maladie peut être due entre autres à des mutations dans le gène RAS qui se retrouvent dans approximativement 25 % des cas de SDM et 3 à 5 % des cas de SDM/LMA (Lopingco MC, 1996). Généralement, la thérapie utilisée pour les patients avec SDM/LMA est la transplantation des cellules souches hématopoïétiques. La progression de SDM en LMA représente un stade final de la maladie qui est caractérisée par une accumulation graduelle d'une série de mutations après une longue période (Dunbar CE, 1995; Head, 1996).

### **1.1.3 Les différents groupes de LMA**

On distingue plusieurs groupes de leucémies. Dans notre laboratoire, on s'intéresse plus particulièrement aux LMA dont y il y a plusieurs sous-types. En effet, au début des années 1970, des chercheurs ont travaillé sur une nouvelle classification des leucémies aiguës. Cette classification reconnaît trois sous-types de leucémies aiguës lymphoblastiques (**LAL**): L1, L2 et L3. Le type L3 s'associe toujours à des

proliférations de cellules B. Les types L1 et L2 correspondent à des proliférations pré-B avec des degrés variables de différenciation ou à des proliférations T. La transformation et la prolifération clonale des cellules souches lymphoïdes sont les premiers événements à se produire dans les cas de LAL (Munker *et al.*, 2000). Les LAL apparaissent lorsque l'organisme produit trop de cellules lymphocytes immatures appelées «blastés». Ces blastés envahissent la moelle osseuse et affectent rapidement les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes. Dans le cas des **LMA**, on reconnaît sept sous-types. Ainsi, on distingue les formes M1, M2 et M3 purement myéloïdes, M4 monocytaires et myéloblastiques, M5 monoblastiques, M6 érythroblastiques et M7 mégacaryoblastiques (Baruchel, 2002; Bennett *et al.*, 1985; Mehta and Hoffbrand, 2003; Munker *et al.*, 2000).

#### **1.1.4 Principales caractéristiques des LMA**

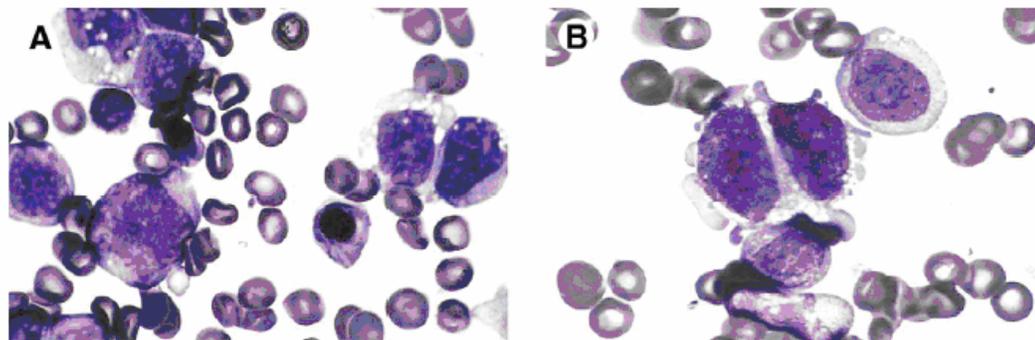
Les LMA ont plusieurs caractéristiques reliées à des mécanismes complexes. Elles sont caractérisées par une accumulation du nombre de cellules myéloïdes immatures (précurseurs de granulocytes ou monocytes) dans la moelle osseuse bloquées à un stade précoce de la différenciation et incapables de maturation terminale (Pabst and Mueller, 2007; Puccetti *et al.*, 2005). Ainsi, on se retrouve avec des cellules hématopoïétiques malignes généralement appelées "blastés" qui sont non-fonctionnelles et n'apportent aucun soutien à l'organisme (Tenen, 2003). Ces cellules immatures sont responsables d'un défaut plus ou moins marqué de la production normale des globules rouges, des polynucléaires neutrophiles et des plaquettes selon le type de la maladie et son évolution.

#### **1.1.5 Les facteurs impliqués dans la production des cellules anormales dans les LMA**

L'extinction de la fabrication des cellules normales est probablement due à plusieurs mécanismes. Tout d'abord, un effet de signaux de « rétro-contrôle » en raison de la présence d'un grand nombre de cellules immatures ainsi qu'un défaut d'apoptose (mal connu) explique l'accumulation des blastés même lorsqu'il n'y a pas

de prolifération (Baruchel, 2002). Par conséquent, il subsiste une anémie, une granulopénie et une thrombopénie. Ensuite, l'immaturation des cellules est généralement due à un défaut (mutations) de facteurs de transcription bloquant le programme de maturation des cellules (cycle cellulaire et différenciation) (Baruchel, 2002; Pabst and Mueller, 2007). Les facteurs les plus reconnus sont : le récepteur de l'acide rétinoïque (anormal dans la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) avec t (15 ; 17) qui donne la protéine de fusion PML-RARA (Zelent et al., 2001); le facteur AML1, anormal dans la t (8 ; 21) qui donne la protéine de fusion AML1-ETO (Alcalay M, 2001). Il y a aussi les facteurs de transcription CBFb, GATA-1, PU.1 et le CAAT/enhancer protéine de liaison alpha (CEBP $\alpha$ ) (Pabst and Mueller, 2007). Le rôle principale de CEBP $\alpha$  est dans le développement des granulocytes durant l'hématopoïèse (Friedman, 2002; Rosmarin et al., 2005; Tenen et al., 1997). Une perte de fonction de CEBP $\alpha$  dans les cellules myéloïdes *in vivo* et *in vitro* conduit à un blocage de la différenciation similaire à ce qu'on observe dans les blastes des patients atteints de LMA. De plus, une altération de CEBP $\alpha$  dans les sous groupes spécifiques de LMA conduit à des protéines de fusions leucémiques suppresseurs de transcription; des inhibiteurs de la traduction par l'activation des protéines de liaisons à l'ARN et l'inhibition fonctionnelle par phosphorylation ou l'augmentation des protéasomes qui servent à la dégradation (Pabst and Mueller, 2007). La fréquence des mutations génomiques dans CEBP $\alpha$  dans des LMA est de 5 à 14 %. Ces mutations se trouvent dans tous les sous-types de LMA (Pabst et al., 2001; Preudhomme et al., 2002). En ce qui concerne PU.1, c'est un facteur de transcription important dans l'hématopoïèse normale. L'interruption de ses fonctions est une cause importante dans les LMA. Le gène PU.1 peut être muté ou son expression et sa fonction peuvent être supprimées par des protéines de fusions leucémogéniques de LMA telles que RUNX1-ETO (Vangala et al., 2003), FLT3-ITD (Mizuki et al., 2003), et PML-RARA (Mueller BU, 2006). Les mutations dans les gènes PU.1 ont été détectées chez 7 % des patients atteints de LMA (Mueller et al., 2002; Vangala et al., 2003). Ensuite, des mutations ponctuelles peuvent être observées dans RUNX1/AML1 dans des sous-types spécifiques de LMA (M0). Le gène RUNX1 est plus fréquemment impliqué

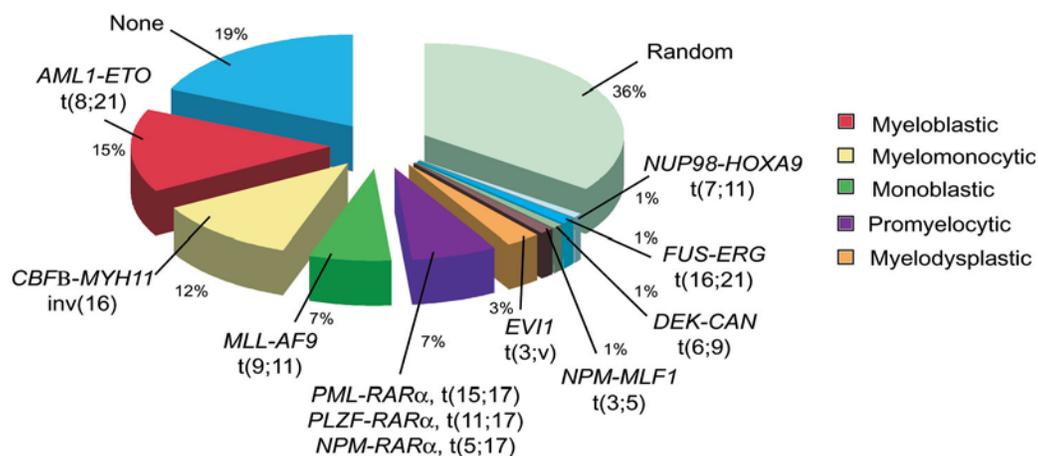
dans les translocations chromosomiques dans les LMA. Par exemple, les gènes de fusion RUNX1-ETO ou CBFB-MYH11 résultant de la t (8; 21) et inv (16) (16; 16) sont capables d'altérer la différenciation des cellules myéloïdes mais ne conduisent pas au phénotype leucémique (Langabeer et al., 2002; Preudhomme et al., 2000; Roumier et al., 2003). La t (8; 21) est présente dans 8 à 12 % des LMA chez l'adulte (Downing, 1999; Rowley, 1973). Dans le cas de GATA1, une mutation de ce gène est présente dans tous les cas de Syndrome de Down-Leucémie myéloïde aiguë (SD-LMA) (Hitzler et al., 2003; Wechsler et al., 2002). La mutation de GATA1 est un événement très précoce dans le développement du Syndrome de Down-acute mégacaryocytaire leucémie (SD-AMKL) (Shimada et al., 2004; Wechsler et al., 2002). Finalement, dans les LMA, des anomalies génétiques moléculaires telles que les mutations des gènes ou la dérégulation de l'expression des gènes comme *NPM1* (mutation dans 35% des cas de LMA) (Falini B, 2006; Falini et al., 2005; Grisendi et al., 2006), récepteur tyrosine kinase (FLT3) (Stirewalt and Radich, 2003); récepteur tyrosine kinase « interne tenderm duplication » (FLT3-ITD) (Caligiuri MA, 2007) dans 30 % de LMA chez les adultes et 20 % chez les enfants (Meshinchi et al., 2003; Shimada A, 2008); tyrosine kinase domaine (TKD) (Frohling et al., 2002), *MLL* (mutations dans 5 à 11% des cas de LMA) (Mrozek et al., 2007); *NRAS* (mutations dans 9 à 14 % des cas de LMA) (Estey and Dohner, 2006; Mrozek et al., 2007), *WT1* (mutations dans 10% des cas de LMA) (King-Underwood and Pritchard-Jones, 1998) ont été identifiées. Certaines mutations peuvent induire un déséquilibre entre les cellules progénitrices et les cellules matures.



(Arber et al., 2003)

**Figure 2: Exemple de changements displasiques impliquant trois lignées dans la moelle osseuse. Les cellules blastiques n'ont pas le même phénotype que les cellules normales.**

Donc, les LMA, les cellules leucémiques se comportent de manière anormale en raison d'une modification de leur génome avec une accumulation, au niveau de leur ADN, de mutations acquises qui permettent la transformation de la cellule. Ces mutations peuvent être des insertions, des délétions, des translocations, des recombinaisons génétiques, ou l'inactivation d'un gène impliqué dans l'induction de l'apoptose (wikipedia.org/wiki/Sang). Chez l'humain, 65 % des cas de leucémie sont dus à des translocations chromosomiques qui génèrent des protéines de fusion chimériques (de Figueiredo LL, 2004). Les protéines de fusion peuvent être des suppresseurs qui bloquent les facteurs de transcription et l'expression des gènes ou des potentialisateurs. Parmi les translocations et les mutations bien connues, certaines impliquent le gène *NPM1* (Grisendi and Pandolfi, 2005).

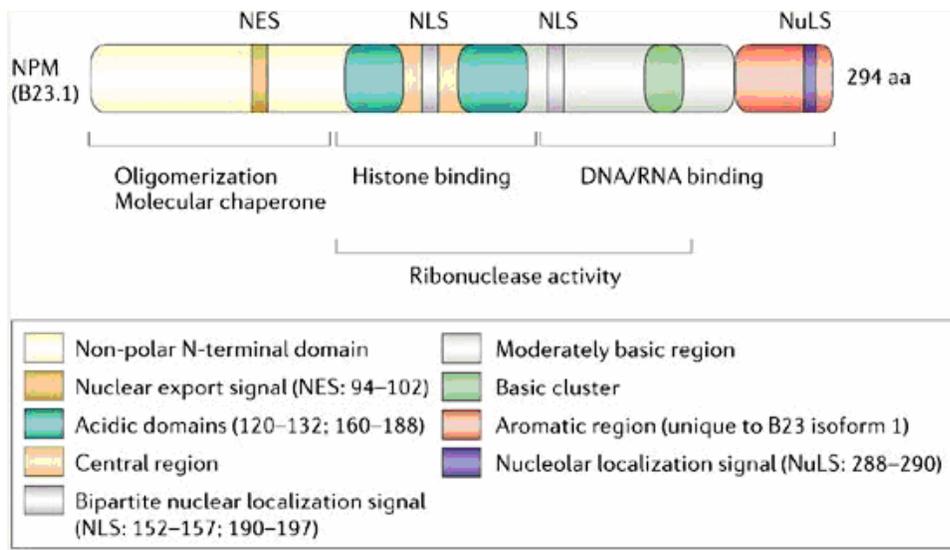


(Grisendi and Pandolfi, 2005)

**Figure 3: Pourcentage de mutations et translocations chromosomiques impliquées dans les LMA.**

## 1.2 Nucléophosmine (NPM)

NPM est hautement conservé chez les vertébrés et est largement distribué chez différentes espèces. Sa taille varie de 35 à 40 KDa (Lim and Wang, 2006). Il existe deux isoformes de NPM soit B23.1 et B23.2. La forme B23.1 est dominante dans tous les tissus (Chang and Olson, 1990; Wang et al., 1993). Ce gène contient 12 exons. Chez l'humain, il se trouve sur le chromosome 5 dans la région q35. La région aromatique de NPM se trouve en C-terminale. Uniquement l'isoforme 1 de NPM contient la séquence de localisation nucléolaire avec les résidus de tryptophane en position 288 et 290 (Falini et al., 2007).



(Grisendi et al., 2006)

**Figure 4: Les différents domaines fonctionnels de NPM régulant plusieurs fonctions cellulaires.**

### 1.2.1 Localisation cellulaire de NPM

NPM est une phosphoprotéine nucléolaire qui fait la navette sans interruption entre le noyau et le cytoplasme durant le cycle cellulaire. La localisation subcellulaire

de NPM correspond à ses fonctions dans la prolifération cellulaire (Borer RA, 1989; Lim and Wang, 2006; Yun JP, 2003). NPM se trouve majoritairement au nucléole (Andersen et al., 2005; Borer RA, 1989; Lam YW, 2005; Yun JP, 2003). La séquence signal NLS conduit NPM du cytoplasme au nucléoplasme et la quantité de NPM retrouvée dans ces deux compartiments est très faible (Grisendi et al., 2006).

### **1.2.2 Expression de NPM**

NPM est plus fortement exprimé dans les cellules en prolifération que les cellules quiescentes (Dergunova et al., 2002). On le retrouve dans des lignées de cellules hématopoïétiques telles que les K562. Aussi, les populations de cellules érythroïdes et myéloïdes cancéreuses démontrent une expression aberrante de NPM sauvage dans leur cytoplasme (Falini et al., 2005).

### **1.2.3 Phosphorylation de NPM**

NPM contient divers sites de phosphorylation. Une étude *in vivo* a démontré qu'il peut être phosphorylé par différentes kinases telles que la caséine kinase II (CKII), la nucléaire kinase II (N-II kinase), la Polo-like kinase (PLK) et la cdc2 kinase (Feuerstein and Randazzo, 1991; Peter et al., 1990). La phosphorylation de NPM joue un rôle dans la biogenèse du ribosome et dans la duplication du centrosome durant la mitose.

### **1.2.4 Fonctions cellulaires de NPM**

NPM est un régulateur clef dans l'hématopoïèse. C'est une protéine multifonctionnelle impliquée dans divers processus biologiques et pathologiques qui contrôle le développement, la croissance cellulaire, la prolifération cellulaire, la transformation cellulaire et la biogénèse du ribosome (Feuerstein et al., 1988). En effet, il médie l'exportation de l'ARNr 5S et interagit avec la protéine ribosomale L5 (Yu Y, 2006). NPM intervient dans le processus de l'assemblage du ribosome par sa capacité à faire la navette entre le noyau et le cytoplasme et son activité intrinsèque RNase ainsi que son habilité à lier les acides nucléiques (Herrera et al., 1995; Wang

et al., 1994). Il peut contrôler les molécules pré-RNA (Savkur and Olson, 1998). Cette protéine a la capacité d'agir comme une chaperonne moléculaire afin d'empêcher l'agrégation des protéines dans le noyau durant l'assemblage du ribosome (Yung and Chan, 1987). Aussi, le fait que NPM fasse la navette entre ces deux compartiments cellulaires lui permet de participer à plusieurs processus cellulaires. Parmi ces processus on peut citer: la réponse aux stimuli de stress génotoxiques et la régulation de la transcription d'ADN en modulant la condensation de la chromatine (Grisendi et al., 2006). De plus, NPM maintient la stabilité génomique (Grisendi et al., 2005); (Colombo et al., 2005) en contrôlant les mécanismes de réparation de l'ADN (Lee SY, 2005; Wu MH, 2002) et la duplication du centrosome durant la mitose (Okuda, 2002).

NPM peut servir de suppresseur de tumeur parce qu'il empêche la fonction qui conduit à la tumorigénèse. Il est impliqué dans l'apoptose dû à une réponse au stress et la stimulation oncogénique (Ye K., 2005). NPM est un régulateur direct d'ARF, de Mdm2 et de p53 qui sont des protéines suppressives de tumeurs (Bertwistle et al., 2004; Colombo et al., 2002; Itahana et al., 2003; Kurki et al., 2004). L'augmentation du niveau d'ARF après un stress oncogénique affecte la polyubiquitination de NPM (Itahana et al., 2003) ce qui promouvoit sa dégradation et interfère avec son transfert du noyau au cytoplasme (Gjerset and Bandyopadhyay, 2006). NPM peut aussi se comporter comme un oncosupresseur quant il est faiblement exprimé ce qui conduit à une inhibition de la mort cellulaire programmée (Grisendi et al., 2006; Ruggero D, 2003).

### **1.2.5 Rôle de NPM dans la régulation du cycle cellulaire**

NPM se lie à ARF et le séquestre dans le nucléole ce qui affecte la régulation du cycle cellulaire (Yoneda-Kato et al., 2005). En effet, une surexpression de NPM réduit le pourcentage de cellules en G1 et augmente la population en phase S dans les cellules n'exprimant pas p53. Par contre, cette surexpression augmente l'arrêt du cycle cellulaire des cellules normales (Itahana et al., 2003). Aussi, lorsque NPM est

surexprimé, il y a une croissance cellulaire incontrôlée et une transformation cellulaire. Inversement, une interruption de l'expression de NPM peut causer une instabilité génomique et une amplification du centrosome, ce qui augmente le risque de transformation cellulaire (Falini et al., 2007; Grisendi et al., 2006). NPM participe à la régulation des processus cellulaires en modulant l'activité des facteurs de transcription tels que p120 (protéine associée à la prolifération nucléolaire) (Chatterjee et al., 1991; Fonagy A, 1994) et YY1.

### **1.2.6 Les mutations dans NPM**

NPM est fréquemment surexprimé, muté, réarrangé et délété dans le cancer chez l'humain. Approximativement 1/3 des LMA sont caractérisées par une localisation aberrante de NPM dans le cytoplasme chez les cellules érythroïdes et myéloïdes dû à une mutation dans l'exon 12 (Alcalay et al., 2005; Falini et al., 2005). Les mutations, qui se situent principalement dans l'exon 12 sont présentes dans 31.7 % de toutes les LMA (Lim and Wang, 2006; Yan LZ, 2007). NPM peut être muté et localisé de façon aberrante dans le cytoplasme (NPMc+) des blastes leucémiques dans une proportion qui se situe autour de 35 % des patients LMA (Falini et al., 2005). Le gène NPM peut subir des mutations (translocations) dans divers lymphomes et leucémies en formant des protéines de fusion telles que: la t(5 ;17)(q35 ;q12) qui donne la protéine de fusion NPM-RAR $\alpha$  impliquée dans APL (Acute promyélocytaire leukemia) (Redner et al., 1996); la t(2 ;5)(p23 ;q35) qui donne la protéine de fusion NPM-ALK impliquée dans ALCL (anaplastic large cell lymphoma) (Morris et al., 1994); et la translocation t(3 ;5)(q25 ;q35) qui donne la protéine de fusion NPM-MLF1 impliquée dans LMA (Yoneda-Kato et al., 1996). Le plus souvent, ces translocations impliquent seulement la partie N-terminale de NPM. Il existe une délétion (-5q35,-5) de NPM impliqué dans SDM (Le syndrome de myélodysplasie) (Mendes-da-Silva et al., 2000). Cette délétion le long du bras de chromosome 5 dans lequel NPM est localisé est fréquemment observée chez les patients avec SDM et dans les tumeurs solides. Donc, une altération ou une perte de fonction causées par une mutation ou une translocation peuvent avoir différents effets

et contribuer à l'oncogenèse par une perte de potentiel de régulation de NPM dans différents processus (Lim and Wang, 2006).

Pour chacune des translocations mentionnées ci-haut, des études ont été menées afin de les caractériser. On ne connaît pas toutes les caractéristiques de ces mutations et leurs rôles précis dans les LMA. Généralement, ces gènes codent pour des protéines qui ont normalement comme fonction de contrôler la croissance cellulaire, la différenciation ou la survie cellulaire (Matsumoto et al., 2000).

### **1.2.7 NPM et le cancer**

NPM semble être largement impliqué dans la pathogenèse du cancer parce qu'il est surexprimé dans plusieurs types de cancer chez l'humain tels que les cancers des ovaires, du colon, du foie, de la prostate et de l'estomac (Grisendi et al., 2006). Il est fortement lié à la croissance incontrôlable des cellules cancéreuses car, une surexpression de NPM dans les cellules tumorales peut conduire à une augmentation de la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. L'abondance de NPM est un trait commun aux cellules cancéreuses et un haut niveau d'expression de celui-ci semble être bénéfique à la survie des cellules cancéreuses. Pour avoir une croissance continue des cellules tumorales, il faut une réserve continue de protéines; ce qui demande une continuité dans la biogénèse du ribosome et NPM est un facteur essentiel dans ce processus (Grisendi et al., 2006). De ce fait, il est possible de cibler NPM dans différentes approches permettant de traiter le cancer.

## **1.3 Myeloid leukemia facteur 1 (MLF1)**

Originellement, le gène *MLF1* a été identifié dans la t(3;5) associée à la LMA en générant une protéine de fusion NPM-MLF1 (Yoneda-Kato et al., 1996). MLF1 se trouve dans la région centrale du chromosome 3. La taille du MLF1 sauvage chez les K562 est de 31 à 37 KDa (Yoneda-Kato et al., 1996). Il est exprimé de façon aberrante dans plus de 25 % des cas de SDM/AML (Matsumoto et al., 2000).

### 1.3.1 Les sites d'expression

MLF1 est exprimé à un taux élevé dans les muscles squelettiques, cardiaques, et les muscles squelettiques de la bouche. L'expression de MLF1 est préférentiellement détectée dans les cellules CD34+ immatures mais celle-ci diminue lors de la différenciation cellulaire durant l'hématopoïèse normale. Dans les lignées cellulaires hématopoïétiques, l'expression de MLF1 est variable et peu concluante. Les cellules érythroleucémiques humaines K562 expriment faiblement MLF1 de type sauvage endogène (Matsumoto et al., 2000). Une surexpression aberrante de MLF1 a été rapportée dans des cellules de carcinome et dans les précurseurs érythroïdes (pro-érythroblastes) (Falini B, 2006; Sun W, 2004). Chez la souris, un renforcement de l'expression de MLF1 perturbe le développement des colonies érythroïdes au niveau des précurseurs de l'hématopoïèse normale et différencie les précurseurs érythroïdes en précurseurs myéloïdes (Williams JH, 1999; Yoneda-Kato et al., 1996).

### 1.3.2 Localisation de MLF1

MLF1 est normalement localisé dans le cytoplasme de différents tissus (Williams JH, 1999; Yoneda-Kato et al., 1996). Il est aussi localisé au noyau des cellules hématopoïétiques (Hanissian SH, 2004; Ohno K, 2000; Pan HY, 2003). Il fait la navette entre le noyau et le cytoplasme parce qu'il se lie à « MLF1 associated nuclear protein » (Manp) qui est localisé dans le noyau et qui peut réorienter MLF1 du cytoplasme au noyau (Falini et al., 2006; Winteringham et al., 2006). Aussi, la présence de NPM-MLF1 dans le noyau reflète la présence de MLF1 dans le noyau. En outre, le motif RSXSXP joue un rôle important dans la régulation et la localisation de MLF1 car une mutation dans ce motif augmente la quantité de MLF1 au noyau (Winteringham et al., 2006).

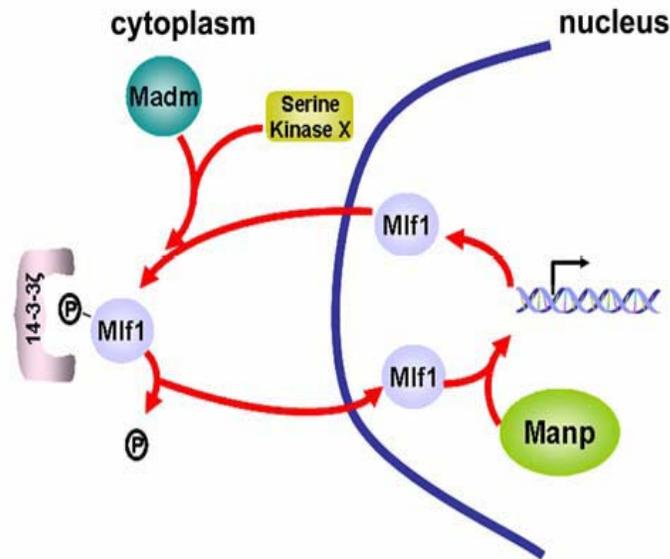
### 1.3.3 Fonctions de MLF1

- **MLF1 joue un rôle dans l'hématopoïèse**

MLF1 prévient les cellules érythro-leucémiques contre les modifications biologiques et morphologiques durant la maturation en réponse à l'érythropoïétine (Winteringham et al., 2004). Il joue potentiellement un rôle dans l'hématopoïèse normale. La surexpression de la protéine dans les cellules hématopoïétiques résultant de la présence de NPM-MLF1 pourrait théoriquement déréguler la voie qui contrôle la croissance et la mort cellulaire (Hitzler et al., 1999). MLF1 joue un rôle dans la suppression de maturation des globules rouges.

- **MLF1 pourrait affecter l'expression de plusieurs gènes**

MLF1 peut se lier à l'ADN et affecte l'expression de plusieurs gènes incluant les facteurs de transcription (Winteringham et al., 2006). En effet, plusieurs gènes qui règlent la transcription de gène semblent influencés par MLF1 tels, le facteur ascendant de transcription 1 (USF1), le facteur « c-myc intron-binding protein 1 » (MIBP1) et le « E26 avian leukemia oncogene 1 » (ETS-1). Les membres de la famille ETS-1 sont fortement impliqués dans le contrôle de la prolifération et la différenciation des cellules érythroïdes (Nerlov and Graf, 1998; Sieweke et al., 1996). La façon dont MLF1 influence l'expression des gènes n'est pas encore claire. Cet effet peut être directement dû à sa liaison à l'ADN ou indirectement par son interaction avec ses partenaires nucléaires tel que Manp (Winteringham et al., 2004). Il y a une possibilité que MLF1 agisse de concert avec Manp pour induire la leucémie lorsqu'ils dérégulent les gènes (Winteringham et al., 2004).



(Winteringham et al., 2006).

**Figure 5 : Mouvement de MLF1 dans la cellule et rôle nucléaire.**

- **Protéines pouvant s'associer avec MLF1**

MLF1 peut s'associer aux protéines 14-3-3 ainsi qu'à certaines protéines qui contrôlent l'apoptose. MLF1 est séquestré dans le cytoplasme par son association avec les protéines 14-3-3, ce qui pourrait moduler son activité. Les protéines 14-3-3 sont une famille de molécules exprimées en toutes les cellules eucaryotiques. Elles ont une capacité de lier une multitude de protéines de signalisation diverses, y compris des kinases, des phosphatases, et des récepteurs transmembranaires. Les protéines 14-3-3 jouent des rôles importants dans divers processus de régulation vitales, tels que la transduction signal mitogénique, la mort cellulaire apoptotique, et la commande du cycle cellulaire; elles permettent aussi la rétention de MLF1 dans le cytoplasme de certaines cellules. MLF1 peut s'associer à différentes protéines telles que : « MLF1 adaptator molécule » (Madm) et Manp (Winteringham et al., 2006) (figure 5). Aussi, MLF1 peut se lier à des régulateurs transcriptionnels comme le

« DNA replication-related element binding factor » (DREF) (Ohno K, 2000), le « MLF1 interacting protein/KSHV et le « latent nuclear antigen interacting protein » (MLF1IP/KLIP1) (Hanissian SH, 2004; Pan HY, 2003). DREF régule les gènes impliqués dans la prolifération incluant le facteur de transcription d'E2F. Il a été suggéré que DREF est impliqué dans la voie de signalisation qui contrôle la croissance et la différenciation (Hirose F, 1996; Ohshima N, 2003).

- **Interférence avec l'érythropoïétine et régulation du cycle cellulaire**

MLF1 interfère avec l'érythropoïétine (Epo) afin d'induire la prolifération en prévenant la sortie du cycle cellulaire (Winteringham et al., 2004). MLF1 prévient l'accumulation de p27<sup>kip1</sup> (Winteringham et al., 2004) qui est essentiel pour l'arrêt du cycle cellulaire durant la différenciation terminale des cellules érythroïdes (Hsieh et al., 2000; Matushansky et al., 2000). Cette protéine peut aussi réguler le cycle cellulaire via « COP9 signalosome complexe subunit 3 constitutive photomorphogenesis protein 1 homologue » (CSN3/COP1), une voie qui influence le niveau de p53 (Yoneda-Kato et al., 2005). En effet, lors d'un stress génotoxique, MLF1 induit l'arrêt du cycle cellulaire en G1 de manière p53 dépendante chez les fibroblastes embryonnaires murins en diminuant l'activation de p53. MLF1 est un régulateur crucial de p53 et il est impliqué dans la leucémogénèse par la voie de CSN3/COP1 (Yoneda-Kato et al., 2005). Donc, MLF1 est une oncoprotéine qui peut influencer la lignée érythroïde/myéloïde, la sortie du cycle cellulaire et la différenciation de ces cellules (Williams JH, 1999; Winteringham et al., 2004; Yoneda-Kato et al., 2005). Une dérégulation de l'activité de MLF1 peut conduire à la LMA (Yoneda-Kato et al., 1996). Aussi, il y a une corrélation possible entre l'augmentation du taux de MLF1 et le SDM.

#### **1.4 La protéine de fusion NPM-MLF1**

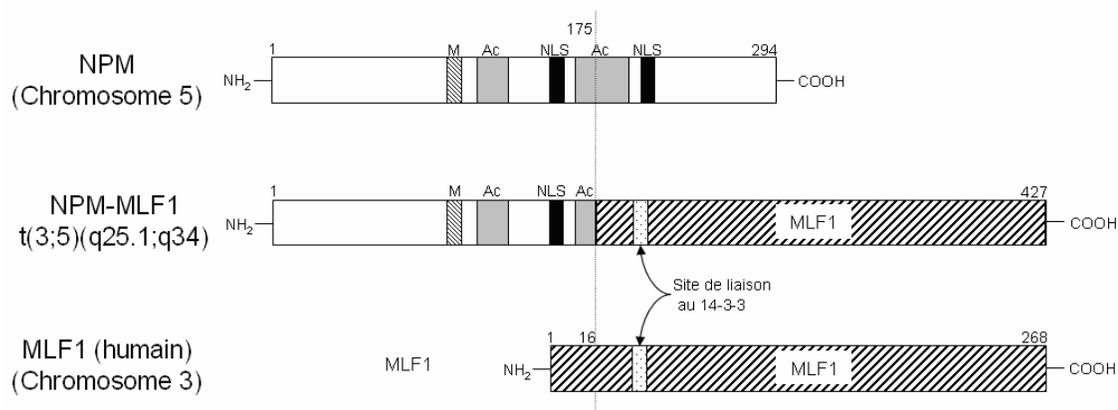
Dans la leucémie humaine, les translocations créent une protéine de fusion aberrante qui agit comme un événement initial dans la tumorigénèse en interrompant

plusieurs mécanismes tels que la différenciation et l'apoptose qui contrôlent l'hématopoïèse (Yoneda-Kato et al., 2005). Différentes translocations génomiques (18 à 65 % des cas) sont associées à l'apparition de la LMA en induisant la formation d'une protéine de fusion. C'est le cas de la translocation t (3; 5) (q25.1; q34) impliquant le suppresseur tumoral NPM1 (chromosome 5) et l'oncogène MLF1 (chromosome 3) (Look, 1997; TH., 1994; Yoneda-Kato et al., 1996). Les causes du gain ou de la perte de fonction subséquente à la t (3; 5) NPM-MLF1 demeurent inconnues car, nous ne savons pas comment cette translocation peut favoriser ou participer à l'avènement de LMA.

#### 1.4.1 Localisation cellulaire de NPM-MLF1

La protéine de fusion NPM-MLF1 mesure 54 KDa (Yoneda-Kato et al., 1996). Elle est localisée majoritairement au noyau, et fortement exprimée au nucléole. La protéine de fusion NPM-MLF1 peut rentrer dans le noyau parce que la portion de NPM1 (1 à 175 a.a.) de la protéine de fusion contient un des deux peptides signaux conduisant la protéine de fusion chimérique au noyau (Kwong, 1998; Xie et al., 1997; Yoneda-Kato et al., 1996). Aussi, l'hétérodimérisation de NPM-MLF1 avec le NPM1 sauvage peut aussi contribuer à importer NPM-MLF1 au noyau.

#### 1.4.2 La structure de NPM-MLF1 et variabilité dans le point de cassure



**Figure 6: structure de *NPM*, *MLF1* et la formation de *NPM-MLF1* à partir de *NPM* et *MLF1*.** Où M : site potentiel de liaison d'un métal, Ac : acides aminés acides, NLS : signal de localisation nucléaire, fc : forme courte, fl : forme longue, les nombres représentent les acides aminés et la ligne verticale représente le point de cassure de la translocation (Bourgoin, 2005 adapté de Yoneda-Kato et al., 1996). La protéine de fusion NPM-MLF1 est constituée des premiers 175 a.a de la portion N-terminale de NPM *ie.*, elle contient le domaine de transactivation, un des 2 signaux de localisation cellulaire et un des 2 domaines de liaison avec les histones. Aussi, NPM-MLF1 est constituée de MLF1 presque en entier sauf pour les 16 premiers acides aminés de la portion N-terminale (figure 6) (Yoneda-Kato et al., 1996). Ainsi cette protéine de fusion contient le domaine de liaison à l'ADN de MLF1.

**Tableau I: les différents points de cassures pour la t (3; 5).**

**TABLE 1.** Clinical and Molecular Features of t(3;5) Patients

Case Number	Age (years)/ Sex	Diagnosis FAB	Diagnosis WHO	Karyotype	FISH <i>NPM/MLF1</i>	FISH <i>Ribophornin/NPM</i>	FISH <i>NPM/EV11</i>	Therapy	Follow up
1	33/M	Refractory anemia with excess blasts in transformation (RAEB-T)*	Refractory cytopenia with multilineage dysplasia	46,XY,der(3)t(3;5)(q25;q35)inv(3)(p21q25),der(5)t(3;5)[20]	+	-	-	MUD BMT	Alive, NED, 8 years after BMT
2	26/M	RAEB-T*	Refractory anemia with excess blasts	46,XY,ins(3;5)(q25;q31.1q35) [20]	+	-	-	MUD BMT	Alive, NED 4.5 years after BMT
3	21/M	Acute myeloid leukemia (AML), M6	AML with multilineage dysplasia	46,XY,t(3;5)(q25;q35) [21]	+	-	-	MUD + AUTO BMT	Alive, NED 6 years after BMT
4	33/M	AML, M4	AML with multilineage dysplasia	46,XY,ins(3;5)(q25;q31.1q35) [20]	***	-	-	PSCT	Alive, NED 1 year after PSCT
5	50/M	RAEB-T	AML with multilineage dysplasia	47,XY,t(3;5)(q25;q35),+8[13]/46,XY[7]	+	-	-	Chemotherapy	Dead of disease at 14 months
6	55/M	Refractory anemia	Refractory cytopenia with multilineage dysplasia	46,XY,der(3)t(3;5)(q27;q31) [4]	-	-	-	NA	NA

\*MDS upgraded due to the presence of Auer rods.  
 \*\*Also *NPM/MLF1* positive by RT-PCR.  
 MUD, matched unrelated donor; BMT, bone marrow transplantation; AUTO, autologous; PCST, peripheral blood stem cell transplantation; NED, no evidence of disease; NA, not available.

(Arber et al., 2003)

Il y a une variabilité dans les points de cassures qui produit la t (3; 5) mais, le point de cassure le plus souvent retrouvé est (q25.1; q34) (Falini et al., 2005).

#### 1.4.3 Faible pourcentage d'association de NPM-MLF1 dans la LMA/SDM

La translocation NPM-MLF1 est très rare. En effet, on la retrouve dans une quantité inférieure à 1 % des cas LMA. Toutefois, une étude sur le SDM, chez de jeunes adultes indique que 8 % des patients portent cette aberration (Chang et al., 2002). Ce réarrangement peut affecter plusieurs sous-types de leucémies sauf la leucémie promyélocytaire (Raimondi et al., 1989). Les patients qui portent la t (3; 5)

(q25; q35) développent généralement une LMA de type M6 (classification : Français-Américains-Britanniques: FAB). Chez un nombre significatif de patients, l'acquisition de la t (3; 5) qui donne la protéine de fusion NPM-MLF1 semble être une étape critique dans la maladie SDM qui conduit à la LMA. Ainsi, la t (3;5) (q25.1; q34) est associée à SDM/LMA (Raimondi et al., 1989).

#### **1.4.4 Induction de l'apoptose par NPM-MLF1**

L'expression ectopique de la protéine de fusion NPM-MLF1 induit l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires humaines dont K562 et les cellules HeLa. L'étude de Yoneda-Kato *et al.*, (1999) suggère fortement que NPM-MLF1 active une voie de signalisation spécifique qui conduit à l'apoptose. La surexpression de la protéine de fusion NPM-MLF1 induit l'apoptose en augmentant le stress intracellulaire non spécifique. Les fibroblastes de souris NIH3T3 qui surexpriment NPM-MLF1 croissent normalement mais, une privation en sérum déclenche la mort cellulaire par apoptose avec une cinétique plus lente que d'autres inducteurs apoptotiques bien connus tels que le c-Myc ou l'E2F-1. L'analyse d'une variété de mutations par délétion dans NPM-MLF1 a révélé que l'induction de l'apoptose requiert le domaine N-terminal de MLF1. Aussi, l'enlèvement du domaine de dimérisation de NPM altère nettement la capacité de NPM à induire l'apoptose (Yoneda-Kato et al., 1999). Entre autres, NPM-MLF1 en collaboration avec les oncoprotéines anti-apoptotiques pourrait jouer un rôle important dans plusieurs étapes qui induisent la progression de SDM à LMA. Car, 90 % des cellules NIH3T3 transfectées par NPM-MLF1 et Bcl-2 ont survécus dans un milieu de culture contenant 0.1 % de sérum tandis que 80 % de ces cellules contenant NPM-MLF1 sans Bcl-2 sont mortes dans un milieu de culture contenant 0.1 % de sérum (Yoneda-Kato et al., 1999).

#### **1.4.5 Implication de NPM-MLF1 dans la transformation maligne des cellules.**

Le mécanisme par lequel la protéine de fusion NPM-MLF1 induit la transformation maligne des cellules demeure inconnu. Selon Yoneda-Kato, hypothétiquement, trois mécanismes pourraient être impliqués dans l'induction de

néoplasie myéloïde par NPM-MLF1. Premièrement, le puissant promoteur de NPM1 conduit à l'expression ectopique de MLF1 dans les cellules qui normalement ne vont pas l'exprimer. Deuxièmement, il y a une association de la protéine de fusion à des sites aberrants ce qui mène à la régulation anormale de différents gènes. Troisièmement, la moitié de la protéine NPM qui existe à cause de la translocation est suffisamment altérée pour affecter la réplication de l'ADN, la production d'ARN et l'expression de gènes qui influencent le contrôle de la croissance des cellules (Yoneda-Kato et al., 1996).

Au laboratoire, nous avons observé une région d'homologie dans MLF1 avec la protéine MTG8 que nous appelons MTG8-like. Le domaine MTG8-like est constitué de 12 a.a. (151 à 164) de la protéine MLF1. Cette région d'homologie se situe environ dans la région où les protéines GFI-1, PLZF, mSin3A, HDAC1 et 3 interagissent avec MTG8 (Davis JN, 2003). Pour ces travaux de maîtrise, nous avons donc étudié plusieurs corépresseurs (GFI-1, PLZF, mSin3A, HDAC1 et 3) afin de voir s'ils interagissent avec NPM-MLF1, NPM, MLF1 et plus précisément via le domaine MTG8-like de MLF1, de NPM-MLF1 et de MTG8 en faisant une délétion de ce domaine dans ces protéines.

## 1.5 GFI-1 (growth factor independant 1) ou zinc- finger transcriptional factor



(Shireen Saleque, et al. 2007).

**Figure 7: Caractéristiques structurales de GFI-1 et GFI-1b**

### 1.5.1 Types cellulaires exprimant GFI-1

GFI-1 est exprimé dans la lignée cellulaire HL60. Il est aussi exprimé dans tous les compartiments de CSHs et quelques sous-unités de progéniteurs hématopoïétiques tels que les lymphoïdes (les lymphocytes B et T), myéloïdes, granulocytes, les macrophages et les neutrophiles. Il existe plusieurs isoformes de GFI-1 dont GFI-1b qui est hautement exprimé dans les CSHs, les érythrocytes et les mégacaryocytes (Zeng H, 2004).

### 1.5.2 Fonctions de GFI-1 dans les cellules hématopoïétiques

L'oncoprotéine GFI-1 a été découverte pour la première fois pour son rôle dans la lymphopoïèse et la myélopoïèse (Duan and Horwitz, 2003a; Karsunky et al., 2002; Person RE, 2003). GFI-1 a été originalement identifié comme un répresseur transcriptionnel dans les cellules lymphoïdes. Maintenant, il est reconnu pour jouer un rôle essentiel dans la maturation des neutrophiles et des CSHs. GFI-1 et GFI-1b jouent un rôle dans le développement et la fonction d'un large spectre de cellules hématopoïétiques incluant les lymphocytes, les neutrophiles, les CSHs et possiblement les érythrocytes et les mégacaryocytes (Hock H, 2006). Par exemple,

GFI-1 permet l'expression d'IL-2 dans les cellules T et contribue à la progression des tumeurs lymphoïdes chez la souris (Gilks et al., 1993; Zornig et al., 1996).

### **1.5.3 Rôle de GFI-1 le développement des cellules lymphoïdes et myéloïdes**

GFI-1 assume des fonctions importantes à différents stades du développement des cellules lymphoïdes. Les souris « knockout » (K.O.) pour GFI-1 (GFI-1<sup>-/-</sup>) démontrent très tôt une réduction sévère des progéniteurs lymphoïdes (Adolfsson et al., 2005; Hock H, 2003; Zeng H, 2004). De plus, GFI-1 est requis pour supprimer la prolifération des précurseurs myéloïdes (Hock H, 2004). Également, il y a une réduction du nombre de cellules B dans la moelle osseuse pour les souris GFI-1 « knockout » (Hock H, 2003; Yucel et al., 2003). GFI-1 est aussi impliqué dans la prolifération des cellules T helper CD4<sup>+</sup>. Cette protéine est nécessaire pour le développement normal des lymphocytes T et B. Ce qui augmente la possibilité que GFI-1 puisse être important pour la régulation de la réponse immunitaire (Zhu J, 2002).

### **1.5.4 Rôle de GFI-1 dans le développement des neutrophiles**

Dans une souris GFI-1<sup>-/-</sup>, il y a une absence de neutrophiles (Karsunky et al., 2002; Person RE, 2003) tandis que les éosinophiles sont présents en quantité normale avec une morphologie normale (Hock H, 2003). GFI-1 est requis pour la différenciation des neutrophiles au-delà du stade promyélocytique.

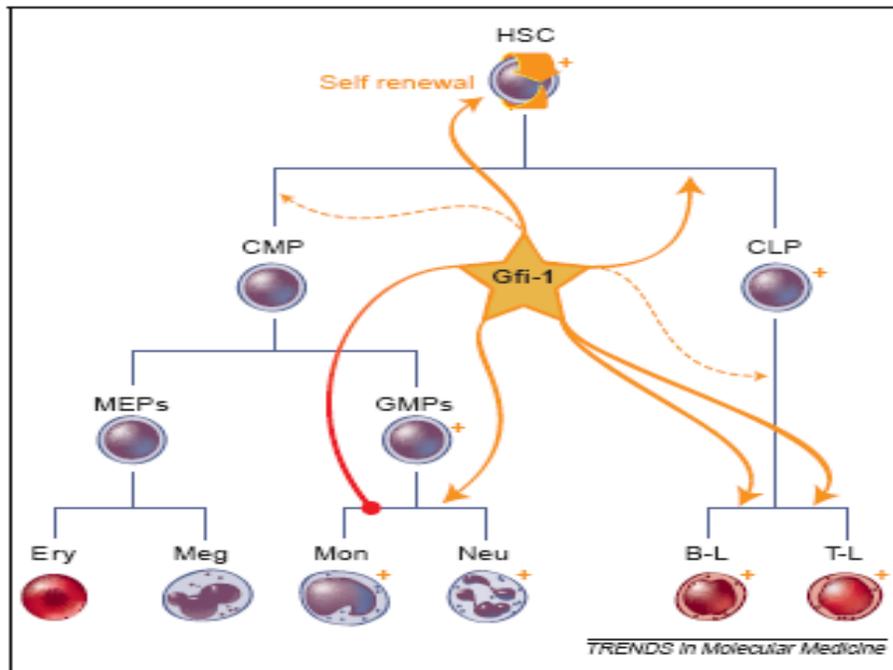
### **1.5.5 Rôle de GFI-1 dans le fonctionnement des CSHs**

GFI-1 régule l'auto-renouvellement et préserve l'intégrité fonctionnelle des CSHs. Il est essentiel pour restreindre la prolifération des CSHs et pour maintenir leur intégrité fonctionnelle dans la moelle osseuse adulte. GFI-1 régule la différenciation des cellules hématopoïétiques et leur survie (McGhee et al., 2003). Il est un important régulateur transcriptionnel qui opère sur plusieurs grandes fenêtres du développement hématopoïétique. En effet, la perte de GFI-1 entraîne une diminution importante des CSHs à court-terme et des progéniteurs multipotants (MPPs) (Lin<sup>-</sup>, Sca1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>,

Flt3<sup>+</sup>) à long terme, dans la moelle osseuse de souris (Hock H, 2004; Zeng H, 2004). L'activité des CSHs normales est cruciallement dépendante de GFI-1 au moins sous les conditions de stress et d'irradiation létale (Hock H, 2004).

### **1.5.6 Rôle de GFI-1 dans l'hématopoïèse et le cycle cellulaire**

Une souris déficiente en GFI-1 peut initier mais non soutenir l'hématopoïèse dans la moelle osseuse car, la perte de GFI-1 conduit à un ralentissement profond de l'hématopoïèse en impliquant la voie de p21<sup>cip/waf1</sup> (Duan and Horwitz, 2005; Zweidler-Mckay PA, 1996). De plus, la voie de GFI-1 gouverne négativement la prolifération dans l'hématopoïèse (Duan and Horwitz, 2005). En outre, plusieurs régulateurs directs ou indirects du cycle cellulaire sont des cibles de GFI-1 (Duan and Horwitz, 2003b). La régulation du cycle cellulaire est essentielle et intrinsèque dans la prolifération hématopoïétique, le destin cellulaire, la spécification cellulaire, la différenciation, la migration et l'apoptose (Steinman, 2002). Dans les CSHs déficientes en GFI-1, il y a une dérégulation du cycle cellulaire qui est caractérisée par une hyper-prolifération et compromet le potentiel de l'auto-renouvellement (Duan and Horwitz, 2005). Les souris déficientes en GFI-1 montrent une déficience en neutrophiles, en lymphocytes et en cellules immatures relâchées par la moelle osseuse exprimant des marqueurs de neutrophiles et de monocytes. Ainsi, GFI-1 semble jouer en partie un rôle dans plusieurs événements cellulaires incluant la prolifération, l'apoptose, la spécification du destin cellulaire, la différenciation et l'oncogenèse (Jafar-Nejad and Bellen, 2004).



(Duan and Horwitz, 2005)

**Figure 8: l'implication de GFI-1 dans plusieurs étapes de l'hématopoïèse.**

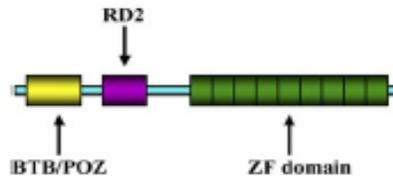
CSHs: Cellules souches hématopoïétiques ; CLP : Cellules lymphoïdes progéniteurs;  
 CMP: Cellules myéloïdes progéniteurs; MEPs : mégacaryocytes/érythrocytes  
 progéniteurs; GMPs: granulocytes/macrophages progéniteurs; Ery: érythrocytes;  
 Meg: mégacaryocytes; Mon: monocytes; Neu: neutrophiles; B-L et T-L:  
 lymphocytes B et T.

### 1.5.7 Liaison de GFI-1 à l'ADN et répression de la transcription

GFI-1 est capable de lier l'ADN par son domaine doigt de zinc qui est situé dans la région C-terminale. GFI-1 et GFI-1b peuvent réprimer la transcription à l'aide du domaine « Gamma-soluble NSF attachment protein » (SNAG) mais le mécanisme est encore inconnu. Il est connu que GFI-1 interagit avec MTG8 *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'avec les histones déacétylases *in vivo* telles que HDAC1, 2, 3. Donc, GFI-1 pourrait réprimer la transcription en recrutant le complexe d'histone déacétylase (McGhee et al., 2003). Cela indique qu'il pourrait agir comme une séquence

protéique d'échafaudage capable de recruter les enzymes de modification des chromatines et d'autres cofacteurs qui visent les promoteurs (Duan and Horwitz, 2005).

### 1.6 Promyelotic leukemia zinc finger (PLZF)



(Rho SB, 2006)

#### Figure 9: Caractéristiques structurales de la protéine PLZF

BTB: “broad complex, tramtrack, bric-a-brac”/POZ: “Pox virus and zinc finger”;  
RD2: “responsive to dessication 2 protein “; ZF: “zinc finger domains”.

#### 1.6.1 Sites d'expression de PLZF et localisation de PLZF

PLZF est situé sur le chromosome 11. Il est exprimé dans la moelle osseuse et à faible niveau dans le rein, dans les ovaires et dans les poumons (Ball et al., 1999; Reid et al., 1995). Au niveau de la moelle osseuse il est exprimé dans les cellules hématopoïétiques immatures et cette expression est faiblement régulée durant leur différenciation. En effet, dans les compartiments hématopoïétiques il y a un haut niveau de PLZF dans les cellules CD34+, les cellules progénitrices érythroïdes, lymphoïdes et myéloïdes. PLZF est aussi exprimé dans les cellules progénitrices pluripotentes et les cellules du sang périphérique matures, comme les lymphocytes T, B et les cellules NK (Parrado et al., 2000; Reid et al., 1995). Dans les cellules K562 il est faiblement exprimé et il est localisé dans le nucléole. Il est situé au niveau nucléaire dans les progéniteurs hématopoïétiques (Horowitz and Berg, 1996; Melnick et al., 2002; Shaknovich et al., 1998).

### **1.6.2 Fonctions générales de PLZF**

De façon générale, le domaine BTB/POZ de PLZF est impliqué dans une variété de processus importants tels que l'homéostasie, la néoplasie, l'apoptose, la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation, la localisation sub-nucléaire et l'embryogénèse (Horowitz and Berg, 1996; Melnick et al., 2002). PLZF est impliqué dans la leucémie myéloïde dans la translocation (11; 17). Il fonctionne comme un facteur qui réprime la transcription en bloquant la croissance des cellules myéloïde et leur différenciation (Shaknovich et al., 1998).

### **1.6.3 Régulation de la transcription par PLZF**

PLZF peut interagir avec certains corépresseurs nucléaires tels que N-CoR, « silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor » (SMRT) et mSin3A. Ces interactions affectent la déacétylation des histones (Shaknovich et al., 1998). Le domaine BTB/POZ de PLZF est aussi fortement impliqué dans la régulation de l'expression des gènes au niveau de la conformation locale de la chromatine en interagissant avec des « specificity protein 1 (Sp1) zinc finger » et en interférant dans l'activité de liaison de SP1 à l'ADN (Lee DK, 2002; Rho SB, 2006). PLZF peut induire une résistance à l'apoptose en inhibant la transcription des gènes pro-apoptotiques (BID protéine un membre de la famille Bcl-2 (Parrado et al., 2004).

### **1.6.4 Suppression de la croissance par PLZF**

PLZF pourrait contrôler négativement la croissance cellulaire. En effet in vitro, la surexpression de PLZF donne un effet de suppression de croissance accompagné d'un retardement du cycle cellulaire par une accumulation de cellules dans la phase G0/G1; ce qui augmente l'incidence de l'apoptose (Parrado et al., 2004; Shaknovich et al., 1998). PLZF pourrait jouer un rôle dans le contrôle du stade quiescent des progéniteurs hématopoïétiques.

### **1.6.5 Rôle de PLZF dans la prolifération cellulaire**

PLZF peut contrôler la prolifération cellulaire. Il exerce un effet antiprolifératif en supprimant l'expression de la cycline A et cet effet peut être renversé par « heparin-binding EGF-like growth factor » (HB-EGF) (Brosens JJ, 2006; Nanba et al., 2003). Quand les cellules sont induites à se différencier, le niveau de PLZF baisse; cela pourrait être nécessaire pour la division cellulaire accompagnée d'une différenciation terminale des cellules.

### **1.6.6 Les protéines avec lesquelles PLZF interagissent**

PLZF peut interagir avec plusieurs protéines. En effet il peut s'associer à « B-cell leukemia/lymphoma 6 » (BCL-6) (Dhordain P, 2000; Koken MH, 1997). Aussi PLZF peut interagir avec le suppresseur de tumeur CCS-3 ce qui peut entraîner une inhibition de la croissance de la lignée cellulaire « human cervical cancer » car, une surexpression de PLZF et de CSS-3 inhibe la croissance cellulaire et empêche l'activité de cyclin A2 et la régulation du cycle cellulaire (Rho SB, 2006). Également les protéines MTG8, AML-1-MTG8 interagissent avec PLZF ce qui entraîne une répression de la transcription (Davis JN, 2003).

## **1.7 La protéine mSin3A**

mSin3A est une protéine de 171 KDa ayant 57% d'homologie avec l'autre isoforme mSin3B (Ayer et al., 1995; Laherty et al., 1997; Schreiber-Agus et al., 1995).

### **1.7.1 mSin3A composante principale d'un complexe de corépresseur**

mSin3A est associée à HDAC1 et 2 et à plusieurs autres protéines (Ayer, 1999; Knoepfler and Eisenman, 1999; Schreiber-Agus and DePinho, 1998). En effet, mSin3A est associée à un complexe corépresseur formé de 7 à 10 polypeptides étroitement liés. Une grande partie de la fonction corépressive de mSin3A dérive de ses associations avec les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2. Cependant, les contributions des autres polypeptides associés à mSin3A demeurent en grande partie

inconnues (Fleischer et al., 2003). Une fraction de mSin3A semble interagir avec le complexe de remodelage de la chromatine de l'humain : SWI/SNF (Kuzmichev et al., 2002; Pal et al., 2003; Sif et al., 2001).

### **1.7.2 Certaines fonctions cellulaires de mSin3A**

L'interaction spécifique de mSin3A avec plusieurs séquences spécifiques de facteurs de transcription permet de lier le complexe corépresseur mSin3A avec plusieurs voies de signalisation et de l'associer à plusieurs processus biologiques. En effet, mSin3A joue un rôle essentiel, très tôt, dans le développement embryonnaire ainsi que dans la prolifération, la survie cellulaire, la modification des histones, la transformation cellulaire (Dannenberg et al., 2005); la différenciation, l'oncogenèse, et la détermination du destin des cellules (Fleischer et al., 2003). Elle peut induire une dérégulation des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la modification de la chromatine et le métabolisme mitochondrial. Par exemple, pour la régulation du cycle cellulaire, en absence de mSin3A, il y a une importante réduction dans la division cellulaire. Aussi, cette protéine influence l'expression des gènes tels que Myc-Mad, E2F et p53 (Dannenberg et al., 2005). Un recrutement aberrant du complexe mSin3A par des facteurs de transcription altérés est observé dans plusieurs types de cancers chez l'humain comme les LMA et la grave leucémie promyélocytaire (Melnick and Licht, 2002). De plus, le complexe mSin3A joue un rôle dans le fonctionnement du centromère et la stabilité génomique chez les mammifères et la levure (Aparicio et al., 2004; De Nadal E, 2004). Cette protéine est aussi nécessaire pour le développement et l'homéostasie des cellules de la lignée lymphoïde (Cowley SM, 2005).

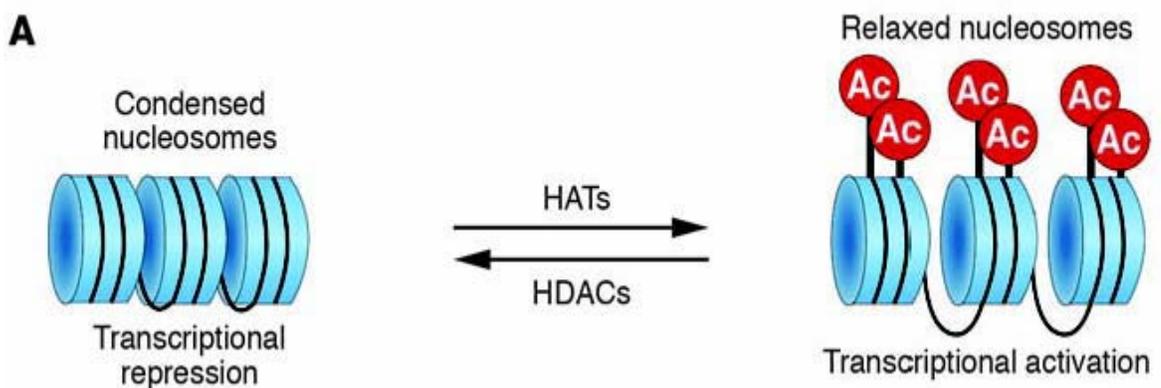
### **1.7.3 Le complexe mSin3A/HDACs joue un rôle dans l'activation de p53**

mSin3A régule la voie de p53. Elle est recrutée par des facteurs impliqués dans la régulation de la transcription incluant p53 (Murphy M, 1999); Ikaros (Koipally et al., 1999), REST (Huang et al. 1999) et E2F4 (Rayman et al., 2002) ce

qui contribue à la répression des gènes cibles. Selon Shaun M. Cowley *et al.* (2005), mSin3A est un gène essentiel pour le développement chez les mammifères.

### 1.8 Les histones déacétylases (HDACs)

Chez les eucaryotes, l'enroulement de l'ADN génomique autour des histones pour former la chromatine est un mécanisme central pour la régulation de l'expression des gènes. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, c'est-à-dire l'enroulement de l'ADN autour d'un octamère d'histone. Les nucléosomes interagissent ensemble pour créer une structure hautement compacte qui limite l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN génomique ce qui réprime l'expression des gènes. L'expression des gènes dépend donc de l'habilité des protéines à lier des séquences d'ADN spécifiques afin de réguler leur transcription. Ceci est accompli en partie par des facteurs de transcription qui médient le recrutement des co-activateurs et des co-répresseurs qui régulent la transcription par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes (Cowger and Torchia, 2006). Ces mécanismes affectent l'environnement local de la chromatine par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination. Toutes ces modifications interviennent la plupart du temps dans la partie N-terminale de la queue des histones et contribuent à la régulation de la transcription (Cowger and Torchia, 2006).



(McKinsey TA, 2005)

**Figure 10: Représentation de la forme hétérochromatine (la chromatine condensée) et la forme euchromatine (la chromatine décondensée).** Les histones acétyltransférases (HATs) sont capables d'acétyler les histones pour favoriser la forme euchromatine, ce qui permet l'activité transcriptionnelle. Dans le sens inverse, les histones déacétylases (HDACs) vont déacétyler les histones pour favoriser la forme hétérochromatine.

Les niveaux d'acétylation sont établis et maintenus par les activités complémentaires de deux familles d'enzymes HATs et HDACs (Grant PA, 1999; Khochbin S, 2001). Les HATs tels que « cofactor binding protein » (CBP) et p300 et les HDACs agissent de manière opposée dans le contrôle de l'acétylation des nucléosomes d'histones. L'acétylation des acides aminés conservés dans la queue des histones permet la relaxation de la structure nucléosomale en affaiblissant les interactions entre la charge positive de la queue d'histone avec la charge négative du phosphate de l'ADN. Ainsi, les activateurs transcriptionnels ont accès à l'ADN et induisent l'expression des gènes. Une déacétylation des histones par les HDACs donne un résultat contraire (figure 10). Toutefois, des inhibiteurs des HDACs comme le butyrate et Trichostatin A ont permis de révéler que tous les effets des HDACs ne conduisent pas à la répression. Toutes les HDACs sont exprimées de façon ubiquitaire dans les tissus immuns et non-immuns (Cowger and Torchia, 2006).

### **1.8.1 Différents types de HDACs chez les mammifères**

Il existe plusieurs types de HDACs chez les mammifères qui se divisent en trois classes se basant sur la structure et les activités biochimiques (Johnson CA, 2002). Les HDACs de classe II possèdent une extension d'acides aminés qui permet la liaison à d'autres régulateurs transcriptionnels et un site de phosphorylation. Les HDACs de classe III contrairement aux HDACs de classe I et II ont besoin de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) pour l'activation catalytique (Dangond F,

1998; McKinsey TA, 2005; Pan F, 2005). Chez l'homme, il existe environ 20 types d'HDACs (Wen YD, 2003). Les enzymes mammifères de la classe I (par exemple HDACs 1-3-8) sont des orthologues du régulateur Rpd3 déacétylase de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), tandis que les enzymes de la classe II (par exemple HDACs 4-7 et 9) sont des orthologues de Hda1 de la levure (Rundlett SE, 1996); (Zhou X, 2001). Les HDACs peuvent aussi déacétyler un certain nombre de substrats non-histone (Cress WD, 2000; Kawai H, 2003).

### **1.8.2 Implication des HDACs dans la carcinogénèse**

Les HDACs jouent un rôle important dans la carcinogénèse, en particulier, dans le cancer colorectal. Ces protéines peuvent y être impliquées de différentes manières. Les HDACs de classe I peuvent réguler à la baisse des suppresseurs tumoraux comme p53 (Kim MS, 2001); (Ito A, 2002). HDAC1 peut affecter la progression du cancer en empêchant l'expression du récepteur alpha d'œstrogène (ER- $\alpha$ ) et son activité transformationnel (Kawai H, 2003). Les classe I (généralement HDAC1 et HDAC3) en particulier sont impliqués dans la régulation de la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Glaser KB, 2003). Une surexpression d' HDAC1 au niveau de l'ARNm et de la protéine a été rapportée dans des tumeurs gastriques et de la prostate (Choi JH, 2001; Patra SK, 2001).

### **1.8.3 Rôle des HDACs dans le cycle cellulaire**

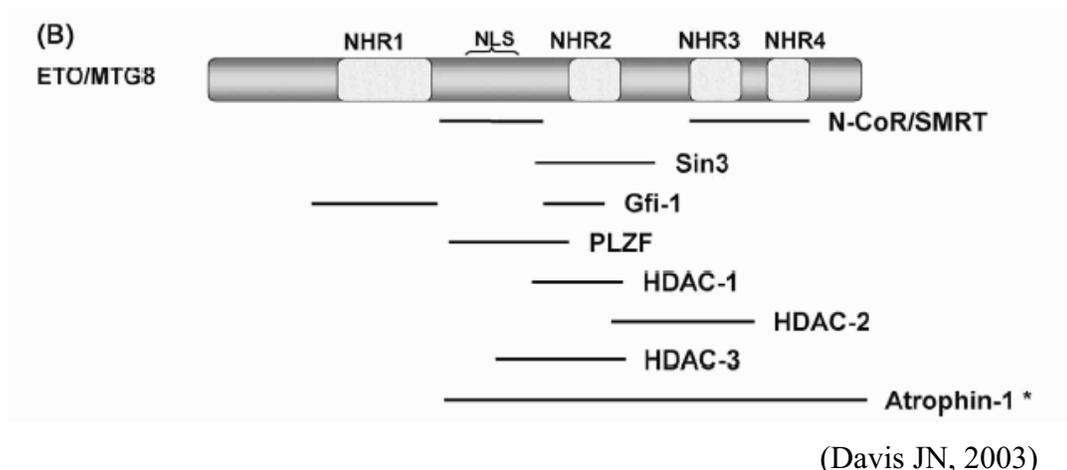
Dans les cellules de la lignée myéloïde leucémique humaine THP-1, une transfection de HDAC3 conduit à une augmentation de la taille des cellules, une morphologie aberrante au noyau et une accumulation de cellule en G2/M du cycle cellulaire. Les HDACs participent à l'activation et la progression du cycle cellulaire (Dangond F, 1998). L'inhibition des HDACs par le butyrate et le trichostatin A (TSA) induit alors un arrêt du cycle cellulaire spécifiquement entre la phase G1 et G2 (Yoshida M, 1995). Lorsque les cellules Swiss 3T3 sont transfectées par HDAC1, il y a une anomalie dans la phase G2/M du cycle cellulaire (Bartl S, 1997). Cela suggère

le rôle des HDACs dans la modulation du stade mitotique. Ils jouent un rôle fondamental dans de multiples voies de signalisation incluant l'activation cellulaire, la croissance et la différenciation. Ils représentent des cibles moléculaires potentielles pour le traitement du cancer et des maladies auto-immunes (Dangond F, 1998).

## **1.9 La protéine «myeloid transforming gene chromosome -8» (MTG8)**

### **1.9.1 Expression et localisation cellulaire de la protéine**

Chez la souris, MTG8 est exprimé chez l'embryon et au stade adulte dans plusieurs tissus (Davis JN, 1999). Chez l'humain, MTG8 est situé sur le chromosome 8 et il est exprimé dans plusieurs organes dont le cerveau, le cœur et les poumons. On le retrouve aussi dans le sang périphérique et dans les cellules de la moelle osseuse CD34 + (Erickson PF, 1996). Il est aussi exprimé dans la lignée cellulaire HELA (Fukuyama T, 2001; Melnick AM, 2000; Sacchi N, 1998). MTG8 et AML-1-MTG8 ont une localisation subcellulaire. Bien que MTG8 a été observé dans le cytoplasme des cellules neuronales, les protéines MTG8 sont le plus souvent nucléaires, et cette protéine contient un signal de localisation nucléaire (NLS) dans des acides aminés 241–280 (Davis et al., 1999; Odaka et al., 2000; Sacchi et al., 1998). MTG8 et AML-1-MTG8 sont étroitement associés à la matrice nucléaire (Le et al., 1998; McNeil et al., 1999) et ces protéines ont été localisées aux foyers subnuclear avec des protéines impliquées dans la répression de la transcription (Wood et al., 2000; McGhee et al., 2003).



**Figure 11: caractéristique structurale de MTG8 et les protéines avec lesquelles il interagit.** La protéine MTG8 se compose de quatre domaines «nervy homology regions» (NHR1-4) conservés au cours de l'évolution. Le domaine NHR1 contient une homologie au facteur 130 TBP-associé à l'humain. Le domaine NHR2 est petit et contient huit séquences hydrophobes. Le domaine NHR3 est ordinaire. Le domaine Cterminal de NHR4 contient deux motifs de doigt-zinc, un du type de CxxC 7x CxxC, et l'autre du type de CxxC 7x HxxC. Cette région de doigt-zinc partage l'homologie avec la protéine RP-8 du rat, de la souris et de *Caenorhabditis elegans* (Owens et al., 1991; Hwang and Gottlieb, 1995; Gross and McGinnis, 1996). Les domaines NHRs de la protéine ETO ont une très grande homologie, et les membres de la famille humaine et murine partagent un grand degré d'homologie globale.

### 1.9.2 Interactions de MTG8 et répression de la transcription

La protéine MTG8 s'associe au complexe N-CoR/msin3A/HDAC *in vivo* et agit comme un corépresseur pour PLZF (Davis JN, 2003). Aussi, MTG8 interagit avec plusieurs autres protéines telles que HDAC1, 2, 3, 6,8 et SMRT. En effet, MTG8 est attaché à la matrice nucléaire à un site qui coïncide avec les HDACs et mSin3A. Deux autres répresseurs transcriptionnels sont capables de se lier à MTG8 tels que PLZF et (Melnick AM, 2000) GFI-1 (Grimes HL, 1996; McGhee et al., 2003). MTG8

est un fort represseur transcriptionnel (Wang et al., 1998; Zhang et al., 2001; Hildebrand et al., 2001), l'effet répressif de MTG8 sur la transcription pourrait être partiellement surmonté avec l'addition du trichostatin A (TSA), un inhibiteur d'histone de deacetylase (Wang et al., 1999). Aussi, cette interaction entre MTG8 et GFI-1 suggère que MTG8 joue un rôle dans l'hématopoïèse parce que GFI-1 opère sur plusieurs grandes fenêtres du développement hématopoïétique. De plus cette protéine a été trouvée dans les cellules hématopoïétiques en développement. La liaison de MTG8 avec PLZF potentialise la répression du promoteur PLZF. Le gène MTG8 joue un rôle critique dans le processus de la leucémie. Il est une cible de t (8; 21) dans les LMA. Aussi, la protéine MTG8 joue un rôle important dans le développement du système gastro-intestinal mais, la fonction exacte demeure inconnue (Davis JN, 2003).

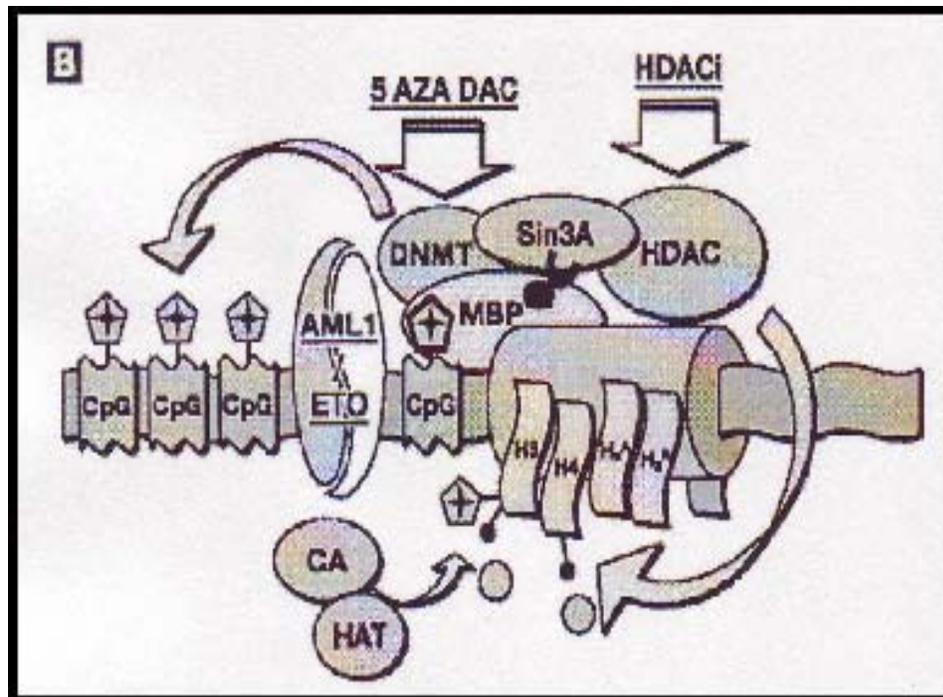
### **1.10 La protéine de fusion AML-1-MTG8**

AML-1-MTG8 est une protéine de fusion induite par la translocation t (8; 21) (q22; q22) impliqué dans les LMA. Approximativement, 12 à 15 % des cas de LMA portent la translocation t (8; 21) (q22; q22). Cette protéine de fusion est très bien caractérisée. Elle n'est pas incluse dans notre étude, mais elle est mentionnée ici, parce qu'elle nous a servi de modèle d'étude et c'est en partie grâce aux études faites sur AML-1-MTG8 que nous avons énoncé notre hypothèse de recherche. Étant donné que la protéine de fusion ne fait pas partie de l'étude, seulement les caractéristiques générales seront mentionnées afin de comprendre l'hypothèse de recherche.

#### **1.10.1 Caractéristiques générales d'AML1-MTG8, AML1 et MTG8**

La protéine de fusion AML-1-MTG8 bloque la différenciation normale des granulocytes par l'interruption de la fonction d'un facteur de transcription, le CCAAT enhancer binding protéines (C/EBP $\alpha$ ). AML1-MTG8 interagit avec PLZF et GFI1 via la portion MTG8. Plus précisément, PLZF et GFI-1 interagissent avec AML-1-MTG8 entre le NHR1 et NHR2, ce qui facilite le recrutement du complexe HDACs et cause en même temps la répression de la protéine GFI-1. La répression de l'expression de

GFI-1 par MTG8 n'est pas encore clarifiée (McGhee et al., 2003). De plus, l'expression d'AML-1-MTG8 cause une interruption du cycle cellulaire dans la phase G1. Le gène AML-1 est un important régulateur de l'hématopoïèse et de l'expression des gènes du cycle cellulaire et il est nécessaire pour la différenciation normale des cellules du sang (Lutterbach B, 2000; Okuda T, 1996; Wang Q, 1996).



(Gozzini A, 2005)

### Figure12 : mécanisme par lequel AML1-MTG8 peut réprimer la transcription

Lorsque la protéine de fusion AML-1/MTG8 est absente dans les cellules normales, les histones des gènes cibles de AML-1-MTG8 sont acétylées ce qui permet l'expression des gènes. Dans le cas contraire, lorsqu'il y a présence d'AML-1-MTG8, celle-ci va interagir avec d'autres facteurs tels que l'ADN méthyltransférase (DNMT) et le complexe mSin3A qui contient des HDACs. Le DNMTs est une enzyme qui catalyse la méthylation de l'ADN. Cette enzyme permet le maintien de la méthylation durant la réplication de l'ADN. L'ADN méthylé est un site pour

« methyl CpG-binding domains protein » (MBP). Lorsque MBP est lié à l'ADN dans le site du promoteur qui permet l'expression du gène, il va chercher d'autres co-répresseurs comme le complexe mSin3A/HDACs. Une fois présentes, les HDACs vont déacétyler les histones. Les histones déacétylées deviennent chargées positivement ce qui permet un enroulement très serré de l'ADN chargé négativement autour des histones. De ce fait, les facteurs de transcription ne sont pas en mesure de se lier à l'ADN. Donc, il y a une répression de la transcription et de l'expression des gènes (Gozzini A, 2005).

## **1.11 Présentation du projet**

### **1.11.1 Séquences d'homologie de MTG8 dans MLL1 et NPM-MLL1**

Il a été démontré dans la littérature (Davis et al.2002) que MTG8 ou AML-1-MTG8 peut interagir avec les protéines suivantes: HDAC1, HDAC3, PLZF, GFI-1. Une étude faite dans notre laboratoire a montré que MTG8 contient une petite séquence d'homologie de 12 a.a. (MTG8-like) dans MLL1. MLL1 tout comme MTG8 est impliqué dans les LMA ainsi que la t (3,5) (q25.1; q34) qui donne la protéine de fusion NPM-MLL1. Du fait de cette similarité (MTG8-like) qu'il y a entre MLL1, MTG8 et NPM-MLL1, l'hypothèse suivante a été émise.

### **1.11.2 Hypothèse de recherche**

Nous supposons que le domaine MTG8-like de MLL1 et de NPM-MLL1 pourrait interagir avec les mêmes protéines que MTG8 tels que HDAC-1, HDAC-3, PLZF, GFI-1 et mSin3A. Cela induirait le dérèglement de plusieurs gènes lorsqu'il y a translocation NPM-MLL1.

### **1.11.3 But et objectifs**

Le but de notre étude est d'analyser le rôle de NPM-MLL1 dans le cancer et d'examiner certains partenaires d'interactions protéiques afin de déterminer comment son activité est dérégulée afin de contribuer à la leucémie. Comment le gain ou la

perte de fonctions de NPM et MLF1 peut contribuer à la leucémie. En effet, si NPM-MLF1 interagit avec ces corépresseurs tout comme le fait MTG8 ou AML-1-MTG8 cela pourrait suggérer que NPM-MLF1 joue un rôle dans la répression de la transcription et la répression de certains gènes.

Pour valider l'hypothèse, plusieurs objectifs doivent être atteints:

- 1) Vérifier s'il y a une interaction entre NPM-MLF1, MTG8-Like, MLF1, NPM et les facteurs de transcription PLZF, GFI-1 ainsi que les corépresseurs HDAC-1, HDAC-3 et mSin3A par la technique de double-hybride dans les levures AH109.
- 2) Vérifier l'implication du domaine MTG8-Like dans l'interaction des protéines avec NPM-MLF1, MLF1-Like et MLF1 en amputant ce domaine MTG8-Like. Nous voulons savoir si ces protéines vont interagir avec les facteurs de transcription PLZF, GFI-1 ainsi que les corépresseurs HDAC-1 et HDAC-3 et mSin3A en absence de leur domaine MTG8-like par la technique de double-hybride dans les levures AH109.
- 3) Vérifier les interactions identifiées en '1' *in vivo*, dans les cellules hématopoïétiques (K562) par immuno-précipitation de protéines, suivie de Western-blots avec les anticorps appropriés.

Dans cette étude, nous ne nous limitons pas à savoir quelles protéines interagissent avec NPM-MLF1, nous voulons savoir également quelles parties de la protéine de fusion (NPM ou MLF1 ou encore MLF1-Like, constitué de l'acide aminé 94 à 157 de MLF1) interagissent avec ces corépresseurs. Tout cela en utilisant comme contrôle la protéine MTG8 qui est bien connue pour interagir avec ces corépresseurs.

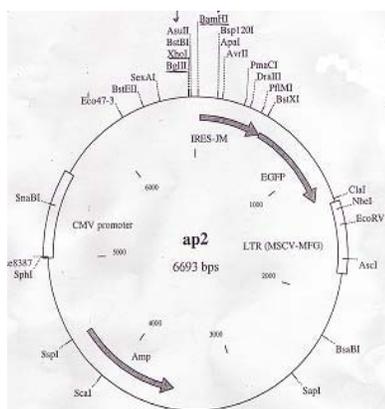
## **2. Matériel et méthodes**

## 2.1 Clonage

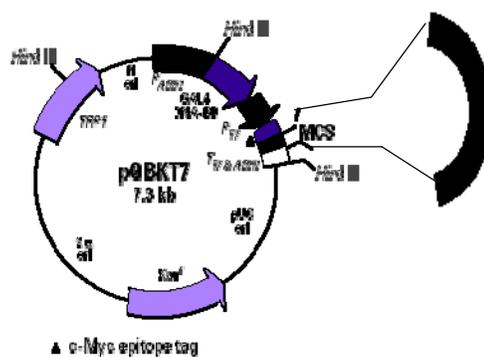
Le clonage est une technique de biologie moléculaire qui permet d'isoler un fragment d'ADN (Acide désoxyribonucléique) afin de le multiplier de façon identique en l'insérant dans une molécule d'ADN (bactérienne) appelée plasmide permettant son amplification. Dans notre cas, cette technique a été utilisée pour le clonage d'ADNc (ADN complémentaire) permettant la production de protéines nécessaires pour atteindre les objectifs du projet. Ainsi, plusieurs ADNc (*MLF1*, *MTG8* (*Runx1T1* ou *ETO*), *NPM-MLF1*, *NPM*, *MLF1-Like*, *GFI-1*, *PLZF*, *mSin3A*, *HDAC1*, *HDAC3*) ont été clonés dans différents plasmides (pGADT7, pGBKT7, pOZ-FH-N, Ap2).

Le matériel utilisé (tels que les ADNc et les plasmides) provient de différentes sources: *GFI-1*, *HDAC1*, *HDAC3*, *PLZF*, *MTG8* et *NPM* proviennent de la compagnie CEDARLANE® Laboratories Limited. L'ADNc de *MLF1* a été obtenu des cellules K562 après une extraction d'ARN et un PCR inverse à l'aide d'une transcriptase inverse (Ross, Julie). *NPM-MLF1* a été obtenu du laboratoire de Dr. Morris (St. Jude Children's Research hospital), *MLF1-Like* est un sous segment de *MLF1* (a.a. 94 à 157). *mSin3A* vient de la compagnie ATCC. Le plasmide pGBKT7 et pGADT7 ont été obtenus de la compagnie CLONTECH Laboratories Inc et pOZ-FH-N est un don du laboratoire de Dr. El Bachir Affar (Université de Montréal). Le plasmide Ap2 a été produit par Galipeau J (1999) (Université McGill).

Tous les ADNc utilisés pour le clonage ont été séquencés chez Génome Québec afin de voir s'il n'y a pas de mutations.

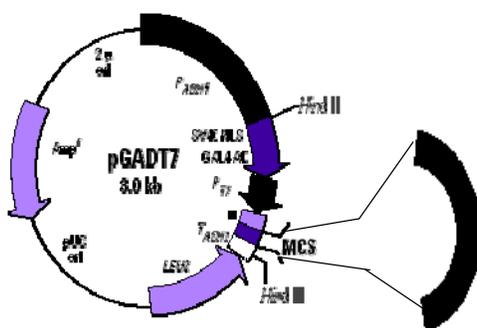


Galipeau J et al. 1999



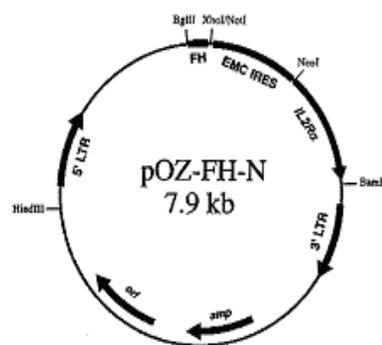
▲ c-Myc epitope tag

1999, CLONTECH Laboratories, Inc



■ HA epitope tag

1999, CLONTECH Laboratories, Inc

<http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&cmd=showvecinfo&vectorid=5988>

**Figure 13: caractéristiques des plasmides utilisés pour cloner les différents ADNc.**

**Tableau II : liste des plasmides et des ADNc qui ont été clonés dans chaque plasmide ainsi que les amorces utilisés pour les cloner.**

Nom du plasmide	ADNc à cloner	Amorces utilisées
pGADT7	GFI-1	5'-cgggatcccgatgccgegetcattt-3'
		3'-cgggagcctcatttgagcccatgct-5'
	PLZF	5'-ccggaattcatggatctgacaaaaatg-3'
		3'-gacacgatacacactcctaggcgc-5'
	mSin3A	5'-gccggatccgaatgaagcgactttg-3'
		3'-cctgtctcagagtaaggggtttgaactgt-5'
	HDAC1	5'-ccggaattcatggcgcagacgcag-3'
		3'-cagttcaaccggactcctaggcgc-5'
	HDAC3	5'-ccggaattcatggccaagaccgtg-3'
		3'-gctacacatctaaattcctagggcgc-3'
pGBKT7	MLF1	5'-gggaattcttttgttctttcacagatgagcc-3'
		3'-gggaattegccaccatgttcagcatgetgaa-5'
	MTG8 (Runx1T1)	5'-ccctgccagctacctgccc-3'
		3'-caggaaccgettcccgagagc-5'
	NPM-MLF1	5'-gggaattcttttgttctttcacagatgagcc-3'
		3'-ggggtaccgccaccatggaagattcgatg-3'
	NPM	5'-aaaactgcagccatggaagattcgatg-3'
		3'-aaactgcagggttaagagacttcctc-5'
MLF1-Like	5'-gggaattcggtaacttccagt-3'	
	3'ggaattcattgatctcctcca-5'	
POZ-FH-N	MLF1	5'-ggaccctcgagatgttcaggatgctg-3'
		3'-ggaattgcggccgcaaatgcatggc-5'
	MTG8 (Runx1T1)	5'-ggaccgctcgagatgctgatcgt-3'
		3'ggaaaagcggccgctatggtggaag-3'
	NPM-MLF1	5'-Ggaccgctcgagatggaagattcgatg-3'
		3'-ggaaaagcggccgcaaatgcatggc-5'
	MTG8-Like	5'ggaccgctcgagggtcaacttccagt3'
		3'-ggaaaagcggccgcttaattgatctcctcc-5'
AP2	GFI-1	5'-ctaggatctcatttgagcccatgctgc-3
		5'-gatagatctcggaccaccatgccgcg-3'

**Note :** toutes les amorces utilisées pour le clonage ont été choisies à partir du codon d'initiation ATG (méthionine) ou d'une séquence Kozak pour l'oligonucléotide 5'-3' et à partir du codon stop pour l'oligonucléotide 3'- 5. La séquence Kozak facilite la reconnaissance de l'ATG par le ribosome.

## 2.2 Réaction PCR

Lors du clonage, plusieurs amorces ont été produites pour chacun des ADNc à amplifier par PCR («Polymerase Chain Reaction») (tableau I). La réaction de PCR met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques de 50 μmoles fait par la compagnie Invitrogen. Chacune des amorces utilisées est spécifique au fragment d'ADN à amplifier. Lors du PCR, pour chaque ADNc une concentration de 100 ng a été utilisée. 1 μL de l'ADN polymérase (Pfu Turbo de la compagnie Promega) et 0,5 μL du mélange de quatre désoxy adénine tri-phosphates constitutifs de l'ADN (dNTP) ont été également utilisés. L'ADN a été amplifié par plusieurs cycles, chaque cycle se reproduit à trois températures différentes pour un temps distinct. Ainsi, 31 cycles d'amplification des ADNc ont été produits dans les conditions suivantes : 3 min à 95°C (dénaturation); 30 sec à 95°C, 30 sec à 60°C (température d'appariement des amorces) et 30 sec à 72°C; puis une élongation finale de 5 min à 72°C. Les produits de PCR ont été visualisés sur gel d'agarose 1 %.

### **2.3 Électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose**

L'agarose 1% a été dissout dans du TBE 1X (Tris 0,89 M, acide borique 0,89 M et 0,02 M d'EDTA). Ensuite, 0,5 μg/ml de bromure d'éthidium ont été ajouté à l'agarose dissout. Le bromure d'éthidium permet de visualiser l'ADN aux UV. Les échantillons ont été mis sur gel après avoir ajouté le tampon de chargement contenant l'orange G et du Ficoll à une concentration finale de 1X. La migration a été faite dans le tampon TBE 1X. La tension appliquée varie entre 60 et 100 volts. Un marqueur de poids moléculaire (55 ng/μL λPstIvDNA Ladder) a été utilisé lors de la migration des ADN sur le gel afin de connaître leur(s) poids moléculaire (PM).

**Tableau III : Liste des plasmides et des ADNc avec leurs sites de restriction enzymatique utilisés pour les clonages.**

<b>Nom du plasmide</b>	<b>ADNc à cloner</b>	<b>Sites d'enzymes dans le plasmide et les ADNc utilisés pour les clonages</b>
<b>pGADT7</b>	<b>GFI-1</b>	<b>BamHI</b>
	<b>PLZF</b>	<b>EcoRI/BamHI</b>
	<b>Sin3A</b>	<b>XhoI/BamHI</b>
	<b>HDAC1</b>	<b>EcoRI/BamHI</b>
	<b>HDAC3</b>	<b>EcoRI/BamHI</b>
<b>pGBKT7</b>	<b>MLF1</b>	<b>EcoRI</b>
	<b>MTG8 (Runx1T1)</b>	<b>NcoI</b>
	<b>NPM-MLF1</b>	<b>EcoRI/Sall</b>
	<b>NPM</b>	<b>PstI</b>
	<b>MLF1-Like</b>	<b>EcoRI</b>
<b>pOZ-FH-N</b>	<b>MLF1</b>	<b>XhoI/NotI</b>
	<b>MTG8 (Runx1T1)</b>	<b>XhoI/NotI</b>
	<b>NPM-MLF1</b>	<b>XhoI/NotI</b>
	<b>MLF1-Like</b>	<b>XhoI/NotI</b>
<b>Ap2</b>	<b>GFI</b>	<b>BamHI</b>

**Note : Les sites de restriction ont été insérés dans les ADNc à partir des amorces.**

## **2.4 Digestion de l'ADN**

Les ADNc amplifiés par PCR ont été digérés par des enzymes de restriction pour lesquelles ils possèdent un site de restriction (tableau III). Le plasmide dans

lequel l'ADNc doit être inséré est digéré par les mêmes enzymes de restriction que l'ADNc concerné (tableau III). Lors de la digestion, selon la quantité d'ADN à digérer, le tampon approprié à l'enzyme utilisée a été ajouté suivit de l'ajout du BSA au besoin. La digestion a été effectuée à 37°C durant une à deux heures, dépendamment de l'enzyme de restriction utilisée. Pour s'assurer que les différents types de plasmides ont été digérés, une vérification sur gel d'agarose 1 % a été effectuée.

### **2.5 Extraction d'ADN sur gel d'agarose**

Après la digestion, une électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose 0,7 % a été effectuée de la même façon que précédemment. Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN dans l'agarose est extrait et traité selon le protocole QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN.

### **2.6 Déphosphorylation**

Les plasmides digérés par deux enzymes de restriction différentes ont été déphosphorylés à l'aide d'une enzyme Alkaline phosphatase (de la compagnie Boehringer), de la même façon que précédemment, pendant une heure d'incubation. L'ADN a été précipité avec du 3 M NaAc pH 4,8 et de l'Éthanol 100 % afin d'enlever l'enzyme alkaline phosphatase.

### **2.7 Ligation de l'ADNc avec le plasmide.**

Dans un premier temps, il a fallu quantifier l'ADN sur gel d'agarose à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire ou d'un spectrophotomètre. Ensuite, chaque ADNc et chaque plasmide ont été mis en présence de 2 µL du tampon de ligation (de la compagnie NEB), de 1 µL de la ligase et d'eau distillée stérile pour un volume final de 20 µL. La réaction a été effectuée durant une nuit à 16 °C.

### **2.8 Transformation bactérienne.**

Durant la transformation des bactéries, les manipulations ont été réalisées stérilement près d'un bec Bunsen allumé.

Dans un tube contenant 100µL de bactéries d'*Escherichia coli* compétentes préalablement préparées, un volume de 10 µL de produit de ligation a été ajouté. Le tout a été incubé 20 minutes dans la glace. Les bactéries ont été agitées délicatement et transférées dans un bain-marie à 37°C pendant 3 minutes. Ensuite, elles ont été transférées 10 minutes dans la glace. Après cette incubation, 1 ml de milieu liquide Luria Broth (LB) a été ajouté aux échantillons et ils ont transférés à 37°C durant 60 minutes. Les bactéries transformées ont été centrifugées 30 s à 10000 rpm et le culot a été suspendu dans 100 µL de LB. Cet échantillon de bactéries a été mis sur petri contenant l'antibiotique (Kanamycine ou ampicilline) pour lequel le plasmide transfecté possède une cassette de résistance.

## **2.9 Sélection des clones ou des plasmides qui portent un insert.**

Deux méthodes ont été utilisées pour faire le criblage des clones: par digestion enzymatique dans le (s) site (s) de clonage (Tableau II) et par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour chaque ADNc. Pour les deux types de criblage, il a fallu extraire l'ADN des bactéries par une technique appelée MINI-prep (QIAGEN - QIAprep Spin Miniprep Kit) ou Maxi-prep (QIAGEN Maxi-Prep kit). Pour faire le MINI-prep, une colonie de bactérie a été incubée toute la nuit dans 2 mL de LB à 37°C. 1 mL de cette culture a été centrifugé dans un tube "Eppendorf" 60 secondes à 13000 rpm. Le surnageant a été enlevé et le culot dissout dans un volume final de 450µL de maxi 1X, NaOH/SDS et d'acétate de sodium 3M (3M NaAc). Ensuite, une extraction phénol/chloroforme a été réalisée suivit d'une centrifugation de 5 minutes à 13000 rpm. Au surnageant, de l'isopropanol a été ajouté s'en est suivit une centrifugation de 10 min à 13000 rpm. Le culot contenant l'ADN a été dissout dans 25µL d'eau distillée. Après la quantification de l'ADN, la digestion enzymatique et la réaction de PCR ont été réalisées selon la méthode décrite précédemment. Les

produits de PCR et de la digestion enzymatique ont été visualisés sur gel d'agarose 1 %. La présence des clones a été détectée après l'analyse du gel.

### **2.10 Séquençage et analyse de séquençage.**

Les clones obtenus ont été séquencés par la compagnie Génome Québec à l'aide des amorces universelles (T7, ADH1 et POZ-TBU2) qui se trouvent dans chaque plasmide utilisé pour le clonage. Dans le cas des ADNc qui ont plus que 1200 pb des amorces internes ont été construites afin d'avoir la séquence complète. Les séquences obtenues ont été analysées afin de voir s'il y a des mutations.

### **2.11 La mutagenèse dirigée**

Lors de l'analyse de séquençage des clones (MLF1-Like, MLF1 et NPM-MLF1) la mutation d'une paire de base a été retrouvée. Pour renverser cette mutation afin de ne pas modifier la protéine, nous avons utilisé la technique de mutagenèse dirigée. Ce procédé permet de remplacer une base ou un petit bout d'ADN par une autre en utilisant des oligonucléotides synthétiques qui doivent avoir la mutation désirée. La paire d'oligonucléotides doit posséder la même température d'appariement pour chaque brin d'ADN opposé. Ils doivent contenir entre 25 et 45 bases. La mutation souhaitée doit être au centre de l'oligonucléotide et doit renfermer 10 à 15 bases de chaque côté de la mutation. Les oligonucléotides nécessitent également un contenu en GC de 40 % et se terminent par au moins une base G ou C. Tous les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée sont présentés au Tableau IV.

**Tableau IV : les oligonucléotides utilisés pour les mutagenèses dirigées et le nom d'ADNc pour lequel elles ont été synthétisées.**

Nom de l'ADNc	Oligonucléotides pour remplacement de deux	Position
---------------	--	----------

	<b>bases</b>	<b>relative</b>
<b>MLF1</b>	5'-ctcgggagccaggattctcatggccaac-3'	640 et 750 pb
	3'-gttggccatgagaatcctggctcctggctcccag-5'	640 et 750 pb
<b>MLF1-Like</b>	5'-ctcgggagccaggattctcatggccaac-3'	640 et 750 pb
	3'-gttggccatgagaatcctggctcctggctcccag-5'	640 et 750 pb
<b>NPM-MLF1</b>	5'-ccaggagttcatcaatatgaatgaaagtgatgctcatgc-3'	640 pb
	3'-gcatgagcatcactttcattcatattgatgaactcctgg-5'	640 pb
<b>Délétion de 14 a.a qui constitue le domaine MTG8-Like.</b>		
<b>Nom de l'ADNc</b>	<b>Oligonucléotides pour la délétion du domaine MTG8 (12 a.a.)</b>	<b>Position relative</b>
<b>MLF1</b>	5'-gcaatgagagattctgacagtgtcatgtcattaaaagtc-3'	550 pb
	3'-gacttttaatgacatggcactgtcagaatctctctcattgc-5'	550 pb
<b>MTG8 (RUNX1T1)</b>	5'ccacctcagcattaccgttctctatcgacacccccagccac-3'	900 pb
	3'-gtggctgggggtgctgataggaacggtaatgctgaggtgg-3'	900 pb
<b>NPM-MLF1</b>	5'-gcaatgagagattctgacagtgtcatgtcattaaaagtc-5'	550 pb
	3'-gacttttaatgacatggcactgtcagaatctctctcattgc-5'	550 pb

La mutagenèse dirigée a été réalisée tel que mentionné dans le guide QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit vendu chez Stratagene®. Après avoir suivi toutes les procédures du protocole, 1 µL du produit de PCR de la mutagenèse dirigée a été utilisé pour transformer des bactéries DH10β. Après la transformation, des Mini-prep et Maxi-prep ont été effectués afin d'extraire l'ADN et de le séquencer pour vérifier si les mutations ont été renversées.

### **2.11.1 Mutagenèse dirigée pour délaier les 12 a.a. qui constituent le domaine MTG8-Like dans MLF1, MTG8 et NPM-MLF1.**

Le même protocole a été suivi pour faire la délétion de 12 acides aminés qu'on nomme MTG8-Like qui se trouvent dans MLF1, MTG8 et NPM-MLF1. Cette délétion permettra de vérifier notre hypothèse et de réaliser le second objectif du projet. Tout comme précédemment, pour faire la mutagenèse dirigée, des bactéries DH10β ont été transformées et les mutants ont été sélectionnés par extraction de

l'ADN plasmidique, digestion enzymatique, PCR et séquençage. Les amorces utilisées pour cette délétion se trouvent dans le tableau IV.

## **2.12 Le principe du double-hybride.**

Cette technique permet de mettre en évidence les partenaires d'interactions d'une protéine *in vivo* dans la levure. Car, l'étude de la fonction d'une protéine implique souvent de connaître les partenaires d'interactions. Cette méthode exploite le fait que le domaine GAL4-DNA-BD (dans le vecteur pGBKT7) ne peut fonctionner comme un activateur transcriptionnel sans sa liaison physique à un domaine d'activation AD-GAL4 (dans le vecteur pGADT7). Pour vérifier l'activation de ces domaines impliquant des interactions protéiques, nous avons utilisé la souche de levure AH109 qui possède quatre gènes rapporteurs tels que HIS3, ADE2, MEL1, lacZ ainsi qu'un domaine GAL1-UASs et un GAL1 TATA « boîte ». Lorsque le domaine AD-GAL4 est activé suite à une interaction protéine/protéine, ces gènes rapporteurs vont être exprimés chez la levure et permettre d'identifier l'interaction des clones positifs par un test avec le  $\beta$ -galactosidase (gène LacZ) ou  $\alpha$ -galactosidase (gène MEL1). Ainsi que d'autres milieux de culture tels que YPD/-Leu/-Trp/-His et YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade pour le gène HIS3 et ADE2. Pour nos travaux, les vecteurs pGADT7, pGBKT7 et la souche AH109 ont été utilisés pour éviter d'avoir trop de faux positifs, selon la compagnie Clontech qui les a développés.

### **2.12.1 La technique du double hybride.**

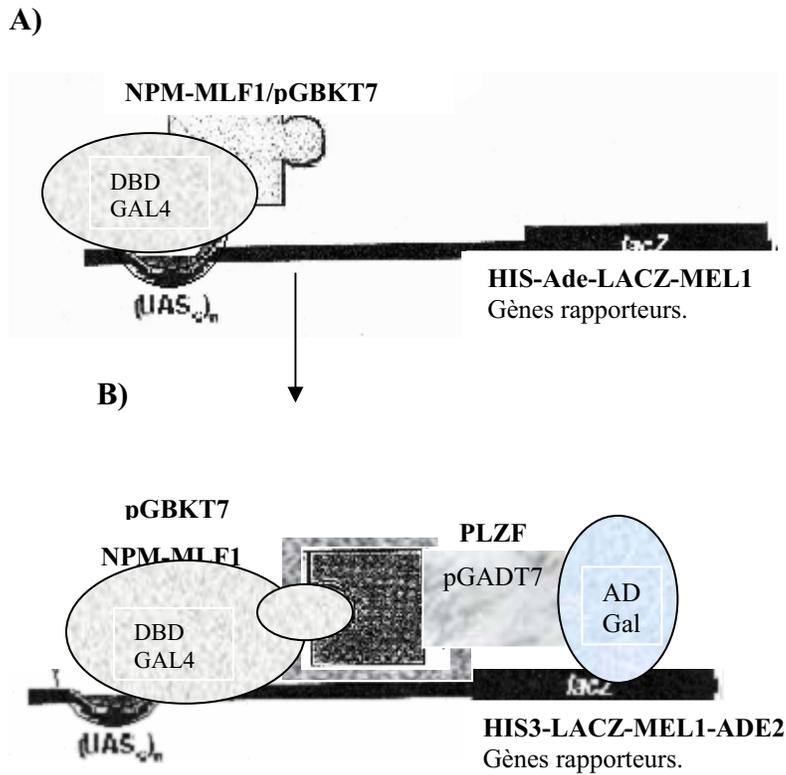
Les expériences ont été réalisées de façon stérile. Chaque incubation a été effectuée à 30°C dans un incubateur en mouvement à 250 rpm. Pour faire le double-hybride, les clones sauvages dans pGBKT7 tels que MLF1, MTG8, NPM-MLF1, NPM, MTG8-Like ainsi que les clones dans pGBKT7 qui portent la délétion de (12 a.a.) tels que MLF1, MTG8, NPM-MLF1 ont été utilisés en premier lieu. En second lieu, les ADNc dans pGADT7 tels que mSin3a, GFI, PLZF, HDAC1 et HDAC3 ont été utilisés afin de transférer une seconde fois les échantillons de levures contenant

les clones pGBKT7 pour être en mesure de détecter des interactions protéine/protéine entre les clones de pGBKT7 et les clones de pGADT7.

### **2.12.2 Préparation et transfection de la souche de levure AH109.**

Sur un petri « yeast extract peptone dextrose and Adenine » (YPDA), l'échantillon de levure AH109 sauvage a été cultivé à 30°C pendant 4 jours afin d'obtenir des colonies isolées. Une colonie de levures a été prélevée du petri et mise en culture une nuit à 30°C dans 2 mL d'YPD. Un volume de 0,5 mL de cette culture a été prélevé et cultivé pendant 3 à 4 heures dans un volume final de 5 mL d'YPD à 30°C. Les 5 mL de culture ont été centrifugés 5 min à 13000 rpm à la température de la pièce (TP), suivi d'un lavage avec de l'eau distillée stérile. Le culot a été dissout dans 1 mL de TE/LiAc. Un volume de 50 µL de cette préparation a été utilisé pour transférer 1 µg ADN plasmidique (par exemple, pGBKT7 contenant NPM-MLF1) plus 5 µL de d'ADN de sperme de saumon (SSDNA). L'échantillon a été incubé 1 heure (h) à 30°C après avoir ajouté 300 µL de PEG/LiAc. Un choc-thermique à 42°C a été effectué durant 15 min suivi d'une incubation de 2 min dans la glace. La levure transfectée a été centrifugée pendant 1 min à 10000 rpm à TP et le culot a été dissout dans de l'eau distillée stérile. L'échantillon de levures a été cultivé sur petri YPD/-Trp. Ainsi, les levures qui portent ce plasmide devraient croître sur ce petri qui a été incubé à 30°C pendant 4 jours. Car le plasmide pGKBT7 avec lequel la levure a été transfectée possède un gène de sélection TRP1.

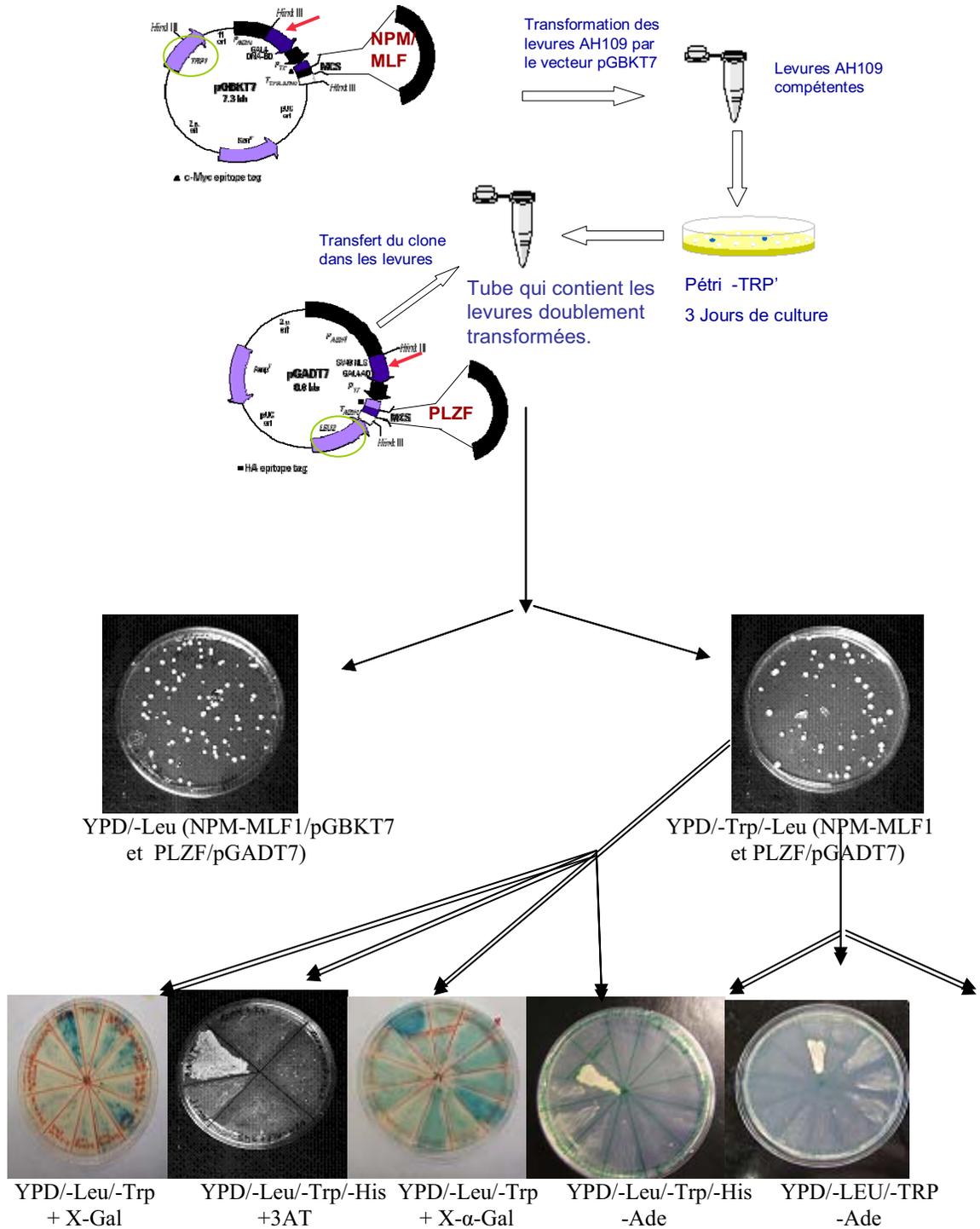
La seconde étape du double hybride consiste à transférer la levure qui contient le plasmide pGBKT7 (avec NPM-MLF1) par un second plasmide qu'on appelle pGADT7 (avec PLZF) qui contient un domaine AD-GAL4 et un gène de sélection LEU2. La transfection des levures avec le second plasmide a été effectuée de la même façon que le premier sauf qu'un petri YPD/-Leu/-Trp a été utilisé afin de sélectionner les colonies de levures qui portent les deux plasmides. Après cette étape, nous avons obtenu des levures qui contiennent deux vecteurs (Figure 15).



**Figure 14: mécanisme moléculaire qui se produit dans la levure après la première et la seconde étape de transfection lors du double-hybride.**

Dans ce schéma en (A), le domaine GAL4-DNA-BD se lie au domaine GAL1-UAS de la levure. En (B) Par exemple, lors de l'interaction de NPM-MLF1 avec PLZF, le domaine AD-GAL4 va se lier au promoteur des gènes rapporteurs pour les activer. Les levures doivent être cultivées sur différents milieux de sélection (figure15) afin de vérifier l'expression des gènes rapporteurs et de savoir s'il y a des interactions protéine/protéine.

## “Two Hybrid”( Methodologies)



**Figure 15: schéma de criblage sur des petri contenant différents milieux YPD afin de vérifier des interactions protéine/protéine après une double transfection de la souche de levure AH109 avec différents clones dans pGBKT7 et pGADT7.**

Au cours de l'expérience, un contrôle positif p53/Large T a été utilisé, car il reconnu scientifiquement que p53 interagit avec Large T (Li and Fields, 1993; Iwabuchi et al., 1993). Aussi, un contrôle négatif Lamine et l'antigène Large T de SV40 ont été utilisés, car la protéine Lamine n'interagit pas avec la protéine Large T (Bertel et al., 1993b; S. Fields, pers. Comm.; Ye and Worman, 1995). D'autres contrôles négatifs ont été testés pour être sûr que les interactions observées proviennent réellement des échantillons de levure doublement transformées qui expriment les protéines.

Selon le schéma de la figure 15 à partir du petri YPD/-Leu/-Trp une colonie de levure doublement transfectée a été utilisée pour faire un criblage sur plusieurs petri avec différents milieux YPD/ (-Leu/-Trp, -Leu/-Trp-His+3AT, -Leu/-Trp/-His/-Ade, -Leu/-Trp + X-Gal, -Leu/-Trp+ X- $\alpha$ -Gal) afin de vérifier l'expression des gènes rapporteurs LEU2, TRP1, HIS3, lacZ, MEL1 et ADE2 et d'en déduire s'il y a des interactions protéine/protéine ou non.

Par exemple, pour conclure que NPM-MLF1 interagit avec PLZF, premièrement, il a fallu vérifier que LacZ est exprimé, l'échantillon de levure contenant NPM-MLF1 et PLZF a été cultivé sur un petri YPD/-Leu/-Trp/+ X-Gal. Le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) est un substrat chromogène inerte pour la Beta-galactosidase, une enzyme qui favorise l'utilisation de lactose. La Beta-galactosidase hydrolyse X-Gal en galactose (réaction incolore) et en 4-chloro-3-brom-indigo qui forme un précipité bleu intense. Ainsi, l'induction du gène LacZ avec l'isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) mène à l'hydrolyse de X-Gal et au développement des colonies bleues sur petri YPD/-Leu/-Trp/+ X-Gal. Par la suite, ce même échantillon de levure a été cultivé sur petri YPD/-leu/-Trp/+ X- $\alpha$ -Gal afin de détecter l'expression du gène MEL1. En effet, X- $\alpha$ -Gal est utilisé

comme substrat pour B-galactosidase et c'est une méthode calorimétrique sensible pour la détection et la quantification de l'activité d'alpha-galactosidase qui résulte de l'expression du gène MEL1. MEL1 est un membre de la famille des gènes GAL4. Il produit l'alpha-Galactosidase qui est activement exprimé et sécrété dans l'espace périplasmique (BioTeach Journal, 2003). Tout comme LacZ, si MEL1 est exprimé il y aura des colonies de couleurs bleues sur petri  $/-leu/-Trp/+ X-\alpha-Gal$ .

Entre autres, pour vérifier l'expression du gène HIS3 l'échantillon de levure a été cultivé sur petri YPD/ $-Leu/-Trp/-His + 3AT$ . Le 3-amino-1-2-4-triazole (3AT) est un inhibiteur compétitif de la protéine HIS3. C'est-à-dire qu'il est utilisé pour inhiber une faible expression de HIS3 et pour éliminer les faux positifs sur milieu YPD/ $-His$  (Fields, 1993; Durfee et al., 1993).

Lors de ce criblage durant le double-hybride, le milieu le plus astringent utilisé est le milieu sans Ade. Il n'y a que les échantillons de levure qui portent des interactions protéine/protéine fortes qui pourrait croître sur ce milieu. Pour détecter la présence de ce gène, les levures ont été cultivées sur petri YPD/ $-Leu/-Trp/-His/-Ade$ .

En somme, dans ce système il y a interactions protéine/protéine lorsqu'un échantillon de levure doublement transformé est capable de croître sur petri YPD/ $-Leu/-Trp/-His/-Ade$  et YPD/ $-leu/-Trp/+ X-Gal$  et X- $\alpha$ -Gal.

### **2.13 Vérification de l'expression des protéines cible.**

Lors du double hybride, avant le criblage sur différents milieux YPD, après chaque étape de transformation, il a fallu vérifier l'expression des protéines cibles tels que NPM, MTG8, NPM-MLF1, MLF1-Like et MLF1 dans un premier temps. En second lieu, il fallait vérifier l'expression de GFI-1, mSin3A, PLZF, HDAC1 et HDAC3 par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps appropriés.

Le Western-blot est une méthode utilisée pour repérer une protéine spécifique dans un échantillon donné. Grâce à cette technique, il est possible de détecter la présence d'une protéine, d'évaluer sa taille et sa concentration. Pour ce procédé, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est indispensable. Elle permet de séparer les protéines préalablement dénaturées selon leur masse. Les protéines sont ensuite

transférées du gel à une membrane de nitrocellulose, où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt.

### **2.13.1 Extractions de protéines des levures.**

Pour faire le western-blot, il fallait extraire les protéines à partir de différents échantillons de levures qui contiennent le plasmide pGBKT7 avec l'ADNc *NPM*, *MTG8*, *NPM-MLF1*, *MLF1-Like* et *MLF1* ainsi que le plasmide pGADT7 avec l'ADNc de *GFI-1*, *Sin3A*, *PLZF*, *HDAC1* et *HDAC3*. Pour extraire les protéines, par exemple, une colonie de levures contenant *NPM/GFI* a été prélevée sur un petri YPD/-Leu/-Trp. Cette colonie a été cultivée dans 10 mL de milieu liquide YPD/-Leu/-Trp durant une nuit à 30°C dans un incubateur qui bouge à 250 rpm. Le lendemain, l'échantillon a été centrifugé 5 min à 13000 rpm à TP suivit de deux lavage avec de l'eau distillée. Le culot de levure a été dissout dans un tampon contenant du PMSF 1mM, DTT50 mM, TRIS-HCL 500mM, NaCl 50mM et du glycérol, du DTT 50mM et inhibiteur de potéase 1X. Ensuite, dans un tube d'ependoff contenant des billes de verre « beads », la suspension de levures a été ajoutée. À l'aide d'un appareil appelé « Bead-beater », les billes de verre ont été en mesure de briser la membrane des levures et de laisser écharper les protéines. L'échantillon a été centrifugé et le surnageant contenant les protéines a été récupéré. Ensuite, un dosage des protéines a été réalisé pour chaque échantillon par la méthode de Bradford. Le même protocole a été suivi pour extraire les protéines pour les autres échantillons contenant *MTG8*, *NPM-MLF*, *MTG8-Like* et *MLF1* ainsi que *Sin3A*, *PLZF*, *HDAC1* et *HDAC3*. Pour chaque type de protéine, l'extraction a été réalisée en duplicata.

### **2.13.2 Le Western-blot.**

Les extraits protéiques (80 et 100 µg) ont été soumis à une séparation selon leur taille sur un gel SDS-polyacrylamide 10 % ou 13 % avec le système Mini Protean II. Ensuite, pour être en mesure de détecter les protéines par un anticorps qui

les reconnaît spécifiquement, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Ce transfert a été réalisé en plaçant la membrane face-à-face avec le gel dans un support solide, suivi de l'application d'un courant électrique dans un tampon de transfère (Tris-glycine (TG), méthanol et SDS). Les protéines chargées migrent du gel à la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel.

Après le transfert, des précautions ont été prises pour diminuer les interactions entre la membrane et l'anticorps. Ainsi, avant de mettre l'anticorps primaire, les sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps ont été bloqués en incubant celle-ci dans du lait 5 % (5 g pour 100 mL de TBS 1X) pendant une heure à température ambiante. Après le blocage, un anticorps primaire voir tableau V (selon l'anticorps, 0,5 et 5 microgrammes/ml) a été dilué dans 1 % de lait, TBS 1X et Tween 0,05 %. La membrane et la solution d'anticorps ont été scellées dans un sachet en plastique et incubées une nuit à 4°C sous agitation modérée.

Après l'incubation, la membrane a été rincée afin d'éliminer les anticorps primaires non liés. Celle-ci a été ensuite exposée à un anticorps secondaire dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est généralement lié à la biotine ou à une enzyme qui permet l'identification visuelle de la protéine étudiée sur la membrane.

Après les rinçages qui permettent d'enlever l'anticorps secondaire non-lié, il a été possible de détecter les protéines d'intérêts par chemiluminescence à l'aide d'un substrat qui émet de la lumière suite à l'exposition au déclencheur présent sur l'anticorps secondaire. Cette enzyme est la HorseRadish Peroxidase (HRP) qui est liée de manière covalente à l'anticorps secondaire. Pour chacun des Western-blot, la taille des protéines a été mesurée en comparant les bandes marquées à celles des marqueurs de la gamme étalon chargées durant l'électrophorèse dans un puits à part. Aussi, des contrôles positifs et négatifs de l'anticorps ont été utilisés afin d'analyser les résultats avec plus de précision.

**Tableau V : liste des protéines étudiées et les anticorps primaires et secondaires utilisés pour leur détection.**

Protéine détectée par l'anticorps.	Anticorps primaire	caractéristiques	Compagnie	Anticorps secondaire	caractéristiques	Compagnie
GFI-1	Anti-GFI-1	Provient de la chèvre	Santa-Cruz	Anti-chèvre	Fait dans le lapin contre la chèvre.	Sigma
PLZF	Anti-PLZF	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
mSin3A	Anti-Sin3A	Provient du lapin	Santa-Cruz	Anti-lapin	Fait dans la chèvre contre le lapin	Sigma
HDAC1	Anti-HDAC1	Provient du lapin	Upstate	Anti-lapin	Fait dans la chèvre contre le lapin	Sigma
HDAC3	Anti-HDAC3	Provient du lapin	Biolegend	Anti-lapin	Fait dans la chèvre contre le lapin	Sigma
NPM	Anti-NPM B23	Provient de la souris	Zymed	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
MTG8 (Runx1T1)	Ant-Myc Épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
MLF1	Ant-Myc Épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
MTG8-Like	Ant-Myc Épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
NPM-MLF	Ant-Myc Épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
P53	Ant-Myc Épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
Lamine	Ant-Myc Épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
Large T	Anti-HA épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
Apn1	Ant-Myc Épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
NPM-	Ant-Myc	Provient de la	Santa-Cruz	Anti-	Fait dans la	Chemicon

MLF-O.E	Épitote	souris		souris	chèvre contre la souris	
MLF-O-E	Ant-Myc Épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
MTG8-O-E	Ant-Myc Épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
GFI-1 PLZF mSin3A HDAC1	Anti-HA épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon
NPM MTG8- Like NPM-MLF	Ant-Myc Épitote	Provient de la souris	Santa-Cruz	Anti-souris	Fait dans la chèvre contre la souris	Chemicon

Après avoir utilisé la méthode du double hybride pour vérifier des interactions protéine/protéine une autre technique a été utilisée pour confirmer les interactions trouvées. Par conséquent nous avons utilisé des cellules mammifères de la lignée érythroleucémique K562 afin de faire des immunoprécipitations (IP) des protéines endogènes ou les protéines surexprimées par la technique d'immunobuvardage Western avec des anticorps appropriés.

#### 2.14 Immunoprécipitation (IP).

L'immunoprécipitation est une technique qui permet d'enlever ou de purifier une protéine spécifique dans une solution à l'aide d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement cette protéine. Les complexes anticorps-protéines sont précipités par l'addition d'une protéine insoluble telle que la protéine A, la protéine G, le Zysorbin, l'Immunoprecipitin, ou l'addition d'un deuxième anticorps à la solution. Cette technique permet de réaliser plusieurs choses, dans notre cas, elle a été utilisée pour évaluer des interactions de protéine/protéine. La méthode d'immunoprécipitation peut être divisée en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, nous avons infecté les cellules K562 avec les clones MLF1, MTG8, NPM-MLF1, MTG8-Like qui se trouvent dans le plasmide pOZ-FH-

N afin de surexprimer ces protéines dans les cellules. Le plasmide pOZ-FH-N utilisé pour cloner les ADNc contient spécifiquement un récepteur IL-2 qui permet de sélectionner les cellules infectées. En effet, les cellules qui ont intégré le plasmide vont exprimer ce récepteur à leur surface.

#### **2.14.1 Transfection des cellules K562 à l'aide des cellules Phoenix A.**

Les cellules K562 sont des cellules leucémiques humaines qui se différencient en cellules érythroïdes. La lignée cellulaire K562 est composée de cellules non-différenciées (blast) qui sont riche en glycophorine. Elles peuvent être impliquées dans la production d'hémoglobine foetale et embryonnaire. Les cellules K562 ont presque 1,5 fois le nombre normal de chromosomes. Elles ont un avantage de croissance. Cet avantage de croissance n'est pas dû à une prolifération rapide des cellules, car ces cellules se divisent habituellement plus lentement que les cellules normales. Les cellules K562 s'accumulent en raison de leur incapacité de maturation en cellules fonctionnelles non divisées. Il y a différentes lignées de K562 et ces diverses lignées peuvent avoir différentes propriétés.

Les cellules erythroleucémiques K562 ont été transfectées par lipofection avec un vecteur d'expression plasmidique pOZ-FH-N (figure 13) contenant séparément l'ADNc de NPM-MLF1, MTG8, MLF1, MLF1-Like. L'infection des cellules K562 a été réalisée en deux étapes: en premier lieux, des cellules phoenix A ont été infectées séparément avec le plasmide (pOZ-FH-N) contenant séparément l'ADNc de NPM-MLF1, MTG8, MLF1 MLF1-Like ainsi que deux autres vecteurs retro-viraux (pRetro-GAG et pRetro-ENV) afin de permettre la production de virions. À l'aide de ces virions, les cellules K562 vont être infectées afin d'intégrer l'ADN de pOZ-FH-N/NPM-MLF1, MTG8, MLF1, MLF1-Like contenir dans les virus; de ce fait, les cellules K562 vont être en mesure de produire ces protéines afin de réaliser des IP.

#### **2.14.2 Principes de transfert de l'ADN à l'intérieur d'une cellule à l'aide des virions.**

L'utilisation des virus est une façon très efficace pour introduire du matériel génétique dans une cellule. Les vecteurs viraux construits pour transférer les cellules sont principalement des adénovirus et des rétrovirus recombinants. Dans notre étude, les vecteurs viraux utilisés sont pRETRO-GAG et pRETRO-ENV. Ces vecteurs viraux ont été développés en délétant une partie du génome essentiel à la réplication virale qui est remplacée par la cassette d'expression du gène d'intérêt avec son promoteur. Ces gènes délétés qui sont nécessaires à la production de particules virales sont amenés dans la lignée cellulaire d'encapsulation par un second vecteur. L'utilisation de deux plasmides (pRETRO-GAG et pRETRO-ENV) pour introduire les séquences nucléotidiques virales permet d'éviter la recombinaison des séquences et la production de virus recombinants infectieux. Les cellules Phoenix d'encapsulation permettent la production de virus recombinants qui ne se propagent pas en dehors des cellules cibles K562 qu'ils atteignent. Ces dernières, en effet, ne possèdent pas le complément viral génomique nécessaire à la formation de nouvelles particules virales.

### **L'infection des cellules cible k562 se fait en plusieurs étapes :**

Étape 1 : production des virions :Étape 2 : infection des K562Étape 3 : sélection des cellules K562 infectées.

#### **Étape 1 :**

Les cellules phoenix A ont été cultivées pendant une journée dans du DMEM, 10 % FBS, pénicilline/streptomycine afin d'obtenir  $6 \times 10^6$  cellules par petri de 100 mm. Le lendemain, elles ont été lavées par la suite dans du PBS 1X pour enlever celles qui sont mortes. Ensuite, ces cellules ont été incubées dans le milieu culture DMEM, 10 % FBS, pénicilline/streptomycine pendant 5 heures. Un mélange de 7,5 µg du plasmide pERTRO-GAG et 7,5 µg pRETRO-ENV plus 15 µg du plasmide pOZ-FH-N contenant le (s) gène (s) d'intérêt ont été ajoutés dans 1,5 mL de HBS 2X. Après une incubation de 15 min, ce mélange d'ADN a été transféré dans les cellules phoenix A. Les cellules ont été incubées dans du DMEM, 10 % FBS,

peniciline/streptomycine une journée et le lendemain le milieu a été remplacé. Trois jours après la transfection des phoenix A il y a eu production de virions.

### **2.14.3 Infection des cellules K562**

Après l'incubation de 20 min des phoenix A dans le polybrene, leur surnageant qui contient les virions a été filtré et ajouté à  $2 \times 10^6$  cellules K562. Après cette étape, les cellules phoenix A ont été conservées en culture toute une nuit. Les cellules K562 aussi ont été mises en culture toute une nuit, après une centrifugation de 90 min à 2200 rpm à TP pièce. Le lendemain, les cellules K562 ont été réinfectées de la même façon que précédemment en utilisant les cellules phoenix A qui ont été incubées la veille. Suite à la deuxième infection, les cellules K562 ont été mises en culture dans du RPMI 1640, 10 % FBS, peniciline/streptomycine et le milieu a été changé à tous les deux jours jusqu'à ce qu'on atteigne le nombre de cellules nécessaire (20 millions) pour faire la sélection des cellules infectées en utilisant des billes magnétiques couplées avec un anticorps qui reconnaît le récepteur IL-2.

### **2.14.4 Sélection des cellules K562 qui contiennent le gène d'intérêt dans le plasmide pOZ-FH-N.**

Toutes les cellules qui contiennent ce plasmide (pOZ-FH-N) expriment le récepteur IL-2 à leur surface. Donc, à l'aide d'un anticorps couplé avec des billes magnétiques, un tri-cellulaire peut être effectué. Pour ce faire, les cellules K562 ont été centrifugées à 13000 rpm à TP pièce. Le culot a été dissout dans 5 mL de RPMI 1640, 10 % FBS, peniciline/streptomycine. Un volume de 10  $\mu$ L de billes couplées avec l'anticorps contre le récepteur IL-2 a été ajouté aux cellules. Ensuite les cellules ont été incubées pendant 2 à 3 heures à 37°C et à chaque 15 min les échantillons ont été mélangés par inversion. À l'aide d'un aimant les cellules couplées aux billes magnétiques ont été récupérées et cultivées dans un milieu de culture RPMI 1640, 10 % FBS, peniciline/streptomycine jusqu'à l'obtention de 15 à 25 million cellules.

Cette purification avec les billes magnétiques a été effectuée deux autres fois de la même manière.

#### **2.14.5 Extraction des protéines des cellules K562.**

Les cellules ont été cultivées après avoir sélectionné au moins 95 % de celles-ci qui portent le plasmide qui contient le gène d'intérêt. Cette culture cellulaire permet de faire une extraction protéique pour être en mesure de voir leur niveau d'expression en utilisant la technique d'immuno-buvardage de type Western.

Pour extraire les protéines des cellules K562,  $2 \times 10^6$  cellules ont été diluées dans du NaCl 0,9 % et 1mM de PMSF. Ces cellules ont été incubées sur glace et soniquées 3 à 5 sec. L'échantillon a été ensuite centrifugé 2 min à 4°C à une vitesse de 1300 rpm. Après la centrifugation, le surnageant a été récupéré et 1  $\mu$ L a été utilisé pour faire un dosage des protéines selon la méthode de Bradford. 50 à 80  $\mu$ g de protéine ont été mises sur gel polyacrylamide afin de faire l'immuno-buvardage de type Western.

Une fois que l'expression des protéines cibles a été vérifiée, une IP a été effectuée de la façon suivante.

#### **2.15 Immunoprécipitation.**

Vu que le niveau d'expression des protéines est connu, il a été possible d'effectuer un IP. Dans un premier temps, les cellules ont été centrifugées à TP pièce à 1300 rpm pendant 5 min et le culot a été récupéré pour être ensuite lavé avec PBS froid 1X et centrifugé à 1300 rpm pendant 5 min à 4°C afin d'enlever complètement le milieu de culture. Le culot de cellule a été dissout dans du tampon de lyse (Tris-HCl 1 mM pH 7,5, glycérol 10 %, KCl 1M, EDTA 2 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub>, NP-40 0,1 %, PMSF 1mM et l'inhibiteur de protéase). Après l'ajout de ce tampon, les cellules ont été soniquées 2 fois 15 sec et l'échantillon a été incubé à 4°C pendant 30 min. Le lysat cellulaire obtenu a été centrifugé durant 15 min à 4°C à 1400 rpm. Le

surnageant a été récupéré en le gardant sur la glace afin de doser les protéines. Ensuite, 15  $\mu$ L de bille flag-HA-agarose a été ajouté à 1 ou 2 mg de protéines. Le mélange a été incubé à 4°C en l'agitant faiblement durant une nuit. Finalement, l'échantillon a été lavé dans du tampon de lyse. Suite aux lavages, le culot qui contient le complexe protéine/anticorps-bille agarose a été bouillit 5 min dans le tampon de chargement 1X (Tris 50  $\mu$ M, HCl pH 6.8, 2 % SDS, Glycérol 10 % et bleu de Bromophénol) afin de dissocier le complexe et de dénaturer les protéines pour être en mesure de réaliser un buvardage Western. Un volume de 30  $\mu$ L du produit de l'IP a été mis sur gel afin de faire le buvardage Western. Pour détecter les interactions protéine/protéine un anticorps spécifique des protéines d'intérêt a été utilisé.

### **2.15.1 Les IP inverses**

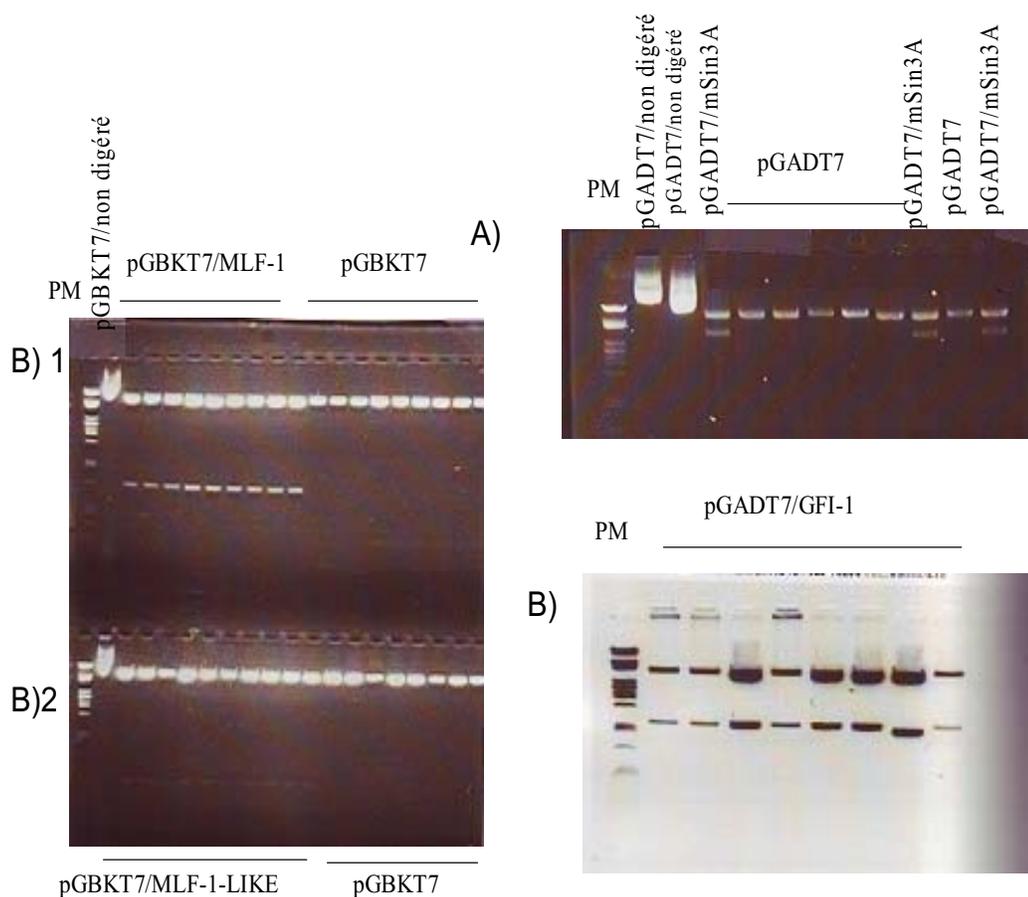
Aussi, des IP inverses ont été réalisées pour vérifier si nous obtenons les mêmes résultats que pour les IP effectués avec l'anti-FLAG-HA. Les IP faites avec l'anti-FLAG-HA permettent d'aller chercher le complexe formé par la protéine qui porte l'anti-FLAG-HA. Par la suite, avec un anticorps anti-HA et d'autres anticorps des protéines cibles qui nous intéressent, il nous a été possible de détecter quelles protéines interagissent avec notre protéine d'intérêt qui porte le FLAG-HA. Pour l'IP inverse c'est le contraire, car pour savoir que HDAC3 interagit avec MTG8 il faut d'abord former le complexe HDAC3 anticorps en utilisant un anti-HDAC3 avec un échantillon protéique qui contient HDAC3 et MTG8. Ensuite, le complexe HDAC3 va se lier à la protéine MTG8 afin de former le complexe anticorps-HDAC3-MTG8. Pour réaliser cet IP inverse, 15  $\mu$ L de beads-agarose ont été ajoutés dans 1 mg d'échantillon protéique qui contient nos protéines cibles afin de le purifier. Par la suite, 7  $\mu$ L d'anticorps HDAC3 a été ajoutés. Cet échantillon anticorps-protéine a été incubé une nuit à 4°C en l'agitant lentement afin de former le complexe anticorps-protéine. Après cette étape, 25  $\mu$ L de bille d'agarose A ont été ajoutés, suivi d'une incubation une nuit à 4°C avec une agitation modérée afin de former le complexe agarose A-protéine/anticorps. Une fois l'incubation terminée, ce complexe a été récupéré par centrifugation à 1300 rpm pendant 3 min. Le complexe a été lavé 3 fois

avec le tampon contenant du Tris-HCl 1M pH 7.5, glycérol 10 %, KCl 1M, EDTA pH 8,2 mM, MgCl<sub>2</sub>, NP-40 0,1 %, PMSF 1mM et l'inhibiteur de protéase. Le complexe a été dissocié en faisant bouillir les échantillons 5 min dans 60 µL de tampon de chargement 1X (Tris 50 µM, HCl pH 6,8, 2 % SDS, Glycérol 10 % et bleu de Bromophénol). Un Western-blot a été réalisé en utilisant des anticorps appropriés afin de détecter les protéines cibles et de savoir s'il y a interaction protéine/protéine.

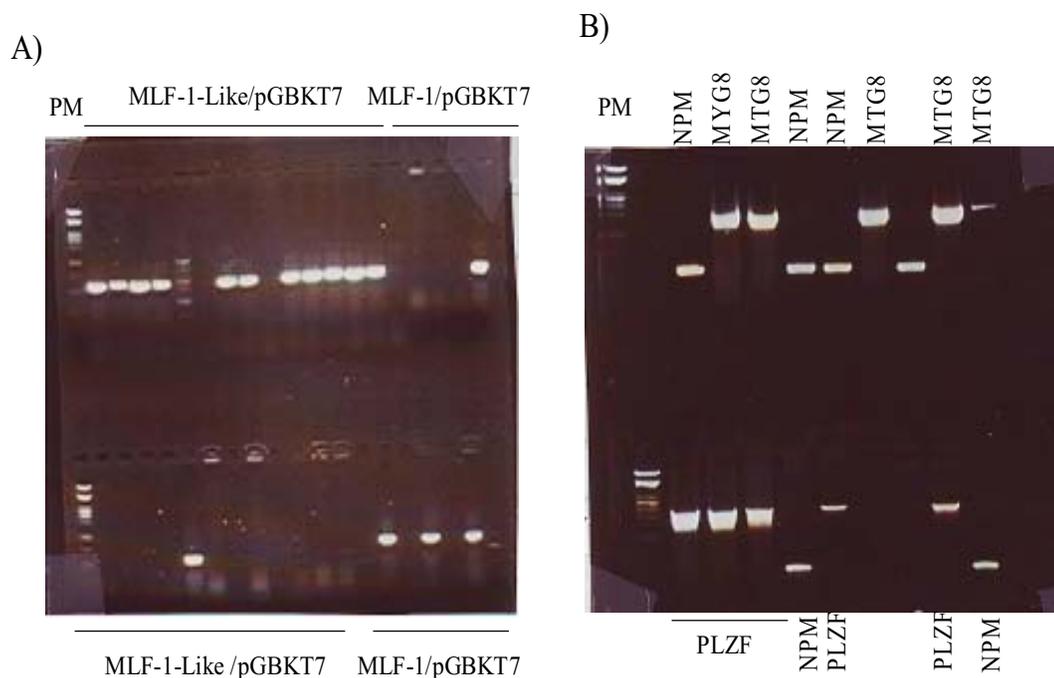
### 3. Résultats

### 3.1 Clonage de plusieurs ADNc dans différents plasmides

Pour être en mesure d'utiliser la technique de double-hybride et de réaliser des IP, plusieurs ADNc ont été clonés dans différents plasmides afin de voir des interactions protéine/protéine. Pour ce faire, nous avons réalisé une PCR avec l'enzyme *pfu* (Promega), qui donne une polymérisation plus fidèle que la Taq ADN polymérase. Lors de ce PCR les amorces utilisées, spécifiques pour chaque ADNc, nous ont permis de modifier l'ADNc en ajoutant des sites de restrictions nécessaires pour le clonage. Ensuite, les plasmides et les produits de PCR (l'ADNc) ont été digérés par une ou des enzymes de restriction qui vont couper l'ADN dans les sites de clonage multiple du plasmide (tableau III). Une ligation a été réalisée afin de souder l'ADNc au plasmide concerné à l'aide d'une enzyme ligase. Le produit de ligation a été mis dans les bactéries DH10 $\beta$  et les colonies de bactéries obtenues ont été cultivées afin de faire une extraction d'ADN par la technique de MINI-prep. Cet ADN extrait a été digéré par des enzymes de restriction, qui vont couper l'ADN dans les sites de clonage, afin de voir si nous avons obtenu des clones en effectuant une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (figure 16). Aussi, la technique de PCR a été utilisée afin de voir quelle colonie de bactéries contient des plasmides avec un insert (figure 17). Le PCR a été réalisé tel que décrit dans la section matériel et méthode.



**Figure 16 : criblage de différents clones sur gel d'agarose 1 % après digestion enzymatique afin de savoir quelle colonie de bactérie porte le plasmide qui contient l'insert.** Pour chacun des clones, 1  $\mu$ L d'ADN a été digéré avec 5 unités d'enzyme par microgramme d'ADN. (A) Criblage pour obtenir des clones de mSin3A dans pGADT7. (B1) criblage pour obtenir des clones MLF1 dans pGBKT7 et (B2) criblage pour obtenir des clones de MLF1-Like dans pGBKT7. (C) criblage pour obtenir des clones de GFI-1 dans pGADT7.



**Figure 17: Résultats du criblage par PCR sur gel agarose 1% afin d'obtenir des clones.** Ces PCR ont été réalisées à partir de différentes colonies de bactéries obtenues lors du clonage après la transformation des bactéries DH10 $\beta$  compétentes. (A) criblage par PCR réalisé afin de sélectionner les clones MLF1-Like et MLF1. (B) résultat de criblage obtenu pour NPM dans pGBKT7, PLZF dans pGAGT7, MTG8 pGBKT7.

Ainsi, par deux méthodes de criblages différentes (PCR et digestion enzymatique), il a été possible d'identifier les colonies de bactéries qui contiennent les clones (un plasmide avec un insert). Ces deux techniques sont efficaces cependant, la technique de criblage par PCR permet d'obtenir des résultats plus rapidement. Tous les clones obtenus ont été séquencés et les séquences ont été analysées afin de voir s'ils contiennent des mutations. Les mutations d'une ou deux bases dans certains clones ont été corrigées par la technique de mutagenèse dirigée

qui permet de reverser une mutation. Tous les clonages réalisés pour ce projet sont présentés dans le tableau VI.

**Tableau VI: liste des ADNc qui ont été clonés et les plasmides dans lesquels ils ont été clonés afin de vérifier des interactions protéines/protéines par la technique de double-hybride et par IP.**

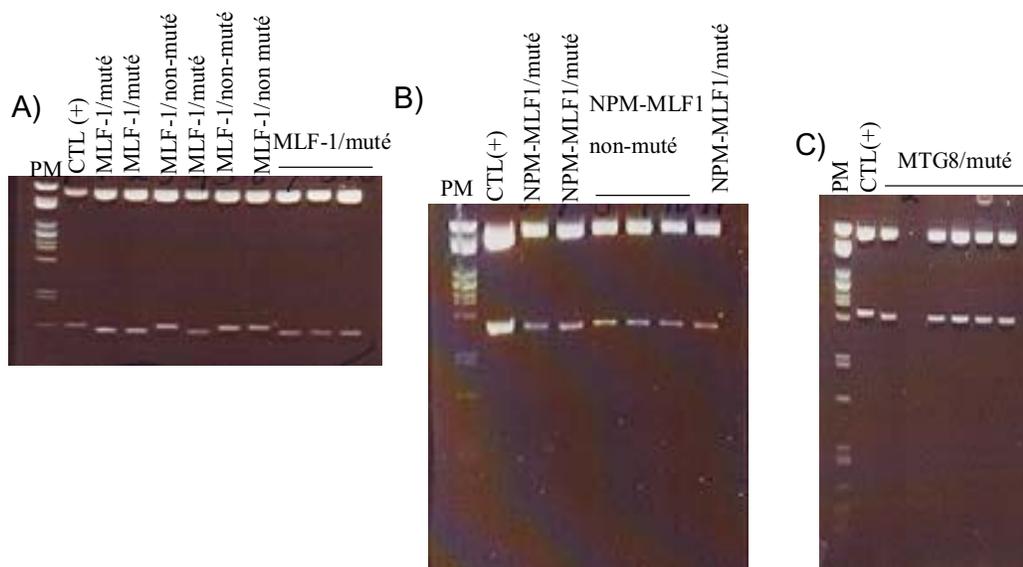
<b>Nom du plasmide</b>	<b>Nom d'ADNc clonés</b>				
pGADT7	HDAC1	HDAC 3	PLZF	GFI-1	mSin3A
pGBKT7	MTG8	NPM	MLF1	NPM/MLF1	MLF1-Like
pOZ-FH-N	NPM-MLF1	MTG8	MLF1	MTG8-Like	
Ap2	GFI-1				
<b>Nom du plasmide</b>	<b>Nom d'ADNc clonés dont le codon MTG8-like de 12 a. a. été délété.</b>				
pZO-FH-N	NPM/MLF1	MTG8	MLF1		
pGBKT7	NPM/MLF1	MTG8	MLF1		

\* le clonage de MLF1, NPM/MLF1, MLF1-Like normaux dans pGBKT7 a été réalisé par Julie Ross une étudiante au doctorat dans notre laboratoire.

### **3.2 Délétion du domaine MTG8-Like dans MLF1, NPM-MLF1 et MTG8 clonés dans pGBKT7 et pOZ-FH-N.**

Cette délétion a été réalisée afin d'atteindre le second objectif du projet c'est-à-dire que nous voulons vérifier si des interactions protéine/protéine peuvent se faire via le domaine MTG8-Like (a.a. 151 à 164) de MLF1, MTG8 et NPM-MLF1. Donc, en enlevant le domaine MTG8-Like si les interactions protéine/protéine sont encore présentes lors du double-hybride, cela signifie que les interactions ne se font pas via ce domaine. Pour faire cette délétion, des amorces ont été construites aux extrémités des 12 a.a. (MTG8-Like) que nous voulons enlever lors du PCR. Cette mutagenèse

dirigée a été réalisée de la même façon que dans les sections matériels et méthodes. Ensuite, pour vérifier que ces 12 a.a. ont été délévés, une digestion enzymatique et un gel d'agarose 1,5 % a permis de sélectionner les clones qui portent la délétion en comparant la faible distance de migration entre les clones mutés et les non mutés (figure 18). Ensuite, les mutants ont été séquencés et les séquences analysées. Aussi, ces ADNc délévés ont été clonés dans le plasmide pOZ-FH-N afin de vérifier par IP si l'absence de ce domaine empêche les interactions de ces protéines dans les cellules de mammifères.



**Figure 18: gel d'agarose 1,5 % réalisé afin de vérifier si le domaine MTG8-Like a été enlevé dans MLF1, NPM-MLF1, MTG8.** Pour faire cette vérification, 1  $\mu$ L ADN obtenu après un MINI-prep pour chacun des ADNc a été digéré par des enzymes de restrictions du site de clonage pour chacun des ADNc. (A) délétion du domaine MTG8 (12a.a.) dans les clones MLF1/pGBKT7 et le contrôle (+) est MLF1/pGBKT7 non muté. (B) Délétion du domaine MTG8 dans les clones NPM-MLF1/pGBKT7 et le contrôle (+) est NPM-MLF1 non muté. (C) Délétion du domaine MTG8 dans MTG8 et le contrôle (+) MTG8 non muté.

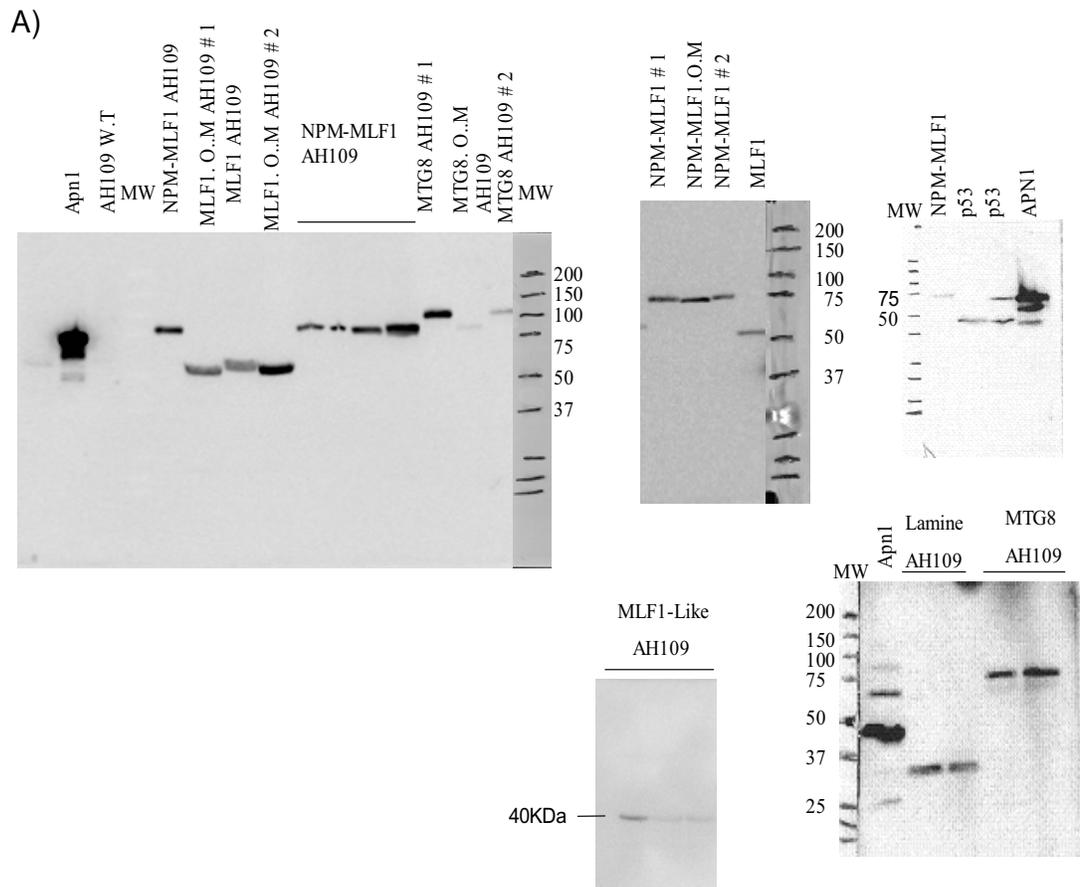
À la figure 18, nous observons clairement la différence dans la distance de migration entre les ADNc mutés du domaine MTG8-Like et les ADN non mutés. Plus le PM des ADNc est élevé plus il est difficile de voir la différence entre les ADNc muté et les ADN non mutés. Aussi, dans NPM-MLF1 il est difficile de voir la différence de taille parce qu'il y a plus d'ADN dans le contrôle (+) que pour les autres échantillons. Pour chacune des figures, la majorité des échantillons contient l'ADNc muté. Pour chaque ADNc deux échantillons pour lesquels nous avons observé une différence de taille avec le contrôle (+) ont été séquencés. L'analyse des séquences nous a démontré une fois de plus que le domaine MTG8-Like a été délété dans chacun des ADNc.

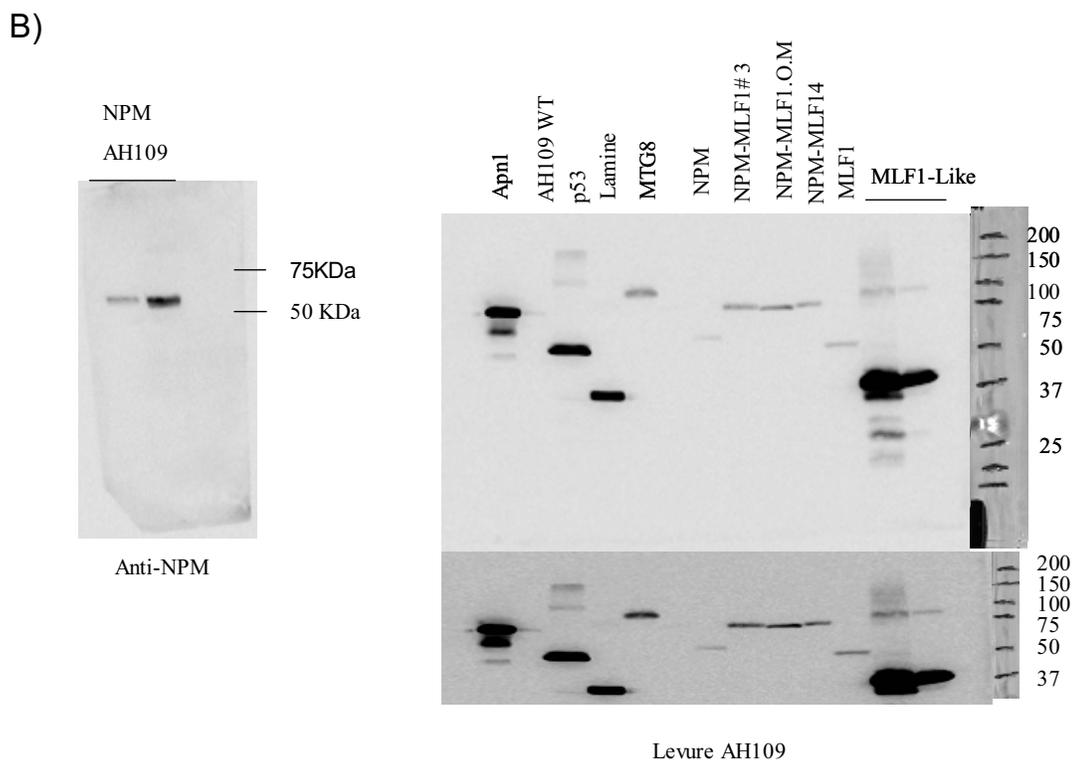
### **3.3 Expression des protéines cibles lors du double-hybride par buvardage de type Western.**

Une fois que tous les clones ont été obtenus et séquencés, nous avons réalisé le premier et (les clones non mutés) le second objectif du projet (les clones muté) qui consiste à vérifier des interactions protéines/protéines entre différentes ADNc par la technique de double-hybride. Lors du double-hybride, plusieurs buvardages de type Western ont été réalisés afin de vérifier l'expression des protéines étudiées. Car, il est impossible de faire cette expérience sans être sûre que les protéines cibles sont exprimées chez la levure. De ce fait, après chaque étape de transformation de levure, il importe de vérifier si les protéines sont exprimées dans celle-ci. Dans un premier temps, durant cette expérience, plusieurs échantillons de levure AH109 ont été transfectés séparément par des clones contenant NPM-MLF1, MTG8, MLF1-Like, NPM, p53 et MLF1 dans pGBKT7. Après la transformation des levures, elles ont été cultivées sur petri YPD/-Trp suivi d'une culture en milieu liquide YPD/-Trp afin de faire une extraction protéique. Cette extraction protéique a été utilisée pour faire un buvardage de type Western afin de voir si les protéines NPM-MLF1, MTG8, MLF1-Like, NPM et MLF1 sont exprimées chez la levure. Le buvardage de type Western a été réalisé de la même façon que dans matériel et méthode. La même expérience a été réalisée pour NPM-MLF1, MTG8 et MLF1 muté du domaine MTG8-Like.

L'expression des protéines normales et mutées chez la levure est présentée dans la figure 19.

### 3.3.1 Expression des protéines chez la levure après la première étape de transfection lors du double-hybride.

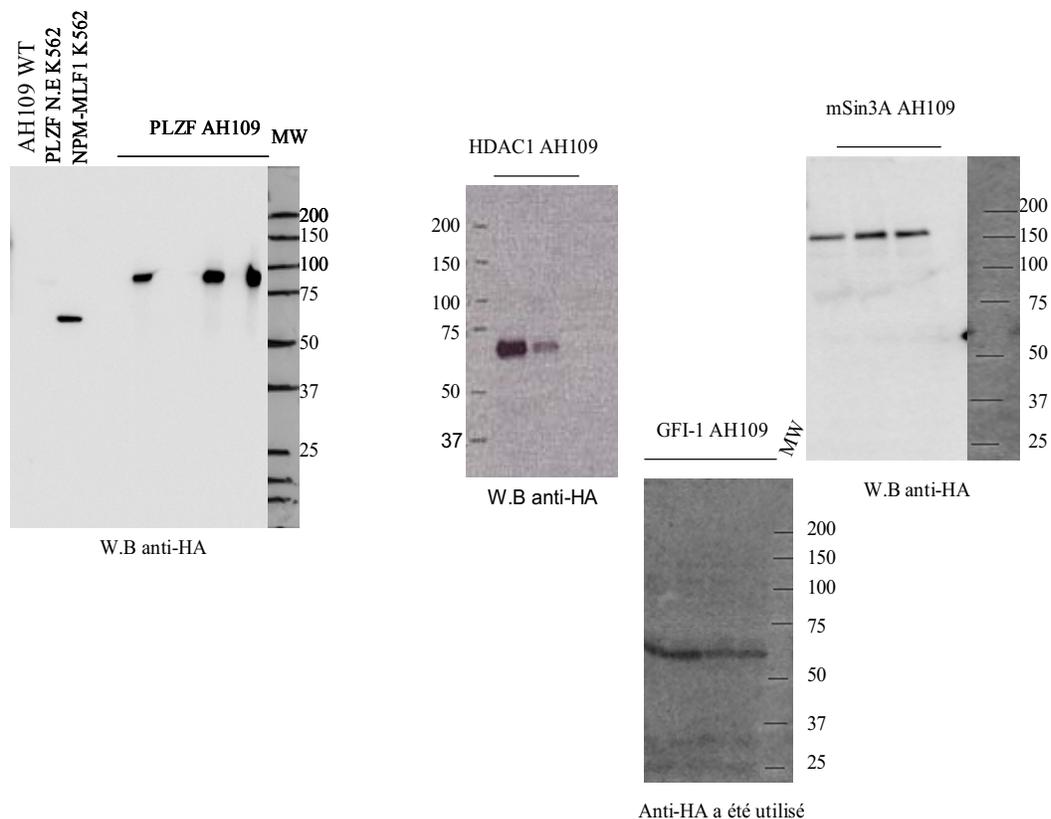


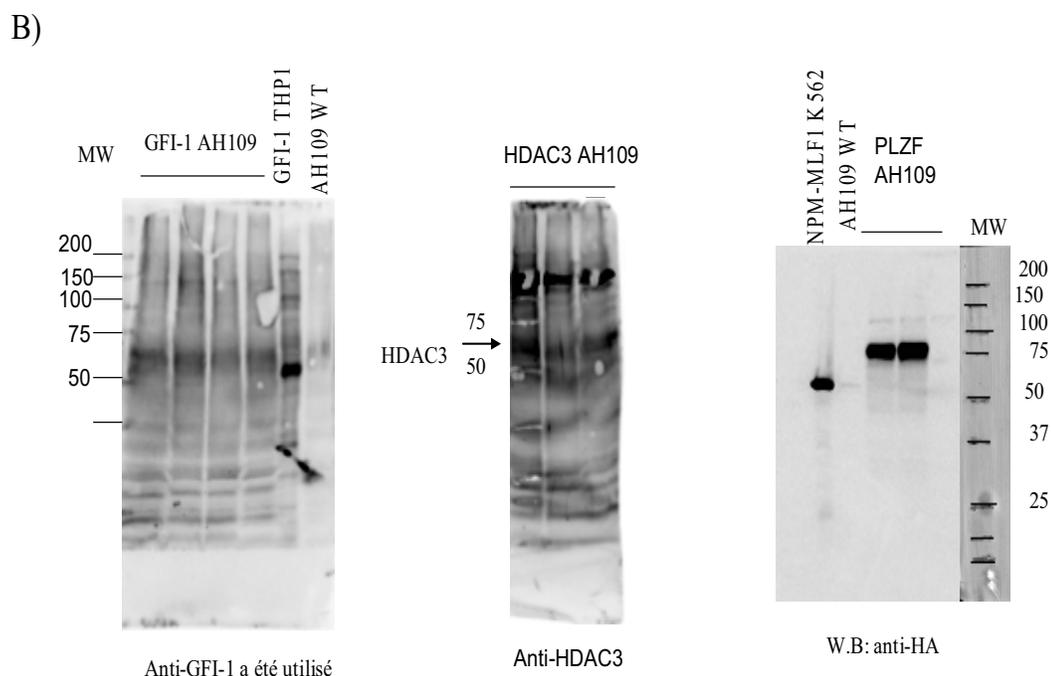


**Figure 19 (A) et (B): l'expression des protéines, NPM-MLF1, MLF1, NPM, MLF1-Like, MTG8, p53, Lamine, Apn1 (CLT +) ainsi que MTG8-out -MTG8-Like, NPM-MLF1-out-MTG8-Like et MLF1-out-MTG8-Like, extraites des levures AH109 lors du double-hybride après un buvardage de type Western.** Durant l'immuno-buvardage de type Western, le contrôle positif utilisé est la protéine Apn1 qui a été fusionnée à l'épitope c-myc et le contrôle négatif est l'extrait protéique de la souche de levure AH109 sauvage. Pour ce faire, les protéines ont été extraites de la souche de levure AH109. 80 à 100 µg de protéines ont été mises sur gel SDS-PAGE 10 ou 13 %. Pour la détection des protéines sur la membrane, un anticorps qui reconnaît l'épitope c-myc fusionné aux protéines a été utilisé comme anticorps primaire. L'anticorps secondaire utilisé est fait à partir de la souris (IgG HRP) et reconnaît une séquence spécifique de l'anticorps anti-c-myc. Les protéines sur la membrane de nitrocellulose ont été détectées par **chemiluminescence** avec le système ECLplus. Le poids moléculaire des protéines (PM) a été mesuré à l'aide du marqueur (precision plus protein standards de BIO-RAD).

En second lieu, lors du double-hybride, les échantillons de levure contenant NPM-MLF1, MLF1, NPM, MLF1-Like, MTG8 ainsi que MTG8-out -MTG8-Like, NPM-MLF1-out-MTG8-Like et MLF1-out-MTG8-Like ont été transformés séparément une seconde fois avec HDAC1, HDAC3, PLZF, GFI-1 et mSin3A. Après cette deuxième transformation des levures, une extraction protéique a été réalisée afin de vérifier l'expression des protéines HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF et mSin3A. Pour détecter le niveau d'expression des protéines cibles, un buvardage de type Western a été effectué. La détection des protéines cibles permet de faire le criblage sur différents milieux de sélections YPD afin de voir si les protéines cibles exprimées dans la levure interagissent ensemble.

A)





**Figure 20 : (A) et (B) : l'expression des protéines HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF et mSin3A extraites des levures AH109 lors du double-hybride après un buvardage de type Western.** Lors du Western-blot, le contrôle positif utilisé est la protéine NPM-MLF1 des cellules K562 qui contient l'épitope HA et le contrôle négatif est l'extrait protéique de la souche de levure AH109 sauvage. Pour ce faire, les protéines ont été extraites de la souche de levure AH109. 80 à 100  $\mu$ g de protéines ont été mises sur gel SDS-PAGE. Pour la détection des protéines sur la membrane, un anticorps qui reconnaît l'épitope HA fusionné aux protéines et d'autres anticorps spécifiques tels qu'un anti-HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF et mSin3A ont été utilisés comme anticorps primaire. L'anticorps secondaire utilisé est fait à partir de la souris, du lapin, de la chèvre selon l'anticorps primaire utilisé (IgG HRP) et reconnaît une séquence spécifique de l'anticorps anti-HA ou de l'anti-HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF et mSin3A (tableau V). Les protéines sur la membrane de nitrocellulose ont été

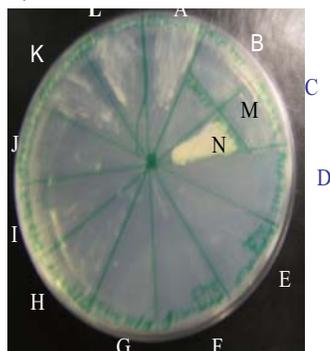
détectées par chemiluminescence avec le système ECLplus. Le PM des protéines a été mesuré à l'aide du marqueur (precision plus protein standards de BIO-RAD).

Dans les figures 19 et 20, nous avons démontré que toutes les protéines étudiées sont exprimées chez la levure. Les protéines NPM-MLF1, MTG8, NPM, p53, MLF1, MLF1-Like dans pGBKT7 ont été détectées à l'aide de l'anticorps c-myc car, le vecteur pGBKT7 possède un épitope tag c-myc. Dans le cas de NPM, nous avons pu le détecter aussi avec l'anti-NPM. Le fait de détecter NPM dans la levure avec les deux anticorps (anti-NPM et anti c-myc) et de trouver la même taille pour NPM avec ces deux anticorps confirme que nous avons travaillé avec la bonne protéine. De ce fait, la bande que nous observons pour NPM n'est pas une bande non spécifique qui migre à la même hauteur que celui-ci. Pour les autres protéines, nous n'avons pas pu utiliser d'autres anticorps spécifiques à part l'anti c-myc car, pour certaines protéines, l'anticorps spécifique n'est pas commercialisé ou bien il n'est pas de qualité suffisante pour ce genre d'étude. Dans ce cas, nous nous sommes basé sur la reproductibilité des données c'est-à-dire, pour chaque type de protéines, une extraction protéique différente et différent buvardage de type Western a été réalisée. Les mêmes résultats ont été obtenus pour chacun des buvardage de type Western. De plus, l'anticorps anti-c-myc est très spécifique car, on obtient une bande pour chaque échantillon dans chaque puits sur la membrane. Donc, l'anticorps ne donne pas de bande non spécifique ce qui augmente la fiabilité des résultats (figure 19). Selon la littérature, NPM-MLF1 a un PM qui varie de 56 à 62 KDa, MLF1 37 à 40 KDa, p53 mesure 53 KDa, NPM mesure 37 à 40 KDa et MTG8 mesure 75 à 80 KDa. Mais, lorsque ces protéines sont extraites de la levure lors des buvadages de type Western blot nous avons observé que leur taille augmente de 5 à 10 KDa environs (figure 19). La variation du PM est probablement due au fait que nous avons utilisé des protéines de fusion ex: myc-MLF1-DBD de VP16; Ha-HDAC1-trans-activation domaine de VP16.

Comme il a déjà été mentionné, plusieurs échantillons de levure contenant séparément NPM, MTG8, MLF1, p53, MLF1-Like et NPM-MLF1 ont été transformés une seconde fois par des clones constitués du plasmide pGADT7 et différents cDNA tels que GFI-1, mSin3A, PLZF, HDAC1, HDAC3. Par exemple, l'échantillon de levure contenant MLF1 a été transformé séparément par GFI-1, mSin3A, PLZF, HDAC1, HDAC3. La même chose a été effectuée pour NPM, MTG8, MLF1-Like et NPM-MLF1. Large T a été introduit dans l'échantillon de levure contenant p53 (p53 interagit avec LargeT), MTG8 a été introduite dans GFI-1, mSin3A, PLZF, HDAC1, HDAC3 pour servir de contrôle positif car, MTG8 interagit avec chacune de ces protéines. De plus, l'échantillon de levure contenant la protéine Lamine a été transfecté par Large T afin de nous servir de contrôle négatif car, Lamine n'interagit pas avec cette protéine. Après la double transformation des levures, l'expression des secondes protéines (GFI-1, HDAC1, HDAC3, PLZF, mSin3A) introduites dans la levure a été vérifiée. Contrairement à la première étape où il y avait seulement NPM1 comme anticorps spécifique et les autres protéines avaient été détectées par l'ant-c-myc; dans ce cas, il a été possible de détecter les protéines par anti-HA et d'autres anticorps spécifiques plus accessibles tels que anti-GFI-1, HDAC1, HDAC3, PLZF, mSin3A. Donc, nous avons pu vérifier l'expression de ces protéines grâce à des anticorps spécifiques et un marqueur du poids moléculaire (precision plus protein standards de BIO-RAD) qui permet de déterminer la taille précise des protéines (figure 20).

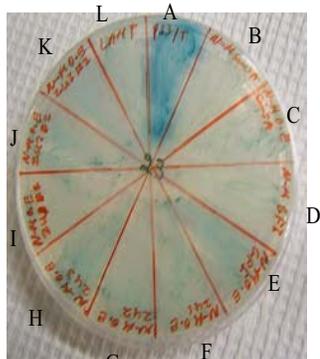
**Résultats de criblage sur différents milieux de sélections YPD.** Plus précisément, les petri YPD/-Leu/-Trp, YPD/-Leu/-Trp/-His +3AT, YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/+ X-Gal, YPD/-Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal ont été utilisés afin de vérifier la présence d'interactions protéines/protéines par la technique de double-hybride.

A)

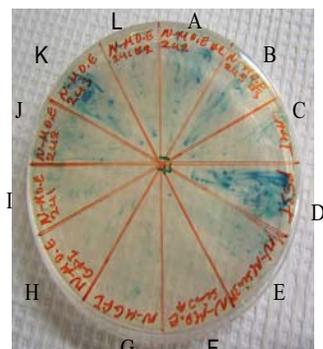


YPD/-Leu/-Trp/-His/-ADE

- A: MLF1-Like + PLZF
- B: MLF1 + HDAC1
- C: MLF1 + HDAC3
- D: MLF1 + PLZF
- E: NPM-MLF1 + HDAC3
- F: NPM-MLF1 + PLZF
- G: NPM + PLZF
- H: MTG8 + HDAC1
- I: MTG8 + HDAC3
- J: MTG8 + PLZF
- K: MLF1-Like + HDAC1
- L: MLF1-Like + PLZF
- M: Lamine + LargeT (CTL (-))
- N: p53 + Large T (CTL (+))

YPD/-Leu/-Trp/+ X- $\alpha$ -Gal

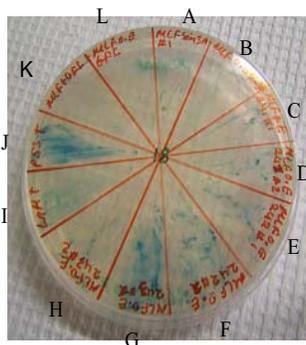
- A: p53 + Large T (CTL (+))
- B: NPM-MLF1 + mSin3A
- C: NPM-MLF1. O. E + mSin3A
- D: NPM-MLF1 + GFI-1
- E: NPM-MLF1. O. E + GFI-1
- F: NPM-MLF1. O. E + HDAC1
- G: NPM-MLF1. O. E + HDAC3
- H: NPM-MLF1. O. E + PLZF
- I: NPM-MLF1. O. E + HDAC1 # 2
- J: NPM-MLF1. O. E + HDAC3 #2
- K: NPM-MLF1. O. E. + PLZF # 2
- L: Lamine + LargeT (CTL (-))



YPD/-Leu/-Trp/-X-Gal

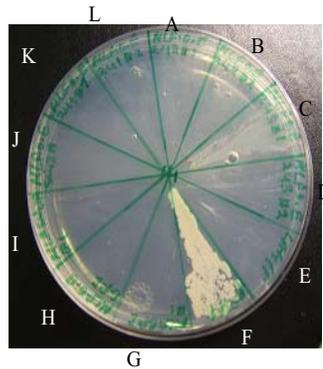
- A: NPM-MLF1. O.E + HDAC3 # 2
- B: NPM-MLF1. O. E + PLZF # 2
- C: Lamine + LargeT (CTL (-))
- D: p53 + Large T (CTL (+))
- E: NPM-MLF1 + mSin3A
- F: NPM-MLF1. O. E + mSin3A
- G: NPM-MLF1 + GFI-1
- H: NPM-MLF1. O. E + GFI-1
- I: NPM-MLF1. O. E + HDAC1
- J: NPM-MLF1. O. E + HDAC3
- K: NPM-MLF1. O. E + PLZF
- L: NPM-MLF1. O. E + HDAC1 # 2

B)



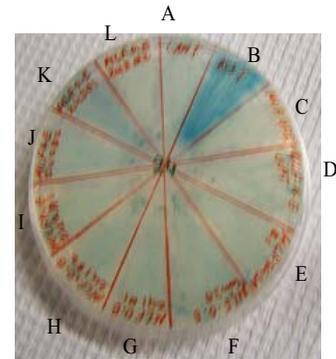
YPD/ -Leu/-Trp + X-Gal

- A: MLF1 + mSin3A
- B: MLF1. O. E + mSin3A
- C: MLF1. O. E + HDAC1
- D: MLF1. O. E + HDAC1 # 2
- E: MLF1. O. E + HDAC3
- F: MLF1. O. E. + HDAC3 # 2
- G: MLF1. O. E + PLZF
- H: MLF1. O. E + PLZF # 2
- I: Lamine + Large T ( CTL (-))
- J: p53 + Large T (CTL(-)).
- K: MLF1 + GFI-1
- L: MLF1. O. E + GFI-1



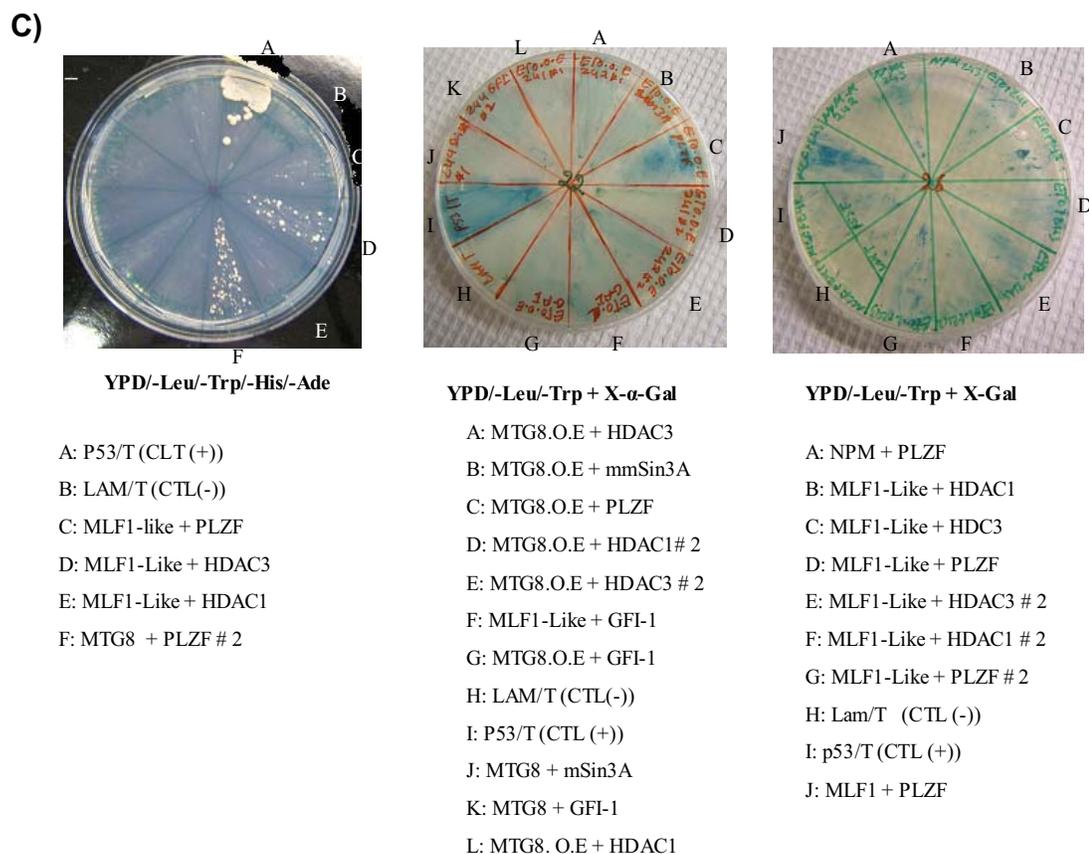
YPD/-Leu/-Trp/-His/-ADE

- A: MLF1. O. E. + HDAC3
- B: MLF1. O. E + HDAC3 # 2
- C: MLF1. O. E + PLZF
- D: MLF1. O. E + PLZF # 2
- E: Lamine + Large T ( CTL (-))
- F: p53 + Large T (CTL(-)).
- G: MLF1 + GFI-1
- H: MLF1. O. E + GFI-1
- I: MLF1 + mSin3A
- J: MLF1. O. E + mSin3A
- K: MLF1 + HDAC1
- L: MLF1. O. E + HDAC1



YPD/ -Leu/-Trp + X-α-Gal

- A: Lamine + Large T ( CTL (-))
- B: p53 + Large T (CTL(-)).
- C: MLF1 + GFI-1
- D: MLF1. O. E + GFI-1
- E: MLF1 + mSin3A
- F: MLF1. O. E + mSin3A
- G: MLF1. O. E + HDAC1
- H: MLF1. O. E + HDAC1 # 2
- I: MLF1. O. E + HDAC3
- J: MLF1. O. E. + HDAC3 # 2
- K: MLF1. O. E + PLZF
- L: MLF1. O. E + PLZF # 2



**Figure 21: A) B) C) Exemples de différents milieux de sélection YPD et les résultats obtenus pour certains échantillons lors du criblage de double-hybride afin de vérifier l'expression des gènes rapporteurs (HIS3, LacZ, MEL1, ADE2) et de voir des interactions protéine/protéine.** Lors de ce criblage le X- $\alpha$ -Gal a été utilisé à une concentration de 4 mg/mL et le X-Gal à une concentration de 20 mg/mL. Tous les petri YPD sont composés de « Yeast extraction médium », peptone et dextrose. Par exemple, dans un petri YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, il y a tous les autres acides aminés sauf les acides aminés Leu, Trp, His et Ade.

Lors du criblage, les levures doublement transformées ont été cultivées sur le milieu YPD/-Leu/-Trp/-His + 3AT (**3-amino-1-2-4-triazole**) à une concentration de 10 mM de 3AT. Nous avons observé une forte croissance uniquement pour p53/T sur ces petris (figure 15). Pour tous les autres échantillons, aucune croissance n'a été

observée. Le 3AT est un inhibiteur compétitif de la protéine His3. Il élimine les faux positifs sur les petris -His. Toutefois, sa toxicité dans la levure peut causer un mauvais réarrangement ou des mutations qui éliminent l'expression de l'activation du domaine hybride. La perte de l'activation de ce domaine résulte en une perte du gène rapporteur et les levures ne vont pas survivre sous une sélection auxotrophique. De plus, avec une concentration trop élevée de 3AT, les interactions faibles ne sont pas détectées (Van Criekinge, W et Beyaert, R, 1999). Pour éviter ce problème, d'autres petris ont été préparés avec une concentration plus faible de 3AT qui est de 2,5 mM. Après avoir mis les échantillons de levures sur ces petris, il y a eu croissance pour tous les échantillons. Le problème est que la concentration du 3AT était trop élevée pour permettre la croissance des échantillons de levures pour qui l'interaction protéine/protéine qui s'y trouvait était plus faible que celle de p53/T. Du même coup, nous avons su que le gène HIS3 est exprimé dans tous les échantillons de levure. De ce fait, l'expression de ce gène n'est pas suffisante pour déduire qu'il y a une interaction protéines-protéines chez la levure car, le contrôle négatif Lamine/ Large T (Lam/T) avait été capable de croître sur ce milieu. À partir de ce moment, il fallait tester les interactions en utilisant d'autres milieux plus astringent tels que YPD/-Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal, YPD/-Leu/-Trp/ + X-Gal, YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/-Ade.

Pour conclure qu'il y a des interactions protéine/protéine à part le gène HIS3, il faudrait que les gènes rapporteurs LacZ, MEL1, ADE2 soient exprimés chez la levure. Dans un premier temps, pour savoir si LacZ est exprimé dans les différents échantillons de levures, il fallait cultiver ces échantillons sur petri YPD/-Leu/-Trp/ + X-Gal. Lorsqu'on cultive des échantillons de levures sur ce type de petri, si LacZ est exprimé et qu'il y a des interactions protéine/protéine on obtient des colonies bleues (figure 21).

Ensuite, les échantillons de levures doublement transfectées ont été cultivés sur petri YPD/-Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal. Le X- $\alpha$ -Gal permet de détecter l'expression du

gène MEL1. Lorsque MEL1 est exprimé les colonies de levures ont une couleur bleue. Dans certains échantillons de levures doublement transfectés, MEL1 est exprimé car, nous avons obtenu des colonies bleues sur les petris X- $\alpha$ -Gal (figure21).

Aussi, les échantillons de levure doublements transfectées ont été cultivées sur petris YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/-Ade. Car, ce milieu permet de vérifier l'expression du gène ADE2. Lors du double-hybride, certains échantillons ont été capables de croître sur ce milieu, ce qui indique qu'il y a des interactions protéine/protéine fortes (figure 21). Mais, pour être en mesure de conclure qu'il y a des interactions protéiques, des contrôles positifs et négatifs ont été utilisés sur chaque petri. Le contrôle positif utilisé est p53 dans pGBKT7 et large T dans pGADT7. Il est bien connu que p53 interagit fortement avec Large T en double-hybride selon le protocole (BioTeach Journal, 2003). MTG8 a été utilisé comme contrôle positif car, selon la revue de (Davis JN, 2003), il interagit en double-hybride avec mSin3A, GFI-1, PLZF, HDAC1, HDAC3. Le contrôle négatif utilisé est Lamine et Large T. Ces deux protéines ne devront pas interagir selon le protocole (BioTeach Journal, 2003). En se basant sur ces contrôles, avec une certitude de 4 expériences sur 6 que nous pouvons dire que certaines protéines interagissent ensemble. Donc, les résultats du double-hybride suggèrent les interactions protéine/protéine suivantes: **MTG8** le contrôle positif interagit avec mSin3A, GFI-1, PLZF, HDAC1, HDAC3 et le second contrôle positif p53 avec Large T. Il a été possible de constater que **MLF1** interagit avec PLZF, HDAC1, HDAC3. **NPM-MLF1** pour sa part, interagit avec PLZF, HDAC3 et faiblement avec GFI-1, HDAC1. **NPM** semble interagir avec mSin3A et GFI-1. **MLF1-Like** interagit avec PLZF, HDAC1, HDAC3 et faiblement ou pas du tout avec mSin3A, GFI-1. De façon générale, l'interaction entre PLZF avec MLF1 et NPM-MLF1 a été très évidente.

### **Analyse des interactions protéine/protéine de MLF1 trouvées lors du double-hybride**

En ce qui concerne PLZF, d'après les résultats du double-hybride cette protéine interagit fortement avec MLF1. Car, il y a eu croissance sur tous les milieux après cinq essais et sur X-Gal et X- $\alpha$ -Gal des colonies de couleurs bleues intenses ont été observées (figure 21 et tableau VIII). En ce qui concerne HDAC1 et 3, il n'y a pas eu de croissance sur YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/-Ade. Cependant, une couleur bleue moins intense que pour PLZF a été observée sur le milieu YPD/-Leu/-Trp/+ X-GAL, YPD/-Leu/-Trp/+ X- $\alpha$ -GAL (figure 21). Le fait d'avoir une couleur bleue plus pâle que pour PLZF indique qu'il y a interaction mais cette interaction peut-être faible, et, c'est pour cela que les levures n'ont pas été capables de croître sur les milieux astringents sans Ade. Pour mSin3A et GFI-1, d'après nos observations, nous ne pouvons pas conclure que ces protéines interagissent avec MLF1. Mais dans le cas de GFI-1, il y avait des colonies de levure bleues pâles sur petri YPD/-Leu/-Trp/+ X- $\alpha$ -GAL et sur petri YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/-Ade il y avait des colonies de couleurs roses (répression) et lorsque nous regardons au microscope les colonies étaient de la même taille. Donc, à cause qu'elles étaient de la même taille, nous ne pouvons pas en déduire qu'il y avait eu croissance ou s'il y avait beaucoup de levures sur le petri dès le départ.

### **Analyse des interactions protéine/protéine de NPM-MLF1 trouvé lors du double-hybride**

Les résultats du double-hybride suggèrent que NPM-MLF1 interagirait avec HDAC1, HDAC3, PLZF, GFI et mSin3A. Ces interactions ont permis la croissance des levures sur tous les milieux sauf ceux sans Ade. Il est donc possible que ces interactions soient faibles vu qu'il n'y a pas eu croissance sur milieu sans Ade. Avec GFI-1, une croissance a été observée sur tous les milieux (tableau VII). Car, lorsque nous avons regardé au microscope, il y avait des colonies de différentes tailles sur le milieu sans Ade. Pour les autres protéines autre que GFI-1, il a été possible de voir des interactions en se basant plus sur les milieux YPD/-Leu/-Trp/+ X-Gal, YPD/-

Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal qui ont donné des colonies bleues. Mais pour mSin3A la couleur bleue était moins intense (figure 21 et tableaux VII).

### **Analyse des interactions protéines/protéines de NPM trouvées lors du double-hybride**

Les résultats du double-hybride suggèrent que NPM interagissait avec GFI-1 et mSin3A. Lorsque nous comparons les résultats de GFI-1 par rapport à mSin3A, l'interaction de GFI-1 paraît plus forte que l'interaction de mSin3A comparativement aux contrôles positifs. Il semble y avoir une interaction entre NPM et PLZF parce que, sur milieu YPD/-Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal, les colonies de levures étaient de couleur bleue mais plus pâles que le contrôle positif. Sur les petris YPD/-Leu/-Trp/ + X-Gal, deux essais sur quatre avaient donné des colonies bleues. En ce qui concerne HDAC1 et HDAC3, il est difficile de conclure qu'ils interagissent avec NPM. En effet, pour HDAC1 une couleur bleue a été observée sur petri YPD/-Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal et non sur petri YPD/-Leu/-Trp/ + X-Gal. De plus, sur les petris YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/-Ade il n'y a pas eu de croissance pour un échantillon de levure contenant ces deux protéines. Pour HDAC3, nous avons observé le même phénomène que pour HDAC1 sauf qu'il a été possible d'observer des colonies au microscope sur YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade. Donc, NPM interagit avec GFI-1 et mSin3A et semble interagir faiblement avec HDAC1 et 3 (tableau IX).

### **Analyse des interactions protéine/protéine de MLF1-Like trouvées lors du double-hybride**

MLF1-Like provient d'une partie de MLF1 de l'acide aminé 94 à 157 qui a été cloné afin de faire l'expérience du double-hybride. Tout comme MLF1, MLF1-Like interagit avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF. Mais il n'y a pas d'interaction avec mSin3A. Cependant, pour MLF1-Like, il a été plus facile de déterminer ces interactions car, sur petris YPD/-Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal et YPD/-Leu/-Trp/ + X-Gal la couleur bleue des colonies de levure était très intense et sur petris YPD/-Leu/-Trp/-

His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/-Ade il y avait une croissance des colonies de levure qu'on voyait à l'œil nu (figure 21 et tableau X). Il est possible que cette différence entre MLF1 et MLF1-Like soit due au fait que la protéine MLF1-Like est plus petite que MLF1. Le repliement de la protéine est différent cela pourrait permettre une plus grande exposition des domaines d'interactions protéines/protéines. Par conséquent, ces interactions sont élevées et il y a plus de croissance de levures.

Ainsi, pour cet objectif qui consistait à observer les interactions protéines/protéines par la technique de double-hybride, dans certains cas, il y a clairement une interaction entre deux protéines données mais dans d'autres cas, lorsque nous avons comparé les résultats avec les contrôles positifs et les contrôles négatifs, il a été plus difficile d'arriver à une conclusion (voir tableau ci-dessous).

**Tableau VII: Résultats du double-hybride réalisé pour NPM-MLF1 et NPM-MLF1.O. M afin de voir s'il interagit avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF, mSin3A.**

Nom du cDNA	YPD/-			Milieu de culture des levures			YPD/-		
	TRP	LEU	TRP	YPD/- LEU/- TRP/- HIS/+ 3AT	YPD/- LEU/- TRP/- HIS/-ADE	YPD/- LEU/- TRP/- ADE	YPD/- LEU/- TRP+X- GAL	YPD/- LEU/- TRP+X- GAL	YPD/- LEU/- TRP+X- $\alpha$ -GAL
NPM/MLF1+ HDAC1	+	+	+	+/+	-	-	+	+	+
NPM/MLF1+ HDAC3	+	+	+	+/+	-	+	+	+	+
NPM/MLF1+ PLZF	+	+	+	+/+	-	+	+	+	+
NPM/MLF1+ GFI-1	+	+	+	+/+	+	+	+	+	+
NPM/MLF1 + mSIN3A	+	+	+	+/+	-	-	+/+	+/+	+/+
NPM/MLF1.O.M + HDAC1	+	+	+	+	+/+	+/+	+	+	+/+
NPM/MLF1.O.M + HDAC3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NPM/MLF1.O.M + PLZF	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NPM/MLF1.O.M + GFI-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NPM/MLF1.O.M + mSin3A	+	+	+	+	-	-	+/+	+/+	+/+
P53/T (CTL(+))	+	+	+	+/+	+	+	+	+	+
Lam/T(CTL(-))	+	+	+	+/+	-	-	-	-	-

**Légende :** Le signe positif (+) indique les milieux pour lesquels il y a eu croissance de levure. Le signe négatif (-) indique les milieux pour lesquels il n'y a pas eu croissance de levure. Le signe positif/négatif (+/-) indique les milieux pour lesquels il a été possible de voir des colonies de différentes tailles au microscope. Sur milieux X-GAL et X- $\alpha$ -GAL le signe positif (+) indique qu'il y a eu des colonies de couleur bleues et le signe négatif (-) indique qu'il n'y a pas eu de colonies de couleur bleues et le signe (+/-) indique que la couleur bleue obtenue était pâle et N/D indique que cette expérience n'a pas été réalisée pour l'échantillon mentionné. Tous les tests sur les différents milieux de sélections ont été effectués 3 ou 4 fois.

**Ce criblage a été réalisé avec des clones de levures AH109. Différents milieux de cultures YPD/-leu/-TRP/+ X-GAL, YPD/-leu/-TRP/+ X- $\alpha$ -GAL, YPD/-LEU/-TRP/-HIS + 3AT ou sans 3AT, YPD/-LEU/-TRP /-ADE, YPD/-LEU/-TRP/-HIS/-ADE ont été réalisés afin de détecter des interactions protéines/protéine entre NPM-MLF1 et HDAC1, HDAC3, PLZF, GFI-1, SIN3A. p53/ T a été utilisé comme contrôle positif et Lam/T comme contrôle négatif. Aussi, lors du double hybride, d'autres contrôles négatifs ont été réalisés. Pour ce faire, une colonie de levure contenant NPM-MLF1 et GFI-1 a été cultivé sur petri YPD/-LEU a plusieurs reprises afin d'éliminer l'expression du plasmide pGBKT7 qui contient NPM-MLF1. Pour vérifier que ce plasmide a été enlevé dans la levure, l'échantillon a été cultivé sur péris YPD-TRP et YPD/-LEU/-TRP, car dans le cas où le plasmide a été éliminé il n'y aura pas de colonie sur ces milieux. Une fois cette vérification effectuée, ce même échantillon de levure a été transformé avec NPM-MLF1 à nouveau. Après cette transfection le même genre de criblage représenté dans ce tableau a été réalisé. Pour ce criblage contrôle, le même résultat a été obtenu c'est-à-dire que NPM-MLF1 interagit avec GFI-1. Les mêmes expériences ont été réalisées pour NPM-MLF1.O.M. Lorsqu'un échantillon de levure est capable de croître sur tous ces milieux de cultures, cela indique qu'il y a une interaction protéine/protéine forte.**

**Tableau VIII: Résultats du double-hybride réalisé pour MLF-1 et MLF1.O.M afin de voir s'ils interagissent avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF, mSin3A.**

Nom du cDNA	Milieu de culture des levures											
	YPD/- TRP	YPD/- LEU	YPD/- LEU/ TRP	YPD/- LEU/ TRP/ HIS	YPD/- LEU/ TRP/ HIS/+	YPD/- LEU/ TRP/ HIS/- ADE	3AT	YPD/- LEU/ TRP/ HIS/+	YPD/- LEU/ TRP/ HIS/- ADE	YPD/- LEU/ TRP/ X- GAL	YPD/- LEU/ TRP+ X- GAL	YPD/- LEU/ TRP+ X- $\alpha$ -GAL
MLF-1 + HDAC1	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-	-	+	+	+
MLF-1+ HDAC3	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-	-	+	+	+
MLF-1 + PLZF	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+
MLF-1+ GFI-1	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-
MLF-1+ mSin3A	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-
MLF-1.O.M + HDAC1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+/-	+/-	+/-
MLF-1. O.M + HDAC3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MLF-1.O.M + PLZF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MLF-1.O.M + GFI-1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+/-	+/-	+/-
MLF-1.O.M + mSin3A	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+/-	+/-	+/-
P53/ t (CTL (+))	+	+	+	+	+/+	+	+/+	+	+	+	+	+
Lam/T (CTL (-))	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-

**Légende :** Le signe positif (+) indique les milieux pour lesquels il y a eu croissance de levure. Le signe négatif (-) indique les milieux pour lesquels il n'y a pas eu croissance de levure. Le signe positif/négatif (+/-) indique les milieux pour lesquels il a été possible de voir des colonies de différentes tailles au microscope. Sur milieux X-GAL et X- $\alpha$ -GAL le signe positif (+) indique qu'il y a eu des colonies de couleur bleues et le signe négatif (-) indique qu'il n'y a pas eu de colonies de couleur bleues et le signe (+/-) indique que la couleur bleue obtenue était pâle et N/D indique que cette expérience n'a pas été réalisée pour l'échantillon mentionné. Tous les tests sur les différents milieux de sélections ont été effectués 3 ou 4 fois.

**Ce criblage a été réalisé avec des clones de levures AH109. Différents milieux de cultures YPD/-leu/-TRP/+ X-GAL, YPD/-leu/-TRP/+ X- $\alpha$ -GAL, YPD/-LEU/-TRP/-HIS + 3AT ou sans 3AT, YPD/-LEU/-TRP /-ADE, YPD/-LEU/-TRP/-HIS/-ADE ont été réalisés afin de détecter des interactions protéine/protéine entre MLF1 et MFL1.O.M avec HDAC1, HDAC3, PLZF, GFI-1, SIN3A. p53/ T a été utilisé comme contrôle positif et Lam/T comme contrôle négatif. Aussi, lors du double hybride, d'autres contrôles négatifs ont été réalisés. Pour ce faire, un échantillon de levure contenant séparément MLF1 et MFL1.O.M avec PLZF a été cultivé sur petri YPD/-Leu a plusieurs reprises afin d'éliminer l'expression du plasmide pGBKT7 qui contient MLF1 et/ou MFL1.O.M. Pour vérifier que ce plasmide a été enlevé dans la levure, l'échantillon a été cultivé sur petri YPD-TRP et YPD/-Leu/-Trp, car dans le cas où le plasmide a été éliminé il n'y aura pas de colonie sur ces milieux. Une fois cette vérification effectuée, ce même échantillon de levure a été transformé séparément avec MLF1 et MFL1.O.M à nouveau. Après cette transformation le même genre de criblage représenté dans ce tableau a été réalisé. Pour ce criblage contrôle, le même résultat a été obtenu c'est-à-dire que MLF1 et MFL1.O.M interagit avec PLZF. Lorsqu'un échantillon de levure est capable de croître sur tous ces milieux de cultures, cela indique qu'il y a interaction protéine/protéine forte.**



**Légende :** Le signe positif (+) indique les milieux pour lesquels il y a eu croissance de levure. Le signe négatif (-) indique les milieux pour lesquels il n'y a pas eu croissance de levure. Le signe positif/négatif (+/-) indique les milieux pour lesquels il a été possible de voir des colonies de différentes tailles au microscope. Sur milieux X-GAL et X- $\alpha$ -GAL le signe positif (+) indique qu'il y a eu des colonies de couleur bleues et le signe négatif (-) indique qu'il n'y a pas eu de colonies de couleur bleues et le signe (+/-) indique que la couleur bleue obtenue était pâle et N/D indique que cette expérience n'a pas été réalisée pour l'échantillon mentionné. Tous les tests sur les différents milieux de sélections ont été effectués 3 ou 4 fois.

**Ce criblage a été réalisé avec des clones de levures AH109. Différents milieux de cultures YPD/-leu/-TRP/+ X-GAL, YPD/-leu/-TRP/+ X- $\alpha$ -GAL, YPD/-LEU/-TRP/-HIS + 3AT ou sans 3AT, YPD/-LEU/-TRP/-ADE, YPD/-LEU/-TRP/-HIS/-ADE ont été réalisés afin de détecter des interactions protéine/protéine entre NPM et HDAC1, HDAC3, PLZF, GFI-1, SIN3A. p53/ T a été utilisé comme contrôle positif et Lam/T comme contrôle négatif. Aussi, lors du double hybride, d'autres contrôles négatifs ont été réalisés. Pour ce faire, une colonie de levure contenant NPM1 et GFI-1 a été cultivé sur petri YPD/-Leu a plusieurs reprises afin d'éliminer l'expression du plasmide pGBKT7 qui contient NPM1. Pour vérifier que ce plasmide a été enlevé dans la levure, l'échantillon a été cultivé sur petri YPD/-Trp et YPD/-Leu/-Trp, car dans le cas où le plasmide a été éliminé il n'y aura pas de colonie sur ces milieux. Une fois cette vérification effectuée, ce même échantillon de levure a été transformé avec NPM1 à nouveau. Après cette transformation le même genre de criblage représenté dans ce tableau a été réalisé. Pour ce criblage contrôle, le même résultat a été obtenu c'est-à-dire que NPM1 interagit avec GFI-1. Lorsqu'un échantillon de levure est capable de croître sur tous ces milieux de cultures, cela indique qu'il y a interaction protéine/protéine forte.**

**Tableau X: Résultats du double-hybride réalisé pour MLF1-Like afin de voir s'il interagit avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF, mSin3A.**

Nom du cDNA	Yeast 1			Milieu de culture des levures			Yeast 2		
	YPD/- TRP	YPD/- LEU	YPD/- LEU/- TRP	YPD/- LEU/- TRP/- HIS	YPD/- LEU/- TRP/- HIS/+ 3AT	YPD/- LEU/- TRP/- HIS/-ADE	YPD/- LEU/- TRP/- ADE	YPD/- LEU/- TRP+ X- GAL	YPD/- LEU/- TRP+ X- $\alpha$ -GAL
MLF1-Like + HDAC1	+	+	+	+	+	+	N/D	+	+
MLF1-Like + HDAC3	+	+	+	+	+	+	N/D	+	+
MLF1-Like + PLZF	+	+	+	+	+	+	N/D	+	+
MLF1-Like + GFI-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MLF1-Like + mSin3A	+	+	+	+	+	N/D	N/D	N/D	N/D
P53/ T (CTL (+))	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lam/ T (CTL (-))	+	+	+	+	+	-	-	-	-

**Légende :** Le signe positif (+) indique les milieux pour lesquels il y a eu croissance de levure. Le signe négatif (-) indique les milieux pour lesquels il n'y a pas eu croissance de levure. Le signe positif/négatif (+/-) indique les milieux pour lesquels il a été possible de voir des colonies de différentes tailles au microscope. Sur milieux X-GAL et X- $\alpha$ -GAL le signe positif (+) indique qu'il y a eu des colonies de couleur bleues et le signe négatif (-) indique qu'il n'y a pas eu de colonies de couleur bleues et le signe (+/-) indique que la couleur bleue obtenue était pâle et N/D indique que cette expérience n'a pas été réalisée pour l'échantillon mentionné. Tous les tests sur les différents milieux de sélections ont été effectués 3 ou 4 fois.

**Ce criblage a été réalisé avec des clones de levures AH109. Différents milieux de cultures YPD/-leu/-TRP/+ X-GAL, YPD/-leu/-TRP/+ X- $\alpha$ -GAL, YPD/-LEU/-TRP/-HIS + 3AT ou sans 3AT, YPD/-LEU/-TRP /-ADE, YPD/-LEU/-TRP/-HIS/-ADE ont été réalisés afin de détecter des interactions protéine/protéine entre MLF1-Like et HDAC1, HDAC3, PLZF, GFI-1, mSIN3A. p53/ T a été utilisé comme contrôle positif et Lam/T comme contrôle négatif. Lorsqu'un échantillon de levure est capable de croître sur tous ces milieux de cultures, cela indique qu'il y a interaction protéine/protéine forte.**

**Tableau XI : Résultats du double-hybride réalisé pour MTG8 et MTG8-out-MTG8-Like afin de voir s'ils interagissent avec HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF, mSin3A.**

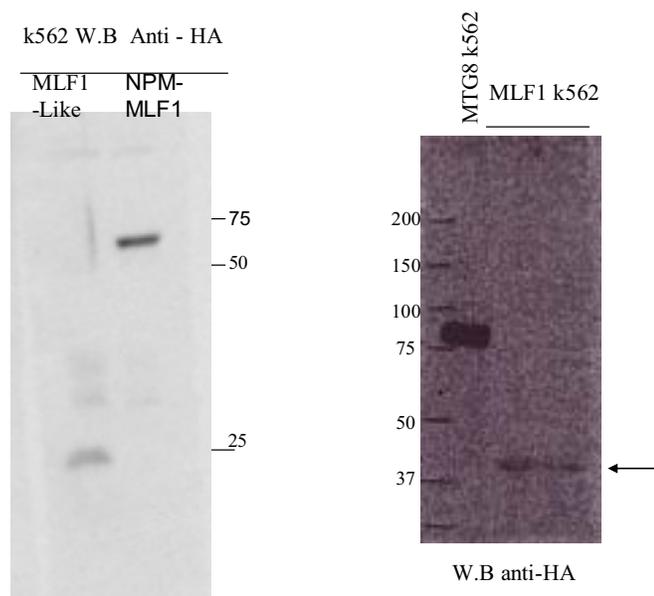
Nom du cDNA	Milieu de culture des levures									
	YPD/- TRP	YPD/- LEU	YPD/- LEU/-TRP	YPD/- LEU/- TRP/-HIS	YPD/- LEU/- TRP/- HIS/+3AT	YPD/- LEU/- TRP/-HIS/- ADE	YPD/- LEU/- TRP/- ADE	YPD/- LEU/- TRP+ GAL	YPD/- LEU/- TRP+ X- GAL	YPD/- LEU/- TRP+ X- $\alpha$ -GAL
ETO +	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
HDAC1										
ETO +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HDAC3										
ETO +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PLZF										
ETO +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GFI-1										
ETO +	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
mSin3A										
MTG8.O.M	+	+	+	+	+	+	N/D	+	+	+
HDAC1										
MTG8.O.M	+	+	+	+	+	+	N/D	+	+	+
HDAC3										
MTG8.O.M + PLZF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MTG8.O.M + GFI-1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
MTG8.O.M										
mSin3A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P53/T (CTL (+))	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lam/T (CTL (-))	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-

**Légende :** Le signe positif (+) indique les milieux pour lesquels il y a eu croissance de levure. Le signe négatif (-) indique les milieux pour lesquels il n'y a pas eu croissance de levure. Le signe positif/négatif (+/-) indique les milieux pour lesquels il a été possible de voir des colonies de différentes tailles au microscope. Sur milieux X-GAL et X- $\alpha$ -GAL le signe positif (+) indique qu'il y a eu des colonies de couleur bleues et le signe négatif (-) indique qu'il n'y a pas eu de colonies de couleur bleues et le signe (+/-) indique que la couleur bleue obtenue était pâle et N/D indique que cette expérience n'a pas été réalisée pour l'échantillon mentionné. Tous les tests sur les différents milieux de sélections ont été effectués 3 ou 4 fois.

**Ce criblage a été réalisé avec des clones de levures AH109. Différents milieux de cultures YPD/-leu/-TRP/+ X-GAL, YPD/-leu/-TRP/+ X- $\alpha$ -GAL, YPD/-LEU/-TRP/-HIS + 3AT ou sans 3AT, YPD/-LEU/-TRP/-ADE, YPD/-LEU/-TRP/-HIS/-ADE ont été réalisés afin de détecter des interactions protéine/protéine entre MTG8 et MTG8.O.M avec HDAC1, HDAC3, PLZF, GFI-1, SIN3A. p53/ T a été utilisé comme contrôle positif et Lam/T comme contrôle négatif. Aussi, lors du double-hybride, d'autres contrôles négatifs ont été réalisés. Pour ce faire, un échantillon de levure contenant séparément MTG8 et MTG8.O.M avec PLZF a été cultivé sur petri YPD/-LEU a plusieurs reprises afin d'éliminer l'expression du plasmide pGBK7 qui contient MTG8 ou MTG8.O.M. Pour vérifier que ce plasmide a été enlevé dans la levure, l'échantillon a été cultivé sur petris YPD-TRP et YPD/-LEU/-TRP, car dans le cas où le plasmide a été éliminé il n'y aura pas de colonie sur ces milieux. Une fois cette vérification effectuée, ce même échantillon de levure a été transformé séparément avec MTG8 et MTG8.O.M à nouveau. Après cette transformation le même genre de criblage représenté dans ce tableau a été réalisé. Pour ce criblage contrôle, le même résultat a été obtenu c'est-à-dire que MTG8 et MTG8.O.M interagit avec PLZF. Lorsqu'un échantillon de levure est capable de croître sur tous ces milieux de cultures, cela indique qu'il y a interaction protéine/protéine forte.**

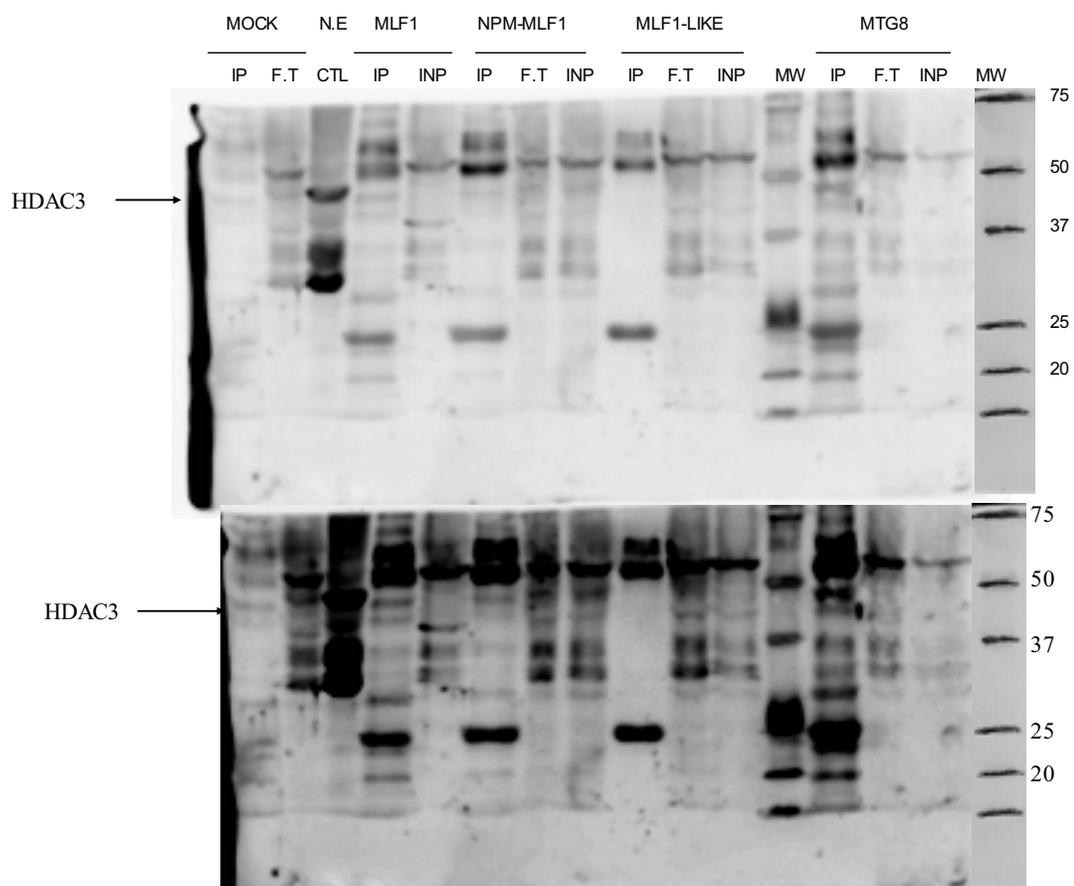
### Les résultats obtenus par la technique d'Immunoprécipitation

Le troisième objectif du projet était de vérifier les interactions protéines/protéines trouvées par double-hybride chez les cellules de mammifère érythroleucémique K562 par la technique d'immuno-précipitation de protéines. Pour ce faire, les cellules ont été transfectées par les clones NPM-MLF1, MTG8, MLF1 et MLF1-Like dans le plasmide pOZ-FH-N. Après la transfection, un tri-cellulaire a été réalisé par des billes magnétiques couplées avec un anticorps dirigé contre le récepteur IL-2 des cellules. Après le tri-cellulaire, les cellules ont été cultivées pour faire une extraction protéique. Les échantillons de protéines ont été utilisés pour faire les IP. Cependant, avant de faire les IP, l'expression des protéines cibles a été vérifiée par immuno-buvardage de type western-blot (figure 22). Les résultats obtenus pour chacun des IP sont présentés dans les figures suivantes:



**Figure 22: vérification de l'expression de protéines telles que MLF1-Like, NPM-MLF1, MTG8 et MLF1 après l'infection des cellules K562.** Pour chaque protéine, un échantillon contenant 10 millions de cellules a été utilisé pour faire une extraction protéique. Ensuite, 60 à 80 µg de protéines ont été mises sur gel SDS-PAGE 10 %

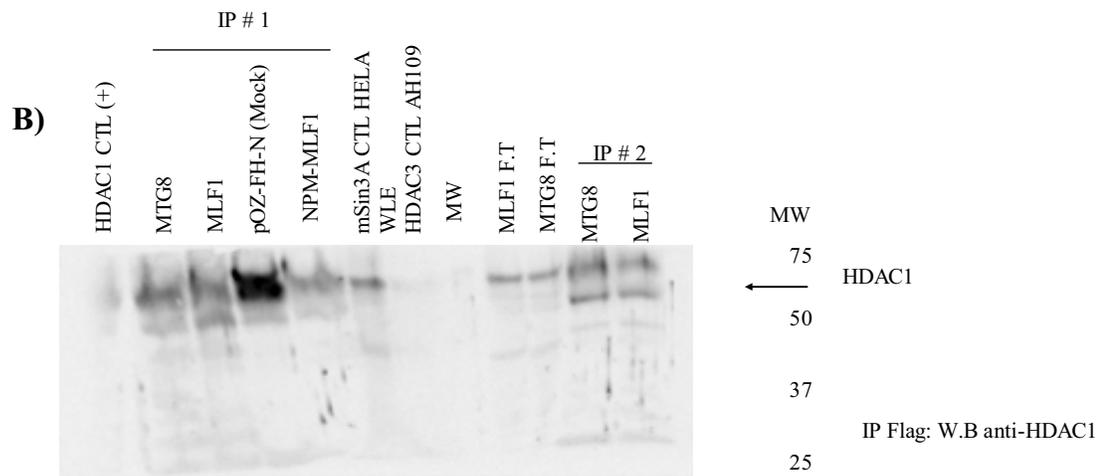
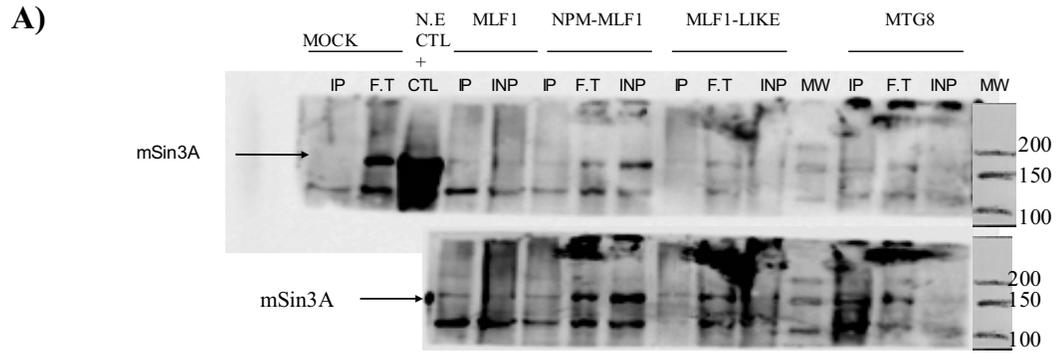
afin de réaliser le Western-blot tel que décrit dans la section matériels et méthodes. Lors du Western-blot, un anticorps qui reconnaît l'épitope HA dans la protéine a été utilisé comme anticorps primaire car, le plasmide pOZ-FH-N contient l'épitope FLAG-HA. L'anticorps secondaire utilisé est fait à partir de la souris (IgG HRP) et reconnaît une séquence spécifique de l'anticorps anti-HA. Ensuite, l'expression des protéines sur la membrane de nitrocellulose a été détectée par chemiluminescence avec le système ECLplus. Le PM des protéines a été mesuré à l'aide de « precision plus protein standards de BIO-RAD ».



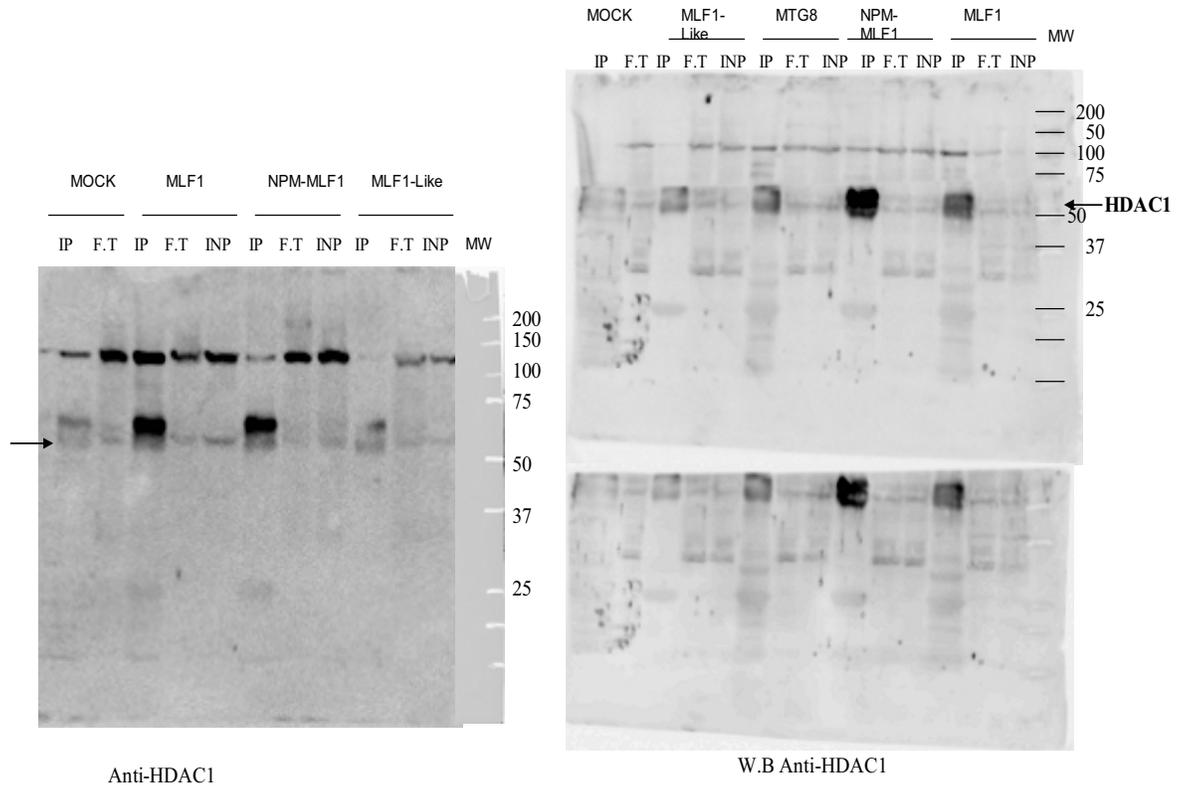
**Figure 23: résultats de l'IP fait pour le Mock, MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like MTG8 afin de voir s'ils interagissent avec HDAC3.** Pour ce faire, pour chaque protéine, un échantillon contenant 20 à 30 millions de cellules a été utilisé pour faire

une extraction protéique. Ensuite, 1 à 2 mg de protéines ont été utilisés pour faire les IP. Ensuite, un buvardage western sur gel SDS-PAGE 10 % a été réalisé. Durant le buvardage Western, un anticorps primaire anti-HDAC3 et un anticorps secondaire anti-lapin (HRP) qui a un épitope qui reconnaît le HDAC3 a été utilisé. Par la suite, l'expression des protéines sur la membrane de nitrocellulose a été détectée par chemiluminescence avec le système ECLplus. Le poids moléculaire des protéines a été mesuré à l'aide de « precision plus protein standards de BIO-RAD ».

Les résultats de cette IP nous inspirent que HDAC3 pourrait interagir avec MLF1, NPM-MLF1 et MTG8 qui est contrôle positif, car selon la littérature, MTG8 interagit avec HDAC3. Contrairement à MLF1 pour MLF1-Like il n'y a pas de bande HDAC3 ce qui signifie que HDAC3 n'interagit pas avec cette protéine. Or, en double-Hybride c'est le contraire. Ce phénomène est probablement dû au fait que le repliement de la protéine n'est pas la même dans les deux systèmes. Il peut y avoir aussi des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation qui empêchent la protéine MLF1-Like d'interagir avec HDAC3. Dans le cas de MLF1 ou MLF1-Like, selon Lim.R *et al.* (2002) Madm recrute une sérine kinase qui phosphoryle Mlf1 au niveau du RSXSXP motif. Ce résultat est très intéressant et suggère que MLF1 pourrait être impliqué dans les mêmes activités biologiques que HDAC3 spécialement la répression de l'expression des gènes.



C)



**Figure 24: résultats de l'IP faite pour le Mock, MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like MTG8 afin de voir s'ils interagissent avec mSin3A (A) et HDAC1 (B) et (C).** 1 à 2 mg de protéines ont été utilisés pour faire les IP. Ensuite, un buvardage western sur gel SDS-PAGE 10 % a été réalisé. Durant le buvardage Western, un anticorps primaire anti-HDAC1 et mSin3A a été utilisé. Un anticorps secondaire anti-lapin (HRP) qui a un épitope qui reconnaît le HDAC1 et pour mSin3A un anticorps secondaire anti-souris (igG HRP) a été utilisé. Ensuite, l'expression des protéines sur la membrane de nitrocellulose a été détectée par chemiluminescence avec le système ECLplus. Le PM des protéines a été mesuré avec « precision plus protein standards de BIO-RAD».

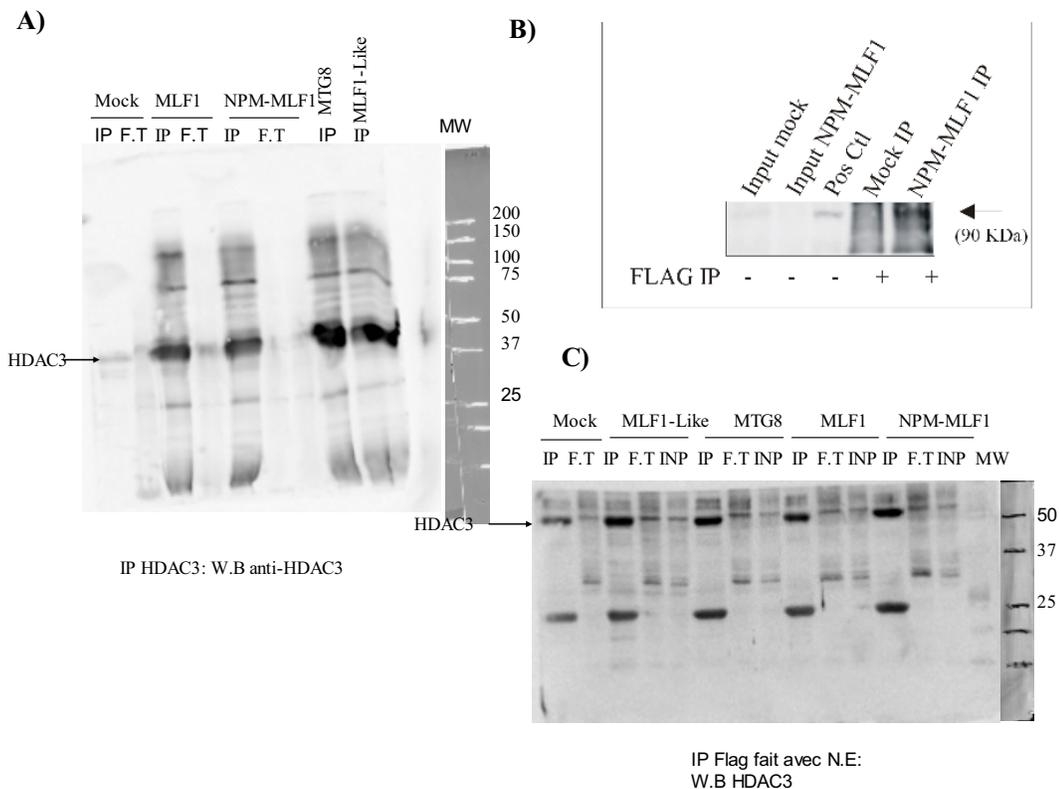
Dans la figure 24 (A), les résultats de l'IP démontrent que mSin3A interagit avec MLF1, NPM-MLF1 et faiblement avec MLF1-Like parce qu'on détecte une bande plus faible sur la membrane de nitrocellulose pour ce dernier. mSin3A interagit aussi avec MTG8 qui est le contrôle positif. Ces résultats suggèrent que ces protéines peuvent être impliquées dans certains mécanismes cellulaires que mSin3A est le principal régulateur. En (B) et (C) les résultats nous démontrent que HDAC1 pourrait interagir avec MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like ainsi que MTG8 qui est le contrôle positif reconnu pour interagit avec ces protéines. HDAC1 étant un répresseur transcriptionnel, il se pourrait que les protéines avec lesquelles il interagit soient impliquées dans ce mécanisme.

#### **4.5 Difficultés rencontrées au court des IP dues à la qualité des anticorps**

De façon générale nous ne pouvons pas conclure à 100 % qu'HDAC1 et 3 interagissent avec MLF1, NPM-MLF1, MTG8, MLF1-Like. En effet, lors de la détection des bandes sur la membrane pendant le buvardage de type western avec les anticorps anti-HDAC1 et anti-HDAC3, nous avons vu une bande qui se situe environ aux poids moléculaires attendus pour HDAC1 et 3 dans le 'mock' (plasmide vide pOZ-FH-N dans les k562). Le fait de voir cette bande faible dans le contrôle négatif mock empêche d'affirmer avec certitude que HDAC1 et/ou HDAC3 interagissent avec MLF1, NPM-MLF1, MTG8, MLF1-Like par IP. Nous comptons vérifier la spécificité d'anticorps contre les HDACs provenant d'autres sources ou d'utiliser d'autres techniques d'interaction protéines/protéine tels que la méthode GST et TAP-tag. Cependant, il y a trois choses qui laissent croire que la bande identifiée dans chaque type d'IP est HDAC1. Premièrement, la bande dans le contrôle est plus faible que celui des IP. Deuxièmement, selon la littérature HDAC1 est toujours présent dans le complexe corépresseur de mSin3A. Donc si mSin3A interagit avec ces protéines, HDAC1 doit l'être aussi. De ce fait, la bande observée dans le contrôle Mock n'élimine pas complètement la possibilité que HDAC1 interagisse avec MTG8, MLF1, MLF1-Like, NPM-MLF1. Troisièmement, il n'y a pas eu de différence entre le

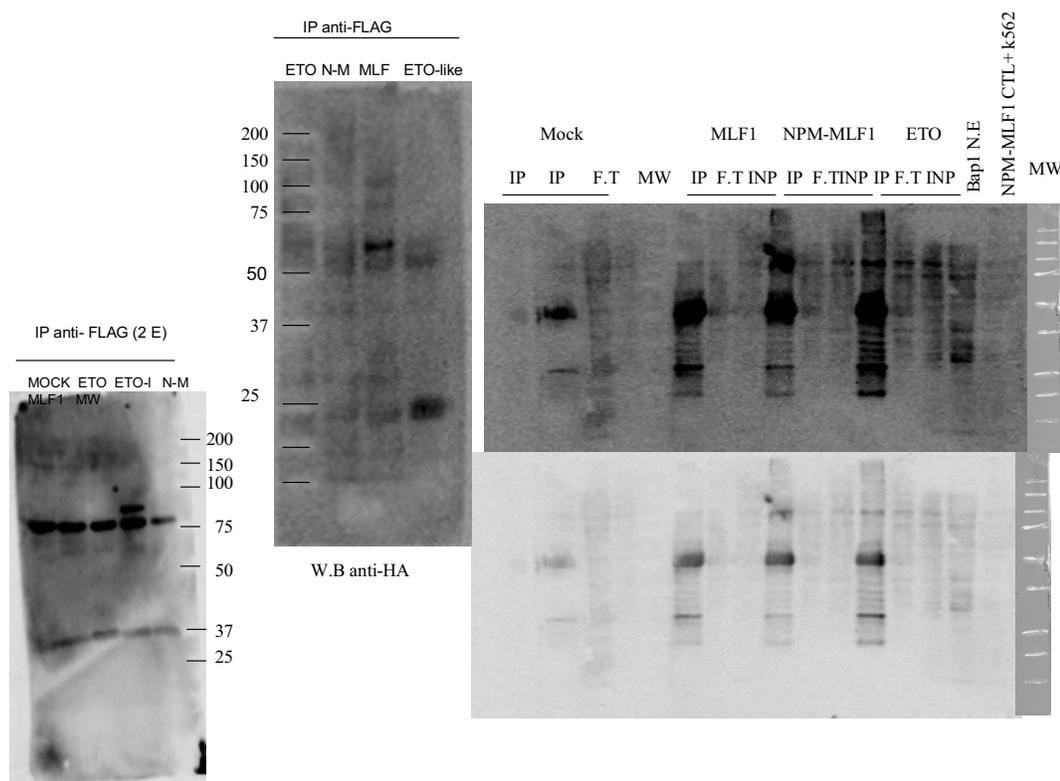
contrôle positif MTG8 et les autres IP fait pour HDAC1 car, selon la littérature MTG8 interagit clairement avec HDAC1. Il est fort possible que la bande observée lors des IP pour HDAC1 indique une interaction de HDAC1 avec ces protéines.

De plus, pour résoudre ce problème une IP inverse a été réalisée avec l'anticorps HDAC3. Les résultats de buvardage de type Western nous a révélé que HDAC3 a été précipité durant l'IP (figure 25). Lors de cette IP inverse nous n'avons pas pu détecter la présence de MTG8, MLF1, NPM-MLF1 clairement à cause d'un problème d'anticorps anti-HA (figure 26). Donc, nous n'avons pas identifié clairement les interactions entre HDAC3 et MTG8, MLF1, NPM-MLF1 à l'aide de l'IP inverse. Cependant, dans l'IP anti-FLAG, la possibilité d'interaction entre HDAC3 et ces protéines semble plus évidente car, la bande observée dans le Mock est plus faible et migre un peu plus que la bande HDAC3 (figure 23).



**Figure 25: résultats de l'IP inverse et IP normale faite pour le Mock, MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like et MTG8 afin de voir s'ils interagissent avec HDAC3.** 1 à 2 mg de protéines ont été utilisés pour faire les IP. Par la suite, un buvardage western sur gel SDS-PAGE 10 % a été réalisé. Durant le buvardage Western, un anticorps primaire anti-HDAC3 a été utilisé. Un anticorps secondaire anti-lapin (HRP) qui a un épitope qui reconnaît le HDAC3 a été utilisé. Ensuite, l'expression des protéines sur la membrane de nitrocellulose a été détectée par chemiluminescence avec le système ECLplus. Le PM des protéines a été mesuré avec « precision plus protein standards de BIO-RAD ». **(A)** IP inverse afin de voir si HDAC3 interagit avec MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like et MTG8. En **(B)** résultats de l'IP qui montre que NPM-MLF1 interagit avec PLZF. **(C)** IP normale fait pour le Mock, MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like et MTG8 afin de voir s'ils interagissent avec HDAC3.

Après avoir réalisé l'IP inverse, nous avons constaté que les deux sortes d'IP (inverse et normale) suggèrent que MLF1, NPM-MLF1, MTG8 et MLF1-Like semblent interagir avec HDAC3. Aussi, dans la figure 25 (b) les résultats de l'IP démontrent que NPM-MLF1 interagit avec PLZF (Botardi. S). Cela suggère que NPM-MLF1 pourrait être impliqué dans les mécanismes cellulaires auxquels PLZF participe.



**Figure 26: résultats des IP avec l'anticorps anti-HA pour détecter le Mock, MLF1, NPM-MLF1, MLF1-Like et MTG8 dans les échantillons d'IP.**

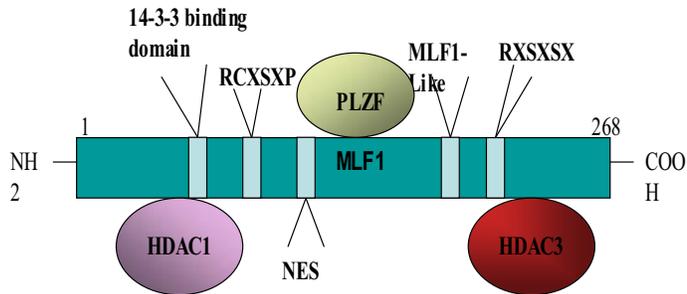
1 à 2 mg de protéines ont été utilisés pour faire les IP. Un buvardage western sur gel SDS-PAGE 10 % a été réalisé. Durant le buvardage Western, un anticorps primaire anti-HA. Un anticorps secondaire anti-souris (igG HRP) a été utilisé. Ensuite, l'expression des protéines sur la membrane de nitrocellulose a été détectée par chemiluminescence avec le système ECLplus. Le poids moléculaire des protéines a été mesuré avec « precision plus protein standards de BIO-RAD ».

Lors des IP avec l'anticorps anti-HA-FLAG, l'expression de NPM-MLF1, MLF1, MTG8 et MLF1-Like n'ont pas été détectées clairement sur la membrane de nitrocellulose. Étant donné que l'IP est une IP anti-FLAG il se pourrait qu'avec l'anticorps anti-HA, la présence de ces protéines n'est pas détectable. Ou, il s'est produit une réaction qui empêche la détection de ces protéines avec l'anticorps anti-HA mais, nous savons qu'elles sont présentes dans les échantillons protéiques

extraient dans les cellules K562 utilisés pour faire l'IP car, nous les avons détectées dans les échantillons protéiques utilisés pour réaliser les IP.

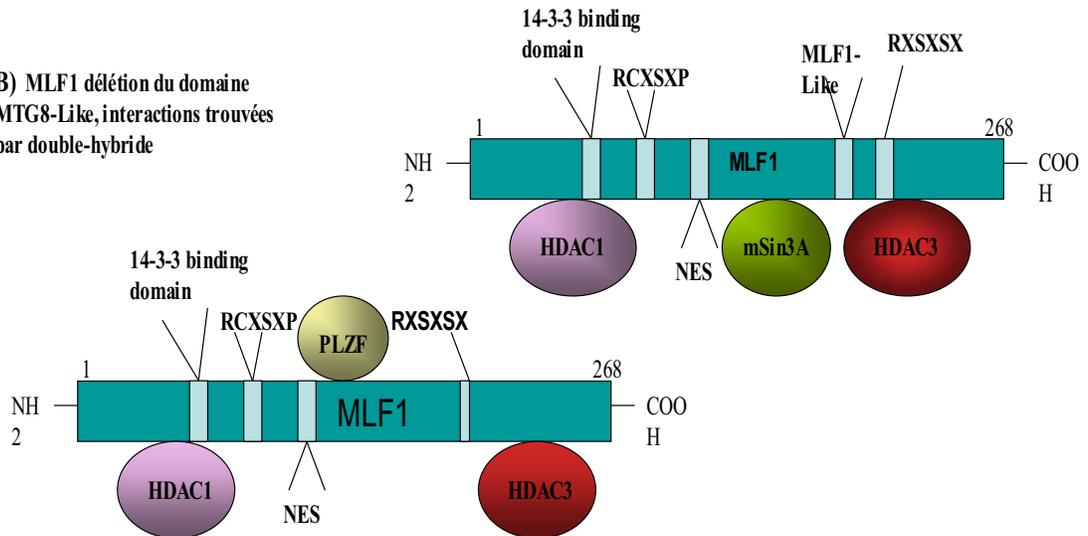
**A)**

**A) MLF1 normale interactions trouvées par double-hybride**



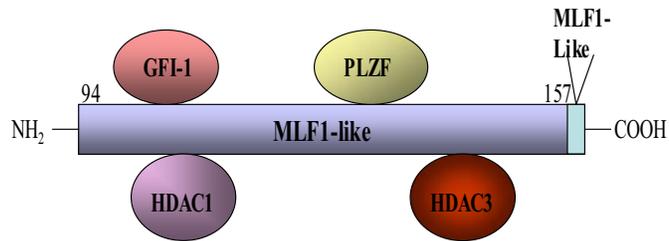
**C) MLF1 normale interactions trouvées par IP**

**B) MLF1 délétion du domaine MTG8-Like, interactions trouvées par double-hybride**

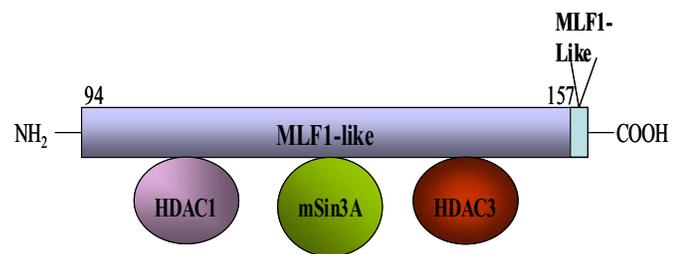


**B)**

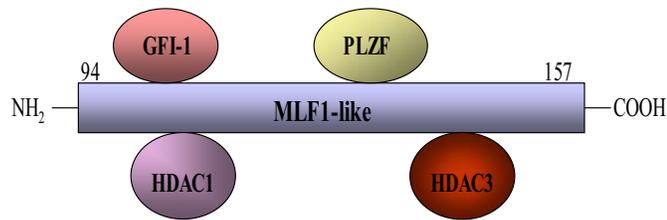
**A) MLF1-like normale**  
interactions trouvées par double-hybride



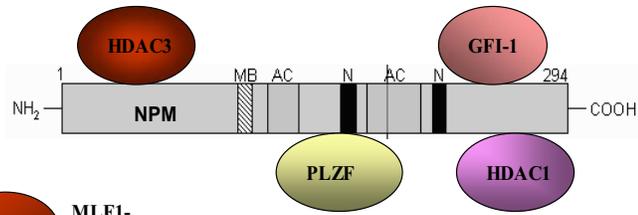
**C) MLF1-like normale**  
interactions trouvées par IP



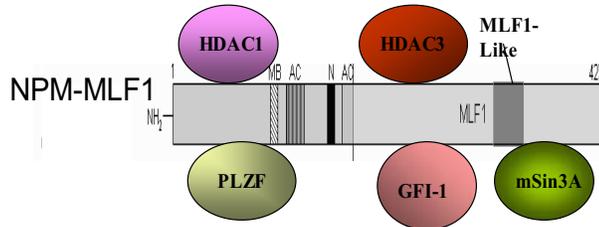
**B) MLF1-like délétion du domaine MTG8-Like, interactions trouvées par double-hybride**



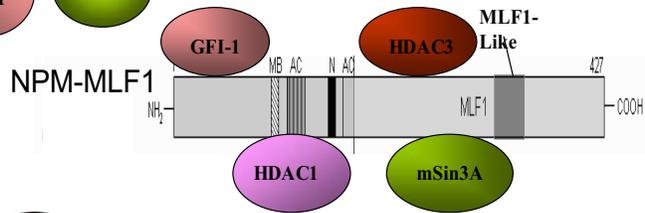
**A) NPM normale interaction trouvées par double-hybride**



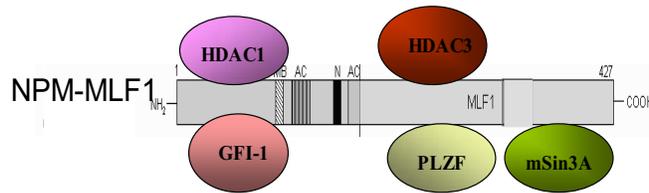
**B) NPN-MLF1 interactions trouvées par double-hybride.**



**C) MLF1 normale interaction trouvées par IP**

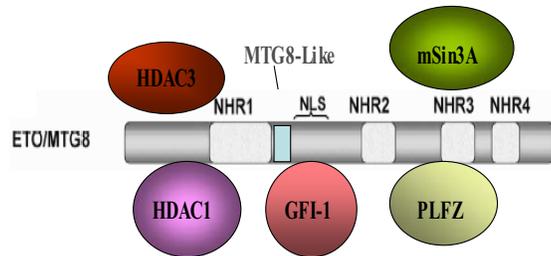


**D) NPM-MLF1 délété du domaine MTG8-Like, interaction trouvées par double-hybride**

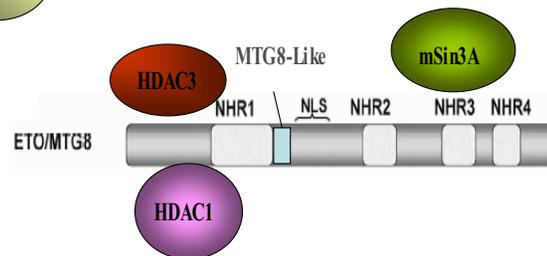


C)

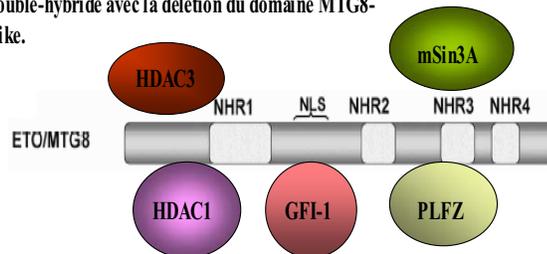
A) MTG8 (contrôle +) interactions trouvées par double-hybride.



C) MTG8 (contrôle +) normale interactions trouvées par IP



B) MTG8 (contrôle +) interactions trouvées par double-hybride avec la délétion du domaine MTG8-Like.



**Figure 27: A), B), C) en résumé les résultats des interactions protéines/protéines par la technique du double-hybride et par la technique d'IP suggère que ces protéines interagissent ensemble, il faudrait réaliser d'autres expériences en utilisant d'autres techniques telles la méthode GST et la méthode TAP-tag pour être certaines que ces protéines interagissent fortement. Cependant, il est évident que MLF1 et NPM-MLF1 interagit avec PLZF, HDAC3 et mSin3A. Les interactions trouvées pour GFI-1 par double-hybrid doivent être vérifiées par IP. Dans cette figure, les protéines ont été placées de façon aléatoire car nous ne connaissons pas la séquence précise des protéines qui permet les interactions protéine/protéine.**

## **4. Discussion**

L'étude de la fonction d'une protéine implique souvent de connaître les partenaires d'interaction. Le but de ce projet de recherche était de vérifier l'interaction entre NPM-MLF1 et 5 autres protéines: GFI-1, PLZF, mSin3A, HDAC1 et 3 afin d'obtenir des indications sur la (les) fonction(s) de cette protéine de fusion leucémogénique qui est retrouvée dans environ 1 % de toutes les LMA. Pour ce faire, nous avons utilisé deux techniques: le double-hybride dirigé en levure et l'immunoprécipitation (IP) en cellules hématopoïétiques suivi de buvardage Western. Plus précisément, nous avons vérifié si NPM-MLF1, MLF1 et/ou NPM interagissent avec certains corépresseurs tels que mSin3A, PLZF, GFI-1, HDAC1, HDAC3. Ceci permettra d'analyser en partie le rôle de NPM-MLF1 dans les LMA. En effet, il est possible que la protéine de fusion NPM-MLF1 promouvoit des fonctions cellulaires et favorise le gain de fonction. Alternativement, la fusion de NPM et MLF1 peut induire une perte de fonction *i.e.*, la perte de fonction(s) normalement associée(s) à l'activité de NPM et/ou de MLF1.

#### **4.1 Comment le gain ou la perte de fonction de NPM et MLF1 peut-il contribuer à la leucémie?**

Pour réaliser ce projet, plusieurs objectifs devaient être atteints. Dans un premier temps, il fallait vérifier les interactions protéine/protéine avec des protéines non-mutées par double-hybride dirigé en levure. Ensuite, il fallait muter dans NPM-MLF1, MTG8 et MLF1 le domaine MTG8-Like qui est principalement formé de 12 acides aminés hautement conservés dans la famille des protéines MLF1 ainsi que les protéines de la famille de MTG8, afin de voir si en absence de ce domaine, les protéines mutées sont capables d'interagir avec les différents corépresseurs mentionnés ci-haut. Par la suite, les interactions trouvées par double-hybride dirigé en la levure ont été vérifiées par la technique d'IP en infectant les cellules K562 avec NPM-MLF1, MTG8, MLF1 et MLF1-Like pour voir s'ils interagissent avec HDAC1, HDAC3, PLZF, mSin3A ainsi que GFI-1.

#### 4.2 L'expression des protéines étudiées dans la levure.

Pour les études d'interactions protéine/protéine par double hybride chez la levure, nous avons dû exprimer les protéines dans celle-ci. L'expression de ces protéines a été vérifiée par buvardage de type Western en utilisant principalement les anticorps contre l'épitope c-myc ou bien l'épitope HA qui sont fusionnés aux différentes protéines que nous avons surexprimées dans les levures (figure 19 A) et B)). NPM-MLF1 a un poids moléculaire (PM) qui varie de 56 à 62 KDa, MLF1 37 à 40 KDa, p53 à 53 KDa, NPM a un PM qui varie de 37 à 40 KDa et MTG8 à un PM 75 à 80 KDa. Mais les protéines qui ont été extraites dans la levure ont un PM qui augmente de 5 à 10 KDa. Outre les (épitope HA ou bien myc) et les domaines de VP16 (i.e., VP16 DBD et VP16 trans-activating domain) (figure13) qui vont augmenter le poids moléculaire des protéines, des modifications post-traductionnelles de ces protéines chez la levure pourraient aussi expliquer cette variation du poids moléculaire. En effet, selon la littérature ces protéines peuvent être phosphorylées sur des sites spécifiques et, certaines de ces protéines par exemple les HDACs sont très conservées entre les espèces. Il est donc possible qu'elles subissent des modifications post-traductionnelles chez la levure. Mais dans le cadre de notre expérience, nous n'avons pas prouvé de manière expérimentale que ces protéines soient modifiées (i.e., phosphorylées) chez la levure. Pour le prouver, il aurait fallu faire un séquençage des protéines LC MS/MS et vérifier les modifications post-traductionnelles. L'explication plausible pour la variation du poids moléculaire de ces protéines est probablement le fait que nous avons utilisé des protéines de fusion exemple : myc-MLF1-DBD de VP16; HA-HDAC1-trans-activation domain de VP16 qui vont augmenter le PM des protéines. Le plasmide pGADT7 dans lequel HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF et mSin3A ont été cloné contient un Tag-HA. Il a été possible de détecter ces protéines par anti-HA et d'autres anticorps spécifiques aux protéines tels que anti-GFI-1, anti-HDAC1, anti-HDAC3, anti-PLZF, anti-mSin3A (figure 20 A) et B)). Le fait d'être capable de détecter ces protéines avec leur anticorps spécifique et l'anticorps dirigé contre le Tag-HA nous prouve que ce ne sont pas les HDACs et le mSin3A

endogènes chez la levure que nous détectons par buvardage de type Western, mais bel et bien les protéines que nous avons exprimées chez la levure.

#### **4.3 Second double-hybride réalisé afin de voir si les interactions protéine/protéine trouvées dans MLF1, NPM-MLF1 et MLF1-Like sont dues à la présence du domaine MTG8-Like.**

Le deuxième objectif du projet avait pour but de confirmer notre hypothèse, c'est-à-dire de vérifier si les interactions trouvées se font via quelques acides aminés hautement conservés entre les protéines de la famille des MLF1 et les protéines de la famille MTG8. Ces acides aminés se retrouvent dans le domaine MTG8-Like (12 a.a.) de MLF1, MTG8, NPM-MLF1. Pour se faire, les 12 acides aminés en question ont été enlevés par mutagenèse dirigée dans chacune de ces protéines. Il n'y a pas eu de différence entre la première expérience de double-hybride avec les protéines normales et la seconde avec les protéines mutées qui ne contenant pas les 12 a.a. De ce fait, les interactions ne sont pas influencées par la perte du domaine MTG8-Like. Cependant, dans la majorité des cas, lorsqu'on compare le double-hybride fait avec les protéines normales et ceux fait avec les protéines mutées, la couleur bleue des colonies sur petris YPD/-Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal et YPD/-Leu/-Trp/ + X-Gal était plus accentuée pour les protéines mutées. Il se pourrait que le fait d'enlever les douze acides aminés change la conformation des protéines et que leur site d'interaction soit plus exposé.

#### **4.4 Un mécanisme de répression dû à des interactions protéine/protéine fortes est soupçonné chez la levure.**

Lors du double-hybride, il n'a pas été facile de déterminer les interactions protéine/protéine car, pour certains échantillons, après trois ou quatre essais les résultats n'étaient pas 100 % identiques. C'est-à-dire que certaines interactions n'étaient pas toujours détectables. Il y a donc eu des problèmes dans la reproductibilité des résultats. Il était donc nécessaire de vérifier aussi ces interactions

par IP en cellules mammifères. Lors du double-hybride, selon les observations, comparativement aux contrôles positifs (p53/T, MTG8 vs HDAC1, 3, GFI-1, PLZF, mSin3A) et le contrôle négatif (Lam/T), certaines interactions pourraient être considérées comme étant fortes et d'autres faibles. Par contre, il est possible que les interactions qui nous semblent faibles (*i.e.*, interactions ne formant que de petites colonies sur les différents milieux de sélections) soient en fait, des interactions fortes. En effet, les protéines HDAC1, HDAC3, mSin3A, PLZF et GFI-1 sont des répresseurs transcriptionnels. Il se pourrait que ces protéines de mammifère surexprimées chez la levure puissent être utilisées dans un mécanisme de répression transcriptionnelle. Puisque ces protéines sont en fusion avec un activateur fort *i.e.*, le domaine de transactivation de VP16, ces protéines pourraient réprimer de façon partielle le gène de sélection qui permet la croissance des levures sur les différents milieux, ce qui peut résulter en une faible croissance chez certains échantillons de levures caractérisés par des petites colonies. Dans le cadre de notre expérience, les interactions induisant la répression n'ont pas été vérifiées directement et ceci est donc une hypothèse pour expliquer que certaines interactions résultaient en une croissance limitée des levures sur milieux de sélection. Aussi, l'homologie de séquence des HDAC1 et 3 de la levure et de l'humain est très élevée, il est donc possible que les HDACs et le mSin3A que nous avons surexprimées chez la levure interagissent fortement avec MLF1, NPM-MLF1 etc lors de l'essai double-hybride dirigé en levure.

#### **4.6 Partenaires d'interactions de NPM et fonction biologique**

Nos résultats de l'étude du double-hybride suggèrent que NPM interagit avec GFI-1, mSin3A ainsi que PLZF (figure 21 (C)) partiellement. À ce jour, des problèmes de qualité d'anticorps commerciaux ainsi que l'expression faible de GFI-1 et PLZF dans toutes les lignées de cellules hématopoïétiques de mammifère que nous avons vérifiées, nous ont empêchés de confirmer ces interactions par IP. De ce fait, pour être en mesure d'immunoprécipiter ces protéines (PLZF et GFI-1), il faut faire des

extractions protéiques à partir d'une grande quantité de cellules après avoir surexprimé ces protéines dans les cellules K562. Aussi, nous avons essayé de réaliser des IP pour NPM afin de vérifier s'il interagit avec HDAC1 et 3. Ces IP n'ont pas fonctionné. Hypothétiquement, ces IP pourraient ne pas marcher pour la raison suivante: NPM est phosphorylé par plusieurs kinases, y compris la kinase nucléaire II, la kinase 2 de caséine, la kinase 1 et les kinases cyclin-dépendantes (CDK1 et 2). Chez les mammifères, ces phosphorylations modulent l'activité et la fonction de NPM (Tarapore P, 2006). De plus, les HDACs sont aussi phosphorylées et cette phosphorylation modifie leur activité. Donc, ces modifications post-traductionnelles pourraient inhiber certaines interactions. Cependant, selon Liu *et al.*, (2007) NPM interagit avec HDAC1, ceci a été démontré par la technique d'IP. De ce fait, les IP de NPM seront recommencées car, nous ne savons pas si la phosphorylation inhibe ou non les interactions NPM-HDACs. Dans le cas où ces autres IP ne fonctionneront pas, d'autres méthodes qui permettent de vérifier des interactions protéine/protéine tel que la méthode GST (glutathione Sulfo Transférase) sera utilisées. La méthode GST est une technique qui permet de tester la liaison d'une protéine X avec une Protéine Y. Pour cela, la protéine X va être fusionnée avec la GST (entre les deux il y a un site de digestion à la thrombine) et la protéine Y sera marquée. Ensuite, la protéine X sera fusionnée sur des billes de glutathione sépharose suivit de l'ajouter de la protéine Y en présence d'une grande quantité de protéines compétiteurs. Finalement, un lavage sera effectué suivit de la sédimentation des billes puis l'analyse. Aussi, lors du double-hybride, nous n'avons obtenu aucune évidence que NPM soit capable d'interagir avec HDAC1 et HDAC3. Il est possible que nous ne puissions détecter les interactions 'possiblement fortes' parce qu'il y a un recrutement abondant de HDAC1 et HDAC3, au promoteur des gènes rapporteurs de levures qui induit une répression de ceux-ci. Donc, par un mécanisme de répression *i.e.*, les HDACs recrutés compétitionnent avec le domaine de trans-activation de VP16 qui se retrouve en fusion avec eux et empêche l'activation des gènes rapporteurs chez la levure et il n'y a pas eu de croissance des levures. **Étant donné que par double-hybride nous avons des évidences que NPM pourrait interagir légèrement avec GFI-1, PLZF**

**et mSin3A, cette étude suggère que NPM puisse former un complexe avec les répresseurs transcriptionnels mSin3A, GFI-1 et PLZF.** Effectivement, selon la littérature NPM peut agir comme un co-facteur et favoriser la répression transcriptionnelle (Liu H, 2007). NPM normale est un régulateur clé dans l'hématopoïèse (Feuerstein et al., 1988). Si les IP qui vont être réalisés dans les cellules érythroleucémiques K562 confirment que NPM interagit avec ces co-répresseurs, nous pourrions supposer que dans les cellules hématopoïétiques, lors de l'hématopoïèse NPM peut réprimer la transcription de certains gènes. Le mécanisme par lequel NPM pourrait réprimer certains gènes demeure cependant obscur. Donc, il serait intéressant de vérifier si certains gènes sont effectivement réprimés par NPM dans les cellules primaires de la moelle osseuse et si oui, nous pourrions vérifier si GFI-1 et/ou mSIN3A sont recrutés avec NPM aux régions de régulation de gènes cibles potentiels (par immunoprécipitation de la chromatine).

#### **4.7 Partenaires d'interactions de NPM-MLF1 et fonction biologique**

Nos résultats de l'étude d'interactions protéine/protéine par les techniques de double-hybride dirigé en levure et d'IP dirigé en cellules K562 suggèrent que NPM-MLF1 interagit partiellement ou fortement avec HDAC1, HDAC3, PLZF, mSin3A et GFI-1 (figure 21 (A)). Dans le cas de GFI-1, **les évidences d'interaction** trouvée avec NPM-MLF1 a été détectée uniquement par la technique de double-hybride. Nous n'avons pas obtenu ce résultat par IP puisque l'expression de GFI-1 est faible dans les cellules hématopoïétiques que nous utilisons. Cependant, dans le cas de PLZF, nous avons eu le temps d'extraire des protéines d'une grande quantité de cellules afin de prouver aussi par IP que PLZF interagit avec NPM-MLF1 (figure 25 (B)). Le fait que NPM-MLF1 interagit avec ces co-répresseurs par double-hybride et/ou par IP suggère que la protéine de fusion pourrait jouer un rôle dans la transcription des gènes et le contrôle de l'expression des gènes. Tout comme une autre protéine de fusion retrouvée fréquemment dans les LMA, AML1-ETO (Gozzini A, 2005), il est possible que lorsque NPM-MLF1 est présente dans la cellule, elle est capable de se lier avec le

complexe de co-répresseur mSin3A qui contient des HDACs **car, l'IP de la figure 24** **démontre que NPM-MLF1 interagit faiblement avec mSin3A**. Une fois présent, ce complexe est capable de déacétyler les histones via les HDACs afin que l'ADN soit fortement enroulé autour des nucléosomes ce qui empêche l'expression de certains gènes (Gozzini A, 2005). De plus, selon la littérature l'interaction spécifique de mSin3A avec plusieurs domaines spécifiques de facteurs de transcription permet de lier l'activité du complexe corépresseur mSin3A à plusieurs voies de signalisation et de l'associer à plusieurs processus biologiques. À l'avenir, pour savoir le rôle de NPM-MLF1 dans l'hématopoïèse et de savoir l'expression de quels gènes elle est capable de déréguler; il sera nécessaire de faire une vérification de l'expression des gènes à l'aide de micro-puces d'ADN en présence de NPM-MLF1.

#### **4.8 Partenaires d'interactions de MLF1 et de MLF1-Like ainsi que leur fonction biologique.**

Nos résultats de l'étude d'interactions protéine/protéine par double-hybride suggèrent que MLF1 et MLF1-Like interagissent fortement avec PLZF, et faiblement avec HDAC1 et HDAC3 puisqu'il n'y a pas eu des colonies sur milieux YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/-Ade mais, il y a eu une forte coloration bleue sur milieux YPD/-Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal et YPD/-Leu/-Trp/ + X-Gal. Le même résultat a été obtenu pour GFI-1 sauf que la couleur bleue était moins accentuée pour les HDACs (tableau VIII) et (figure 21). Selon les résultats de l'IP, il y a des évidences que MLF1 et MLF1-Like interagissent avec HDAC1 et 3 mais la détection western ne te permet pas de confirmer avec certitude ces interactions à cause d'une faible bande dans le mock (contrôlr négatif) (figure 23, 24, 25). De ce fait, la méthode TAP tag sera utilisée afin de clarifier les résultats. La méthode TAP-tag est une technique qui permet la purification de complexes protéiques sous forme native en utilisant une étiquette en particulière appelée TAP (Tandem Affinity Purification) (Puig O, 2001; Rigaut G, 1999). Le système du TAP tag est une méthode de purification par affinité. Cette méthode consiste à étiqueter une protéine dont on sait qu'elle interagit avec le complexe d'intérêt, elle permet d'exprimer cette protéine dans le parasite puis, après

extraction des protéines en conditions non dénaturantes, il est possible de purifier et d'analyser les protéines qui lui sont associées. Les interactions trouvées pour GFI-1 et PLZF avec ces deux protéines ont été vérifiées uniquement par la technique de double-hybride dirigée en levure. Il n'a pas été possible de vérifier ces interactions par IP parce que GFI-1 n'est pas exprimé et PLZF est faiblement exprimée dans les cellules mammifères K562. Aussi, l'interaction de MLF1 et MLF1-Like avec mSin3A a été trouvée uniquement par IP (figure 24 (A)). Selon l'analyse buvardage de type western, cette interaction est faible parce que nous avons alors obtenu une bande de faible intensité sur la membrane de nitrocellulose **due à la faible quantité de protéine (1 mg) utilisée lors de l'IP** (figure 24). Aussi, durant le double-hybride, il a été plus facile de déterminer les interactions avec MLF1-Like comparativement à MLF1. En effet, lors des essais d'interaction protéine/protéine, sur petris YPD/-Leu/-Trp/ + X- $\alpha$ -Gal et YPD/-Leu/-Trp/ + X-Gal la couleur bleue des colonies de levure était très intense et sur petris YPD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, YPD/-Leu/-Trp/-Ade, la croissance des colonies MLF1-Like était toujours supérieure à celle contenant MLF1 (figure 21 (A), (B), (C)). Il est possible que cette différence entre MLF1 et MLF1-Like soit due au fait que la protéine MLF1-Like (une partie de MLF1) est plus petite que MLF1 et que son repliement soit différent. Les sites d'interactions sont possiblement plus exposés. Ainsi, l'expression des gènes de la levure qui permet de voir ces interactions est plus élevée. Il y a plus de croissance de levures parce que les activités enzymatiques sont plus élevées. Des modifications post-traductionnelles peuvent modifier suffisamment la conformation de la protéine afin de masquer ou d'exposer les sites de liaisons de MLF1. La modification post-traductionnelle la plus probable dans ce cas-ci est la phosphorylation. En effet, selon Lim. R *et al.* (2002) Madm recrute une sérine kinase qui phosphoryle Mlf1 au niveau du RSXSXP motif. Cette phosphorylation est importante pour la liaison de MLF1 et 14-3-3. Alors, nous pouvons supposer que cette phosphorylation modifie la structure 3D de MLF1 en favorisant ou diminuant ces interactions avec d'autres protéines. D'autres modifications post-traductionnelles de MLF-1 pourraient jouer un rôle similaire dans les interactions MLF-1 avec d'autres protéines. Donc, MLF1-Like qui est une partie

de MLF1 semble avoir permis de détecter des interactions protéine/protéine par double-hybride avec plus de certitude parce que la conformation 3D de cette protéine favorise plus les interactions protéine/protéine comparativement à MLF1.

Selon la littérature, une surexpression de MLF1 peut induire la leucémie. Il est proposé que MLF1 soit capable de se lier à l'ADN et d'affecter l'expression de gènes incluant des gènes codant pour des facteurs de transcription (Winteringham et al., 2006). La façon dont MLF1 influence l'expression des gènes n'est pas claire, cet effet peut être directement lié à sa liaison à l'ADN ou directement par son interaction avec ses partenaires nucléaires tel que Manp (Winteringham et al., 2004). Il y a une possibilité que MLF1 agit de concert avec Manp pour induire la leucémie lorsqu'ils dérégulent les gènes (Winteringham et al., 2004). Nos résultats suggèrent que MLF1 et MLF1-Like pourrait interagir **faiblement ou fortement** avec différents corépresseurs tels que HDAC1, HDAC3, GFI-1, PLZF et mSin3A. Il est possible que MLF1 soit capable d'affecter l'expression de plusieurs gènes par sa liaison avec ces différents co-répresseurs. Tout comme NPM-MLF1, lorsque MLF1 forme le complexe de corépresseurs avec les HDACs, mSin3A, etc. ce complexe est capable de déacétyler les histones via les HDACs afin que l'ADN soit fortement enroulé autour des nucléosomes ce qui empêche l'expression de certains gènes (Gozzini A, 2005). De plus, un renforcement de l'expression du MLF1 murin perturbe le développement des colonies érythroïdes chez les précurseurs de l'hématopoïèse normale et différencie les précurseurs érythroïdes en progéniteurs myéloïdes (Williams JH, 1999; Yoneda-Kato et al., 1996). Vu que MLF1 et MLF1-Like interagissent avec différents co-répresseurs, il se pourrait que lorsqu'il y a beaucoup de MLF1 dans les cellules hématopoïétiques, il y a plus de chance que la protéine MLF1 rencontre ces co-répresseurs pour former un complexe qui va réprimer l'expression de certains gènes qui permettent la formation des cellules érythroïdes. Tout comme NPM, il serait intéressant de vérifier si certains gènes sont effectivement réprimés par MLF1 dans les cellules hématopoïétiques et si oui, nous pourrions

vérifier si ces co-facteurs sont recrutés par MLF1 aux régions de régulation de gènes cibles potentiels (par immunoprécipitation de la chromatine).

#### **4.9 Fonctions dans lesquelles NPM-MLF1, NPM et MLF1 pourraient être impliqués selon les protéines avec lesquelles elles interagissent.**

Lors de cette étude, la technique de double-hybride et d'IP nous a suggéré que NPM-MLF1, MLF1, NPM, MLF1-Like et MTG8 (contrôle positif) interagissent avec **certains** co-répresseurs. Le fait que ces protéines interagissent avec **différents** corépresseurs nous laisse supposer qu'elles sont fortement impliquées dans la régulation de l'expression de gènes et plus précisément que NPM-MLF1 puisse empêcher l'expression de certains gènes nécessaires pour une hématopoïèse normale, ce qui pourrait induire la leucémie. Pour confirmer cette hypothèse, il faut réaliser d'autres expériences en utilisant d'autres techniques de biologie moléculaire telles que les puces à ADN, l'immunoprécipitation de la chromatine et l'interférence à l'ARN. Il est important de pousser plus loin cette étude car, la répression de la transcription de différents gènes peut modifier certains mécanismes cellulaires contrôlés par les protéines qui doivent être formées à partir des gènes modulés par ces répresseurs transcriptionnels.

Le fait **qu'il y a des évidences que NPM-MLF1 pourraient** interagir avec mSin3A et les HDACs suggère qu'ils peuvent être impliqués dans l'un ou plusieurs de ces processus cellulaires comme la prolifération, la survie cellulaire, la modification des histones et la transformation cellulaire (Dannenberget al., 2005) ainsi que la différenciation cellulaire. Ils peuvent être aussi impliqués dans la régulation de différents gènes du cycle cellulaire et des gènes importants pour d'autres mécanismes cellulaires car, mSin3A joue un rôle essentiel dans chacun des ces mécanismes.

Le fait que PLZF interagit avec les protéines NPM-MLF1, MLF1 et **légèrement avec NPM** indique que ces protéines peuvent être impliquées dans une

variété de processus de développement importants tels que l'homéostasie, l'apoptose, la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation, la localisation sub-nucléaire et la répression de la transcription lors de l'embryogénèse (Horowitz and Berg, 1996; Melnick et al., 2002). De plus, lorsque PLZF interagit avec les corépresseurs nucléaires, cela affecte la dé-acétylation des histones (Shaknovich et al., 1998). Le domaine BTB/POZ de PLZF est aussi fortement impliqué dans la régulation de l'expression des gènes au niveau de la conformation locale de la chromatine (Rho SB, 2006). PLZF peut induire une résistance à l'apoptose en inhibant la transcription des gènes pro-apoptotiques (BID), un membre de la famille Bcl-2 (Parrado et al., 2004). Nous pensons que NPM-MLF1, MLF1 et NPM pourraient être impliquées dans ces mécanismes induits par PLZF. Car l'interaction physique directe de ces protéines nous laisse supposer qu'elles sont capables de se lier pour remplir des fonctions similaires dans la cellule.

Dans le cas de GFI-1, les résultats du double-hybride suggèrent qu'il soit capable d'interagir avec MLF1-Like, NPM-MLF1 et NPM. Si ces interactions sont confirmées par IP ou par la technique de GST ou TAP-tag, il sera pertinent de vérifier si par exemple, NPM-MLF1 altère les fonctions cellulaires que GFI-1 influence *i.e.*, la régulation de l'auto-renouvellement et l'intégrité fonctionnelle des CSHs (McGhee et al., 2003). En effet, GFI-1 est essentiel pour restreindre la prolifération des HSCs et le maintient de leur intégrité fonctionnelle dans la moelle osseuse adulte. GFI-1 régule la différenciation des cellules hématopoïétiques et leur survie (McGhee et al., 2003). Il est un important régulateur transcriptionnel qui opère sur plusieurs grandes fenêtres du développement hématopoïétique. De plus, GFI-1 est capable de lier l'ADN et réprimer la transcription. En effet, il interagit avec ETO (MTG8) *in vitro* et *in vivo* ainsi que les HDAC 1, 2 et 3 *in vivo* (McGhee et al., 2003). Donc, GFI-1 réprime la transcription en recrutant des HDACs (Miyoshi et al., 1991; Erickson et al., 1996). Ainsi, GFI-1 semble jouer un rôle dans plusieurs événements cellulaires incluant, la prolifération, l'apoptose, la spécification du destin cellulaire, la différenciation et l'oncogenèse (Jafar-Nejad and Bellen, 2004). Donc, NPM, MLF1-

Like et NPM-MLF1 pourraient être impliquées dans certains mécanismes (répression de la transcription des gènes) pour lesquels GFI-1 est le principal régulateur.

Pour que l'histoire des protéines qui interagissent avec NPM-MLF1, MLF1, MLF1-Like, NPM, MTG8 soit complète, il faut faire d'autres IP pour voir si MTG8, MLF1, NPM interagissent avec PLZF. Aussi, il faut faire d'autres IP pour vérifier si NPM interagit avec PLZF, mSin3A, HDAC1, HDAC3. Entre autre, il faut infecter les cellules K562 avec GFI-1 afin de voir si cette protéine interagit avec MTG8, MLF1, NPM, NPM-MLF1 et MLF1-Like par IP.

#### **4.10 Conclusion**

Cette étude d'interactions protéine/protéine a permis de connaître certains partenaires de NPM-MLF1, MLF1, NPM qui sont des co-répresseurs. On sait que chacune des protéines citées joue un rôle important dans les LMA. Le but de l'étude, était d'analyser en partie le rôle de NPM-MLF1 dans le cancer et d'examiner comment son activité est dérégulée afin de contribuer à la leucémie. Comment le gain ou la perte de fonction de NPM et MLF1 peut-il contribuer à la leucémie? Le fait de trouver que des corépresseurs interagissent avec ces protéines nous suggère que le rôle de NPM-MLF1 dans la leucémie est de contrôler la régulation de l'expression de certains gènes. Il se pourrait que lorsque la protéine se lie avec ces corépresseurs, elle empêche l'expression des gènes importants qui jouent un rôle dans l'hématopoïèse. Le fait d'empêcher l'expression de ces gènes pourrait favoriser l'apparition de la leucémie. Car, l'absence d'un gène ou une mutation dans les deux allèles peut provoquer une maladie. Pour remédier à cette situation, l'interférence à l'ARN pourrait être utilisée afin d'empêcher l'expression de NPM-MLF1. Aussi, des inhibiteurs des corépresseurs surtout les HDACs pourraient être utilisés afin de permettre l'expression de certains gènes importants qui pourraient jouer un rôle dans l'hématopoïèse et d'avoir une hématopoïèse normale. De plus, il est possible que NPM-MLF1 favorise la leucémie en induisant une perte de fonction de NPM et/ou

MLF1. De ce fait, la régulation de certains gènes normalement régulés par NPM ou bien MLF1 devrait être modifiée lorsqu'il y a translocation NPM-MLF1, ce qui peut favoriser la leucémie. En effet, Falini *et al.*, (2006) a démontré que NPM-MLF1 est au cytoplasme et au noyau alors que MLF1 est majoritairement localisé au cytoplasme. De plus, l'autre allèle de NPM qui ne fait pas partie de la translocation produit un NPM normal qui interagit avec le NPM-MLF1 ce qui le relocalise, en partie, dans le cytoplasme. Ceci, favoriserait la leucémie parce que NPM est important dans la régulation de la voie ARF-p53. Donc, NPM ne peut plus jouer son rôle normal dans le nucléole et possiblement dans la régulation génique. Cela suggère que le cytoplasme des cellules LMA contient un NPM muté ou une protéine de fusion réciproque MLF1-NPM ou encore plus de NPM sauvage (Falini et al., 2006). Il est impossible d'éliminer toutes les mutations ou de les empêcher d'apparaître. La chose la plus plausible, ce n'est pas d'empêcher la maladie, mais de connaître les mécanismes qui l'induisent afin de produire des médicaments qui vont empêcher ces mécanismes ou de trouver d'autres techniques scientifiques ou médicales qui vont reverser ces mécanismes induisent par les mutations afin de soulager les personnes qui en souffrent. Des études comme celle-ci, permettant de déterminer en partie les mécanismes par lesquels la protéine de fusion favorise le développement du cancer **et** pourraient contribuer à l'élaboration d'un procédé qui renverse le processus de néoplasie chez les patients qui souffrent des LMA dû à la présence de la protéine de fusion NPM-MLF1.

## **5. Références**

Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., *et al.* (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* *121*, 295-306.

Alcalay M, O.A., Sebastiani C, Meani N, Chiaradonna F, Casciari C, Scirpi MT, Gelmetti V, Riganelli D, Minucci S, Fagioli M, Pelicci PG. (2001). Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncogene* *10;20(40):5680-94*.

Alcalay, M., Tiacci, E., Bergomas, R., Bigerna, B., Venturini, E., Minardi, S.P., Meani, N., Diverio, D., Bernard, L., Tizzoni, L., *et al.* (2005). Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood* *106*, 899-902.

Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I., and Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* *433*, 77-83.

Aparicio, J.G., Viggiani, C.J., Gibson, D.G., and Aparicio, O.M. (2004). The Rpd3-Sin3 histone deacetylase regulates replication timing and enables intra-S origin control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* *24*, 4769-4780.

Arber, D.A., Chang, K.L., Lyda, M.H., Bedell, V., Spielberger, R., and Slovak, M.L. (2003). Detection of NPM/MLF1 fusion in t(3;5)-positive acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Human pathology* *34*, 809-813.

Ayer, D.E. (1999). Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends in cell biology* *9*, 193-198.

Ayer, D.E., Lawrence, Q.A., and Eisenman, R.N. (1995). Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* *80*, 767-776.

Ball, H.J., Melnick, A., Shakhovich, R., Kohanski, R.A., and Licht, J.D. (1999). The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase. *Nucleic acids research* *27*, 4106-4113.

Bartl S, T.J., Lagger G, Khier H, Kuchler K, Seiser C. (1997). Identification of mouse histone deacetylase 1 as a growth factor-inducible gene. *Mol Cell Biol* *(9):5033-43*.

Baruchel, S.a.D. (2002). Diagnostic des leucémies aiguës CHUP.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute

myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103, 620-625.

Bertwistle, D., Sugimoto, M., and Sherr, C.J. (2004). Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Molecular and cellular biology* 24, 985-996.

Borer RA, L.C., Eppenberger HM, Nigg EA. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *cell* 10;56(3):379-90.

Bourgoin, V. (2005). Caractérisation de l'oncogène MLF1 (Myeloid Leukemia Factor 1).

Brosens JJ, G.B. (2006). Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol* 36(3):389-98.

Caligiuri MA, B.R., Yu J, Wang L, Wei M, Arnoczky KJ, Marburger TB, Wen J, Perrotti D, Bloomfield CD, Whitman SP. (2007). Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood* 1;110(3):1022-4.

Catenacci, D.V., and Schiller, G.J. (2005). Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. *Blood reviews* 19, 301-319.

Chang, J.H., and Olson, M.O. (1990). Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *The Journal of biological chemistry* 265, 18227-18233.

Chang, K.L., O'Donnell, M.R., Slovak, M.L., Dagens, A.C., Arber, D.A., Niland, J.C., and Forman, S.J. (2002). Primary myelodysplasia occurring in adults under 50 years old: a clinicopathologic study of 52 patients. *Leukemia* 16, 623-631.

Chatterjee, A., Busch, R.K., Jung, D., Zhang, W.W., and Busch, H. (1991). Purification of a group of HeLa nuclear proteins that bind to a regulatory element (-1430/-1327) of the human proliferating cell nucleolar protein P120 gene. *Biochemical and biophysical research communications* 180, 805-812.

Choi JH, K.H., Yoon BI, Kim JH, Han SU, Joo HJ, Kim DY. (2001). Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res* 92(12):1300-4.

Colombo, E., Bonetti, P., Lazzerini Denchi, E., Martinelli, P., Zamponi, R., Marine, J.C., Helin, K., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2005). Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Molecular and cellular biology* 25, 8874-8886.

Colombo, E., Marine, J.C., Danovi, D., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nature cell biology* 4, 529-533.

Cowger, J.J., and Torchia, J. (2006). Direct association between the CREB-binding protein (CBP) and nuclear receptor corepressor (N-CoR). *Biochemistry* 45, 13150-13162.

Cowley SM, I.B., Mendrysa SM, Xu T, Cheng PF, Yada J, Liggitt HD, Eisenman RN. (2005). The mSin3A chromatin-modifying complex is essential for embryogenesis and T-cell development. *Mol Cell Biol* (16):6990-7004.

Cress WD, S.E. (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 184(1):1-16.

Dangond F, H.D., Tong JK, Randall J, Kojima R, Utku N, Gullans SR. (1998). Differential display cloning of a novel human histone deacetylase (HDAC3) cDNA from PHA-activated immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* 242(3):648-52.

Dannenbergh, J.H., David, G., Zhong, S., van der Torre, J., Wong, W.H., and Depinho, R.A. (2005). mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes & development* 19, 1581-1595.

Davis JN, M.L., Meyers S. (2003). The ETO (MTG8) gene family. *Gene* 303:1-10.  
Davis JN, W.B., Herron JT, Galiano FJ, Meyers S. (1999). ETO-2, a new member of the ETO-family of nuclear proteins. *Oncogene* 18(6):1375-83.

de Figueiredo LL, d.A.e.L.R., Rego EM. (2004). Granulocyte colony-stimulating factor and leukemogenesis. *Mediators Inflamm* 13(3):145-50.

De Nadal E, Z.M., Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, Posas F. (2004). The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoreponsive genes. *Nature* 427(6972):370-4.

Dergunova, N.N., Bulycheva, T.I., Artemenko, E.G., Shpakova, A.P., Pegova, A.N., Gemjian, E.G., Dudnik, O.A., Zatsepina, O.V., and Malashenko, O.S. (2002). A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. *Immunology letters* 83, 67-72.

Dhordain P, A.O., Honore N, Guidez F, Lantoine D, Schmid M, The HD, Zelent A, Koken MH. (2000). Colocalization and heteromerization between the two human oncogene POZ/zinc finger proteins, LAZ3 (BCL6) and PLZF. *Oncogene* 19(54):6240-50.

Downing, J.R. (1999). The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. *British journal of haematology* *106*, 296-308.

Duan, Z., and Horwitz, M. (2003a). Gfi-1 oncoproteins in hematopoiesis. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* *8*, 339-344.

Duan, Z., and Horwitz, M. (2003b). Targets of the transcriptional repressor oncoprotein Gfi-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 5932-5937.

Duan, Z., and Horwitz, M. (2005). Gfi-1 takes center stage in hematopoietic stem cells. *Trends in molecular medicine* *11*, 49-52.

Dunbar CE, N.A. (1995). Myelodysplastic syndromes. *Blood Principles & Practice of Hematology. J Biol Chem* *377-414*.

Erickson PF, D.G., Lasher RS, Philips G, Robinson M, Drabkin HA. (1996). ETO and AML1 phosphoproteins are expressed in CD34+ hematopoietic progenitors: implications for t(8;21) leukemogenesis and monitoring residual disease. *Blood* *88(5):1813-23*.

Estey, E., and Dohner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *Lancet* *368*, 1894-1907.  
Falini, B., Bigerna, B., Pucciarini, A., Tiacci, E., Mecucci, C., Morris, S.W., Bolli, N., Rosati, R., Hanissian, S., Ma, Z., *et al.* (2006). Aberrant subcellular expression of nucleophosmin and NPM-MLF1 fusion protein in acute myeloid leukaemia carrying t(3;5): a comparison with NPMc+ AML. *Leukemia* *20*, 368-371.

Falini B, B.N., Shan J, Martelli MP, Liso A, Pucciarini A, Bigerna B, Pasqualucci L, Mannucci R, Rosati R, Gorello P, Diverio D, Roti G, Tiacci E, Cazzaniga G, Biondi A, Schnittger S, Haferlach T, Hiddemann W, Martelli MF, Gu W, Mecucci C, Nicoletti I. (2006). Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood* *1;107(11):4514-23*.

Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., *et al.* (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England journal of medicine* *352*, 254-266.

Falini, B., Nicoletti, I., Bolli, N., Martelli, M.P., Liso, A., Gorello, P., Mandelli, F., Mecucci, C., and Martelli, M.F. (2007). Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* *92*, 519-532.

Feuerstein, N., Chan, P.K., and Mond, J.J. (1988). Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals. *The Journal of biological chemistry* 263, 10608-10612.

Feuerstein, N., and Randazzo, P.A. (1991). In vivo and in vitro phosphorylation studies of numatrin, a cell cycle regulated nuclear protein, in insulin-stimulated NIH 3T3 HIR cells. *Experimental cell research* 194, 289-296.

Fleischer, T.C., Yun, U.J., and Ayer, D.E. (2003). Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex. *Molecular and cellular biology* 23, 3456-3467.

Fonagy A, S.C., Ostrovsky AM, Bolton WE, Freeman JW. (1994). Effect of nucleolar P120 expression level on the proliferation capacity of breast cancer cells. *Cancer Res* 1;54(7):1859-64.

Friedman, A.D. (2002). Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 21, 3377-3390.

Frohling, S., Schlenk, R.F., Breitnick, J., Benner, A., Kreitmeier, S., Tobis, K., Dohner, H., and Dohner, K. (2002). Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 100, 4372-4380.

Fukuyama T, S.E., Sugio Y, Otsuka T, Niho Y, Akagi K, Kozu T. (2001). MTG8 proto-oncoprotein interacts with the regulatory subunit of type II cyclic AMP-dependent protein kinase in lymphocytes. *Oncogene* 20(43):6225-32.

Gilks, C.B., Bear, S.E., Grimes, H.L., and Tschlis, P.N. (1993). Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *Molecular and cellular biology* 13, 1759-1768.

Gjerset, R.A., and Bandyopadhyay, K. (2006). Regulation of p14ARF through subnuclear compartmentalization. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 5, 686-690.

Glaser KB, L.J., Staver MJ, Wei RQ, Albert DH, Davidsen SK. (2003). Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 310(2):529-36.

Gozzini A, S.V. (2005). Butyrates and decitabine cooperate to induce histone acetylation and granulocytic maturation of t(8;21) acute myeloid leukemia blasts. *Ann Hematol* 84 Suppl 1:54-60.

Grant PA, B.S. (1999). Histone acetyltransferase complexes. *Semin Cell Dev Biol* 10(2):169-77.

Greenberg, P.L. (1998). Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leuk Res* 22, 1123-1136.

Grimes HL, G.C., Chan TO, Porter S, Tschlis PN. (1996). The Gfi-1 protooncprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25):14569-73.

Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., and Pandolfi, P.P. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437, 147-153.

Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., and Pandolfi, P.P. (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nature reviews* 6, 493-505.

Grisendi, S., and Pandolfi, P.P. (2005). Two decades of cancer genetics: from specificity to pleiotropic networks. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 70, 83-91.

Hanissian SH, A.U., Teng B, Janjetovic Z, Hoffmann A, Hitzler JK, Iscove N, Hamre K, Du X, Tong Y, Mukatira S, Robertson JH, Morris SW. (2004). cDNA cloning and characterization of a novel gene encoding the MLF1-interacting protein MLF1IP. *Oncogene* 23(20):3700-7.

Head, D.R. (1996). Revised classification of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 1826-1831.

Herrera, J.E., Savkur, R., and Olson, M.O. (1995). The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic acids research* 23, 3974-3979.

Hirose F, Y.M., Kuroda K, Omori A, Hachiya T, Ikeda M, Nishimoto Y, Matsukage A. (1996). Isolation and characterization of cDNA for DREF, a promoter-activating factor for Drosophila DNA replication-related genes. *J Biol Chem* 271(7):3930-7.

Hitzler, J.K., Cheung, J., Li, Y., Scherer, S.W., and Zipursky, A. (2003). GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood* 101, 4301-4304.

Hitzler, J.K., Witte, D.P., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Naeve, C.W., Look, A.T., and Morris, S.W. (1999). cDNA cloning, expression pattern, and chromosomal localization of Mlf1, murine homologue of a gene involved in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *The American journal of pathology* 155, 53-59.

Hock H, H.M., Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, Orkin SH. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431(7011):1002-7.

Hock H, H.M., Rooke HM, Traver D, Bronson RT, Cameron S, Orkin SH. (2003). Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* (1):109-20.

Hock H, O.S. (2006). Zinc-finger transcription factor Gfi-1: versatile regulator of lymphocytes, neutrophils and hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* 13(1):1-6.

Hofmann, W.K., and Koefler, H.P. (2005). Myelodysplastic syndrome. *Annual review of medicine* 56, 1-16.

Horowitz, H., and Berg, C.A. (1996). The *Drosophila* pipsqueak gene encodes a nuclear BTB-domain-containing protein required early in oogenesis. *Development* (Cambridge, England) 122, 1859-1871.

Hsieh, F.F., Barnett, L.A., Green, W.F., Freedman, K., Matushansky, I., Skoultchi, A.I., and Kelley, L.L. (2000). Cell cycle exit during terminal erythroid differentiation is associated with accumulation of p27(Kip1) and inactivation of cdk2 kinase. *Blood* 96, 2746-2754.

Itahana, K., Bhat, K.P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., and Zhang, Y. (2003). Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Molecular cell* 12, 1151-1164.

Ito A, K.Y., Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, Yao TP. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J* 21(22):6236-45.

Jafar-Nejad, H., and Bellen, H.J. (2004). Gfi/Pag-3/senseless zinc finger proteins: a unifying theme? *Molecular and cellular biology* 24, 8803-8812.

Jiang PS, Y.B. (1999). Down-regulation of nucleophosmin/B23 mRNA delays the entry of cells into mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* 21;257(3):865-70.

Johnson CA, W.D., Lavender JS, O'Neill LP, Turner BM. (2002). Human class I histone deacetylase complexes show enhanced catalytic activity in the presence of ATP and co-immunoprecipitate with the ATP-dependent chaperone protein Hsp70. *J Biol Chem* 277(11):9590-7.

K., Ye. (2005). Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther* 4(9):918-23.

Karsunky, H., Zeng, H., Schmidt, T., Zevnik, B., Kluge, R., Schmid, K.W., Duhrsen, U., and Moroy, T. (2002). Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nature genetics* 30, 295-300.

Kawai H, L.H., Avraham S, Jiang S, Avraham HK. (2003). Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha. *Int J Cancer* 107(3):353-8.

Khochbin S, V.A., Lemercier C, Seigneurin-Berny D. (2001). Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* 11(2):162-6.

Kim MS, K.H., Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW. (2001). Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* (4):437-43.

King-Underwood, L., and Pritchard-Jones, K. (1998). Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* 91, 2961-2968.

Knoepfler, P.S., and Eisenman, R.N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 99, 447-450.

Koipally, J., Renold, A., Kim, J., and Georgopoulos, K. (1999). Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *The EMBO journal* 18, 3090-3100.

Koken MH, R.A., Quignon F, Chelbi-Alix MK, Davies JM, Kabarowski JH, Zhu J, Dong S, Chen S, Chen Z, Tan CC, Licht J, Waxman S, de Thé H, Zelent A. (1997). Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19):10255-60.

Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T.M., Ojala, P.M., Meek, D., and Laiho, M. (2004). Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer cell* 5, 465-475.

Kurokawa, M., and Hirai, H. (2003). Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer Sci* 94, 841-846.

Kuzmichev, A., Zhang, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Molecular and cellular biology* 22, 835-848.

Kwong, Y.L. (1998). Translocation (3;5)(q21;q34) in erythroleukemia: a molecular and in situ hybridization study. *Cancer genetics and cytogenetics* 103, 15-19.

Laherty, C.D., Yang, W.M., Sun, J.M., Davie, J.R., Seto, E., and Eisenman, R.N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-356.

Lam YW, T.-M.L., Lamond AI (2005). The nucleolus. *J Cell Sci* 1;118(Pt 7):1335-7.  
Langabeer, S.E., Gale, R.E., Rollinson, S.J., Morgan, G.J., and Linch, D.C. (2002). Mutations of the AML1 gene in acute myeloid leukemia of FAB types M0 and M7. *Genes, chromosomes & cancer* 34, 24-32.

Lee DK, S.D., Edenberg HJ, Hur MW. (2002). POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1. *J Biol Chem* 277(30):26761-8.

Lee SY, P.J., Kim S, Park EJ, Yun Y, Kwon J. (2005). A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks. *Biochem J* 15;388(Pt 1):7-15.

Lim, M.J., and Wang, X.W. (2006). Nucleophosmin and human cancer. *Cancer detection and prevention* 30, 481-490.

Liu H, T.B., Tseng KH, Chuang CP, Yeh CW, Chen KD, Lee SC, Yung BY (2007). Nucleophosmin acts as a novel AP2alpha-binding transcriptional corepressor during cell differentiation. *EMBO Rep* (4):394-400.

Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* (New York, NY 278, 1059-1064.

Lopingco MC, P.A. (1996). Molecular analysis of Evi1, a zinc finger oncogene involved in myeloid leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 211:211-22.*Links*.  
Lutterbach B, H.S. (2000). Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene* 245(2):223-35.

Matsumoto, N., Yoneda-Kato, N., Iguchi, T., Kishimoto, Y., Kyo, T., Sawada, H., Tatsumi, E., and Fukuhara, S. (2000). Elevated MLF1 expression correlates with malignant progression from myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 14, 1757-1765.

Matushansky, I., Radparvar, F., and Skoultschi, A.I. (2000). Reprogramming leukemic cells to terminal differentiation by inhibiting specific cyclin-dependent kinases in G1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14317-14322.

McGhee, L., Bryan, J., Elliott, L., Grimes, H.L., Kazanjian, A., Davis, J.N., and Meyers, S. (2003). Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8)

and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *J Cell Biochem* 89, 1005-1018.

McKinsey TA, O.E. (2005). Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. *J Clin Invest* 115(3):538-46.

Mehta, A.B., and Hoffbrand, A.V. (2003). *Hématologie* (Paris, De Boeck).

Melnick, A., Carlile, G., Ahmad, K.F., Kiang, C.L., Corcoran, C., Bardwell, V., Prive, G.G., and Licht, J.D. (2002). Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors. *Molecular and cellular biology* 22, 1804-1818.

Melnick, A., and Licht, J.D. (2002). Histone deacetylases as therapeutic targets in hematologic malignancies. *Current opinion in hematology* 9, 322-332.

Melnick AM, W.J., Polinger A, Carlile GW, Arai S, Ball HJ, Lutterbach B, Hiebert SW, Licht JD. (2000). The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 20(6):2075-86.

Mendes-da-Silva, P., Moreira, A., Duro-da-Costa, J., Matias, D., and Monteiro, C. (2000). Frequent loss of heterozygosity on chromosome 5 in non-small cell lung carcinoma. *Mol Pathol* 53, 184-187.

Meshinchi, S., Stirewalt, D.L., Alonzo, T.A., Zhang, Q., Sweetser, D.A., Woods, W.G., Bernstein, I.D., Arceci, R.J., and Radich, J.P. (2003). Activating mutations of RTK/ras signal transduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 102, 1474-1479.

Mizuki, M., Schwable, J., Steur, C., Choudhary, C., Agrawal, S., Sargin, B., Steffen, B., Matsumura, I., Kanakura, Y., Bohmer, F.D., *et al.* (2003). Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* 101, 3164-3173.

Morris, S.W., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Dittmer, K.G., Shapiro, D.N., Saltman, D.L., and Look, A.T. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* (New York, NY) 263, 1281-1284.

Mrozek, K., Dohner, H., and Bloomfield, C.D. (2007). Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Current opinion in hematology* 14, 106-114.

Mueller, B.U., Pabst, T., Osato, M., Asou, N., Johansen, L.M., Minden, M.D., Behre, G., Hiddemann, W., Ito, Y., and Tenen, D.G. (2002). Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 100, 998-1007.

Mueller BU, P.T., Fos J, Petkovic V, Fey MF, Asou N, Buergi U, Tenen DG. (2006). ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood* 107(8):3330-8.

Mufti, G., List, A.F., Gore, S.D., and Ho, A.Y. (2003). Myelodysplastic syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 176-199.

Munker, R., Hiller, E., and Paquette, R. (2000). *Modern hematology : biology and clinical management* (Totowa, N.J., Humana Press).

Murphy M, A.J., Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, George DL. (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 13(19):2490-501.

Nanba, D., Mammoto, A., Hashimoto, K., and Higashiyama, S. (2003). Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *The Journal of cell biology* 163, 489-502.

Nerlov, C., and Graf, T. (1998). PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes & development* 12, 2403-2412.

Ohno K, T.Y., Hirose F, Inoue YH, Taguchi O, Nishida Y, Matsukage A, Yamaguchi M. (2000). Characterization of a Drosophila homologue of the human myelodysplasia/myeloid leukemia factor (MLF). *Gene* 260(1-2):133-43.

Ohshima N, T.M., Hirose F. (2003). Identification of a human homologue of the DREF transcription factor with a potential role in regulation of the histone H1 gene. *J Biol Chem* 278(25):22928-38.

Okuda, M. (2002). The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 21, 6170-6174.

Okuda T, v.D.J., Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84(2):321-30.

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

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

Pabst, T., and Mueller, B.U. (2007). Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. *Oncogene* 26, 6829-6837.

Pabst, T., Mueller, B.U., Zhang, P., Radomska, H.S., Narravula, S., Schnittger, S., Behre, G., Hiddemann, W., and Tenen, D.G. (2001). Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nature genetics* 27, 263-270.

Pal, S., Yun, R., Datta, A., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Kumar, J., Tempst, P., and Sif, S. (2003). mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Molecular and cellular biology* 23, 7475-7487.

Pan F, M.A., Liu JO. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase IV regulates nuclear export of Cabin1 during T-cell activation. *EMBO J* 24(12):2104-13.

Pan HY, Z.Y., Wang XP, Deng JH, Zhou FC, Gao SJ. (2003). Identification of a novel cellular transcriptional repressor interacting with the latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 77(18):9758-68.

Parrado, A., Noguera, M.E., Delmer, A., McKenna, S., Davies, J., Le Gall, I., Bentley, P., Whittaker, J.A., Sigaux, F., Chomienne, C., *et al.* (2000). Deregulated expression of promyelocytic leukemia zinc finger protein in B-cell chronic lymphocytic leukemias does not affect cyclin A expression. *Hematol J* 1, 15-27.

Parrado, A., Robledo, M., Moya-Quiles, M.R., Marin, L.A., Chomienne, C., Padua, R.A., and Alvarez-Lopez, M.R. (2004). The promyelocytic leukemia zinc finger protein down-regulates apoptosis and expression of the proapoptotic BID protein in lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1898-1903.

Patra SK, P.A., Dahiya R. (2001). Histone deacetylase and DNA methyltransferase in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 287(3):705-13.

Patterson SD, G.J., D'Andrea P, Latter GI. (1995). Reduced numatrin/B23/nucleophosmin labeling in apoptotic Jurkat T-lymphoblasts. *J Biol Chem* 270(16):9429-36.

Perera, F.P. (1997). Environment and cancer: who are susceptible? *Science* (New York, NY) 278, 1068-1073.

Person RE, L.F., Duan Z, Benson KF, Wechsler J, Papadaki HA, Eliopoulos G, Kaufman C, Bertolone SJ, Nakamoto B, Papayannopoulou T, Grimes HL, Horwitz M. (2003). Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 34(3):308-12.

Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C., and Nigg, E.A. (1990). Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* 60, 791-801.

Preudhomme, C., Sagot, C., Boissel, N., Cayuela, J.M., Tigaud, I., de Botton, S., Thomas, X., Raffoux, E., Lamandin, C., Castaigne, S., *et al.* (2002). Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 100, 2717-2723.

Preudhomme, C., Warot-Loze, D., Roumier, C., Grardel-Duflos, N., Garand, R., Lai, J.L., Dastugue, N., Macintyre, E., Denis, C., Bauters, F., *et al.* (2000). High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. *Blood* 96, 2862-2869.

Puccetti, E., Zheng, X., Brambilla, D., Seshire, A., Beissert, T., Bohrer, S., Nurnberger, H., Hoelzer, D., Ottmann, O.G., Nervi, C., *et al.* (2005). The integrity of the charged pocket in the BTB/POZ domain is essential for the phenotype induced by the leukemia-associated t(11;17) fusion protein PLZF/RARalpha. *Cancer research* 65, 6080-6088.

Puig O, C.F., Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* (3):218-29.

Raimondi, S.C., Dube, I.D., Valentine, M.B., Mirro, J., Jr., Watt, H.J., Larson, R.A., Bitter, M.A., Le Beau, M.M., and Rowley, J.D. (1989). Clinicopathologic manifestations and breakpoints of the t(3;5) in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Leukemia* 3, 42-47.

Rayman, J.B., Takahashi, Y., Indjeian, V.B., Dannenberg, J.H., Catchpole, S., Watson, R.J., te Riele, H., and Dynlacht, B.D. (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes & development* 16, 933-947.

Redner, R.L., Rush, E.A., Faas, S., Rudert, W.A., and Corey, S.J. (1996). The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* 87, 882-886.

Reid, A., Gould, A., Brand, N., Cook, M., Strutt, P., Li, J., Licht, J., Waxman, S., Krumlauf, R., and Zelent, A. (1995). Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* 86, 4544-4552.

Rho SB, P.Y., Park K, Lee SH, Lee JH. (2006). A novel cervical cancer suppressor 3 (CCS-3) interacts with the BTB domain of PLZF and inhibits the cell growth by inducing apoptosis. *FEBS Lett* 580(17):4073-80.

Rigaut G, S.A., Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* (10):1030-2.

Rosmarin, A.G., Yang, Z., and Resendes, K.K. (2005). Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Experimental hematology* 33, 131-143.

Roumier, C., Eclache, V., Imbert, M., Davi, F., MacIntyre, E., Garand, R., Talmant, P., Lepelley, P., Lai, J.L., Casasnovas, O., *et al.* (2003). M0 AML, clinical and biologic features of the disease, including AML1 gene mutations: a report of 59 cases by the Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC) and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique (GFCH). *Blood* 101, 1277-1283.

Rowley, J.D. (1973). Chromosomal patterns in myelocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 289, 220-221.

Ruggero D, P.P. (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 3(3):179-92.

Rundlett SE, C.A., Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM, Grunstein M. (1996). HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25):14503-8.

Sacchi N, T.F., Willemsen R, Denis-Donini S, Campiglio S, Hoogeveen AT (1998). Subcellular localization of the oncoprotein MTG8 (CDR/ETO) in neural cells. *Oncogene* (20):2609-15.

Savkur, R.S., and Olson, M.O. (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic acids research* 26, 4508-4515.

Schreiber-Agus, N., Chin, L., Chen, K., Torres, R., Rao, G., Guida, P., Skoultchi, A.I., and DePinho, R.A. (1995). An amino-terminal domain of Mxi1 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3. *Cell* 80, 777-786.

Schreiber-Agus, N., and DePinho, R.A. (1998). Repression by the Mad(Mxi1)-Sin3 complex. *Bioessays* 20, 808-818.

Shaknovich, R., Yeyati, P.L., Ivins, S., Melnick, A., Lempert, C., Waxman, S., Zelent, A., and Licht, J.D. (1998). The promyelocytic leukemia zinc finger protein

affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Molecular and cellular biology* 18, 5533-5545.

Shimada A, T.T., Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. (2008). Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese childhood AML Cooperative Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 50(2):264-9.

Shimada, A., Xu, G., Toki, T., Kimura, H., Hayashi, Y., and Ito, E. (2004). Fetal origin of the GATA1 mutation in identical twins with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Blood* 103, 366.

Sieweke, M.H., Tekotte, H., Frampton, J., and Graf, T. (1996). MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* 85, 49-60.

Sif, S., Saurin, A.J., Imbalzano, A.N., and Kingston, R.E. (2001). Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. *Genes & development* 15, 603-618.

Steinman, R.A. (2002). Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene* 21, 3403-3413.

Stirewalt, D.L., and Radich, J.P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature reviews* 3, 650-665.

Sun W, Z.K., Zhang X, Lei W, Xiao T, Ma J, Guo S, Shao S, Zhang H, Liu Y, Yuan J, Hu Z, Ma Y, Feng X, Hu S, Zhou J, Cheng S, Gao Y. (2004). Identification of differentially expressed genes in human lung squamous cell carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Cancer Lett* 212(1):83-93.

Tarapore P, S.K., Suzuki H, Tokuyama Y, Kim SH, Mayeda A, Fukasawa K. (2006). Thr199 phosphorylation targets nucleophosmin to nuclear speckles and represses pre-mRNA processing. *FEBS Lett* 580(2):399-409.

Tenen, D.G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature reviews* 3, 89-101.

Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D., and Zhang, D.E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90, 489-519.

TH., R. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372(6502):143-9.

Vangala, R.K., Heiss-Neumann, M.S., Rangatia, J.S., Singh, S.M., Schoch, C., Tenen, D.G., Hiddemann, W., and Behre, G. (2003). The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood* 101, 270-277.

Wang, D., Baumann, A., Szebeni, A., and Olson, M.O. (1994). The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. *The Journal of biological chemistry* 269, 30994-30998.

Wang, D., Umekawa, H., and Olson, M.O. (1993). Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cellular & molecular biology research* 39, 33-42.

Wang Q, S.T., Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8):3444-9.

Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M.A., Anastasi, J., Karp, J.E., Le Beau, M.M., and Crispino, J.D. (2002). Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nature genetics* 32, 148-152.

Wen YD, C.W., Roy AL, Seto E. (2003). Histone deacetylase 3 binds to and regulates the multifunctional transcription factor TFII-I. *J Biol Chem* 278(3):1841-7.

Williams JH, D.L., Ingley E, Beaumont JG, Tilbrook PA, Lalonde JP, Stillitano JP, Klinken SP (1999). HLS7, a hemopoietic lineage switch gene homologous to the leukemia-inducing gene MLF1. *EMBO J* 15;18(20):5559-66.

Winteringham, L.N., Endersby, R., Kobelke, S., McCulloch, R.K., Williams, J.H., Stillitano, J., Cornwall, S.M., Ingley, E., and Klinken, S.P. (2006). Myeloid leukemia factor 1 associates with a novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like molecule. *The Journal of biological chemistry* 281, 38791-38800.

Winteringham, L.N., Kobelke, S., Williams, J.H., Ingley, E., and Klinken, S.P. (2004). Myeloid Leukemia Factor 1 inhibits erythropoietin-induced differentiation, cell cycle exit and p27Kip1 accumulation. *Oncogene* 23, 5105-5109.

Wu MH, C.J., Yung BY. (2002). Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis* 23(1):93-100.

Xie, J., Briggs, J.A., Morris, S.W., Olson, M.O., Kinney, M.C., and Briggs, R.C. (1997). MND1 binds NPM/B23 and the NPM-MLF1 chimera generated by the t(3;5)

associated with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Experimental hematology* 25, 1111-1117.

Yan LZ, C.S., Liang JY, Feng YF, Cen JN, He J, Chang WR, Zhu ZL, Pan JL, Wu YF, Xue YQ, Wu DP. (2007). Analysis of NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia. First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Institute of Hematology, Suzhou 215006, China 28(5):289-93.

Yoneda-Kato, N., Fukuhara, S., and Kato, J. (1999). Apoptosis induced by the myelodysplastic syndrome-associated NPM-MLF1 chimeric protein. *Oncogene* 18, 3716-3724.

Yoneda-Kato, N., Look, A.T., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Raimondi, S.C., Cohen, K.J., Carroll, A.J., and Morris, S.W. (1996). The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* 12, 265-275.

Yoneda-Kato, N., Tomoda, K., Umehara, M., Arata, Y., and Kato, J.Y. (2005). Myeloid leukemia factor 1 regulates p53 by suppressing COP1 via COP9 signalosome subunit 3. *The EMBO journal* 24, 1739-1749.

Yoshida M, H.S., Beppu T. (1995). Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* (5):423-30.

Yu Y, M.L.J., Brady SN, Apicelli AJ, Dai MS, Lu H, Weber JD. (2006). Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol Cell Biol* 26(10):3798-809.

Yucel, R., Karsunky, H., Klein-Hitpass, L., and Moroy, T. (2003). The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit<sup>+</sup> T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *The Journal of experimental medicine* 197, 831-844.

Yun JP, C.E., Liew CT, Chan JY, Jin ML, Ding MX, Fai YH, Li HK, Liang XM, Wu QL. (2003). Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J Cell Biochem* 15;90(6):1140-8.

Yung, B.Y., and Chan, P.K. (1987). Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23. *Biochimica et biophysica acta* 925, 74-82.

Zelent, A., Guidez, F., Melnick, A., Waxman, S., and Licht, J.D. (2001). Translocations of the RAR $\alpha$  gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20, 7186-7203.

Zeng H, Y.R., Kosan C, Klein-Hitpass L, Möröy T. (2004). Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J* 23(20):4116-25.

Zhou X, M.P., Rifkind RA, Richon VM. (2001). Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19):10572-7.

Zhu J, G.L., Min B, Watson CJ, Hu-Li J, Young HA, Tschlis PN, Paul WE. (2002). Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. *Immunity* 16(5):733-44.

Zornig, M., Schmidt, T., Karsunky, H., Grzeschiczek, A., and Moroy, T. (1996). Zinc finger protein GFI-1 cooperates with myc and pim-1 in T-cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2. *Oncogene* 12, 1789-1801.

Zweidler-Mckay PA, G.H., Flubacher MM, Tschlis PN. (1996). Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 16(8):4024-34.