

Université de Montréal

Rôle de l'oncogène RAR $\alpha$ -PLZF dans la leucémie promyélocytaire aiguë.

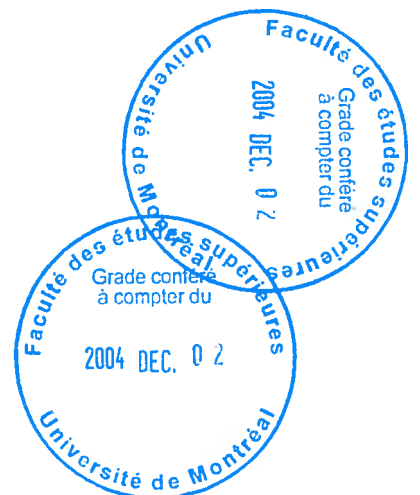
par  
Nathalie Girard

Programme de biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Docteur ès science (Ph.D)  
en biologie moléculaire

Avril 2004

©Nathalie Girard, 2004



QH

506

U54

2004

V. 016

C

C

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle de l'oncogène RAR $\alpha$ -PLZF dans la leucémie promyélocytaire aiguë.

présenté par  
Nathalie Girard

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Jean Vacher	Président-rapporteur
Dr Trang Hoang	Directrice de recherche
Dr David Lohnes	Membre du jury
Dr Wilson Miller	Examineur externe

## Sommaire

L'hématopoïèse est un processus qui, pour assurer la production normale de cellules sanguines matures essentielles à la survie des organismes, doit être hautement régulé. Un dérèglement des processus cellulaires normaux contrôlant la différenciation, la prolifération ou les mécanismes d'apoptose peut résulter en maladie hématopoïétique potentiellement mortelle. Des réarrangements chromosomiques récurrents ont été liés à des sous-types spécifiques de leucémies. Les produits de ces réarrangements structuraux interfèrent avec d'importantes cascades régulatrices des divers processus cellulaires.

Phénotypiquement, la leucémie promyélocytaire aiguë (APL) est caractérisée par un blocage de la différenciation des cellules de la lignée des granulocytes et une prolifération anormale qui résulte en l'accumulation, dans la moelle, d'un nombre anormalement élevé de cellules ayant l'apparence de promyélocytes. Cette leucémie est invariablement associée à des translocations impliquant toutes le locus du récepteur  $\alpha$  d'acide rétinoïque ( $RAR\alpha$ ). Toutefois, l'identification de la translocation  $t(11;17)$  chez certains patients a permis de révéler en outre l'importance du partenaire de translocation dans le processus de leucémogénèse et son impact sur le pronostic de la maladie. Les cellules leucémiques de ces patients produisent deux protéines chimériques réciproques:  $PLZF-RAR\alpha$  et  $RAR\alpha-PLZF$ . Il a clairement été démontré que ces deux protéines jouent un rôle essentiel dans la leucémogénèse.

D'un point de vue moléculaire,  $PLZF-RAR\alpha$  inhibe la signalisation des rétinoïdes et nuit potentiellement à la fonction de  $PLZF$ . L'objectif de mes travaux étaient de déterminer de quelle façon la protéine de fusion inverse,  $RAR\alpha-PLZF$ , contribue à la leucémogénèse de l'APL.

A l'aide d'un modèle de lignée cellulaire, les 32D, et de culture primaire de moelle et de foie fétal, nous avons déterminé que l'expression ectopique de

RAR $\alpha$ -PLZF inhibe la capacité des cellules 32D à se différencier. Diverses études de transactivation, co-immunoprécipitation, pulldown, co-localisation, de traitement de lignées cellulaires avec un inhibiteur d'histone déacétylase et précipitation de la chromatine, nous ont permis de déterminer que RAR $\alpha$ -PLZF inhibe l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\alpha$  en recrutant, par sa capacité d'interagir physiquement avec ce dernier, HDAC1, une protéine qui possède la capacité de déacétyler les histones sur le promoteur des gènes cibles de C/EBP $\alpha$ . Cette modification de la chromatine résulte en une répression de l'expression des gènes ciblés, qui sont importants pour la différenciation cellulaire.

Ce nouveau mode d'action de RAR $\alpha$ -PLZF s'ajoute à sa capacité de modifier l'activité transcriptionnelle des promoteurs de cibles directes de PLZF. De plus, nos travaux viennent appuyer l'hypothèse que C/EBP $\alpha$  joue un rôle de suppresseur de tumeur dans la lignée myéloïde. En effet, la fonction et l'intégrité protéique de C/EBP $\alpha$  est affectée dans d'autres désordres myéloïdes.

De plus, des travaux préliminaires que nous avons effectués ont confirmé le rôle de RAR $\alpha$ -PLZF dans le dérèglement de la prolifération cellulaire et dans le maintien de l'intégrité génomique.

**Mots clés :** Hématopoïèse, Cancer, Leucémie, APL, oncogène, différenciation, prolifération, facteur de transcription, PLZF-RAR $\alpha$ , RAR $\alpha$ -PLZF, C/EBP $\alpha$ .

## Abstract

Hematopoiesis is the normal process by which mature blood cells, essential for survival, are produced by stem cells. It is highly regulated as any deregulation in cell survival, proliferation and differentiation can lead to a potentially deadly disease such as leukemia. Recurrent chromosomal translocations have been linked to specific leukemia subtypes and produce proteins that interfere with critical regulatory cascades for normal cell functions.

Acute promyelocytic leukemia (APL) is characterized by a block of differentiation and increased proliferation that result in the accumulation, in the bone marrow, of immature myeloid cells. These cells phenotypically resemble promyelocytes. APL is invariably associated with translocations that implicate the locus encoding for the retinoic acid receptor  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ). However, the identity of the translocation partner and its disruption plays an important role in leukemogenesis and outcome of the disease.

The expression of two reciprocal chimeric proteins result from the t(11;17) translocation and both play an essential role in leukemogenesis. From a molecular standpoint, PLZF-RAR $\alpha$  inhibits retinoid signalling and, potentially, the normal function of PLZF. The objective of my study was to determine the pathway by which RAR $\alpha$ -PLZF contributes to the leukemogenesis of APL. Using the murine myeloid cell line (32D) as a model and primary cultures of bone marrow and fetal liver cells, we determined that the ectopic expression of RAR $\alpha$ -PLZF inhibited differentiation. Transactivation studies, pulldown assays, coimmunoprecipitation, colocalisation and a variety of other methods were used to elucidate the pathway that was implicated. Our results show that RAR $\alpha$ -PLZF through its physical interaction with C/EBP $\alpha$ , inhibited its transcriptional activity by recruiting HDAC1 on target promoters, resulting in chromatin deacetylation. The ensuing compaction of the chromatin then leads to the silencing of the

genes, the products of which are critical for terminal differentiation in the granulocyte lineage.

Our contribution to this field was the demonstration of this novel pathway by which  $RAR\alpha$ -PLZF contributes to the leukemogenesis of APL. In addition, our data support a role for  $C/EBP\alpha$  as a tumor suppressor in the myeloid lineage as this transcription factor is affected in other myeloid disorders. Our work also shows that  $RAR\alpha$ -PLZF is implicated in deregulating proliferation and genome stability of the cells harbouring the t(11;17) translocation.

**Key words** : Hematopoiesis, Cancer, Leukemia, APL, oncogene, differentiation, proliferation, transcription factor, PLZF- $RAR\alpha$ ,  $RAR\alpha$ -PLZF,  $C/EBP\alpha$ .



## Table des matières

	Page
Sommaire	i
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des sigles et abréviations	x
1. INTRODUCTION	1
1.1 L'hématopoïèse	2
1.2 Les granulocytes	4
1.2.1 Différenciation morphologique et fonctionnelle	5
1.2.2 Facteurs importants pour la différenciation des granulocytes	7
1.2.2.1 Cytokines	8
1.2.2.2 Facteurs de transcription	9
1.2.2.2.1 PU.1	9
1.2.2.2.2 C/EBP $\alpha$	10
1.2.2.2.3 RAR	12
1.3 Cycle cellulaire	15
1.3.1 Contrôle du cycle cellulaire	17
1.3.1.1 Les cyclines	17
1.3.1.2 Les inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes	18
1.4 Les leucémies myéloïde aiguës	18
1.5 La leucémie promyélocytaire aiguë	20
1.5.1 Présentation de la leucémie chez les patients	22
1.5.2 Les partenaires de translocation	22
1.5.2.1 PML	23
1.5.2.2 PLZF	26

1.5.2.3	NPM	28
1.5.2.4	NUMA	29
1.5.2.5	STAT5b	30
1.5.3	Traitement thérapeutique	31
2.	LEUKEMOGENESIS IN APL T(11;17)	34
3.	THE RAR $\alpha$ -PLZF ONCOGENE INHIBITS C/EBP $\alpha$ FUNCTION IN MYELOID CELLS	74
4.	EFFET DE L'ACTIVITÉ DE RAR $\alpha$ -PLZF SUR LE CYCLE CELLULAIRE	124
4.1	Introduction	125
4.2	Résultats	127
4.2.1	L'expression de RAR $\alpha$ -PLZF dérègle la progression du cycle cellulaire et la stabilité génétique.	128
4.2.2	RAR $\alpha$ -PLZF n'affecte pas l'expression de la cycline A dans les cellules de foie foetales et dans les cellules myéloïdes 32D.	135
4.2.3	L'expression de p21 et l'interaction de C/EBP $\alpha$ avec CDK2 et 4 ne sont pas affecté par l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF.	135
4.2.4	RAR $\alpha$ -PLZF ne semble pas affecter certains gènes cibles de E2F.	139
4.2.5	Génération de lignées inductibles pour l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF.	140
4.3	Perspectives	143
4.4	Matériels et méthodes	144
5	DISCUSSION	146

5.2	L'oncogène modificateur RAR $\alpha$ -PLZF	149
5.3	Rôle de RAR $\alpha$ -PLZF dans le blocage de la différenciation dans l'APL	151
5.4	Rôle de RAR $\alpha$ -PLZF dans le dérèglement du cycle cellulaire	153
6	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	158
	REMERCIEMENTS	161
	BIBLIOGRAPHIE	163

**Liste des figures**

	Page
<b>Chapitre 1</b>	
Figure 1.1 Hématopoïèse	3
Figure 1.2 Voie de différenciation des granulocytes	6
Figure 1.3 Le cycle cellulaire	16
<b>Chapitre 3</b>	
Figure 3.1 The 32D cell line reproduces the patterns of differentiation observed in primary cells.	116
Figure 3.2 Ectopic expression of RAR $\alpha$ -PLZF in myeloid cells specifically inhibits G-CSF-dependent cell survival.	117
Figure 3.3 RAR $\alpha$ -PLZF decreases the expression of C/EBP $\alpha$ target genes.	118
Figure 3.4 C/EBP $\alpha$ target genes are inhibited by RAR $\alpha$ -PLZF	119
Figure 3.5 RAR $\alpha$ -PLZF but not PLZF-RAR $\alpha$ inhibits transcription activation by C/EBP $\alpha$ .	120
Figure 3.6 RAR $\alpha$ -PLZF associates with C/EBP $\alpha$ and HDAC1 <i>in vivo</i> .	121
Figure 3.7 RAR $\alpha$ -PLZF interacts with HDAC1 to modify the chromatin state of the C/EBP $\alpha$ targets.	122
Figure 3.8 Decreased C/EBP $\alpha$ function in t(11;17) APL.	123
<b>Chapitre 4</b>	
Figure 4.1 L'expression ectopique de RAR $\alpha$ -PLZF augmente la prolifération des cellules hématopoïétiques et modifie leur cycle cellulaire.	129

- Figure 4.2 L'expression de RAR $\alpha$ -PLZF altère le caryotype des 32D. 133
- Figure 4.3 RAR $\alpha$ -PLZF les niveaux d'expression de p21WAF/CIP  
et de la Cycline A. 136
- Figure 4.4 L'expression de RAR $\alpha$ -PLZF dans les lignées clonales  
et polyclonales de cellules 32D transduites avec le vecteur  
Retro-off. 141

**Liste des tableaux**

Page

**Chapitre 1**

Table 1. Translocations décrites dans l'APL.

21

## Liste des sigles et abréviations

ACTR	: activateur des récepteurs d'hormone thyroïdienne et de RA (activator of thyroid and RA receptor)
ADN	: acide déoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
AML	: leucémie myéloïde aiguë
AML1	: gène 1 de la leucémie myéloïde aiguë
APL	: leucémie promyélocytaire aiguë
ARNm	: acide ribonucléique messenger
ARNr	: acide ribonucléique ribosomal
ATRA	: acide rétinoïque tout-trans (all-trans retinoic acid)
CAK	: kinase activatrice de CDK
CBP	: protéine de liaison à CREB (CREB binding protein)
CDC	: kinase cycline-dépendante
CDK	: kinase cycline-dépendante
CDKI	: inhibiteur de CDK
C/EBP $\alpha$	: protéine de liaison de la séquence activatrice CCAAT (CCAAT enhancer binding protein $\alpha$ )
CLP	: progéniteur commun lymphoïde
CML	: leucémie myéloïde chronique
CR	: rémission complète
CREB	: protéine de liaison à l'élément de réponse du cAMP (cAMP response element-binding protein)
DTT	: dithiothréitol
GATA 1,2,3	: facteur de transcription liant les séquences GATA
G-CSF	: facteur de stimulation de colonies de granulocytes (granulocyte colony stimulating factor)
G-CSF-R	: récepteur du G-CSF
GM-CSF	: facteur de stimulation de colonies de granulocytes et de monocytes
GMP	: progéniteur de granulocytes et monocytes

FAB	: système de classification français, américain et britannique
FISH	: hybridisation fluorescente <i>in situ</i>
HSC	: cellule souche hématopoïétique
IL	: interleukine
INF	: interféron
LDB	: domaine de liaison au ligand
LPS	: lipopolysaccharide
Kb	: kilo paires de bases
Kda	: kilodaltons
HDAC	: déacétylase d'histones
MEP	: progéniteur myéloïde et érythroïde
MRP8	: protéine reliée aux cellules myéloïdes (Myeloid-related protein)
M-CSF	: facteur de stimulation de colonies de monocytes
N-CoR	: co-répresseur de récepteur nucléaire (nuclear receptor Co-repressor)
NPM	: nucléophosmine
NuMA	: appareillage mitotique nucléaire (nuclear mitotic apparatus)
PLZF	: doigt de zinc de l'APL (promyelocytic leukemia zinc finger)
PML	: protéine de leucémie promyélocytaire (promyelocytic leukemia)
PU.1	: facteur de transcription qui lie une séquence riche en purines
RA	: acide rétinoïque
RAR	: récepteur de l'acide rétinoïque
Rb	: protéine du rétinoblastome
RNP	: ribonucléoprotéine
RT-PCR	: transcription réverse suivi d'amplifications en chaîne par une polymérase (reversed transcribed polymerase chain reaction)
RXR	: récepteur nucléaire de rétinoïde
SCF	: facteur de cellules souches (stem cell factor)
SCL	: gène de leucémie de cellule souche (stem cell leukemia gene)
siRNA	: ARN d'interférence court (short interfering RNA)



SMRT	: médiateur d'inhibition pour RAR et TR(silencing mediator for RAR and TR)
STAT	: médiateur de signal et activateur de transcription (signal transducer and activator of transcription)
TBP	: TATA box binding protein
TIF-1	: facteur transcriptionnel intermédiaire (transcriptional intermediary factor)
TNF	: facteur de nécrose tumorale
TR	: récepteur d'hormone thyroïdienne
VAD	: déprivé en vitamine A

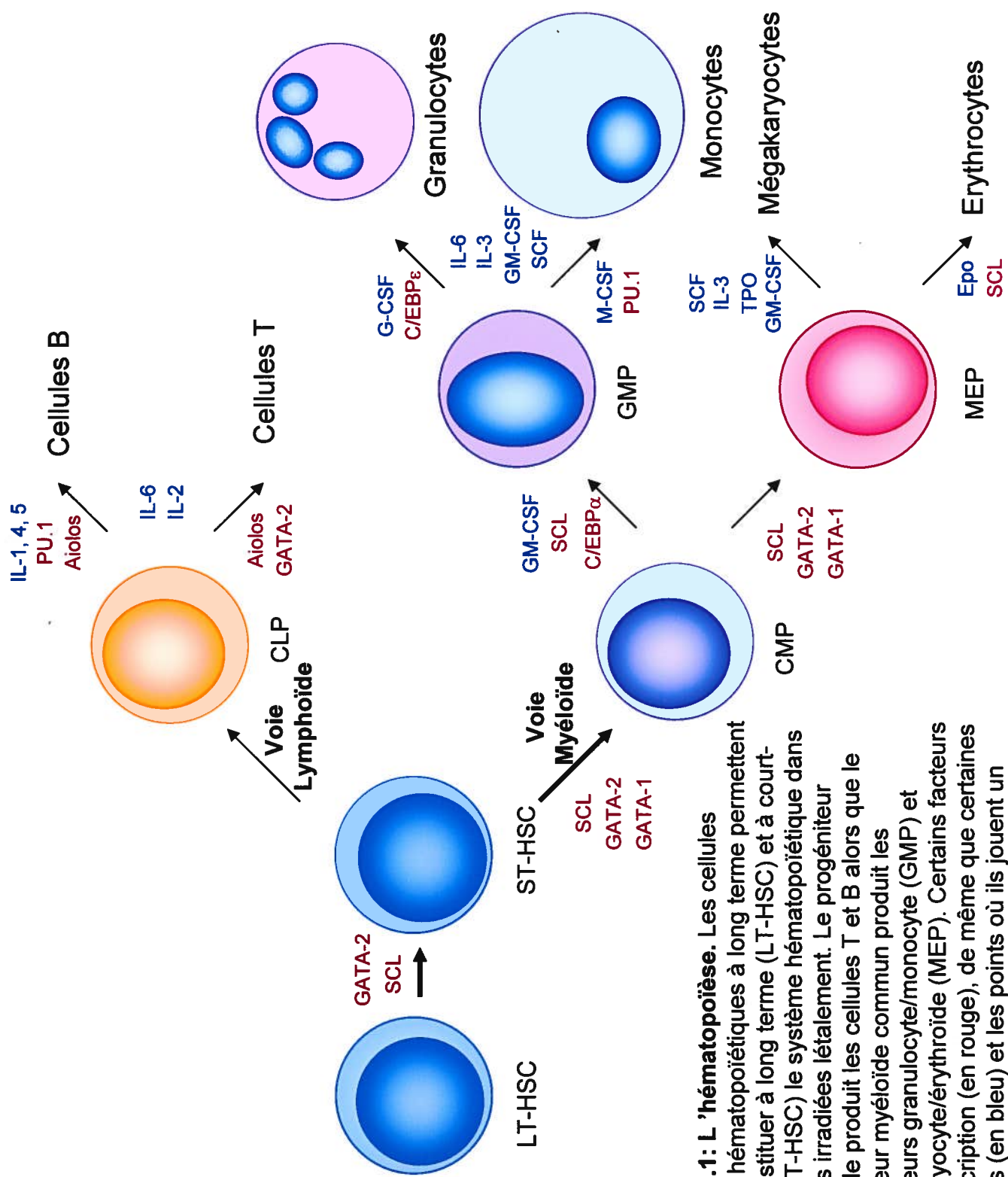
## **1.INTRODUCTION**

## 1.1 L'hématopoïèse

Le sang est constitué de huit lignées cellulaires principales de fonctions diverses (Figure 1.1). Elles sont essentielles au développement et la survie d'individus normaux. Les cellules hématopoïétiques matures sont incapables de se répliquer et ont une durée de vie limitée. Par conséquent, au cours de l'embryogenèse et tout au long de la vie adulte, de nouvelles cellules des différentes lignées doivent être produites à partir de cellules souches multipotentes ayant la capacité à recréer le système hématopoïétique (HSC : cellules souches hématopoïétiques)<sup>1,2</sup>. Chez l'adulte, ces cellules pluripotentes résident dans la moelle où elles représentent une population restreinte des cellules nucléées (0.005% à 0.01%)<sup>3</sup>.

Les HSC (à long terme) sont des cellules qui se divisent rarement et qui sont généralement au stade G<sub>0</sub> du cycle cellulaire<sup>4,5</sup>. Elles possèdent toutefois un potentiel prolifératif important qui leur permet de s'auto-renouveler et/ou produire des progéniteurs immatures mais commis à la différenciation (short-term HSC)<sup>6-8</sup>. Différentes étapes de différenciation vont mener la cellule à devenir un progéniteur plus mature qui s'engagera dans la voie lymphoïde (CLP) et pour produire les cellules B ou T matures, ou dans la voie myéloïde (CMP). La différenciation du précurseur commun myéloïde mène à la production de progéniteurs plus matures; les GMP et les MEP. Ces cellules deviendront respectivement les mégakaryocytes/érythrocytes et monocytes/granulocytes. Tout au long du processus de différenciation, les précurseurs intermédiaires perdent progressivement leur pluripotence pour ultimement ne pouvoir se différencier qu'en un seul type de cellules matures. De plus, au cours de leur différenciation, les progéniteurs multipotents prolifèrent de façon importante<sup>9</sup>.

La production des diverses cellules hématopoïétiques et le maintien de la population des HSC sont contrôlés par une série de mécanismes intrinsèques et extrinsèques. La combinaison des facteurs de transcription présents dans la



**Figure 1.1: L' hématopoïèse.** Les cellules souches hématopoïétiques à long terme permettent de reconstituer à long terme (LT-HSC) et à court terme (ST-HSC) le système hématopoïétique dans les souris irradiées létalement. Le progéniteur lymphoïde produit les cellules T et B alors que le progéniteur myéloïde commun produit les progéniteurs granulocyte/monocyte (GMP) et megakaryocyte/érythroïde (MEP). Certains facteurs de transcription (en rouge), de même que certaines cytokines (en bleu) et les points où ils jouent un rôle dans la production des diverse lignées sont indiqués.

cellules à ce moment précis, la présence de facteurs de croissance et de survie, les interactions cellules-cellules et cellule-stroma assurent une homéostasie du système et, lorsque nécessaire, la production rapide de cellules de types cellulaires spécifiques nécessaires pour répondre à certaines situations physiologiques, telles qu'une infection ou une hémorragie <sup>10</sup>.

## 1.2 Les granulocytes

Les granulocytes ou neutrophiles sont une composante essentielle du système immunitaire. Leur fonction est de détecter et neutraliser les agents pathogènes responsables d'infections bactériennes et fongiques. Une cascade coordonnée permet l'attraction des granulocytes et leur mouvement vers le site d'infection, suivi de la reconnaissance des organismes étrangers et leur phagocytose. Lors de leur ingestion, ces organismes sont acheminés vers des compartiments intracellulaires appelés phagosomes. Une variété d'agents cytotoxiques, tels que des composés de digestion et antimicrobiens sont alors transférés vers les phagosomes à partir des granules cytoplasmiques <sup>11</sup>. La destruction des micro-organismes se produit également à l'aide de pulses oxydatifs générés par la production de superoxide et d'autres espèces réactives d'oxygène suite au transfert d'électrons d'oxygène à travers la membrane des phagosomes <sup>12-14</sup>.

Les granulocytes présents dans la circulation possèdent une demi-vie relativement courte (8-20hrs). Elle peut, toutefois, augmenter de plusieurs fois lorsque les cellules pénètrent un tissu infecté ou inflammé <sup>231</sup>. En effet, les cytokines présentes dans le tissu affecté vont agir non seulement en tant que médiateurs locaux pro-inflammatoires mais elles vont également avoir un rôle anti-apoptotique. Parmi les cytokines pro-inflammatoires qui prolongent la survie des neutrophiles on retrouve l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, l'IL-15, l'INF- $\gamma$ , le G-CSF, le GM-CSF, le LPS et possiblement l'IL-6 <sup>15</sup>. En absence de ces cytokines

ou d'autres agents pro-inflammatoires, les neutrophiles âgés meurent par apoptose de façon spontanée pour ensuite être phagocytés par les macrophages<sup>16-18</sup>. Ce mode de suppression des neutrophiles apoptotiques intacts plutôt que nécrotiques, a pour but d'empêcher les cellules mortes de relâcher leur contenu cytosolique dans le milieu extra-cellulaire. De tels événements pourraient, en effet, occasionner des dommages tissulaires à cause du relâchement de radicaux d'oxygène hautement réactifs et toxiques, et d'enzymes normalement contenues dans les granules cytosoliques (tels que des protéases).

### 1.2.1 Différenciation morphologique et fonctionnelle

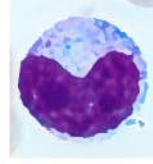
La granulopoïèse possède deux caractéristiques importantes : sa capacité à produire de grandes quantités de cellules (chez les humains, environ 120 milliards de granulocytes matures sont produits quotidiennement dans le but de maintenir l'homéostasie) et sa capacité à augmenter rapidement cette production en réponse à des stress tels que des infections.

La production des granulocytes s'effectue à partir d'un précurseur myéloïde commun (GMP) qui peut produire des granulocytes ou des macrophages (Figure 1.1 et 1.2). Ces précurseurs sont caractérisés par un rapport nucléocytoplasmique élevé; le noyau représentant le contenu majoritaire dans la cellule. Ces précurseurs tardifs ont été caractérisés par l'expression de divers marqueurs de surface et facteurs de transcription. Ils sont considérés comme étant CD34<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>-</sup>, Lin<sup>-</sup>, IL-7Rα<sup>-</sup>, FcγR<sup>hi</sup> et ils expriment les facteurs de transcription C/EBPα, c-Myb et PU.1 mais on note l'absence de GATA-1, 2, 3<sup>19</sup>. Suite à l'engagement de la cellule vers la lignée des neutrophiles et au cours de sa différenciation progressive, on observe une évolution morphologique de la cellule. Plusieurs intermédiaires de différenciation ont été caractérisés en fonction de leur morphologie, des protéines retrouvées à leur surface et des

**HSC → CMP → GMP →**



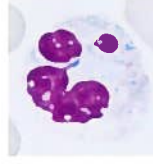
promyelo/  
myelocyte



meta-  
myelocyte



band



neutrophil

**Figure 1.2: . Voie de différenciation des granulocytes.** La production des granulocytes s'effectue à partir des GMPs. Différentes étapes ont été caractérisées en fonction de la morphologie cellulaire. Au cours du processus de différenciation, le noyau des cellules précurseurs va se fragmenter et occuper une proportion réduite du cytoplasme. Les différents intermédiaires de différenciation peuvent également être caractérisés en fonction des protéines membranaires et exprimées par les cellules.

gènes exprimés. Le GMP se différencie d'abord en myéloblaste puis en promyélocyte. Le promyélocyte possède un noyau bilobé dont la conformation est spécifique (Figure 1.2) <sup>20</sup>. Ils sont caractérisés par la présence de granules primaires azurophiles qui persistent en nombre décroissant jusqu'aux dernières phases de maturation des neutrophiles. Ces granules contiennent divers types de protéases (le groupe des Cathepsin G, la Leucocyte Elastase, la Proteinase 3/myeloblastine, la myeloperoxydase et les défensins). La transformation en myélocyte constitue la phase suivante de différenciation. A ce point, les divisions cellulaires cessent. Des composés du système oxydatif tels que la chaîne lourde du cytochrome gp91-phox sont exprimés. Ensuite la cellule transitionne vers les stades de métamyélocytes dans lesquels on observe l'apparition de granules secondaires ou spécifiques. Les granules secondaires contiennent, dans la matrice de leur membrane, les protéines qui assurent les fonctions des granulocytes différenciés : soit la phagocytose, chimiotaxie et pulse oxydatif. Finalement, le neutrophile mature possède un noyau trilobé, un rapport nucléocytoplasmique diminué et des granules tertiaires. Parmi les marqueurs plus tardifs du développement des neutrophiles on retrouve l'expression des composés des granules secondaires tels que la lactoferrine, neutrophil gelatinase et le marqueur de surface Gr-1.

### 1.2.2 Facteurs importants pour la différenciation des granulocytes

Plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques régulent la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation des granulocytes. Les cytokines et autres facteurs de croissance et survie présents dans l'environnement extracellulaire, de même que la combinaison des facteurs de transcription présents dans la cellule contribuent tous à la régulation de la production et différenciation optimale de granulocytes.



### 1.2.2.1 Cytokines

L'environnement dans lequel se trouvent les cellules hématopoïétiques fournit une multitude de signaux grâce à la présence de différentes cytokines et facteurs de croissance de même que certaines interactions cellules-cellules. L'intégration de ces divers signaux permet le contrôle de la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation. Les facteurs de stimulation de colonies (CSF) (par exemple le facteur de stimulation granulocytaire (G-CSF) et le facteur de stimulation granulocytaire et monocyttaire (GM-CSF)) et plusieurs interleukines (IL) (dont l'IL-3 et l'IL-6) sont des régulateurs positifs qui stimulent la prolifération, différenciation et la survie des cellules hématopoïétiques. Les protéines qui régulent négativement l'hématopoïèse sont nettement moins connues; le TGF- $\beta$  en est un exemple. La fonction et l'importance relative des cytokines individuelles dans la régulation de l'hématopoïèse *in vivo* et leurs mécanismes d'actions ne sont pas complètement élucidés. Certaines évidences obtenues *in vitro* se sont révélées difficiles à confirmer *in vivo* probablement dues à une redondance dans la fonction de divers facteurs. Tel est le cas pour les cytokines qui semblent jouer un rôle dans plusieurs lignées (tel que l'IL-3). Plusieurs approches complémentaires sont donc utilisées pour contrer ce problème. Elles sont basées sur des approches génétiques, soit par invalidation génique de certains récepteurs de cytokines chez la souris, ou par transgénèse causant une surproduction de cytokines. Parmi les différentes cytokines qui régulent la granulopoïèse, certaines vont assurer la survie et la prolifération cellulaire, l'IL-3 et le GM-CSF en sont deux exemples. Ces facteurs exercent souvent leurs actions sur plusieurs types de cellules. Certaines cytokines stimulent plutôt la survie et la différenciation de façon lignée-spécifique. Le G-CSF et l'IL-6 stimulent spécifiquement la production de granulocytes et, chez les souris dépourvues des récepteurs pour ces cytokines, le nombre de cellules matures ou leur fonctionnalité sont compromises <sup>21, 22</sup>.

### 1.2.2.2 Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription impliqués dans le développement du système hématopoïétique peuvent être répertoriés en deux classes : les facteurs qui sont impliqués dans plusieurs lignées telles que SCL et AML1, et qui vont souvent jouer un rôle au niveau des précurseurs, et ceux qui ont des patrons d'expression spécifiques et vont permettre la différenciation des différentes lignées. Parmi ceux-ci, on retrouve les facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\epsilon$ . L'absence de ces derniers facteurs affecte généralement une seule ou peu de lignées alors que l'ablation génique de facteurs comme AML1 ou SCL affecte la formation de tout le tissu hématopoïétique<sup>23-25</sup>.

Différents facteurs de transcription jouent un rôle dans le développement de la lignée myéloïde (Figure 1.1). Ces protéines coordonnent l'expression séquentielle de produits géniques qui résultent en stades progressifs de détermination du destin cellulaire et différenciation. L'absence de facteurs de transcription lignée-spécifique bloque la différenciation à un stade où ce facteur devient essentiel pour la poursuite de la maturation. Ils agissent par différents mécanismes pour accomplir leur rôle : autorégulation<sup>26</sup>, inhibition de voies alternatives de différenciation (en interagissant avec les facteurs d'autres lignées par exemple)<sup>27-30</sup>, activation de gènes importants pour la poursuite du programme de différenciation cellulaire lignée-spécifique<sup>31-34</sup>, inhibition de la prolifération<sup>35,36</sup> et induction de l'apoptose. Les membres de la famille de C/EBP ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\epsilon$ ), RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  et PU.1 sont des facteurs de transcription associés à la différenciation de la lignée myéloïde.

#### 1.2.2.2.1 PU.1

PU.1 est le produit de l'oncogène Spi-1, identifié comme site d'intégration du virus de Friend causant des érythroleucémies<sup>37,38</sup>. Cette intégration active la transcription de PU.1, un facteur de transcription des gènes d'immunoglobuline

et des gènes myéloïdes. C'est un membre de la famille des facteurs de transcription Ets qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN caractérisé par un motif de conformation hélice-tour-hélice. Il lie des séquences consensus dont le cœur est riche en purines (GGAA)<sup>39</sup>. PU.1 possède un patron spécifique d'expression dans les cellules hématopoïétiques. Au cours du développement hématopoïétique, l'expression d'ARNm codant pour PU.1 est détectée faiblement dans les cellules ES de souris et les cellules progénitrices humaines CD34<sup>+</sup>. Elle est spécifiquement régulée à la hausse lors de la différenciation myéloïde à partir du stade de CMP<sup>26,37,39,40</sup>. PU.1 est également exprimé dans les cellules B à partir du stade de pro-B<sup>19,41</sup> (Figure 1.1).

L'étude de souris dans lesquelles on a éliminé l'expression de PU.1 a démontré que cette protéine est essentielle pour le développement des macrophages et des cellules B. De plus, l'absence de PU.1 retarde également le développement des granulocytes et des cellules T<sup>42,43</sup>.

PU.1 peut interagir avec d'autres facteurs de transcription tels que c-Jun et C/EBP $\alpha$ <sup>29,44</sup> et avec au moins un élément de la machinerie basale, TBP<sup>45,46</sup>. On peut donc penser que PU.1 pourrait recruter sur les promoteur myéloïdes sans boîtes TATAA, la machinerie basale de transcription<sup>47</sup>. Parmi ses cibles on retrouve le récepteur du M-CSF<sup>48,49</sup>, de l'IL-1 $\beta$ <sup>50</sup>, les récepteurs du G-CSF et du GM-CSF<sup>31,51</sup>.

#### 1.2.2.2.2 C/EBP $\alpha$

Les protéines de la famille C/EBP (CCAAT/enhancer-binding proteins) font partie d'une famille de facteurs de transcription constituée de 6 membres (C/EBP $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\xi$ ). Tous les C/EBPs partagent une région C-terminale conservée qui contient des motifs de dimérisation de type glissière à leucine (leucine zipper) adjacent à un domaine basique de liaison à l'ADN. La région N-terminale est plus divergente et contient des domaines d'activation de la transcription. La

dimérisation de C/EBP avec d'autres membres de la même famille ou d'autres facteurs de transcription est pré requise pour la liaison à l'ADN à un consensus CCAAT et la transactivation subséquente. A l'exception de C/EBP $\epsilon$  dont l'expression est restreinte aux cellules de la lignée granulocytaire, les différents membres de la famille C/EBP ont des patrons d'expression qui se chevauchent partiellement dans plusieurs tissus. De plus, la fonction de certains membres semble pouvoir compenser pour la perte d'un autre dans la mesure où l'expression spatio-temporelle est maintenue. Cette caractéristique a été démontré dans l'étude de remplacement génique chez la souris (knock-in) dans lesquelles Jones *et al*<sup>52</sup> ont inséré C/EBP $\beta$  dans le locus de C/EBP $\alpha$ . Ces souris se sont révélées normales ce qui suggère que C/EBP $\beta$  est en mesure de remplir toutes les fonctions normales de C/EBP $\alpha$ . Toutefois, l'inactivation dirigée (knock-out) des différents gènes de C/EBP dans la souris a révélé l'importance de chacun des membres de la famille à la différenciation cellulaire. Dans la lignée des granulocytes, deux membres de la familles C/EBP semblent jouer des rôles prédominants soit C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\epsilon$ .

Dans le tissu hématopoïétique, C/EBP $\alpha$ , tout comme PU.1, est faiblement exprimé dans les HSC. L'expression de C/EBP $\alpha$  est spécifiquement et exclusivement régulée à la hausse dans les précurseurs bipotents myéloïdes (GMP). Cette induction permet l'initiation du développement granulocytaire et l'inhibition du développement monocytaire grâce à la répression de la fonction de PU.1 par C/EBP $\alpha$ <sup>19,29,30,41</sup> (Figure 1.1).

L'ablation de C/EBP $\alpha$  dans les souris mène à une absence complète de granulocytes matures. On observe un blocage de la différenciation des cellules myéloïdes au stade de myéloblastes immatures (entre CMP et GMP). À l'exception des eosinophiles, les autres lignées hématopoïétiques, y compris les macrophages ne sont pas affectées<sup>34</sup>. Le facteur de transcription C/EBP $\alpha$  régule l'expression de gènes myéloïdes tels que celui codant pour le récepteur du G-

CSF<sup>34</sup>, la myéloperoxidase<sup>53</sup>, la neutrophile élastase<sup>54</sup> mais, également des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme *c-myc*<sup>35</sup>. *C/EBP $\alpha$*  est également impliqué dans la régulation de la progression du cycle cellulaire des cellules myéloïdes en régulant l'activité du facteur de transcription E2F<sup>36</sup>.

*C/EBP $\epsilon$*  de son côté est exprimé dans des granulocytes plus matures et son expression est régulé, du moins partiellement, par *RAR $\alpha$*  et *C/EBP $\alpha$* <sup>55</sup>. A l'aide de diverses lignées cellulaires murines et humaines, Chumakov *et al*<sup>56</sup> ont déterminé que *C/EBP $\epsilon$*  est exprimé à partir du stade de promyélocyte (ou myéloblaste tardif). Sa fonction est nécessaire à partir du stade de metamyélocyte pour assurer la maturation finale des granulocytes et leur fonctionnalité<sup>57</sup>. En effet, les souris dans lesquelles *C/EBP $\epsilon$*  est absent sont sujettes à une mort précoce suite à des infections spontanées par *Pseudomonas aeruginosa* (60% des souris entre les âges de 3-5 mois)<sup>57,58</sup>. Les granulocytes de ces souris présentent des défauts de migration, probablement dû à l'expression anormale de CD11b (intégrine) et L-sélectine et l'absence de granules secondaires, ce qui les rend moins aptes à tuer les bactéries qu'ils ont phagocytées.

#### 1.2.2.2.3 RAR

Les récepteurs d'acide rétinoïque (*RAR $\alpha$* ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) appartiennent à la superfamille des récepteur nucléaires qui fonctionnent comme des facteurs de transcription ligand-dépendent<sup>59,60</sup>. Ils influencent la croissance et la différenciation d'une grande variété de types de tissus adultes. Ils doivent former des hétérodimères avec une seconde famille de récepteur nucléaire, les RXR, pour être en mesure de lier, de façon efficace, leurs éléments de réponse (RARE) situés dans la région promotrice de gènes cibles. Les RARE sont composés d'hexanucléotides

répétés directement (direct repeat) avec un nombre variable de nucléotides d'espacement entre les motifs répétés<sup>61-63</sup>. Les RAR et RXR transduisent tous les deux le signal rétinoïde et sont activés par l'acide rétinoïque 9-cis (9-cis RA). En plus, les RAR sont également activés par l'acide rétinoïque tout-trans (ATRA)<sup>64,65</sup>.

En absence de ligand, l'hétérodimère RAR-RXR lie avec haute affinité les RAREs. Il inhibe alors la différenciation en réprimant la transcription de ses gènes cibles en recrutant, sur leur promoteur des co-répresseurs nucléaires (N-CoR (nuclear receptor co-repressor) ou SMRT (silencing mediator for RAR and TR))<sup>66-68</sup>. Ces co-répresseurs, à leur tour, recrutent le complexe Sin 3 contenant HDAC1. Ce complexe mène à la déacétylation des histones au cœur des nucléosomes et à la condensation de la chromatine. La chromatine condensée est inaccessible aux activateurs transcriptionnels et à la machinerie basale de transcription et, par conséquent, la transcription est réprimée et l'expression des gènes cibles de RAR rendue silencieuse.

La liaison de RA avec son récepteur induit un changement conformationnel du domaine de liaison au ligand (LBD), ce qui dissocie le complexe de co-répresseurs et permet de recruter des co-activateurs (dont CBP, ACTR). Les différents co-activateurs interagissent entre eux et avec d'autres partenaires protéiques pour favoriser l'initiation de la transcription en acétylant les histones et en déroulant l'ADN par une activité hélicase (Trip1/sug1). Ces activités induisent un relâchement de la chromatine, ce qui permet de recruter la machinerie de transcription basale (TIF-1) sur le promoteur des gènes cibles de RAR<sup>69</sup>.

Les patients et les souris déprivés en vitamine A (VAD), un précurseur de l'acide rétinoïque, présentent une hématopoïèse anormale caractérisée, entre autre, par une expansion accrue et anormale de granulocytes<sup>70-73</sup>, suggérant un rôle pour au moins une des trois formes de RAR $\alpha$  dans la production des granulocytes. Toutefois, les souris dépourvues de RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  ou RAR $\gamma$  sont viables et

possèdent peu de défauts, même au niveau hématologique<sup>74-77</sup>. Ces études suggèrent qu'une redondance de la fonction de ces récepteurs masque l'importance du rôle physiologique de chaque type de RAR dans l'hématopoïèse. RAR $\alpha$  et  $\gamma$  sont exprimés dans les cellules myéloïdes. RAR $\alpha$  est la forme prédominante et son expression est induite à partir du stade GMP<sup>78,79</sup>. Malgré ces résultats mitigés, un rôle modulateur des RAR $\alpha$  dans la lignée granulocytaire est appuyée par de nombreuses études dans des lignées cellulaires et des cultures primaires de cellules de moelle de souris et humaines et de cellules de foie foetal en culture. En culture, les cellules dépourvues de RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  sont bloquées au stade de myélocytes alors qu'elles se différencient normalement *in vivo*<sup>79</sup>. Dans les cellules multipotentes FDCPmixA4, on observe une corrélation entre un traitement au G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), qui stimule la différenciation granulocytaire et la régulation à la hausse des deux isoformes de RAR $\alpha$ . A l'inverse, un traitement à l'érythropoïétine, qui stimule l'érythropoïèse, corrèle avec une répression de l'expression de RAR $\alpha$ <sup>78</sup>. Dans les cellules de moelle et de foie foetal humains, les rétinoïdes inhibent la prolifération et semblent stimuler la différenciation des granulocytes sans affecter celle des monocytes et des érythrocytes<sup>80,81</sup>. De plus, la transfection d'une forme dominante négative de RAR $\alpha$  (constituée de la portion C-terminale tronquée de RAR $\alpha$ , dans laquelle le domaine de liaison au ligand (LBD) était partiellement absent) dans les cellules d'une culture primaire de moelle de souris ou des FDCPmixA4, bloque la différenciation granulocytaire. *In vivo*, l'expression d'un RAR $\alpha$  porteur d'une mutation dans le LBD qui empêche sa liaison à RA, mène à augmentation du nombre de neutrophiles immatures dans la moelle<sup>82</sup>.

L'ensemble de ces études et le fait que le locus de RAR $\alpha$  soit impliqué systématiquement dans toutes les translocations décrites dans l'APL, suggèrent que RAR $\alpha$  possède un rôle important de facteur de transcription dans la granulopoïèse. En absence de ligand, RAR $\alpha$  semble être un régulateur négatif

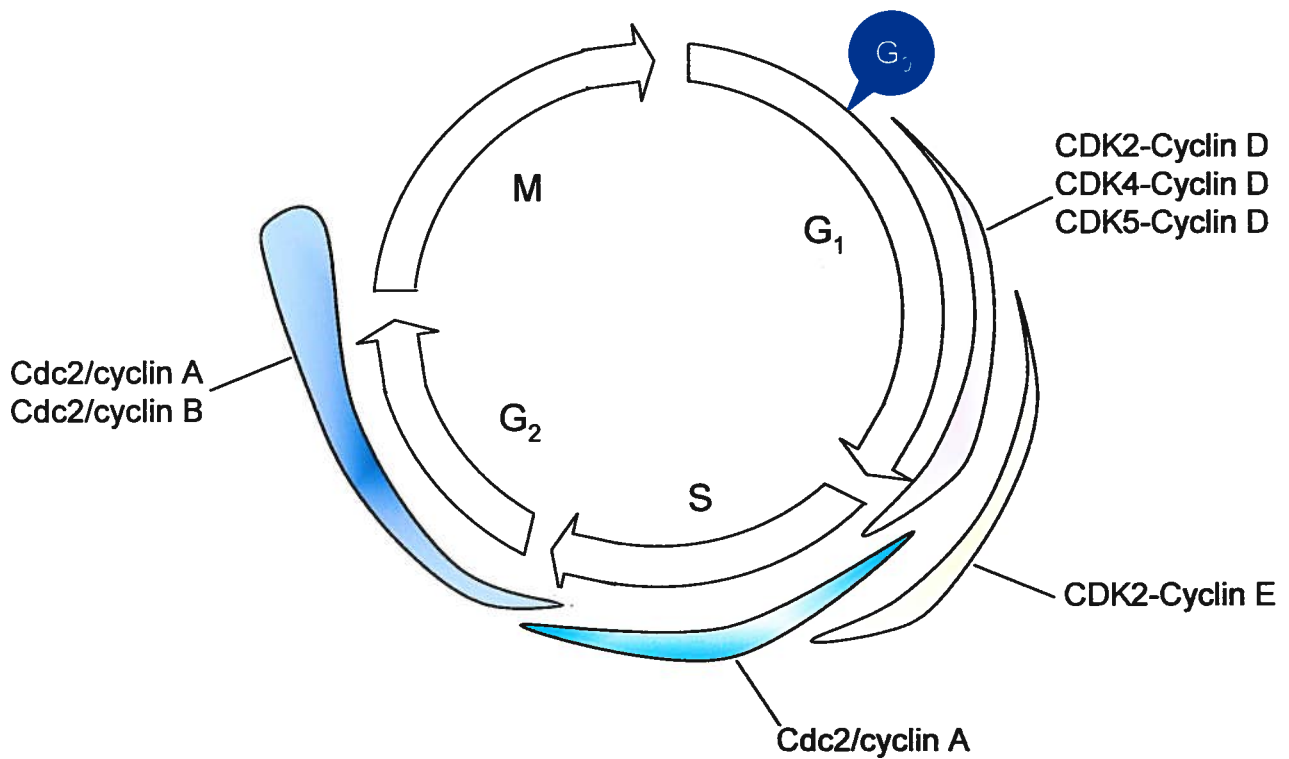
de la différenciation granulocytaire alors que la présence de son agoniste stimule la différenciation grâce à l'activation de l'expression de certains gènes.

### 1.3 Cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire doit être contrôlée de façon rigoureuse dans toutes les cellules. En effet, le dérèglement de la prolifération est associé de près au processus de tumorigénèse et à l'inhibition de la différenciation. Ainsi, presque tous les types de cancer ont des altérations dans les gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire<sup>83</sup>. Dans la lignée granulocytaire, comme dans multiples autres types cellulaires, il doit y avoir un arrêt de la prolifération cellulaire pour que la différenciation finale se produise. Plusieurs exemples ont démontré qu'en empêchant l'arrêt de la prolifération, les cellules ne peuvent pas se différencier<sup>84-87</sup>. De plus, plusieurs facteurs de transcription essentiels pour la différenciation induisent aussi un arrêt du cycle cellulaire, soulignant à nouveau la relation étroite entre la différenciation et la prolifération.

Le cycle cellulaire peut être divisé en quatre phases distinctes: phase de croissance initiale ( $G_1$ ), phase de réplication de l'ADN (S), une phase de pause ( $G_2$ ) et la mitose (M)<sup>88</sup> (Figure 1.3). A la transition  $G_1/S$ , la cellule est commise à se diviser de façon irréversible. La progression du cycle est soumise à différents contrôles qui reflètent l'action de facteurs de croissance extracellulaires et certaines conditions intracellulaires. Les contrôles intrinsèques de la cellule proviennent du besoin de coordonner les événements propres au progrès du cycle cellulaire dans le temps et l'espace. En effet, la progression du cycle doit s'arrêter en réponse à certaines irrégularités tels que des dommages à l'ADN ou un assemblage des fuseaux mitotiques défectueux. Dans leur ensemble, les contrôles du cycle cellulaire servent à intégrer la prolifération cellulaire, la croissance et la différenciation.





**Figure 1.3. Le cycle cellulaire.** La progression à travers les différentes étapes du cycle cellulaire est contrôlée par l'activation de kinases (CDK) par des cyclines spécifiques, la phosphorylation du complexe et les inhibiteurs de kinase présents dans la cellule. Le patron de synthèse et destruction des cyclines et la formation des complexes CDK-Cycline spécifiques sont illustrés en couleur.

### 1.3.1 Contrôle du cycle cellulaire

#### 1.3.1.1 Les cyclines

La transition entre les diverses étapes s'effectue grâce à l'activation et l'inactivation de kinases (CDK) associées à des partenaires de régulation (les Cyclines) qui modifient différents substrats impliqués dans la synthèse de l'ADN, la croissance cellulaire, la destruction de l'enveloppe nucléaire, etc. Les substrats des CDK dépendent de la cycline qui y est associée. La régulation de l'activité CDK s'effectue par trois mécanismes : par liaison avec les cyclines, par la phosphorylation et la déphosphorylation des sous-unités CDK et des cyclines et par l'intermédiaire d'inhibiteurs de CDK (CKI).

Différentes cyclines vont interagir avec différents CDK et certaines cyclines peuvent lier différents CDK. L'abondance de différentes cyclines varie en fonction des différentes étapes du cycle cellulaire. Leur synthèse programmée et leur destruction par protéolyse assure l'activation des CDK dans un patron temporel approprié au maintien de l'ordre des événements du cycle cellulaire. Les cyclines de type D sont considérées comme des régulateurs clés de la progression de la phase G<sub>1</sub>. Lorsque les cellules quiescentes entrent dans le cycle cellulaire, les gènes codant pour les cyclines de type D sont induits en réponse à des signaux mitotiques. Elles s'assemblent alors avec CDK4 et CDK6<sup>89</sup>. Le complexe Cycline-CDK est transloqué dans le noyau où il est phosphorylé par CAK (CDK activating kinase). Les différentes cibles contrôlées par ce complexe permettent à la cellule de progresser à travers la phase G<sub>1</sub>. La fonction la plus connue des kinases cycline D-dépendantes est de phosphoryler Rb (la protéine du retinoblastome) et les protéines apparentées (p107 et p130) au milieu de la phase G<sub>1</sub><sup>90,91</sup>. Lors de la phosphorylation de Rb, les protéines E2F, normalement associées avec la forme hypophosphorylée de Rb, sont libérées et transactivent leurs gènes cibles impliqués, entre autres, dans la synthèse et la réparation de l'ADN et dans l'induction de la transcription de d'autres cyclines

<sup>45,90-97</sup>. Dans la lignée myéloïde, l'activité du facteur de transcription E2F est également inhibé par C/EBP $\alpha$ , ce qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G<sub>1</sub>/S <sup>35,36</sup>. Une cible de E2A est le gène encodant pour la cycline E qui se lie à CDK2 pour assurer, suite à l'activation du complexe, la transition G<sub>1</sub>/S. La progression à travers la phase S est assurée par l'association de la cycline A et de CDK2 <sup>98</sup>. Finalement, la formation de complexe entre CDC2 et la cycline A et la Cycline B promeut l'entrée dans la phase de mitose <sup>89</sup>.

### 1.3.1.2 Les inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes

Finalement, les activités des complexes Kinase des Cyclines D :CDK4/6 et Kinase des Cyclines E : CDK2 sont régulées négativement par deux familles d'inhibiteurs de kinase cycline-dépendante: les protéines INK4 (p16 INK4, p15 INK4B, p18 INK4C et p19 INK4D) et les protéines KIP (kinase inhibitor protein) incluant p21 CIP/WAF, p27 KIP1 et p57 KIP2. Les protéines de la famille INK4 inhibent les sous-unités catalytiques de CDK4 et CDK6. Elles sont induites au cours de la sénescence cellulaire <sup>99</sup> et suite à une exposition à des signaux inhibiteurs de croissance (par exemple, TGF $\beta$ )<sup>100</sup>. P21 est le membre le plus connu de la famille KIP. Il est, entre autre, activé lors de dommages à l'ADN par la voie p53. Dans la lignée myéloïde, sa transcription, de même que celle de p27, est directement activée par RAR $\alpha$ . De plus, p27 est indirectement induit par RAR $\alpha$  <sup>101-103</sup>. Cette protéine est un inhibiteur du cycle cellulaire grâce à sa capacité à lier et inhiber l'activité des complexes Kinase des Cyclines D :CDK4/6 et Kinase des Cyclines E :CDK2 <sup>104,105</sup>.

## 1.4 Les leucémies myéloïdes aiguës

L'oncogénèse de tumeurs solides et du système hématopoïétique est considérée comme un processus à plusieurs étapes qui nécessite plusieurs événements génétiques ("hits") menant à l'activation de différents oncogènes collaborateurs et à l'inactivation de suppresseurs de tumeur. Les leucémies sont caractérisées par des translocations, des inversions et des délétions récurrentes acquises de

façon somatique <sup>106</sup>. Des réarrangements chromosomiques spécifiques ont été liés à des sous-types distincts de leucémies ou associés à des stades particuliers de la progression de la maladie et, peuvent permettre d'établir un pronostic. Ces réarrangement structuraux impliquent fréquemment des gènes codant pour des facteurs de transcription dont la fonction est altérée par la translocation et qui interfèrent avec les cascades régulatrices critiques pour le contrôle de la croissance, la différenciation et la survie des précurseurs hématopoïétiques normaux <sup>107</sup>. Les produits de ces translocations agissent de concert avec d'autres classes de lésions génétiques (tel que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur).

Les leucémies myéloïdes aiguës (AML) sont caractérisées par l'accumulation dans la moelle et dans le sang périphérique de précurseurs de granulocytes ou de monocytes. Les AML sont plus communes chez les adultes et ont une incidence qui augmente avec l'âge. Elles constituent un groupe de maladies hétérogènes d'un point de vue physiologique et traitement clinique. La classification traditionnelle des AML se base sur la morphologie cellulaire et le stade dans lequel les cellules leucémiques sont bloquées (cytomorphologie). Plus récemment, les activités enzymatiques (cytochimie), les marqueurs de surface (immunophénotypage) et les translocations chromosomiques (détectées par RT-PCR et/ou FISH) ont permis d'améliorer la classification.

De façon générale, les AML sont rapidement fatales en l'absence de traitement puisque qu'elles inhibent la capacité de la moelle osseuse à produire les neutrophiles et les plaquettes nécessaires pour la défense contre les infections bactériennes et le maintien de l'intégrité du système vasculaire. La mort résulte normalement d'infection ou d'hémorragie.

## 1.5 La leucémie promyélocytaire aiguë

La leucémie promyélocytaire aiguë (APL) est considérée comme le sous-type M3 des leucémies myéloïdes aiguës (AML), selon la classification FAB (French-American-British) <sup>20</sup>. La fréquence des cas *de novo* d'APL est estimée à 8-15% de toutes les leucémies non-lymphoblastiques, avec une incidence de 2-3 cas par million d'habitants, par année. La fréquence est plus élevée en Europe méridionale (Italie, Espagne, Portugal) (15-20%), comparativement à l'Europe centrale (7% en Allemagne). Une forte incidence est rapportée dans les pays d'Amérique latine où ce type de leucémie représente 30% des leucémies non-lymphoblastiques aiguës <sup>108</sup>. Les deux sexes sont également vulnérables à l'APL et elle est peu commune chez les enfants <sup>109</sup>.

Cette leucémie est caractérisée par trois éléments uniques et distinctifs : 1) l'accumulation dans la moelle osseuse de cellules tumorales possédant des caractéristiques promyélocytaïres; 2) elle est associée invariablement avec des translocations impliquant toujours le chromosome 17; 3) dans la majorité des cas, il est possible, par un traitement à l'acide rétinoïque (ATRA), d'induire la différenciation des blastes leucémiques.

D'un point de vue moléculaire, l'APL est associé avec des translocations réciproques qui impliquent obligatoirement le gène de  $RAR\alpha$  situé sur le chromosome 17(q21) et un des cinq partenaires distincts décrits jusqu'à présent (Table 1). Dans une grande majorité des cas, le locus de  $RAR\alpha$  est fusionné au gène de PML (promyelocytic leukemia gene) situé sur le chromosome 15(q22). Toutefois, dans certains cas, il a été rapporté que la translocation impliquait plutôt les gènes encodant pour  $RAR\alpha$  et PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) <sup>110</sup>, NPM (nucleophosmin) <sup>111</sup>, NuMA (Nuclear mitotic apparatus) <sup>112</sup> ou STAT 5 <sup>113</sup> localisés respectivement sur les chromosomes 11(q23), 5(q32), 11(q13) et 17(q11) <sup>114</sup>. D'autres anomalies chromosomiques ont été décrites

**Table 1 : Translocations décrites dans l'APL.**

Gène	Anormalité Cytogénétique	Nom	Rôle	Produits de fusion	Sensibilité à ATRA	Référence
PML	t(15;17)(q22;q21)	ProMyelocytic Leukemia	Apoptose	PML-RAR $\alpha$ RAR $\alpha$ -PML	Oui Également sensible à l'arsenic	De Thé et al, 1991, Cell 66; 675-684
PLZF	t(11;17)(q23;q21)	ProMyelocytic Zinc Finger	Morphogénèse (membres et squelette)	PLZF-RAR $\alpha$ RAR $\alpha$ -PLZF	Non	Chen et al, 1993, EMBO J. 12; 1161-1167
NPM	t(5;17)(q35;q21)	Nucleophosmin	Biogénèse des ribosomes	NPM-RAR $\alpha$ RAR $\alpha$ -NPM	Oui	Redner et al, 1996, Blood 87; 882-886
NuMA	t(11;17)(q13;q21)	Nuclear Mitotic Apparatus	Compaction de la chromatine	NuMA-RAR $\alpha$ Réciproque absente	Oui	Wells et al, 1997, Nat. Genet. 17; 109-113
STAT5b	der17	Signal Transducer and Activator of Transcription	Facteur de transcription pour EPO, G-CSF, IL-2, IL-3 et IL-7	STAT5b-RAR $\alpha$ Réciproque absente	Non	Arnould et al, 1999, Hum Mol Genet. 8; 1741-1749

dans environ 30% des cas d'APL sans toutefois qu'on y associe un pronostique pire <sup>115,116</sup>.

### 1.5.1 Présentation de la leucémie chez les patients

Chez les patients souffrant de la forme classique d'APL, un frottis de cellules de moelle révèle que la majorité des cellules sont des promyélocytes anormaux comportant de nombreuses granules azurophiles et des bâtonnets de Auer (inclusions cytoplasmiques en forme de fuseau) parfois en fagots. Les protéases contenues dans leurs granules (Cathepsin G, Leucocyte Elastase, Proteinase 3/myeloblastine, myeloperoxydase et les défensins) peuvent activer les voies de coagulation et mener, lors de leur relâchement par les cellules APL, à une coagulation intravasculaire disséminée ou fibrinolyse caractérisée par des niveaux élevés de produits de dégradation de fibrinogène/fibrine <sup>117</sup>.

Les blastes d'APL possèdent un immunophénotype différent des autres AML. Ils expriment des protéines de surface retrouvés sur les promyélocytes normaux soit CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> et l'antigène HLA-DR<sup>-</sup> <sup>118</sup>. À l'occasion, ils expriment des marqueurs lymphocytaires tel que le marqueur de cellules B, CD19, le marqueur de cellules T, CD2 <sup>119</sup> ou l'antigène associé aux cellules NK (natural killer), CD56 <sup>120</sup>. L'expression de CD56 semble corrélérer particulièrement avec l'APL dans laquelle on retrouve la translocation t(11;17). Ces marqueurs retrouvés occasionnellement sont associés avec un pronostique défavorable <sup>120</sup>.

### 1.5.2 Les partenaires de translocation

L'APL est caractérisée par des réarrangements chromosomiques qui fusionnent le gène codant pour le RAR $\alpha$  à l'un des cinq gènes partenaires décrits jusqu'à présent. Le réarrangement le plus fréquent implique le gène de PML (95% des cas) <sup>121</sup> suivi de celui impliquant PLZF (0.8%) et NPM (0.5%). NuMA et STAT5b ont été décrit comme partenaire dans seulement un cas <sup>122</sup> (Table 1).

Lors de chaque translocation, il y a production d'une protéine chimérique (X-RAR $\alpha$ ) qui conserve le domaine de liaison à l'ADN et au ligand de RAR $\alpha$ . Il en résulte ainsi un récepteur de rétinoïde aberrant qui possède toutefois la même affinité à l'acide rétinoïque que la forme sauvage de RAR $\alpha$  <sup>111,123-128</sup>. Les X-RAR $\alpha$  possèdent toutes la capacité à s'homo- ou oligo-dimériser. Or, ces interactions inhibent la signalisation rétinoïde normale. En effet, Lin et al <sup>240</sup> ont rapporté que dans les cellules exprimant des protéines PML-RAR $\alpha$  inaptes à l'homodimérisation, la réponse à l'acide rétinoïque est restaurée. De plus, ils ont confirmé que ces protéines chimériques interfèrent non seulement avec la fonction de RAR $\alpha$ , mais également avec la signalisation des autres récepteurs nucléaires. Toutefois, des études *in vivo* ont démontré que les protéines X-RAR $\alpha$  sont insuffisantes pour la leucémogénèse, tout comme le dérangement de la voie de signalisation rétinoïde <sup>79,129, 151-153, 220</sup> et, que l'altération des fonctions de d'autres facteurs, telles que celles contrôlées par les partenaires de translocation, sont également nécessaires pour le développement de l'APL. Les divers partenaires de translocation possèdent peu en commun d'un point de vue structurel et fonctionnel si ce n'est du fait que ce sont toutes des protéines qui peuvent être phosphorylées et qui possèdent au moins un domaine d'interaction protéique leur permettant de s'homo- ou s'hétérodimériser. Du point de vue de leur localisation subcellulaire, PML, NPM et NuMA sont des protéines associées à la matrice nucléaire et PLZF est retrouvé dans des corps nucléaires associés à la matrice nucléaire. Le peu de points communs entre les différents partenaires de translocation suggèrent qu'il n'y a pas nécessairement de deuxième voie commune directe affectée par toutes les translocations.

#### 1.5.1.1 PML

PML est une protéine nucléaire de la famille des protéines RING <sup>130</sup>. Elle semble exprimée de façon relativement ubiquiste. Elle a été détectée dans plusieurs lignées cellulaires. Toutefois, la répartition tissulaire reste controversée <sup>131</sup>. En



effet, il semblerait que l'expression des ARNm ne concorde pas avec les niveaux de protéines. Ces observations suggèrent un contrôle post-transcriptionnel de l'expression de la protéine <sup>132</sup>. PML est fortement exprimé dans le cadre de maladies inflammatoires telles que l'hépatite et dans les cellules inflammatoires entourant les cancers épithéliaux et Hodkin's <sup>133-135</sup>. Il semble également y avoir une corrélation inversement proportionnelle entre l'expression de PML et le niveau de prolifération des tissus normaux <sup>136</sup>. PML est exprimé dans les précurseurs myéloïdes de la moelle et, à moindre degré dans les monocytes et granulocytes circulants <sup>137,138</sup>.

Les souris PML<sup>-/-</sup> ne développent pas de tumeurs de façon spontanée mais la perte de PML les prédispose à une variété de tumeurs suite à une exposition à des agents cancérigènes. Cette prédisposition serait due au fait que les cellules de ces souris sont protégées contre l'apoptose induite par les effets létaux des radiations ionisantes ou les anticorps contre Fas <sup>139</sup>.

Dans les cellules, PML est une composante des corps nucléaires (NB=nuclear bodies ou POD) <sup>140,141</sup> qui sont composés de nombreuses protéines et sont associée avec la matrice nucléaire. Plus de 30 protéines ont été identifiées comme composantes de ces corps nucléaires telles que eIF4E (eucaryotic translation initiating factor 4E) <sup>142,143</sup>, Rb <sup>144</sup>, PRH (proline-rich homeodomain protein) <sup>145</sup> et PLZF <sup>146</sup>. Les fonctions physiologiques et biochimiques de PML ne sont pas entièrement éclaircies. Toutefois, en fonction des interactions protéiques entre PML et certains partenaires et grâce à des études dans des lignées cellulaires et dans des souris dans lesquelles l'expression de PML a été abolie, il a été possible de suggérer que PML est impliqué dans plusieurs processus cellulaires, incluant l'apoptose, la sénescence cellulaire, la régulation de la croissance cellulaire, la régulation transcriptionnelle, la maturation de l'ARN, le contrôle de la stabilité génomique, la réponse aux agents pathogènes viraux, la présentation d'antigènes et la suppression de tumeur <sup>147,148</sup>.

### *PML-RAR $\alpha$ et RAR $\alpha$ -PML*

PML-RAR $\alpha$  est exprimé chez les patients souffrant d'APL et porteurs de la translocation t(15;17). Parmi ceux-ci, l'expression d'ARNm encodant pour la protéine de fusion réciproque, RAR $\alpha$ -PML est détectée dans seulement 80% des cas<sup>149,150</sup>, ce qui suggère que cette dernière n'est pas essentielle au processus de leucémogénèse contrairement à PML-RAR $\alpha$ .

Quand l'expression de PML-RAR $\alpha$  est ciblé au stade promyélocytes/métamyélocytes dans la lignée des granulocytes, en utilisant le promoteur MRP8 ou de la Cathepsin G, les souris transgéniques développent, vers l'âge de 6 à 12 mois, une leucémie similaire à celle observée chez l'humain, dans 10-30% des animaux. Celle-ci est précédée par une phase pré-leucémique caractérisée par une augmentation de cellules myéloïdes immatures dans la moelle et une spénomégalie due à une hématopoïèse extra médullaire<sup>151-153</sup>. L'importance de la période de latence suggère également que d'autres événements génétiques doivent contribuer à la leucémogénèse. Ces résultats appuient un rôle dispensable pour RAR $\alpha$ -PML dans le développement de l'APL. Toutefois, l'expression de RAR $\alpha$ -PML pourrait remplacer la nécessité de certains événements génétiques supplémentaires. En effet, même si les transgéniques pour RAR $\alpha$ -PML ne développent pas de leucémies, les doubles transgéniques exprimant PML-RAR $\alpha$  et RAR $\alpha$ -PML développent une APL avec un taux de pénétrance accru comparativement aux souris exprimant seulement PML-RAR $\alpha$  (57% vs 15%)<sup>154</sup>. Toutefois, les mécanismes impliqués dans cette collaboration demeurent obscurs.

Diverses études *in vivo* et *in vitro* ont permis d'élucider certains mécanismes par lesquels PML-RAR $\alpha$  pourrait contribuer à la leucémogénèse. Dans les cellules APL, PML-RAR $\alpha$  est présent en excès important par rapport à RAR $\alpha$  de type sauvage. Cette forme aberrante de récepteur pour les rétinoïdes prédomine donc

dans les cellules leucémiques <sup>155,156</sup>. L'oncoprotéine est capable de lier les RARE en hétérodimère avec RXR avec la même affinité que RAR $\alpha$ /RXR <sup>125,155,156</sup> et en homodimères grâce au domaine hélice torsadée (coiled-coil) de PML mais, avec une affinité plus faible que RAR $\alpha$ -RXR <sup>155,156</sup>. Les niveaux d'expression élevés de PML-RAR $\alpha$  et ces résultats suggèrent donc que PML-RAR $\alpha$  pourrait altérer la signalisation des rétinoïdes en se liant en homodimères à des gènes cibles différents de ceux normalement affectés par RAR $\alpha$ /RXR, en compétitionnant la liaison de RAR $\alpha$  sur les RARE de ses gènes cibles en tant qu'homodimère ou hétérodimère avec RXR et en séquestrant RXR et/ou d'autres cofacteurs de RAR $\alpha$ . En plus de déranger la fonction rétinoïde, la protéine de fusion peut inhiber les fonctions normales de PML. Wang *et al* ont démontré que PML-RAR $\alpha$  agit de façon dominante négative sur la fonction de PML, bloquant, entre autre, la capacité de PML à induire l'apoptose <sup>139</sup>. De plus, une étude récente par Lan et Ley <sup>239</sup> a démontré que la neutrophile élastase clive PML-RAR $\alpha$ , dans les souris et humains, et que le produit de dégradation est important au développement de l'APL. Toutefois, le mécanisme et les cibles affectées demeurent obscurs.

#### 1.5.2.2 PLZF

Le gène de PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger), tout comme celui de PML, a d'abord été identifié grâce à sa participation à un réarrangement chromosomique avec RAR $\alpha$ , retrouvé dans certains cas de leucémies promyélocyaires aiguës <sup>157-159</sup>. Il encode un répresseur transcriptionnel qui appartient à la même famille que Bcl6 : la famille POK caractérisée par la présence d'un domaine BTB/POZ impliqué dans l'homodimérisation, l'hétérodimérisation et la colocalisation avec d'autres oncogènes <sup>160-166</sup> et une série de doigts de zinc de type C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> Krüppel en C-terminal qui lui permet de lier des séquences consensus sur le promoteur de gènes cibles.

PLZF est exprimé dans les progéniteurs hématopoïétiques quiescents (CD34+)<sup>167</sup>. Son expression augmente graduellement au cours du développement megakaryocytaire alors qu'elle diminue dans les lignées érythroïdes et granulocytaires en différenciation<sup>110,167</sup>. Toutefois, les souris dépourvues de PLZF ne présentent aucun défaut hématopoïétique<sup>168</sup>. Il est possible que d'autres membres de la même famille que PLZF, tel que MZF-1, par exemple<sup>169</sup>, compensent pour son absence.

Le patron d'expression de PLZF et les études effectuées en lignées cellulaires et dans les souris dans lesquelles l'expression de PLZF était abolie, ont permis de déterminer que ce facteur de transcription est impliqué dans les processus cellulaires d'apoptose, de suppression de la prolifération cellulaire, la différenciation et la répression transcriptionnelle<sup>168,170,171</sup>. PLZF semble également jouer un rôle dans le maintien d'une population de progéniteurs hématopoïétiques quiescente et non-différenciée<sup>172,173</sup>. PLZF contrôle ces divers processus par au moins deux mécanismes différents : transcriptionnellement en recrutant sur ses cibles des complexes de déacétylation des histones qui modifient l'état de la chromatine la rendant inaccessible pour les facteurs de transcription<sup>174</sup> et, en interagissant avec d'autres facteurs de transcription tels que GATA-1 et SP-1, pour moduler leurs activités respectives<sup>175,176</sup>. Peu de cibles dans le système hématopoïétique lui sont connues mais, certaines études ont démontré que PLZF inhibe la transcription des gènes codant pour la cycline A2, c-myc et certains gènes hox. Sans que cette fonction ait été démontrée dans les cellules hématopoïétiques, dans les cellules HeLa, PLZF interagit également avec RAR $\alpha$  et interfère avec son hétérodimérisation avec RXR nuisant à la fonction normale de RAR $\alpha$ <sup>177</sup>.

#### *PLZF-RAR $\alpha$ et RAR $\alpha$ -PLZF*

Ces produits de la translocation t(11;17) et leur contribution au processus de leucémogénèse seront traités au chapitre 2.

### 1.5.2.3 NPM

NPM est une phosphoprotéine nucléolaire majeure qui est exprimée de façon ubiquiste. Elle est en mesure d'hexamériser via un domaine d'oligomérisation en N-terminal. NPM est retrouvé dans les régions subcellulaires associées à la maturation des ribonucléoprotéines (RNP) <sup>178-180</sup>. NPM se lie aux acides nucléiques, pour modifier leur conformation dans le but probable de faciliter la liaison des protéines ribosomales aux RNAr <sup>178</sup>. De plus, on croit qu'elle est importante pour le transport des composantes ribosomales et d'autres protéines entre le cytoplasme et les nucléoles <sup>181-183</sup>. Elle jouerait également un rôle dans le contrôle de la croissance. Des évidences récentes suggèrent un rôle pour NPM en tant que régulateur de p53 <sup>184</sup>. En effet, NPM est en mesure d'interagir avec p53, de la stabiliser et augmenter sa transcription, suite à différents stress. La surexpression de NPM accélère également la sénescence prématurée induite par p53 dans les fibroblastes. Le gène encodant pour NPM est ciblé dans d'autres maladies hématologiques comme, dans certains cas d'AML dans lesquelles on retrouve la translocation t(3;5)(q25.1;q34-35) produisant la protéine de fusion NPM-MLF1 et dans certains cas de lymphomes caractérisés par la translocation t(2;5)(p23;q34-35) et générant la fusion NPM-ALK <sup>185,186</sup>.

#### *NPM-RAR $\alpha$*

Les souris transgéniques exprimant NPM-RAR $\alpha$  sous le contrôle du promoteur de la Cathepsin G, développent un syndrome similaire à l'APL suite à une période de latence de 12 à 15 mois <sup>187</sup>.

Tout comme PML-RAR $\alpha$ , NPM-RAR $\alpha$  agit comme un activateur ligand-dépendant s'il est coexprimé avec des gènes rapporteurs contenant des RARE <sup>111</sup>. Des essais en culture cellulaire ont démontré que, tout comme PML-RAR $\alpha$  et

PLZF-RAR $\alpha$ , NPM-RAR $\alpha$  semble avoir une activité dominante négative sur l'activité de RAR $\alpha$  et de ses cofacteurs <sup>188-191</sup>.

La protéine réciproque RAR $\alpha$ -NPM a été détectée chez les patients porteurs de la translocation t(5;17) <sup>111</sup>. Son rôle dans le processus de leucémogénèse est inconnu. La protéine est toutefois en mesure d'interagir avec NPM. On ignore toutefois si RAR $\alpha$ -NPM interfère avec la fonction de NPM.

#### 1.5.2.4 NuMA

NuMA est une protéine ubiquiste abondante qui est associée à la matrice nucléaire. NuMA peut multimériser par un motif hélice torsadée (coiled-coil) <sup>192</sup>. Elle a plusieurs fonctions dépendantes du cycle cellulaire incluant l'organisation de l'appareillage mitotique au cours de l'interphase. Elle est impliquée dans la formation des fuseaux mitotiques <sup>193-196</sup> et dans la reformation des noyaux filles lors de la fin de la division cellulaire.

#### *NuMA-RAR $\alpha$*

Cette translocation a été initialement décrite chez un patient souffrant d'APL qui a avait traité avec succès à l'ATRA <sup>112</sup>. Les bases moléculaires selon lesquelles NuMA-RAR $\alpha$  possède des propriétés oncogéniques sont peu connues. Tout comme les autres protéines de fusion décrites précédemment, NuMA-RAR $\alpha$  lie les RARE en homodimères ou en hétérodimères avec RXR et inhibe l'activité transcriptionnelle de RAR $\alpha$  (dans la ligné d'hépatoblastome HepG2). Elle interagit également *in vitro* avec NuMA. Comme dans le cas des autres partenaires de translocation, on peut suggérer que la protéine chimérique pourrait nuire à la fonction normale de la protéine NuMA <sup>197</sup>. Cette hypothèse reste à être documentée.

### 1.5.2.5 Stat5b

Les facteurs transcription STAT5b sont exprimés dans plusieurs tissus incluant les progéniteurs hématopoïétiques. Les souris déficientes pour STAT5B ne présentent pas de défauts hématopoïétiques dramatiques. D'autres membres de la famille, tel que STAT5a, sont donc potentiellement en mesure de compenser pour cette perte. Effectivement, en abolissant l'expression de STAT5a et b par inactivation génique, on observe, malgré la présence d'un nombre normal de cellules souches hématopoïétiques, que les souris souffrent de cytopénie périphérique des lignées myéloïdes, érythroïdes et lymphoïdes. Des niveaux accrus d'apoptose étaient également rapportés dans la moelle. Ces observations soulignent l'importance du rôle de ce STAT5a et b dans l'hématopoïèse <sup>198</sup>.

Les protéines STAT5 sont activées par les tyrosines kinases JAK suite au signal de cytokines telles que le G-CSF et l'IL-6. Lors de leur phosphorylation, elles sont transloquées du cytoplasme vers le noyau où elles augmentent la transcription de gènes cibles spécifiques impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie. L'activation aberrante de STAT5 a été rapportée dans plusieurs cancers hématopoïétiques dont des leucémies myéloïdes aiguës et chroniques <sup>198,199</sup>.

### *STAT-RAR $\alpha$*

Arnould *et al* <sup>113</sup> ont démontré l'existence d'un 5<sup>e</sup> partenaire de translocation possible chez un patient souffrant d'APL. Dans ce cas, Stat5b était fusionné à RAR $\alpha$  suite à une délétion interstitielle de 3Mb dans le bras long du chromosome 17. Ce patient présentait une résistance au traitement à l'ATRA.

Comme dans le cas des autres protéines chimériques générées par diverses translocation impliquant RAR $\alpha$ , cet oncogène interfère avec la fonction de RAR $\alpha$ .

et possiblement celle des autres récepteurs nucléaires en liant des RARE en homodimères et en hétérodimères avec RXR <sup>200</sup>. Cette protéine stimule également avec l'activité de STAT3, un autre membre de la famille des STAT dont l'activation est également constatée dans plusieurs cancers.

### 1.5.3 Traitement thérapeutique

Le traitement thérapeutique de l'APL varie en fonction de la translocation présente dans le clone leucémique. Dans tous les cas toutefois, il est important, suite à un traitement d'obtenir une rémission moléculaire (absence d'amplication, par RT-PCR de l'expression des gènes chimériques caractéristiques de l'APL) pour un meilleur pronostic de survie <sup>201-204</sup>.

Deux approches principales sont présentement utilisées pour traiter la forme prédominante d'APL; celle dans laquelle on retrouve la translocation t(15;17). L'induction de la différenciation du clone leucémique par l'ATRA a été la première application d'une thérapie de différenciation <sup>205</sup>. A ce jour aucun autre sous-type d'AML ne répond à l'ATRA <sup>206</sup>. Ce traitement induit une rémission de 90% des cas suite à la différenciation et la mort des cellules malignes <sup>207</sup>. De plus, contrairement à un traitement de chimiothérapie qui permet d'obtenir 80% de rémission mais soumet les patients à des effets secondaires importants, la thérapie à l'ATRA démontre rapidement une amélioration de la coagulopathie, l'absence de résistance primaire, absence de phase anaplastique, pas de perte de cheveux et peu d'épisodes d'infections. Toutefois, suite à ce type de traitement, la survie à long terme atteint seulement 35% <sup>208</sup>. En effet, tous les patients rechutent éventuellement et développent une résistance secondaire à l'ATRA <sup>132,137,209-212</sup>. Le consensus en terme de traitement souhaitable actuellement pour contrer ce syndrome est d'utiliser la chimiothérapie simultanément avec le traitement à l'ATRA. Suite à ce traitement d'induction, une consolidation avec deux séries de chimiothérapie et un traitement d'ATRA en combinaison avec une chimiothérapie à faible dose pour 2 ans comme thérapie



de maintien permettait d'obtenir un taux de CR supérieur à 90% et un taux de rechute inférieur à 10% à 2 ans <sup>213</sup>.

Ce traitement est appliqué à une majorité des cas d'APL mais, pas tous. En effet, la translocation présente dans le clone leucémique affecte profondément la sensibilité du patient à l'ATRA (Table 1). L'APL t(15;17) représente la majorité des cas et elle répond bien à ce traitement contrairement à l'APL caractérisée par la translocation t(11;17) impliquant PLZF qui est insensible aux traitements utilisés de façon routinière pour ce type de leucémie. Les leucémies portant une translocation t(5;17) impliquant RAR $\alpha$  et NPM sont rares et semblent répondre à l'ATRA. Le traitement des blastes leucémiques primaires *in vitro* avec 10<sup>-6</sup> M ATRA permet leur différenciation. Toutefois, la réponse chez les patients est partielle <sup>111</sup>. Pourtant, la translocation entre les loci encodant pour RAR $\alpha$  et NuMA a été initialement décrite chez un patient souffrant d'APL qui a été traité avec succès à l'ATRA <sup>112</sup>. Finalement, l'unique patient chez qui la délétion interne du chromosome 17 a fusionné le gène de RAR $\alpha$  à celui de STAT5b semblait insensible à un traitement à l'ATRA <sup>113</sup>.

Les composés d'arsenic sont également prometteurs en tant qu'agent thérapeutique pour les patients porteurs de la translocation t(15;17). Des expériences en cliniques et *in vitro* suggèrent que certains composés d'arsenic (AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou ATO et plus récemment AS<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) sont particulièrement efficaces pour traiter l'APL t(15;17) (60-88% de rémission moléculaire) <sup>214</sup> en induisant la différenciation (à faible concentration 0.1-0.5  $\mu$ mol/L) et l'apoptose (à plus haute concentration 0.5-2.0  $\mu$ mol/L) des blastes leucémiques <sup>215-217</sup>. Ces résultats sont obtenus grâce à la réticulation chimique des protéines contenant des groupement thiol (-SH) par les composés d'arsenic. Ces liaisons covalentes altèrent l'activité d'une variété de systèmes enzymatiques et de protéines impliquées dans des voies de signalisation. Ce dérangement mène ultimement au déclenchement des réponses de différenciation et d'apoptose <sup>218</sup>.

Les patients qui portent la translocation t(11;17) ont un pronostique moins favorable que ceux qui répondent à un traitement de différenciation. Non seulement, ils ne répondent pas à ce type de traitement mais, ils sont également insensible à un traitement aux composés d'arsenic. Les patients décrits jusqu'à présent ont été traités par chimiothérapie et transplantation de moelle avec des résultats mitigés. Il y a toutefois peu de patients qui portent cette translocation, par conséquent, il n'existe pas de statistique à long terme sur le taux de survie le meilleur en fonction des différents traitement possible <sup>219</sup>.

## **2 LEUKEMOGENESIS IN APL T(11;17)**

## **Avant-propos**

Cette section de l'introduction est constitué d'un article de revue de la littérature dont le but est de faire une synthèse des travaux publiés sur le processus de leucémogénèse dans l'APL t(11;17). Deux auteurs figurent sur cet article intitulé « Leukemogenesis in APL t(11;17) » : Nathalie Girard et Trang Hoang. Cette revue nous a été demandé par la revue Leukemia.

Pour cet article, j'ai effectué la recherche de la littérature, la synthèse d'informations et la rédaction du texte. Dr Hoang a revu et corrigé le texte afin qu'il véhicule bien l'information recensée.

## Leukemogenesis in APL t(11;17)

Nathalie Girard<sup>1,2</sup> and Trang Hoang<sup>1-4\*</sup>

From the Institute of Immunovirology and Cancer <sup>1</sup>, the Molecular Biology Program<sup>2</sup>, the Department of Pharmacology<sup>3</sup> and Biochemistry<sup>4</sup>, University of Montreal.

Running title: Leukemogenesis in APL t(11;17)

This work was supported by grants from the Leukemia Research Fund of Canada (T.H.) and the Cancer Research Society Inc (T.H.). Nathalie Girard is supported by a studentship award from the Canadian Institutes for Health Research.

Correspondence to:

Trang Hoang

Institute of Immunovirology and Cancer (IRIC)

University of Montreal P.O. Box 6128, Downtown station

Montreal, Quebec

H3C 2J7



## Abstract

Acute promyelocytic leukemia (APL) is characterized by the expansion, in the bone marrow, of myeloid cells blocked in their differentiation at the promyelocytic stage. A variant form of APL t(11;17) is characterized by a translocation causing a fusion between the PLZF and RAR $\alpha$  loci, resulting in the expression of two reciprocal chimeric proteins : PLZF-RAR $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF. This variant form of APL has stimulated a particular interest because patients harbouring this rearrangement, as opposed to the more common form with the t(15;17) translocation, are resistant to differentiation therapy and have poor prognosis. Various studies have revealed that fusion proteins seem to contribute to leukemogenesis. Two mechanisms also seem to be involved in leukemogenesis. Chromatin harboring the targets of RAR $\alpha$  and PLZF is incorrectly modified by the translocation products resulting in misexpression of those genes. In addition, PLZF-RAR $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF have retained certain abilities of the parental protein to modulate the activity of different transcription factors and other protein partners. The promoter controlling their expression would then produce a novel protein structure with inappropriate temporal and spatial patterns and with altered activities. Studies in transgenic mice have underlined the importance of the translocation products in leukemia but also the fact that other genetic modifications are necessary for leukemogenesis. The various pathways affected by these modifications result in increased proliferation, defects in differentiation abilities and in programmed cell death. In this review, we will discuss the genes and proteins targeted in APL t(11;17) and how they may contribute to the leukemogenesis process.

**Keywords:** Acute promyelocytic leukemia, PLZF-RAR $\alpha$ , RAR $\alpha$ -PLZF, leukemogenesis, transgenic.

## Introduction

Oncogenesis of solid tumour or leukemia is considered to be a multi-step process. Considerable effort has been spent in trying to understand the genetic events essential to cell transformation and the different molecular pathways, which may be affected by those events. The better our knowledge of tumorigenesis, the better our approach to the development of new therapies not only in view of the numbers of targets uncovered but also in their specificity. In leukemia, recurrent chromosomal translocations have been linked to distinct subtypes or associated with particular stages of disease progression or prognostic outcomes. These rearrangements have clearly been implicated in the genesis of the disease. In acute myeloid leukemia, as in other acute leukemia, structural rearrangements often target transcription factors<sup>1</sup>. The end result of the translocation is often the production of reciprocal chimeric proteins. These fusion proteins generally have characteristics that differ from both of the original wild type proteins. Also, these new entities gain and/or lose certain domains, thereby altering their function and expression patterns. As a consequence, crucial downstream regulatory pathways, such as those involved in the control of cell proliferation, differentiation and survival are disrupted. However, the precise molecular pathways controlling these processes and the way in which the oncogenes affect them are still for the most part, elusive. In addition, studies of transgenic mice expressing these translocation products have highlighted that the expression of fusion proteins was insufficient to reproduce the human disease since the penetrance of the phenotype is often incomplete or different from the human disease and also that mice do not suffer from leukemia at birth. This suggests that additional genetic events are required to modify the phenotype of the tumour and/or shorten the latency period. This review will present our current knowledge on the roles of PLZF-RAR $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF, the products of a recurrent translocation found in certain cases of acute promyelocytic leukemia (APL, t(11;17)(q23;q21)) in leukemogenesis and, other

possible genetic alterations that are necessary for the transformation of normal myeloid cells.

### **APL t(11;17)**

APL is a consequence of the uncontrolled proliferation of immature blasts that fail to terminally differentiate into mature granulocytes. It is one of the best characterized adult leukemias at the molecular level. Five different chromosomal rearrangements have been described in APL patients (reviewed by Melnick and Licht, Mistry *et al* Redner and Zelent *et al* <sup>2-5</sup>). All of these rearrangements implicate the RAR $\alpha$  locus and underline the fact that disruption of normal retinoid signalling is an important step in the formation of APL. It would also be tempting to think that the disruption of RAR $\alpha$  is the major cause of APL. Indeed, the importance of RAR $\alpha$  in myelopoiesis has clearly been demonstrated and has been reviewed by Collins <sup>6</sup> and Kastner and Chan <sup>7</sup>. RAR $\alpha$  appears to be dispensable for granulopoiesis, as RAR $\alpha$ 1/RAR $\gamma$  <sup>8,9</sup> and RAR $\alpha$ <sub>t</sub> null mice <sup>10</sup> demonstrate normal levels of properly differentiated neutrophils in their peripheral blood. However, their functionality remains to be fully investigated. Other studies have suggested that RAR plays many important roles in haematopoiesis and granulopoiesis, such as stem cell maintenance, commitment of haematopoietic progenitors to the neutrophil lineage, neutrophil differentiation and control in apoptotic processes in granulocytes <sup>8,10,11-14</sup>. However, the disruption of RAR signalling and/or the forced expression of dominant negative forms of RAR into wild type bone marrow doesn't result in the development of leukemia <sup>6</sup>. This suggests that the disruption of the locus harboring the RAR $\alpha$  partners (PML, PLZF, STAT5b, NPM and NUMA) by the translocation in APL, also contributes to the leukemic phenotype. The t(15;17) translocation is involved in the majority of APL cases in which the RAR $\alpha$  locus is transposed to the PML locus. Paradoxically, these patients respond to differentiation therapy with all-trans retinoic acid (ATRA) (reviewed by Chen *et al* <sup>15</sup>). However, in a minority of APL cases (0.8%), a variant translocation, the t(11;17) implicating PLZF, has



stimulated a particular interest since patients harbouring this rearrangement are resistant to differentiation therapy and have poor prognosis<sup>17,18</sup>. This translocation causes a fusion between the RAR $\alpha$  and PLZF loci<sup>19</sup>. The N-terminal region of PLZF harbours a POZ/BTB domain and nine *Krüppel* like zinc fingers are found on its C-terminal region. PLZF activities are quite complex as the protein is implicated in many DNA binding and protein-protein interactions. The POZ/BTB domain mediates interactions with several co-repressors such as NcoR, SMRT, SIN3 and HDAC1<sup>20-25</sup> but also other transcription factors such as GATA-1 and 2<sup>26,27</sup>, Sp1<sup>28</sup> and the vitamin D3 receptor<sup>29,30</sup>. The first two zinc fingers of PLZF can also mediate protein-protein interactions with PML<sup>31</sup> and BCL6<sup>32</sup>. Other domains of PLZF, less characterized, have also been implicated in protein-protein interaction (our unpublished work and<sup>24,25</sup>). In addition, the zinc finger region of PLZF binds DNA. A TA-rich consensus sequence for PLZF was identified through *in vitro* binding selection<sup>33,34</sup>. In addition, Ball *et al*<sup>35</sup> have reported that PLZF activity can be modulated by its phosphorylation on serine and threonine residues by Cyclin B/cdc2 kinase. The functions of the PLZF protein in haematopoiesis are not fully understood as only a few of its targets are known and PLZF<sup>-/-</sup> mice have no haematopoietic phenotype<sup>36,37</sup>. PLZF has been implicated in apoptosis, growth suppression, differentiation and transcriptional repression<sup>36,38,39</sup>, in some situations by collaborating with other co-repressors such as ETO and the LIM-only protein DRAL/FHL2<sup>40 41</sup>. PLZF appears to play a role in the maintenance of the undifferentiated and quiescent phenotype of haematopoietic progenitors<sup>38,42</sup>. Recent data suggest that at least two PLZF mechanisms control these processes.

First, it is well known that the architecture of the chromatin influences gene expression. Acetylation of core histones that form the nucleosome has been associated with transcriptionally active chromatin. Conversely, histone deacetylation and methylation are associated with repressed chromatin. With its ability to bind DNA and proteins, PLZF can recruit on its targets, co-repressor proteins such as histone deacetylase and polycomb complexes. The chromatin is

then remodelled and expression PLZF targets, such as cyclin A and HoxD genes, is silenced<sup>43</sup>. Another mode of action of PLZF involves its capacity to interact with different transcription factors and to modulate their activities (such as GATA-1, 2 and SP-1).

### **The role of the translocation proteins**

Considerable work has been done in recent years, with the objective of understanding the mechanisms by which the translocation products of t(11;17) APL cause leukemia. Most studies have concentrated their area of research on the alterations of the transcriptional characteristics of the chimeric proteins in comparison to their wild type counterparts: RAR $\alpha$  and PLZF. In this respect, it has clearly been demonstrated that chromatin harbouring the targets of RAR $\alpha$  and PLZF is incorrectly modified by the translocation products, resulting in the misexpression of those genes, hence contributing to leukemogenesis<sup>37,43,44</sup>. In addition, when compared to RAR $\alpha$  or PLZF, the oncogenic fusion proteins have altered properties and also have the ability to subvert the activity of the transcription factors that normally interact with PLZF or RAR $\alpha$ . As a result, their targets are also affected by the chimeric proteins. These proteins bring forth altered activities in a temporal and spatial manner that may be inappropriate because of the promoter, that controls their expression and because of the protein structure (our unpublished results,<sup>35,45</sup>). In addition, it has been suggested that the fusion proteins could also titrate common cofactors of different signalling pathways (such as RXR) and affect them indirectly (reviewed by Melnick and Licht<sup>2</sup>).

### **Transgenic mice studies**

In order to understand the role of the fusion proteins in the development of APL, different transgenic mice were engineered to express one or all oncogenes in a wild type or null background for PLZF. It is interesting to note, that in order to

obtain such mice, the expression of the oncogenes had to be specifically directed in the promyelocyte cellular compartment of the myeloid lineage<sup>37,46,47</sup>. The use of ubiquitous or earlier-directed expression promoters rendered impossible the obtention of transgenic mice. Different transgenic mice models were generated using a human cathepsin-G (hCG) minigene expression vector.

After a myeloproliferative disorder of various duration, PLZF-RAR $\alpha$  transgenic mice developed leukemia and died between 6 and 18 months of age<sup>46,47</sup>. This leukemia was characterized by the presence of myeloid cells that retained their ability to differentiate terminally. This disease lacked the distinctive block of differentiation at the promyelocytic stage, as observed in human APL, and is more comparable to human CML. This is in opposition to the hCG-PML-RAR $\alpha$  transgenic mice that developed leukemia, which was reminiscent of human APL. It increased the number of promyelocytes and a partial maturation in the peripheral blood and bone marrow was also noted. Again, in this case, a latency of approximately six to twelve months was necessary for 25-30 percent of the animals to develop a leukemia<sup>46,48,49</sup>. Similarly, in hMRP8-PML-RAR $\alpha$  transgenic mice, 3-9 months were necessary for mice to develop a leukemia resembling APL<sup>50</sup>.

RAR $\alpha$ -PLZF transgenic mice showed normal differential counts in their peripheral blood. Although, a slow and progressive accumulation of myeloid cells was observed in the BM and the spleen, they also displayed splenomegaly. This phenotype is reminiscent of a myeloproliferative disorder but no mice developed a full-blown leukemia. The haematopoietic cells found in the BM and spleen had retained their ability to differentiate into mature granulocytes<sup>37</sup>.

Double transgenic mice, expressing both PLZF-RAR $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF, were generated<sup>37</sup>. As in PLZF-RAR $\alpha$  transgenic mice, leukemia was preceded by a myeloproliferative disorder. By six months of age, all the animals had developed a leukemia characterized by an accumulation of immature cells blocked at the

promyelocytic stage of differentiation. This leukemia resembled human APL. The data obtained from these animals played an important part in understanding that both fusion proteins are essential to obtain a leukemia in mice resembling that found in humans. These models indicate that each chimeric protein is insufficient to cause APL by itself even though both clearly have an impact on the myeloid lineage. This hypothesis is further supported by the fact that the presence of both fusion proteins are present in almost all patients (15/16) reported in the literature<sup>18,51,52</sup>. Thus, the presence of both transgenes is necessary to block differentiation and confer a survival and proliferative advantage. Even with the complete penetrance of the phenotype, the delay in the appearance of leukemia suggests the necessity for other hits to transform the cells. Finally, these studies points to the fact that other genetic alterations necessary for leukemogenesis remain to be uncovered since the mice did not suffer from leukemia at birth.

### **Molecular mechanisms of action of the fusion proteins**

#### *PLZF-RAR $\alpha$*

The t(11;17) translocation causes a fusion from the N-terminal region of PLZF up to the third zinc finger to domains B-F of the C-terminal region of the RAR $\alpha$ . Hence, the expression of this oncoprotein is under the control of the PLZF promoter region. It also contains the POZ/BTB domain, the first two zinc fingers of PLZF in addition to the DNA binding region and the ligand binding domain of RAR $\alpha$ <sup>53</sup>. Both segments of the protein appear to have maintained at least part of their functional abilities as the POZ domain can still bind partners (such as HDAC1, VD3R and ETO) and sequences for dimerization, as well as the ligand-dependent transcription activation function AF-2, remain functional.

*In vitro* studies have demonstrated that heterodimers of PLZF-RAR $\alpha$ / RAR $\alpha$  and PLZF-RAR $\alpha$ /RXR bind efficiently to RARE, although several other studies<sup>44,43,44,54,55</sup> have suggested that PLZF-RAR $\alpha$  also play an important role in

leukemogenesis as homodimers or oligomers by interfering with the actions of RXR $\alpha$ /RAR $\alpha$  heterodimers. The recruitment of repressor complexes composed of NcoR, SMRT, Sin3A by the RAR $\alpha$  moiety<sup>25</sup>, along with HDAC and Bmi, a component of polycomb complexes, by the PLZF moiety of PLZF-RAR $\alpha$ <sup>21-25,43,56</sup> on the RAR targets lead to the modification of chromatin and their silencing. Exposure of cells harbouring this oncogene to ATRA, releases repressor complexes from the RAR $\alpha$ , but not the PLZF moiety<sup>22,27,46</sup> rendering t(11;17) APL refractory to ATRA treatment. In contrast, in t(15;17) APL, PML-RAR $\alpha$  is expressed and recruits repressor complexes on its targets through the RAR $\alpha$  moiety alone. Hence, an ATRA treatment is sufficient to remove co-repressor complexes and relieve repression on RAR targets. However, Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, relieves the RA-resistance of leukemic cells from PLZF-RAR $\alpha$  transgenic mice, confirming that part of PLZF-RAR $\alpha$  oncogenic property may be directly linked to its constitutive repressor activity<sup>46</sup>. This data suggests that PLZF-RAR $\alpha$  has a dominant negative effect over wild type RAR $\alpha$  by occupying its target sites and silencing the chromatin<sup>44,54,57</sup>. Another contribution to leukemogenesis by PLZF-RAR $\alpha$  could be its ability to interact with and titrate or sequester common protein partners that may be involved with other signalling pathways, such as VD3R and thyroid hormone receptor, causing profound disruptions in normal cell processes. Indeed, PLZF-RAR $\alpha$  maintains the ability to interact with RXR. RAR $\alpha$  transcriptional co-activators, such as TIF1, could also be sequestered by PLZF-RAR $\alpha$ . In addition to the effect on retinoid signalling and other nuclear receptors, PLZF-RAR $\alpha$  combined with a common protein partner (RXR, TIF,...), may interfere with the function of other proteins that normally interact with PLZF. PLZF-RAR $\alpha$  can also bind to PLZF through the POZ/BTB domain and can theoretically function in a dominant negative manner in PLZF pathways, and possibly other POZ containing proteins<sup>54</sup>. Recent studies have demonstrated that the activity of transcription factors such as GATA-1 and 2 and Sp-1 is modulated by PLZF<sup>26-28</sup>

and that PLZF-RAR $\alpha$  still possesses the ability to modulate them. How these activities translate to leukemia remains to be investigated.

### *RAR $\alpha$ -PLZF*

The N-terminal region of RAR $\alpha$ -PLZF is comprised of part of the first transactivation domain of RAR $\alpha$  and the seven C-terminal zinc fingers of PLZF. The zinc fingers of RAR $\alpha$ -PLZF have retained the ability to bind the PLZF DNA binding sites on its targets<sup>33,34</sup>. Transactivation studies have suggested that RAR $\alpha$ -PLZF not only interferes with wild type PLZF endogenous repressive activity, by occupying its binding sites, but that it loses the transcriptional repressive ability of PLZF. It may also act as a weak transcriptional activator<sup>33,39</sup>. This data was supported by a recent study by He *et al*<sup>37</sup>, reporting that, PLZF-RAR $\alpha$  transgenic mice bred in a PLZF null background, permitted the development of a leukemia that is reminiscent of APL within 6 month after birth. This leukemia is indistinguishable from that observed in the double transgenic mice for PLZF-RAR $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF. These results suggest that the leukemogenic activity of RAR $\alpha$ -PLZF resides in its capacity to have a dominant negative effect over the activity of the normal allele of PLZF and that it acts to release the repression on potential PLZF targets. These observations suggest that the leukemic effect is tightly dependent on PLZF gene dosage. However, a more stringent protocol eliminating variability introduced by the location of the integration site(s) and the number of transgene copy will be necessary to confirm this hypothesis. The use of a knock-in approach, in which RAR $\alpha$ -PLZF would be inserted in the PLZF locus would lead to the inactivation of one PLZF allele and put the oncogene under the control of the PLZF regulatory sequences. This model would replicate more accurately what is observed in human APL. It is important to note that this hypothesis does not necessarily exclude other contributions of RAR $\alpha$ -PLZF to leukemogenesis. Data, from our laboratory, and

others, suggest that the transactivation domain from RAR $\alpha$  and the zinc fingers from PLZF have the ability to interact with other proteins, among which NcoR and HDAC1 (our results, <sup>24,25</sup>), raising the possibility that RAR $\alpha$ -PLZF may interfere with the function of these protein partners.

### Secondary events

Studies in transgenic mice have underlined the importance of the translocation products in leukemia. However, the latency in the appearance of the phenotype have also brought forward the fact that other genetic modifications are necessary for full transformation of primary cells. In agreement with this, Renan <sup>58</sup> has suggested that 4 to 7 rate-limiting independent events are necessary in humans to develop a variety of age-dependent cancer types. Using embryonic human cells in culture, Hahn *et al* <sup>59</sup> have reported that at least three genetic events are necessary to render them capable of forming tumours in nude mice. In the clinically manifest tumour, multiple genetic events coexist and it is difficult to assess their relative contribution to tumorigenesis, as some events are necessary to the transformation, while others are only a consequence of genomic instability with little relevance to the leukemogenesis process. Using the micro array technology, Golub *et al* <sup>60</sup> have identified variations in the expression of genes to characterize AML vs ALL. Interestingly, the genes not only included cell surface markers or other myeloid specific genes, but also included genes that are involved in cell cycle progression (such as Cyclin D3 (repressed in AML), Op18 (over-expressed), MCM3(repressed)), involved in inhibition of apoptosis in hematopoietic cells (leptin receptor), repression of chromatin remodelling (SNF2, RbAp48) and upregulation of HOXA9, which transforms myeloid cells when over expressed. However, the 11 samples studied, did not include APL patients. With the use of available DNA micro array technology, the monitoring of patients and transgenic mice might help to elucidate the common events and pathways affected that are necessary for a progression from a myeloproliferative disorder, as observed initially in the double transgenic mice into APL.

## Oncogenesis

Observations of human cancer and animal models suggest that the development of cancer involves a complex succession of genetic alterations that confers growth advantage to cancer cells (reviewed by Hanahan and Weinberg and Hahn and Weinberg<sup>61,62</sup>). These modifications affect pathways in which they have been implicated directly resulting in increased proliferation, defects in differentiation and programmed cell death. However, integration of increased knowledge from both genomic and proteomic approaches suggest that the impact of an altered or absent protein may be further reaching and modify more pathways than the specific cellular pathways for which a role has previously been described. Indeed, recent studies in yeast and human have shown that large networks of protein interactions exist and that they result in an unanticipated relationship between, previously thought, independent pathways such as ribosome biogenesis and commitment to cell division or repair pathways and chromosome segregation<sup>127-128</sup>. Thus, it is not surprising to find that the modifications in activity of normal genes and proteins targeted by the fusion proteins can have wide ranging cellular repercussions and affect varied functions implicated in proliferation, differentiation and apoptosis. In addition to the disruption of various functional networks, genomic instability often appears to collaborate with oncogenes to push oncogenesis forward.

Studies of PLZF<sup>-/-</sup> mice have revealed that PLZF is a proliferation regulator, that it functions as a pro-apoptotic factor in the hind limb bud and that it controls interdigital programmed cell death, which is necessary for the separation of digits. PLZF<sup>-/-</sup> mice, not only display interdigital webbing in the hind limbs, but the cells in this region also show an increase in proliferation when compared to their wild type counterparts<sup>36</sup>. Further evidence of this anti-proliferative role of PLZF has been supplied by its over expression in the murine myeloid cell line 32DCL3. In this system, PLZF inhibited cell growth in the presence of IL-3 or GM-CSF and



blocked the cells in the G1 phase of the cell cycle<sup>38,39</sup>. In addition, these cells exhibited a higher rate of apoptosis and a reduced ability to differentiate in response to G-CSF or GM-CSF<sup>38</sup>. The molecular targets controlled by PLZF in these processes, and how these are deregulated by the expression of the fusion proteins, are mostly unknown.

Although RAR $\alpha$  null mice do not present any hematopoietic phenotype<sup>63</sup>, it has been postulated that RAR $\alpha$  plays important roles in differentiation and cell cycle progression in the granulocytic lineage. Although RAR $\gamma$  is also weakly expressed, RAR $\alpha$  is the predominant form of RAR expressed in myeloid cells and it is induced in differentiating cells. In addition, the use of agonists<sup>64</sup>, antagonists<sup>65</sup> or dominant negative mutants<sup>66</sup> for RAR $\alpha$  and other RAR have suggested that RAR $\alpha$  stimulates granulopoiesis and that retinoic acid induces differentiation and cell cycle arrest of myeloid cells<sup>67,68,69,70-72</sup>. The possible genes targeted by retinoic acid are numerous and were reviewed by Balmer and Blomhoff<sup>73</sup>.

Because of their various effects on proliferation, differentiation and apoptosis, it is clear that alterations in the normal function of RAR $\alpha$  and PLZF, caused by the presence of RAR $\alpha$ -PLZF or PLZF-RAR $\alpha$ , could have serious effects on normal cellular biology and may also ultimately contribute to leukemogenesis. It is also important to keep in mind that the targets of both PLZF and RAR $\alpha$  may be tissue and cell type specific. Thus, the effect of the fusion proteins needs to be tested in an appropriate and relevant cellular context. In addition, some targets of wild type proteins could preferentially be affected by the fusion protein. Indeed, it has been shown that not all RAR $\alpha$  targets are affected similarly by PML-RAR $\alpha$  and PLZF-RAR $\alpha$  homodimers<sup>54</sup>. Not only do they bind to different target sequences, than each other, but also to wild type RAR $\alpha$ .<sup>44,55</sup> The next sections will try to reconcile what little we know about PLZF and RAR $\alpha$  targets, how their function are disrupted in leukemogenesis and how they might contribute to leukemogenesis.

## Proliferation

Anarchical proliferation is a hallmark of cancer cells. In order to achieve this, a neoplastic cell must become oblivious to its environment by becoming self-sufficient to external mitogenic signals, insensitive to growth-inhibitory signals and have limitless potential<sup>61</sup>. Many growth factors and their receptors, as well as their membranes, cytoplasmic and nuclear downstream effectors, have been identified as proto-oncogenes or tumour suppressor genes. Shaknovich *et al*<sup>38</sup> have suggested that, in the myeloid cell line 32D transduced to expressed PLZF, the cells secrete a growth suppressive factor. Is this secretion disrupted by the presence of the fusion proteins and what could this specific factor be?

TGF- $\beta$  signalling occurs through serine/threonine kinase receptors and the phosphorylation of SMAD proteins. The association with other transcription factors also regulate their activity and enhance their specificity. It plays an important role by inducing growth inhibition and by controlling the transcription of various genes that are involved in cell cycle progression<sup>74,75 76,77</sup>. TGF- $\beta$  and its signalling appear to be a commonly affected pathway in leukemogenesis. Mutations in Smad4 have been reported in t(15;17) APL<sup>78</sup> and in t(8;21) AML, whereas interactions between AML1-ETO and Smad3 inhibit TGF- $\beta$  signalling<sup>79</sup>. A recent report by La *et al*<sup>80</sup> suggests that<sup>81-84</sup>, in mink lung epithelial cells, PLZF-RAR $\alpha$  stimulates proliferation by inhibiting TGF- $\beta$  signaling which is normally induced by RA through its capacity to interact with Smad3. TGF- $\beta$  growth inhibition is surmounted by PLZF-RAR $\alpha$ , hence overriding the G1 arrest, which is normally induced by TGF- $\beta$  through transcription of the p15 (ink4b) gene.

Another factor that could contribute to an increase in the proliferative capabilities of the cells harbouring the t(11;17) translocation has been reported by Ball *et al*<sup>35</sup>. A consensus binding sequence for PLZF was found in the promoter of the  $\alpha$ -

chain of the IL-3 receptor. IL-3 is a multi-potent haematopoietic growth factor that induces proliferation, maturation and probably self-renewal of pluri-potent haematopoietic stem cells and cells of myeloid, erythroid and megakaryocytic lineages. Expression of PLZF down regulates the protein level of the IL-3R $\alpha$ . It has been proposed that RAR $\alpha$ -PLZF has a dominant negative effect on the transcriptional targets of PLZF, as it relieves the repression by PLZF. What is the impact of this oncogene on the expression IL-3R $\alpha$  ? And, is there a functional advantage for the cells and the leukemogenic process?

Various components of pathways directly implicated in regulating cell cycle are reported to be defective in tumours. For example, the precise regulation of cyclin A2 expression and stabilization/degradation pattern is essential for the proper progression through the cell cycle. Interestingly, the promoter of cyclin A2 contains a consensus binding sequence for PLZF. Yeyati *et al* <sup>39</sup> have demonstrated in NIH 3T3 and 293 cells that PLZF inhibits cyclin A2 promoter activity, resulting in a block of cell cycle in G1/S. On the other hand, RAR $\alpha$ -PLZF weakly activated the promoter, when compared to its basal activity which translated into an increase in cyclin A2 protein levels. These results suggest that RAR $\alpha$ -PLZF deregulates cyclin A transcription by occupying the PLZF binding site on the its promoter.

In addition, cyclin A1 has been shown to be down regulated by ATRA. In U937 cells, the expression of PLZF-RAR $\alpha$  or PML-RAR $\alpha$  leads to an increase in cyclin A1 mRNA levels <sup>85</sup>, as these two fusion proteins hinder normal retinoid signalling. Together, these observations suggest that the oncogenes can affect the proliferation of myeloid cells by increasing the levels of cyclin A1 and A2, although it remains to be formally demonstrated.

Normal cell cycle progression may also be altered by the disruption of CDC2 activity. This protein is up-regulated and forms a complex with cyclin A at the G1/S transition. It has been associated with an S phase progression, during

which it exerts transcriptional repression by phosphorylating basal transcription factors. Work by Ball *et al*<sup>35</sup> has suggested that PLZF is a substrate for CDC2 and that its phosphorylation by CDC2 allows for it to bind DNA. In contrast, RAR $\alpha$ -PLZF does not seem to have the ability to interact with CDC2 but seems to have the capacity to bind DNA. However, it is unclear which PLZF targets are affected by this mechanism and how this deregulation contributes to tumorigenesis.

The normal function of other important regulators of cell cycle progression, such as p21<sup>WAF/CIP</sup> and c-Myc, could also be affected by PLZF-RAR $\alpha$  or RAR $\alpha$ -PLZF. The transcription of p21<sup>WAF/CIP1</sup> is directly controlled by RAR and ATRA, which normally induces transcription leading to G0/G1 arrest<sup>70</sup>. Myc has been causally associated with cancer for decades. It is one of the most common molecular lesions contributing to multi step carcinogenesis. Borger *et al*<sup>86</sup> have shown, that transgenic mice expressing the myc oncogene in hematopoietic cells develop malignant T cell leukemia and acute myeloid leukemia phenotype that can be reversed when the transgene is switched off. A functional PLZF DNA binding site has been described in the promoter region of c-Myc<sup>5</sup> and U937 cell over expressing PLZF has reduced c-Myc expression. It is not known however, where the presence of PLZF-RAR $\alpha$  in leukemic cells affects the transcription of the regulators of cellular proliferation, and whether or not this translates into a proliferate advantage for those cells.

RARs are important regulatory transcription factors for Hox genes. In addition, studies by Barna *et al*<sup>43,36</sup> and Ivins *et al*<sup>87</sup> have clearly demonstrated that PLZF controls the expression of certain Hox genes in development. Work in *Drosophila*, over-expression studies in mammalian progenitor haematopoietic cells and dysregulation of Hox gene expression in leukemia, suggest that Hox gene controls the transcription of proteins that are involved in regulating cellular proliferation, survival, adhesion and migration. The over-expression of certain Hox genes in bone marrow cells has dramatic effects on the proliferation and

self-renewal capacities of progenitors from specific lineages. For example, HoxB4 induces an expansion of primitive haematopoietic stem cells without inducing their capacity to differentiate or affecting their ability to repopulate<sup>88</sup>. The over-expression of HoxA10 leads to selective expansion of the megakaryocytic lineage at the expense of monocytic and B-lymphoid progenitors<sup>89</sup>. The importance of a proper regulation of Hox gene expression is also underlined by the fact that a recurrent translocation involving Hox genes or their partners, such as NUP98-HoxA9 (t(7;11), Hox11 and PBX, are found in subsets of AML and ALL<sup>90,91-94</sup>. Barna *et al*<sup>43</sup> have shown that PLZF inhibits genes at the 5' end of the HoxD locus which is essential for the proper differentiation of the hindlimbs by recruiting HDAC and Bmi, a polycomb protein, on its binding sequences by silencing the chromatin. These results explain the morphological defects observed in the hind limb of PLZF null mice originating from HoxD gene misexpression. Recently, Ivins *et al*<sup>87</sup> have demonstrated that other Hox genes, such as HoxB2 and HoxA9, are regulated by PLZF. Interestingly, these genes are expressed in haematopoietic cells<sup>95,96</sup> and HoxA9 is involved in an AML-associated translocation and its over-expression in bone marrow leads to the development of leukemia in mice<sup>97</sup>. RARs are also important regulators of Hox gene expression. RARE have been found in the promoter of several Hox genes including HoxA1, HoxA4, HoxB1 and HoxB4<sup>98-103</sup>. In addition, in a RAR $\alpha$ <sup>-/-</sup> embryonic teratocarcinoma stem cell line (F9), ATRA failed to induce HoxB1 expression<sup>104</sup>. Thus, the regulation of Hox gene expression may be disrupted in APL by the fusion proteins because of their effects on both the RAR and PLZF pathways. It will be of interest to see which Hox genes become relevant in the haematopoietic system, how they might be deregulated in APL and how they may collaborate in leukemogenesis.

## Differentiation

The impediment of cellular differentiation is another characteristic of tumours of diverse histological origins. This characteristic is tightly linked to proliferation, as numerous proteins have a role to play in both cellular processes. It has been shown that proliferation has to stop to allow for terminal differentiation. Among these are the factors implicated in both the control cell cycle progression and differentiation: c-myc, TGF- $\beta$ , Hox and VD3R. In myeloid cells, expression of c-myc is down regulated when cells are induced to differentiate. In addition, antisense oligonucleotide treatment of these cells allows for the induction of differentiation while activation of an inducible myc-estrogen receptor construct can block differentiation. Thus, if the fusion protein deregulates c-myc expression, it could then play a role in excessive proliferation and differentiation blockade. Similar conclusions could be extrapolated for TGF- $\beta$  as a study by Ruthard *et al*<sup>105</sup> has demonstrated that PLZF-RAR $\alpha$ , not only stimulates proliferation by inhibiting TGF- $\beta$  signalling, but also blocks TGF- $\beta$ 1-induced differentiation in U937 and HL-60 cells.

In leukemia, the phenotype of the disease reveals the tropism of the oncogene for a specific pathway and a specific lineage. Although, in APL, the nature of the target cells of the transformation remains to be documented, it is possible that the translocation occurs in primitive cells when the loci of PLZF and RAR $\alpha$  are transcriptionally active and in open chromatin, as reported for acute myeloid leukemia<sup>106</sup>, reviewed by Look<sup>107</sup>. Evidence suggests that the phenotype of the cells in leukemia depends on the transcription factors that are either directly mutated or indirectly targeted via protein-protein interaction. Hence, the phenotype of the leukemic cells reveals the tropism of the oncogene for a specific pathway and a specific lineage.

Such a target has been identified in our laboratory as C/EBP $\alpha$ . In the haematopoietic system, it is expressed in the myeloid lineage and C/EBP $\alpha$ -null

mice exhibit a complete absence of neutrophils and eosinophils. C/EBP $\alpha$  regulates the transcription of genes that are involved in the myeloid differentiation (such as the receptors for G-CSF<sup>108</sup>, GM-CSF<sup>109,110</sup>) and several granule proteins (including myeloperoxidase, neutrophil elastase<sup>111,112</sup>). It is also implicated in the transcription of another member of the family, C/EBP $\epsilon$ , which is important for the terminal differentiation of granulocytes<sup>113</sup>. Interestingly, the capacity of C/EBP $\alpha$  to induce differentiation is coupled to its capacity to cause growth arrest. In myeloid cells, C/EBP $\alpha$  represses the activity of the E2F transcription factor<sup>114</sup>, hence inhibiting cell cycle progression. C/EBP $\alpha$  function is disturbed in other types of leukemias as well. This can be observed in AML with the t(8;21) translocation, AML1-ETO, where the translocation product down regulates the expression of C/EBP $\alpha$ <sup>115,116</sup> and in CML, BCR-ABL destabilizes the C/EBP $\alpha$  protein, without affecting mRNA levels. In 16% of AML-M2, in which the t(8;21) translocation is absent, mutations rendering C/EBP $\alpha$  non-functional have been described<sup>117</sup>. We have recently demonstrated that, in t(11;17) APL, the RAR $\alpha$ -PLZF fusion protein binds C/EBP $\alpha$  tethered to target loci and recruits HDAC1, leading to a deacetylation of chromatin and an inhibition of C/EBP $\alpha$  target genes, thus contributing to the differentiation blockade observed in APL.

Another member of the C/EBP family, necessary for the last maturation steps in neutrophils, appears to be functionally compromised because of deficient retinoid signalling in APL. C/EBP $\epsilon$  null mice present functionally defective neutrophils<sup>113</sup>, whereas over-expression in U937 cells is sufficient to induce granulocytic differentiation<sup>118</sup>. A functional RARE was identified by Park *et al*<sup>118</sup> in the promoter of C/EBP $\epsilon$  and exposure of myeloid cells (NB4) to ATRA induces C/EBP $\epsilon$  expression<sup>118,119</sup>. Park *et al*<sup>118</sup> have also shown that PLZF-RAR $\alpha$  prevented ATRA-induced C/EBP $\epsilon$  expression without inhibiting it in the absence of retinoids. These data suggest a contribution for PLZF-RAR $\alpha$  in the differentiation blockade observed in t(11;17) APL.

The vitamin D3 nuclear receptor (VD3R) is widely expressed in haematopoietic cells and can induce the differentiation of haematopoietic cell lines such as HL-60 and U937 along the monocytic lineage<sup>120,121</sup>. VD3R acts as a transcription factor and regulates the expression of its targets such as p21WAF1/CIP1 and HOXA10<sup>122</sup>, hence resulting in a decrease in proliferation that permits differentiation. PLZF-RAR $\alpha$  expression blocks VitD3-induced monocytic differentiation<sup>30,105</sup>. The POZ/BTB domain of PLZF and PLZF-RAR $\alpha$  interacts directly with the DNA binding region of VDR to inhibit its transcriptional activity without inhibiting its capacity to bind DNA<sup>30</sup>. This effect is independent of histone deacetylase and is due to the delocalization of VDR by PLZF-RAR $\alpha$ <sup>29</sup>. Although Muto *et al*<sup>122</sup> have demonstrated that treatment of a retinoic acid resistant cell line (UF-1) with Vit D3 induces differentiation, it remains to be investigated if this effect contributes to the transformation process in the granulocytic lineage.

PLZF-RAR $\alpha$  also disrupts the transcriptional activity of SP1 and GATA1, which could also contribute to the leukemogenic process by interfering with cellular differentiation. SP1 is abundantly expressed in myeloid cells. Several studies have implicated this transcription factor in mediating myeloid-specific gene expression. Lee *et al*<sup>28</sup> have recently demonstrated that the POZ domain of PLZF directly interacts with the zinc finger DNA binding domain of SP1 and that this interaction prevents the binding of Sp1 to the GC boxes of the ADH5/FDH promoter. These data suggest that PLZF represses the expression of some of Sp1 target genes. Does the POZ/BTB domain in the PLZF- RAR $\alpha$  fusion protein deregulate the function of Sp1 in myeloid cells? The impact of the presence of this fusion protein on SP1 transcriptional activity remains to be demonstrated and its importance evaluated.

GATA-2 is considered an essential component in the development, maintenance, and function of haematopoietic stem cells<sup>123</sup>. It may also function as a gatekeeper to preserve their immaturity as a reduction of GATA-2 expression or activity is required for the differentiation of precursors to haematopoietic cells



<sup>124,125</sup>. However,, GATA-2 mRNA and protein can be detected in human myelogenous leukemia cell lines and in most patients with primary leukemia. The role of GATA-2 in the pathogenesis of leukemia is still not well understood. A recent report by Tsuzuki and Enver <sup>27</sup> demonstrates that the POZ domain of PLZF and PLZF-RAR $\alpha$  and the first two zinc fingers of PLZF allow for their recruitment by GATA-2 on target sequences, thereby inhibiting GATA-2 activity. This may be possible through chromatin silencing. Also, the same group had previously reported that GATA-2 associated with PML and PML-RAR $\alpha$  modified GATA-2 function <sup>126</sup>. Therefore, targets of GATA-2 may be deregulated in APL, but their importance in the pathogenesis of the disease remain to be documented.

### **Evading apoptosis**

Defects in apoptotic pathways confer a growth advantage to cancer cells. The ability of tumour cells to expand in numbers is not only determined by the rate of cell proliferation but also by the rate of cell attrition. A defective programmed cell death process allows for cells to proliferate in the presence of genetic defect and thus, ultimately leading to genetic instability. This instability contributes to oncogenesis. Over-expression studies of myeloid cells and examination of interdigital programmed cell death in the hind limb bud of PLZF $^{-/-}$  mice have demonstrated a clear role for PLZF as proapoptotic factor <sup>36,38</sup>. However, the mechanisms through which this occurs remain to be documented. In addition, a possible pro-apoptotic role for PLZF in haematopoiesis has not yet been documented. Consequently, a role for the PLZF-RAR $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF in cell death processes in leukemia remains to be confirmed. The only hint at an increase in cell survival has been provided by Ball *et al* <sup>35</sup>. These authors reported a binding site for PLZF in the promoter of the IL-3R $\alpha$  and that PLZF repressed its expression. They also reported the effects that RAR $\alpha$ -PLZF had on IL-3R $\alpha$  expression and how it increased cell sensitivity to environmental IL-3 and

promoted cell survival in t(11;17) APL. Clearly, other defects in apoptosis pathways are essential and need further investigation.

## **Conclusion**

The ongoing research in the APL field has allowed us to identify a few targets affected by the products of the t(11;17) translocation involving PLZF and RAR $\alpha$ . These targets regulate important pathways such as cell cycle progression, proliferation and differentiation. Two mechanisms by which the chimeric proteins affect their targets have been reported. PLZF-RAR $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF can bind respectively to wild type RAR $\alpha$  and PLZF consensus sequences and modify the state of the chromatin incorrectly, disturbing the expression of the targets. PLZF and RAR $\alpha$  also mediate numerous protein-protein interactions. The fusion proteins can also bind these factors, but the alterations in their abilities to modulate their activity may result in the misexpression of their targets. However, they do not explain, on their own, tumorigenesis. More effort has to be made to uncover the targets of wild type RAR $\alpha$  and PLZF and how the fusion proteins disrupt their normal function in hematopoiesis. The acquisition of such knowledge could arise from the use and integration of data obtained by genomic and proteomic approaches. In addition, a field relatively unexplored to this point, the secondary events of the translocation also need to be investigated in APL. The more we know about the genes affected in APL, the better we can develop specific therapies that aim for a maximum efficacy with a minimal level of toxicity.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Leukemia Research Fund of Canada (T.H.) and the Cancer Research Society Inc (T.H.). Nathalie Girard is supported by a studentship award from the Canadian Institutes for Health Research.

## References

- (1) Rabbitts TH. Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell*. 1991;67:641-644.
- (2) Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999;93:3167-3215.
- (3) Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev*. 2003;17:71-97.
- (4) Redner RL. Variations on a theme: the alternate translocations in APL. *Leukemia*. 2002;16:1927-1932.
- (5) Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 2001;20:7186-7203.
- (6) Collins SJ. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia*. 2002;16:1896-1905.
- (7) Kastner P, Chan S. Function of RARalpha during the maturation of neutrophils. *Oncogene*. 2001;20:7178-7185.
- (8) Labrecque J, Allan D, Chambon P et al. Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha1 and gamma. *Blood*. 1998;92:607-615.
- (9) Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS et al. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999;400:464-468.

- (10) Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C et al. Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha. *Blood*. 2001;97:1314-1320.
- (11) Tsai S, Bartelmez S, Heyman R et al. A mutated retinoic acid receptor-alpha exhibiting dominant-negative activity alters the lineage development of a multipotent hematopoietic cell line. *Genes Dev*. 1992;6:2258-2269.
- (12) Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD, Friedman MA. Retinoids in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 1992;10:839-864.
- (13) Chen JY, Clifford J, Zusi C et al. Two distinct actions of retinoid-receptor ligands. *Nature*. 1996;382:819-822.
- (14) Zhu J, Heyworth CM, Glasow A et al. Lineage restriction of the RARalpha gene expression in myeloid differentiation. *Blood*. 2001;98:2563-2567.
- (15) Chen SJ, Chen Z, Chen A et al. Occurrence of distinct PML-RAR-alpha fusion gene isoforms in patients with acute promyelocytic leukemia detected by reverse transcriptase/polymerase chain reaction. *Oncogene*. 1992;7:1223-1232.
- (16) Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood*. 2000;96:1297-1308.
- (17) Guidez F, Huang W, Tong JH et al. Poor response to all-trans retinoic acid therapy in a t(11;17) PLZF/RAR alpha patient. *Leukemia*. 1994;8:312-317.

- (18) Licht JD, Chomienne C, Goy A et al. Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11;17). *Blood*. 1995;85:1083-1094.
- (19) Chen Z, Brand NJ, Chen A et al. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J*. 1993;12:1161-1167.
- (20) David G, Alland L, Hong SH et al. Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene*. 1998;16:2549-2556.
- (21) Hong SH, David G, Wong CW, Dejean A, Privalsky ML. SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:9028-9033.
- (22) Grignani F, De Matteis S, Nervi C et al. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*. 1998;391:815-818.
- (23) Guidez F, Ivins S, Zhu J et al. Reduced retinoic acid-sensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RARalpha underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1998;91:2634-2642.
- (24) Wong CW, Privalsky ML. Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J Biol Chem*. 1998;273:27695-27702.
- (25) Puccetti E, Sennewald B, Fosca-Ferrara F et al. Down-stream regions of the POZ-domain influence the interaction of the t(11;17)-associated

PLZF/RARalpha fusion protein with the histone-deacetylase recruiting co-repressor complex. *Hematol J.* 2001;2:385-392.

- (26) Labbaye C, Quaranta MT, Pagliuca A et al. PLZF induces megakaryocytic development, activates Tpo receptor expression and interacts with GATA1 protein. *Oncogene.* 2002;21:6669-6679.
- (27) Tsuzuki S, Enver T. Interactions of GATA-2 with the promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein, its homologue FAZF, and the t(11;17)-generated PLZF-retinoic acid receptor alpha oncoprotein. *Blood.* 2002;99:3404-3410.
- (28) Lee DK, Suh D, Edenberg HJ, Hur MW. 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.* 2002;277:26761-26768.
- (29) Puccetti E, Obradovic D, Beissert T et al. AML-associated translocation products block vitamin D(3)-induced differentiation by sequestering the vitamin D(3) receptor. *Cancer Res.* 2002;62:7050-7058.
- (30) Ward JO, McConnell MJ, Carlile GW et al. The acute promyelocytic leukemia-associated protein, promyelocytic leukemia zinc finger, regulates 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced monocytic differentiation of U937 cells through a physical interaction with vitamin D(3) receptor. *Blood.* 2001;98:3290-3300.
- (31) Koken MH, Reid A, Quignon F et al. Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10255-10260.

- (32) Dhordain P, Albagli O, Honore N et al. Colocalization and heteromerization between the two human oncogene POZ/zinc finger proteins, LAZ3 (BCL6) and PLZF. *Oncogene*. 2000;19:6240-6250.
- (33) Li JY, English MA, Ball HJ et al. Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem*. 1997;272:22447-22455.
- (34) Sitterlin D, Tiollais P, Transy C. The RAR alpha-PLZF chimera associated with Acute Promyelocytic Leukemia has retained a sequence-specific DNA-binding domain. *Oncogene*. 1997;14:1067-1074.
- (35) Ball HJ, Melnick A, Shaknovich R, Kohanski RA, Licht JD. The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:4106-4113.
- (36) Barna M, Hawe N, Niswander L, Pandolfi PP. Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet*. 2000;25:166-172.
- (37) He LZ, Bhaumik M, Tribioli C et al. Two critical hits for promyelocytic leukemia. *Mol Cell*. 2000;6:1131-1141.
- (38) Shaknovich R, Yeyati PL, Ivins S et al. The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1998;18:5533-5545.
- (39) Yeyati PL, Shaknovich R, Boterashvili S et al. Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene*. 1999;18:925-934.
- (40) Melnick A, Carlile GW, McConnell MJ et al. AML-1/ETO fusion protein is a dominant negative inhibitor of transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Blood*. 2000;96:3939-3947.

- (41) McLoughlin P, Ehler E, Carlile G, Licht JD, Schafer BW. The LIM-only protein DRAL/FHL2 interacts with and is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem.* 2002;277:37045-37053.
- (42) Eaves CJ, Cashman JD, Kay RJ et al. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. *Blood.* 1991;78:110-117.
- (43) Barna M, Merghoub T, Costoya JA et al. Plzf mediates transcriptional repression of HoxD gene expression through chromatin remodeling. *Dev Cell.* 2002;3:499-510.
- (44) Licht JD, Shaknovich R, English MA et al. Reduced and altered DNA-binding and transcriptional properties of the PLZF-retinoic acid receptor-alpha chimera generated in t(11;17)-associated acute promyelocytic leukemia. *Oncogene.* 1996;12:323-336.
- (45) Koken MH, Reid A, Quignon F et al. Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10255-10260.
- (46) He LZ, Guidez F, Tribioli C et al. Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet.* 1998;18:126-135.
- (47) Cheng GX, Zhu XH, Men XQ et al. Distinct leukemia phenotypes in transgenic mice and different corepressor interactions generated by promyelocytic leukemia variant fusion genes PLZF-RARalpha and NPM-RARalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:6318-6323.



- (48) He LZ, Tribioli C, Rivi R et al. Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:5302-5307.
- (49) Grisolano JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ. Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood*. 1997;89:376-387.
- (50) Brown D, Kogan S, Lagasse E et al. A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:2551-2556.
- (51) Grimwade D, Gorman P, Duprez E et al. Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1997;90:4876-4885.
- (52) Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood*. 2000;96:1297-1308.
- (53) Chen Z, Brand NJ, Chen A et al. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J*. 1993;12:1161-1167.
- (54) Dong S, Zhu J, Reid A et al. Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor-alpha fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:3624-3629.

- (55) Hauksdottir H, Privalsky ML. DNA recognition by the aberrant retinoic acid receptors implicated in human acute promyelocytic leukemia. *Cell Growth Differ.* 2001;12:85-98.
- (56) Lin RJ, Nagy L, Inoue S et al. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature.* 1998;391:811-814.
- (57) Chen Z, Guidez F, Rousselot P et al. PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:1178-1182.
- (58) Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.* 1993;7:139-146.
- (59) Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS et al. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature.* 1999;400:464-468.
- (60) Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 1999;286:531-537.
- (61) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
- (62) Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.* 2002;347:1593-1603.
- (63) Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C et al. Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha. *Blood.* 2001;97:1314-1320.
- (64) Chen JY, Clifford J, Zusi C et al. Two distinct actions of retinoid-receptor ligands. *Nature.* 1996;382:819-822.

- (65) Mehta K, McQueen T, Manshouri T et al. Involvement of retinoic acid receptor-alpha-mediated signaling pathway in induction of CD38 cell-surface antigen. *Blood*. 1997;89:3607-3614.
- (66) Tsai S, Bartelmez S, Heyman R et al. A mutated retinoic acid receptor-alpha exhibiting dominant-negative activity alters the lineage development of a multipotent hematopoietic cell line. *Genes Dev*. 1992;6:2258-2269.
- (67) Warrell RP, Jr., de The H, Wang ZY, Degos L. Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1993;329:177-189.
- (68) Liu M, Iavarone A, Freedman LP. Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem*. 1996;271:31723-31728.
- (69) Steinman RA, Hoffman B, Iro A et al. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene*. 1994;9:3389-3396.
- (70) Dimberg A, Bahram F, Karlberg I et al. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines is associated with sequential down-regulation of c-Myc and cyclin E and posttranscriptional up-regulation of p27(Kip1). *Blood*. 2002;99:2199-2206.
- (71) Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, Struhl G. A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell*. 2001;7:1279-1291.
- (72) Jiang H, Lin J, Su ZZ et al. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene*. 1994;9:3397-3406.
- (73) Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*. 2002;43:1773-1808.

- (74) Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature*. 1996;383:832-836.
- (75) Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature*. 1996;383:168-172.
- (76) Liu X, Sun Y, Constantinescu SN et al. Transforming growth factor beta-induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:10669-10674.
- (77) Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*. 1998;95:737-740.
- (78) Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K et al. Mutations of the Smad4 gene in acute myelogenous leukemia and their functional implications in leukemogenesis. *Oncogene*. 2001;20:88-96.
- (79) Jakubowiak A, Pouponnot C, Berguido F et al. Inhibition of the transforming growth factor beta 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein. *J Biol Chem*. 2000;275:40282-40287.
- (80) La P, Morgan TA, Sykes SM et al. Fusion proteins of retinoid receptors antagonize TGF-beta-induced growth inhibition of lung epithelial cells. *Oncogene*. 2003;22:198-210.
- (81) Roberts AB, Sporn MB. Mechanistic interrelationships between two superfamilies: the steroid/retinoid receptors and transforming growth factor-beta. *Cancer Surv*. 1992;14:205-220.
- (82) Nunes I, Kojima S, Rifkin DB. Effects of endogenously activated transforming growth factor-beta on growth and differentiation of retinoic acid-treated HL-60 cells. *Cancer Res*. 1996;56:495-499.

- (83) Defacque H, Piquemal D, Basset A, Marti J, Commes T. Transforming growth factor-beta1 is an autocrine mediator of U937 cell growth arrest and differentiation induced by vitamin D3 and retinoids. *J Cell Physiol.* 1999;178:109-119.
- (84) Borger DR, Mi Y, Geslani G et al. Retinoic acid resistance at late stages of human papillomavirus type 16-mediated transformation of human keratinocytes arises despite intact retinoid signaling and is due to a loss of sensitivity to transforming growth factor-beta. *Virology.* 2000;270:397-407.
- (85) Muller C, Yang R, Park DJ et al. The aberrant fusion proteins PML-RAR alpha and PLZF-RAR alpha contribute to the overexpression of cyclin A1 in acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 2000;96:3894-3899.
- (86) Felsher DW, Bishop JM. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell.* 1999;4:199-207.
- (87) Ivins S, Pemberton K, Guidez F et al. Regulation of Hoxb2 by APL-associated PLZF protein. *Oncogene.* 2003;22:3685-3697.
- (88) Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C et al. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood.* 2002;100:862-868.
- (89) Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR et al. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol.* 1997;17:495-505.
- (90) Nakamura T, Largaespada DA, Shaughnessy JD, Jr., Jenkins NA, Copeland NG. Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nat Genet.* 1996;12:149-153.

- (91) Dube ID, Kamel-Reid S, Yuan CC et al. A novel human homeobox gene lies at the chromosome 10 breakpoint in lymphoid neoplasias with chromosomal translocation t(10;14). *Blood*. 1991;78:2996-3003.
- (92) Kennedy MA, Gonzalez-Sarmiento R, Kees UR et al. HOX11, a homeobox-containing T-cell oncogene on human chromosome 10q24. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:8900-8904.
- (93) Hatano M, Roberts CW, Minden M, Crist WM, Korsmeyer SJ. Deregulation of a homeobox gene, HOX11, by the t(10;14) in T cell leukemia. *Science*. 1991;253:79-82.
- (94) Chang CP, de V, I, Cleary ML. The Hox cooperativity motif of the chimeric oncoprotein E2a-Pbx1 is necessary and sufficient for oncogenesis. *Mol Cell Biol*. 1997;17:81-88.
- (95) Mathews CH, Detmer K, Boncinelli E, Lawrence HJ, Largman C. Erythroid-restricted expression of homeobox genes of the human HOX 2 locus. *Blood*. 1991;78:2248-2252.
- (96) Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:12223-12227.
- (97) Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U et al. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J*. 1998;17:3714-3725.
- (98) Langston AW, Gudas LJ. Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mech Dev*. 1992;38:217-227.
- (99) Doerksen LF, Bhattacharya A, Kannan P, Pratt D, Tainsky MA. Functional interaction between a RARE and an AP-2 binding site in the regulation of

the human HOX A4 gene promoter. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:2849-2856.

- (100) Marshall H, Studer M, Popperl H et al. A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature.* 1994;370:567-571.
- (101) Ogura T, Evans RM. A retinoic acid-triggered cascade of HOXB1 gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:387-391.
- (102) Langston AW, Thompson JR, Gudas LJ. Retinoic acid-responsive enhancers located 3' of the Hox A and Hox B homeobox gene clusters. Functional analysis. *J Biol Chem.* 1997;272:2167-2175.
- (103) Gould A, Itasaki N, Krumlauf R. Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoid pathway. *Neuron.* 1998;21:39-51.
- (104) Boylan JF, Lufkin T, Achkar CC et al. Targeted disruption of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and RAR gamma results in receptor-specific alterations in retinoic acid-mediated differentiation and retinoic acid metabolism. *Mol Cell Biol.* 1995;15:843-851.
- (105) Ruthardt M, Testa U, Nervi C et al. Opposite effects of the acute promyelocytic leukemia PML-retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and PLZF-RAR alpha fusion proteins on retinoic acid signalling. *Mol Cell Biol.* 1997;17:4859-4869.
- (106) Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3:730-737.
- (107) Look AT. A leukemogenic twist for GATA1. *Nat Genet.* 2002;32:83-84.

- (108) Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood*. 1996;88:1234-1247.
- (109) Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT et al. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol*. 1995;15:5830-5845.
- (110) Zhang DE, Hohaus S, Voso MT et al. Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;211:137-47.:137-147.
- (111) Ford AM, Bennett CA, Healy LE et al. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:10838-10843.
- (112) Oelgeschlager M, Nuchprayoon I, Luscher B, Friedman AD. C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4717-4725.
- (113) Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J et al. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:13187-13192.
- (114) Porse BT, Pedersen TA, Xu X et al. E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell*. 2001;107:247-258.
- (115) Pabst T, Mueller BU, Harakawa N et al. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med*. 2001;7:444-451.



- (116) Westendorf JJ, Yamamoto CM, Lenny N et al. The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol Cell Biol.* 1998;18:322-333.
- (117) Pabst T, Mueller BU, Zhang P et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet.* 2001;27:263-270.
- (118) Park DJ, Chumakov AM, Vuong PT et al. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment. *J Clin Invest.* 1999;103:1399-1408.
- (119) Chih DY, Chumakov AM, Park DJ, Silla AG, Koeffler HP. Modulation of mRNA expression of a novel human myeloid-selective CCAAT/enhancer binding protein gene (C/EBP epsilon). *Blood.* 1997;90:2987-2994.
- (120) Olsson IL, Breitman TR, Gallo RC. Priming of human myeloid leukemic cell lines HL-60 and U-937 with retinoic acid for differentiation effects of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents and a T-lymphocyte-derived differentiation factor. *Cancer Res.* 1982;42:3928-3933.
- (121) Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood.* 1987;70:1233-1244.
- (122) Muto A, Kizaki M, Yamato K et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of a retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) associated with expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1). *Blood.* 1999;93:2225-2233.
- (123) Tsai FY, Keller G, Kuo FC et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature.* 1994;371:221-226.

- (124) Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T et al. Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood*. 2003;.
- (125) Kumano K, Chiba S, Shimizu K et al. Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood*. 2001;98:3283-3289.
- (126) Tsuzuki S, Towatari M, Saito H, Enver T. Potentiation of GATA-2 activity through interactions with the promyelocytic leukemia protein (PML) and the t(15;17)-generated PML-retinoic acid receptor alpha oncoprotein. *Mol Cell Biol*. 2000;20:6276-6286.
- (127) Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003;422:193-197.
- (128) Ren B, Cam H, Takahashi, Y et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2M checkpoints. *Genes & Development* 2002;16:245-256.

### **3.0 THE RAR $\alpha$ -PLZF ONCOGENE INHIBITS C/EBP $\alpha$ FUNCTION IN MYELOID CELLS**

## Avant-propos

Ce chapitre est constitué de l'article «The RAR $\alpha$ -PLZF oncogene inhibits C/EBP $\alpha$  function in myeloid cells » dont les auteurs sont Nathalie Girard, André Haman, Nathalie Bouchard, Jean Labrecque, Bing Chen, Zhu Chen, Sai-Juan Chen et Trang Hoang. Cet article est présentement en cours de révision pour considération de publication dans Genes and Development. Il présente une majorité des résultats que j'ai obtenus au cours de mes travaux de doctorat effectué sous la supervision de Dr. Trang Hoang.

A mon arrivée dans le laboratoire, des lignées clonales de cellules myéloïdes murine (32D) exprimant l'oncogène RAR $\alpha$ -PLZF avaient été dérivées par Nathalie Bouchard et Jean Labrecque et certains travaux préliminaires avaient été effectués. Les figures 1B et 2B, C, D présentent leur contribution au travail. André Haman a effectué l'essai de retardement sur gel de la figure 4D. Bing Chen a, tant qu'à lui, contribué la figure 7B. Ces coauteurs et les autres ont également contribuer un support technique et critique pour l'article.

## The RAR $\alpha$ -PLZF oncogene inhibits C/EBP $\alpha$ function in myeloid cells

Nathalie Girard<sup>1,2</sup>, André Haman<sup>1</sup>, Nathalie Bouchard<sup>1</sup>, Jean Labrecque<sup>1,3</sup>, Bing Chen<sup>4</sup>, Zhu Chen<sup>4</sup>, Sai-Juan Chen<sup>4</sup> and Trang Hoang<sup>1-3,5</sup>

<sup>1</sup> Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Canada

<sup>2</sup> Molecular Biology Program,

<sup>3</sup> Department of Pharmacology and Biochemistry,

University of Montreal, Montreal, Canada

<sup>4</sup> State key laboratory of Medical Genomics and Shanghai Institute of Hematology, Rui Jin Hospital, Second Medical University of Shanghai, China.

*Running head: RAR $\alpha$ -PLZF inhibits C/EBP $\alpha$  function*

Keywords: APL, leukemia, RAR $\alpha$ -PLZF, C/EBP $\alpha$ , differentiation, granulocyte.

<sup>5</sup>Correspondence : XXXXXXXXXX

**Abstract**

In the hemopoietic system, the C/EBP $\alpha$  transcription factor is essential for myeloid gene expression and for terminal maturation in the granulocyte lineage. In acute promyelocytic leukemia (APL), the variant t(11;17) translocation produces two fusion proteins, PLZF-RAR $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF, and both proteins are required for leukemogenesis. Here we show that RAR $\alpha$ -PLZF inhibits myeloid cell differentiation through direct interaction with C/EBP $\alpha$  and recruitment of HDAC1, causing histone deacetylation at C/EBP $\alpha$  target loci and decreased expression of C/EBP $\alpha$  target genes. Furthermore, this inhibition is reversed by treatment with histone deacetylase inhibitors. Finally, our data indicate that C/EBP $\alpha$  activity is severely impaired in leukemic cells from patients with t(11;17) APL, as compared to the t(15;17)APL, which is more amenable to therapy. Since C/EBP $\alpha$  function is decreased in several other myeloid leukemias, our observations reveal the mechanism through which a new type of modifier oncogene subverts differentiation and provide support for transcription therapy as an additional approach to APL and possibly other acute leukemias.

## Introduction

Acute leukemias are classified into separate clinical entities on a morphological basis, depending on the stage of differentiation at which leukemic cells are arrested. In acute promyelocytic leukemia (APL), myeloid cells are blocked at the promyelocytic stage and accumulate in the bone marrow. APL has been consistently associated with disruption of the  $RAR\alpha$  locus (de The et al., 1990) that, as a result, is fused to one of five different partners (reviewed by Melnick and Licht, 1999; Redner, 2002). Disruption of RAR signaling *in vivo*, however, is not sufficient *per se* to induce leukemia as mice lacking  $RAR\alpha_1/RAR\gamma$  (Labrecque et al., 1998) or  $RAR\alpha_t$  (Kastner et al., 2001) develop normally. This suggests that additional genetic events are required for leukemogenesis.

The majority of APL cases involving the t(15;17) translocation in which the  $RAR\alpha$  locus is transposed into the PML locus, paradoxically, respond to differentiation therapy with all-trans retinoic acid (ATRA) (reviewed by Melnick and Licht, 1999; Mistry et al., 2003). In contrast, in a subset of APL characterized by the t(11;17) translocation, both patients and primary APL cells do not respond to ATRA induction (Guidez et al., 1994; Licht et al., 1995). In this translocation,  $RAR\alpha$  is fused to a *Krüppel*-like zinc finger gene, PLZF (Chen et al., 1994). The breakpoint occurs between zinc finger two and three of PLZF and produces two fusion transcripts, PLZF- $RAR\alpha$  and  $RAR\alpha$ -PLZF. The PLZF protein harbors *Krüppel* like zinc fingers at its C-terminal region and an N-terminal POZ domain and belongs to the same family as Bcl6, an oncogene and transcriptional repressor. PLZF directly interacts with many proteins including PML and itself, as well as several co-repressors, NcoR, SMRT, mSIN3A and HDAC (reviewed by (Melnick and Licht, 1999)). Transgenic mice expressing PLZF- $RAR\alpha$  in promyelocytes develop a disease that is more reminiscent of chronic myeloid leukemia (CML) as myeloid cells lack the distinctive differentiation block at the promyelocytic stage (He et al., 1998; Cheng et al., 1999).  $RAR\alpha$ -PLZF transgenic mice develop a myeloproliferative disorder with increased percentages of myeloid

cells in the bone marrow and spleen, as well as marked extramedullary hematopoiesis (He et al., 1999). Interestingly, PLZF-RAR $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF double transgenic mice develop an APL-like disease by 6 months of age. RAR $\alpha$ -PLZF therefore collaborates with PLZF-RAR $\alpha$  to transform a chronic leukemia into an acute leukemia, suggesting that RAR $\alpha$ -PLZF belongs to a novel class of oncogenes that modify the tumor phenotype (He et al., 1999; He et al., 2000). How the oncogene contributes to leukemogenesis remains nonetheless elusive as only a few target genes have been reported.

C/EBP $\alpha$  (CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ ) is a tissue-specific transcription factor and a member of the basic region-leucine zipper (bZIP) family. In the hematopoietic system, it is essential for terminal differentiation in the granulocyte lineage as bone marrow cells from C/EBP $\alpha$ -null mice are blocked at the myeloblast stage, while other hematopoietic lineages are not affected (Zhang et al., 1997). C/EBP $\alpha$  regulates the transcription of genes involved in myeloid differentiation including lactoferrin, myeloperoxidase and neutrophil elastase (Khanna-Gupta et al., 2000; Ford et al., 1996; Oelgeschlager et al., 1996), all produced at the promyelocyte stage of differentiation, and of genes encoding myeloid specific cytokine receptors such as the granulocyte colony stimulating factor receptor (CSF3R) (Smith et al., 1996; Zhang et al., 1997). Moreover, the capacity of C/EBP $\alpha$  to induce differentiation is coupled to its capacity to cause growth arrest (Porse et al., 2001). Interestingly, C/EBP $\alpha$  function is decreased in myeloid leukemias, in some cases due to mutations in the C/EBP $\alpha$  gene (Pabst et al., 2001b), and in AML associated with the t(8;21) translocation, due to a direct down-regulation of C/EBP $\alpha$  function by the AML1-ETO fusion protein (Westendorf et al., 1998; Pabst et al., 2001a). Finally, in CML blast crisis, BCR-ABL destabilizes the C/EBP $\alpha$  protein, without affecting mRNA levels (Perrotti et al., 2002). Taken together, these observations suggest that disruption of C/EBP $\alpha$  function in AML may be a common event, and that C/EBP $\alpha$  may act as a tumor suppressor in AML (reviewed by McKnight, 2001; Look, 2002).



The present study was designed to define the cellular and molecular anomalies induced through ectopic expression of RAR $\alpha$ -PLZF, using the model cell line 32D, primary fetal liver cells and primary leukemic cells from patients with t(11;17) APL. We show here that RAR $\alpha$ -PLZF severely impairs the function of C/EBP $\alpha$ , an essential transcription factor in myeloid differentiation, thereby contributing to differentiation arrest in APL.

## Results

### *G-CSF suppresses apoptosis in control cells but not in RAR $\alpha$ -PLZF transfectants*

We chose the 32D cell line as a model to define the role of RAR $\alpha$ -PLZF in the myeloid lineage. These cells require the hematopoietic growth factors IL-3 or G-CSF for survival (Fig. 1A). In the presence of IL-3, the cells self-propagate and remain undifferentiated. When exposed to G-CSF, the cells undergo terminal differentiation into mature granulocytes expressing secondary granules (data not shown), acquire the Gr-1 surface marker (Fig. 1B) and upregulate CSF3R expression (Fig. 1C). This pattern of differentiation reproduces that observed in primary myeloid cells, whereby CSF3R expression also increases as the cells progress from the CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup> (immature myeloid cells) to CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> stage (mature granulocytes) (Fig. 1D). 32D cells have therefore retained two essential properties of primary myeloid cells, the requirement of growth factors for survival and the capacity to undergo terminal differentiation in response to G-CSF.

We generated several independent clones of 32D cells expressing the RAR $\alpha$ -PLZF or the PLZF-RAR $\alpha$  fusion gene. Three independent clones were retained because of the presence of RAR $\alpha$ -PLZF mRNA as determined by RT-PCR, RP3, RP7 and RP11 and two that expressed PLZF-RAR $\alpha$ , PR1 and PR2 (Fig. 2A). The cells survived normally and proliferated in the presence of IL-3 (Fig. 2B). After 24 h of growth factor withdrawal, parental 32D cells (Fig. 1A), controls as

well as all RAR $\alpha$ -PLZF transfectants were apoptotic. As expected, G-CSF suppressed apoptosis in parental 32D that underwent terminal maturation to PMN within 6 days (Fig. 1B). Similarly, two control clones, C7 and C14 expressing the vector alone (data shown for C7 in Fig. 2C, upper panel) as well as the two PLZF-RAR $\alpha$  transfectants PR1 and PR2 (Fig. 2C, upper panel) survived readily in G-CSF. In contrast, most of RP7 and RP11 cells, and a significant proportion of RP3 cells failed to survive in response to an optimum concentration of G-CSF (Fig. 2C, lower panel). By day 3 of culture, when controls and parental cells start to differentiate and acquire Gr-1 expression, all RAR $\alpha$ -PLZF transfectants were apoptotic (data not shown), indicating that cell differentiation and cell survival are linked in these cells. Furthermore, cell death was rescued in RAR $\alpha$ -PLZF expressing cells following ectopic bcl-2 expression (Fig. 2D), suggesting that the effect of RAR $\alpha$ -PLZF was upstream of, or parallel to, members of the bcl-2 family.

*RAR $\alpha$ -PLZF decreases the expression levels and physiological activity of the CSF3R.*

To elucidate the reason for altered G-CSF response in RAR $\alpha$ -PLZF transfectants, we tested the induction of STAT DNA binding activity, an early event in cytokine signaling, using a c-fos SIE probe (Fig. 3A). G-CSF induced STAT activity in control cells (parental 32D and C7) but not in RP7 and RP11 cells while RP3 was intermediate in this assay, indicating impaired STAT activation. Together, the observations indicate that the defective survival/differentiation response to G-CSF caused by ectopic RAR $\alpha$ -PLZF expression is an early event in myeloid cells.

These results led us to assess the mRNA levels for the G-CSF receptor, CSF3R, through semi-quantitative RT-PCR (Fig. 3B). Parental 32D cells (Fig. 3B, upper panel) and both control clones C7 and C14 expressed CSF3R mRNA (data shown for C7). CSF3R expression was also detected in the PLZF-RAR $\alpha$  transfectants PR1 and PR2 (data shown for PR1) but only very weakly in RP7

and RP11, the two RAR $\alpha$ -PLZF transfectants that failed to respond to G-CSF (Fig. 3B, lower panel). These results were also confirmed by Northern blot analysis (Fig. 3C). In clone RP3, CSF3R was lower but detectable, correlating with a partial response to G-CSF as shown in Fig. 2C. In order to rule out the possibility of a clonal selection with puromycin, we repeated the infection of 32D cells with the MSCV retrovirus harboring RAR $\alpha$ -PLZF and the fluorescent marker GFP. Analysis of the GFP<sup>+</sup> polyclonal population also revealed a decrease in CSF3R expression in RAR $\alpha$ -PLZF transfectants when compared to control MSCV-GFP transfectants (Fig. 3D). The pattern of CSF3R expression, therefore, concurred with the biological assay and indicates that ectopic expression of RAR $\alpha$ -PLZF in the 32D myeloid cell line inhibits CSF3R gene expression.

These results lead us to attempt to rescue the ability of the RAR $\alpha$ -PLZF expressing cell line RP7, to survive and differentiate in G-CSF by ectopically expressing the human CSF3R (Figure 3E and G). Figure 3F illustrates that RP7/huCSF3R cells were successfully transduced to express the human CSF3R which was not detectable in the original RP7 cells nor in the parental 32D cells or RP7 transduced with the empty expression vector (RP7/MSCV). The expression of human CSF3R did not alter that of the endogenous murine CSF3R levels or those of C/EBP $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF. FACS analysis of annexin V staining revealed that RP7/hCSF3R cells survived to levels similar to those observed in 32D parental cells in a media containing G-CSF, for a 24-48 hrs period (Figure 3E). However, this short term survival could not be sustained long term as cells apoptosed thereafter. These results suggest that the defect caused by RAR $\alpha$ -PLZF was upstream of the CSF3R transcription.

*RAR $\alpha$ -PLZF decreases the expression levels of C/EBP $\alpha$  target genes.*

C/EBP $\alpha$  is an essential transcription factor for granulopoiesis and important for optimal CSF3R expression (Smith et al., 1996). We, therefore, addressed the question whether other C/EBP $\alpha$  target genes might be affected by RAR $\alpha$ -PLZF.

Data shown in Fig. 4 A and B indicate that lactoferrin, neutrophil elastase and myeloperoxidase (data not shown) were strongly reduced in clones RP7 and RP11. These results suggest that RAR $\alpha$ -PLZF inhibits the expression of C/EBP $\alpha$  target genes.

To address the possibility that this might be caused by an indirect effect of RAR $\alpha$ -PLZF on C/EBP $\alpha$  expression, we evaluated C/EBP $\alpha$  and PU.1 mRNA levels in the 32D parental cells and clonal cell lines. Transcript levels for both factors were unaffected by RAR $\alpha$ -PLZF (data not shown). Since, C/EBP $\alpha$  translation is controlled by the presence of an upstream ORF (Calkhoven et al., 2000), we also evaluated the C/EBP $\alpha$  protein levels by Western blot analysis. Our results show that C/EBP $\alpha$  protein levels correlated with mRNA levels in all cell lines examined, suggesting that RAR $\alpha$ -PLZF does not exert a negative translational control on the C/EBP $\alpha$  protein. In addition, Figure 4C illustrates that C/EBP $\alpha$  expression is generally at least similar if not superior to those observed in RAR $\alpha$ -PLZF expressing cell lines (RP3, RP11, HA-RP and RP-GFP) with the exception of RP7 cells in which C/EBP $\alpha$  levels are reduced when compared to the parental cell line. Together, these results are consistent with the view that RAR $\alpha$ -PLZF inhibits the expression of C/EBP $\alpha$  target genes in myeloid cells.

#### *RAR $\alpha$ -PLZF interacts with C/EBP $\alpha$ and inhibits G-CSF receptor expression*

To assess the possibility that RAR $\alpha$ -PLZF directly inhibits *CSF3R* transcription, we verified the activity of the *CSF3R* promoter in 32D cells upon co-transfection of PLZF-RAR $\alpha$  or RAR $\alpha$ -PLZF and a chimeric construct in which the luciferase reporter gene was placed downstream of the proximal promoter region of 1324 bp of the *CSF3R* (Smith et al., 1996). As shown in Fig. 5A and B, the *CSF3R* promoter is active in 32D cells, and this activity was consistently repressed by RAR $\alpha$ -PLZF (2 to 3 fold), as compared to the effect of the empty vector. In contrast, PLZF-RAR $\alpha$  was inactive in this assay. Finally, RAR $\alpha$ -PLZF did not

inhibit the activity of the promoterless reporter vector pXP11 (data not shown), indicating that the repression was specific to *CSF3R* promoter sequences.

We therefore mapped the binding site through which RAR $\alpha$ -PLZF exerts its inhibitory effects on *CSF3R* promoter activity using a series of 5'deletions and internal deletions. Data shown in Figure 4B indicate the essential contribution of a sequence located between position -74 and -40 for transcription repression by RAR $\alpha$ -PLZF. This region contains a C/EBP $\alpha$  binding site at -49 (Smith et al., 1996). In the context of the full-length promoter, a mutation of this C/EBP binding site resulted in a 70% decrease in promoter activity in 32D cells (Fig. 5C), confirming the importance of C/EBP $\alpha$  for *CSF3R* gene expression. Furthermore, the mutated construct was no longer repressed by RAR $\alpha$ -PLZF (Fig. 5C, bottom panel). Finally, this site was sufficient (Fig. 5D, upper panel) and necessary (Fig. 5D, lower panel) to confer transcription repression by RAR $\alpha$ -PLZF when placed upstream of a heterologous promoter, the minimal Tk promoter. Our results therefore indicate that the C/EBP binding site is essential for transcription repression by RAR $\alpha$ -PLZF.

Inhibition of C/EBP $\alpha$  transcriptional activity by RAR $\alpha$ -PLZF could be due to decreased C/EBP $\alpha$  DNA binding or to the recruitment of a co-repressor on C/EBP $\alpha$  targets or both. To discriminate between these possibilities, we performed electromobility shift assays using nuclear extracts of our 32D clonal cell lines or a stable polyclonal cell line expressing RAR $\alpha$ -PLZF. This assay confirmed C/EBP $\alpha$  binding to the -49 sequence (Fig. 5E, lane 1) as binding was specifically supershifted with an anti-C/EBP $\alpha$  (lanes 4 and 5) and was displaced by an excess of unlabeled wild type competitor (lane 2). The mutation that functionally inactivates the sequence in transient assays (as shown in Fig. 5A and C) also abrogated C/EBP $\alpha$  binding (Fig. 5E, lane 3). Furthermore, the assays revealed that the expression of RAR $\alpha$ -PLZF did not inhibit C/EBP $\alpha$  DNA binding (Fig. 5E, compare lanes 1 and 6), consistent with the view that RAR $\alpha$ -

PLZF represses the transcriptional activity of C/EBP $\alpha$  tethered to its cognate binding site on the *CSF3R* proximal promoter. Finally, a saturating amount of C/EBP $\alpha$  overcame the repression conferred by RAR $\alpha$ -PLZF (Fig. 5F). Together, our data indicate a functional antagonism between C/EBP $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF at a C/EBP $\alpha$  target promoter.

These observations raised the possibility that RAR $\alpha$ -PLZF might directly interact with C/EBP $\alpha$  and inhibit its function as a transcriptional activator, an issue that we addressed using *in vitro* and *in vivo* protein-protein binding assays. In GST-pulldown assays (Fig. 6A), *in vitro* translated RAR $\alpha$ -PLZF specifically interacted with GST-C/EBP $\alpha$ . These results were confirmed by co-immunoprecipitation using radiolabeled *in vitro* translated proteins (Fig. 6B). The antibody against C/EBP $\alpha$  brought down RAR $\alpha$ -PLZF whereas a control pre-immune rabbit serum did not, suggesting that the interaction between RAR $\alpha$ -PLZF and C/EBP $\alpha$  is direct. To determine whether these interactions occur *in vivo* with endogenous C/EBP $\alpha$ , we performed co-immunoprecipitation using 32D cellular or nuclear extracts. For these experiments, we generated HA-tagged RAR $\alpha$ -PLZF that was stably transferred into 32D cells. In these transfectants, an antibody against C/EBP $\alpha$  co-immunoprecipitated the HA-tagged RAR $\alpha$ -PLZF, as revealed by Western blotting with the anti-HA antibody while no such immunoreactivity was detected using a pre-immune serum, confirming the specificity of the reaction. Finally, the anti-HA was not reactive in parental 32D cells. Together, the results indicate that protein-protein interactions occurred *in vivo* (Fig. 6C).

To verify if RAR $\alpha$ -PLZF or PLZF and C/EBP $\alpha$  co-localize in living cells, we transfected GFP-tagged RAR $\alpha$ -PLZF or PLZF into 32D cells (Fig. 6D, E) and stained for endogenous C/EBP $\alpha$  proteins. In the absence of RAR $\alpha$ -PLZF, C/EBP $\alpha$  localized to discrete regions within the nucleus, previously shown to contain heterochromatin (Tang and Lane, 1999). In our stable polyclonal cell line, RAR $\alpha$ -PLZF had a diffuse pattern and was found in numerous microspeckles in the nucleus. Furthermore, RAR $\alpha$ -PLZF shifted C/EBP $\alpha$  from a punctuate to a

diffuse immunofluorescence (Fig. 6D). In contrast, PLZF was found in nuclear speckles, as previously described (Reid et al., 1995) and its presence did not interfere with the normal localization of C/EBP $\alpha$ . As shown in Fig. 6E, the subcellular localization of the two proteins were mutually exclusive. The fluorescence patterns of GFP-tagged PLZF and RAR $\alpha$ -PLZF in 32D cells were identical to those obtained when 32D cells were transfected with wild type PLZF or HA-tagged RAR $\alpha$ -PLZF and stained with antibodies against PLZF or HA (data not shown), thus confirming that the GFP tag did not alter the sub-cellular localization of the two proteins. Together, these results indicate that the chimeric RAR $\alpha$ -PLZF, but not wild type PLZF, and C/EBP $\alpha$  proteins co-localize within the same nuclear substructure within living cells and validate the relevance of our observations.

*RAR $\alpha$ -PLZF recruits HDAC1 on C/EBP $\alpha$  targets.*

The capacity of PLZF to repress transcription has been associated with the recruitment of histone deacetylase complexes including HDAC1, SIN3A, NcoR and SMRT. The POZ domain present in PLZF-RAR $\alpha$  directly binds SMRT, SIN3A and HDAC1 whereas the zinc fingers present in RAR $\alpha$ -PLZF interact with HDAC1 only (Wong and Privalsky, 1998 ; Melnick et al., 2002). We therefore determined whether HDAC1 is part of a complex containing C/EBP $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF. The antibody against C/EBP $\alpha$  brought down the endogenous C/EBP $\alpha$  protein in parental 32D cells and in RAR $\alpha$ -PLZF transfected cells (Fig. 7A). In 32D cells, HDAC1 did not co-immunoprecipitate with C/EBP $\alpha$ . In contrast, the antibody against C/EBP $\alpha$  co-immunoprecipitated HDAC1 in the RAR $\alpha$ -PLZF transfectants. The absence of SMRT in the immunoprecipitates confirmed the specificity of the assay. Pulldown assays were next performed to determine which region of HDAC1 is necessary for RAR $\alpha$ -PLZF binding (Fig. 7B). Two regions appear to mediate this interaction: a region comprised between amino acids 1 and 53 and the C-terminal region of HDAC1 (amino acids 130 and 482). The latter region of HDAC1 contains a lysine rich region that has been described as the nuclear localisation signal (Taplick et al., 2001). These results indicate that

RAR $\alpha$ -PLZF associates with C/EBP $\alpha$  and recruits HDAC1 to DNA, suggesting that inhibition of CSF3R expression could be due to histone deacetylation at its promoter. To address this question, we used two approaches. First, we verified if the acetylation of histone H3 was affected in the stable cell lines expressing the RAR $\alpha$ -PLZF chimeric protein. As shown in Fig. 7C and D, the expression of RAR $\alpha$ -PLZF (in RP7 cells) caused a reduction in histone H3 acetylation specifically at the *CSF3R* promoter, when compared to that observed in parental cells. Second, we tested if a treatment with trichostatin A (TSA), an inhibitor of histone deacetylase activity could restore *CSF3R* expression in 32D that were stably or transiently transfected with RAR $\alpha$ -PLZF (Fig. 7E and F). Exposure of parental 32D cells (Fig. 7E) or PR1 cells (data not shown) to TSA either did not affect CSF3R mRNA levels or caused a modest decrease. In contrast, TSA treatment induced a 3 to 4-fold increase in CSF3R mRNA levels in clone RP7, indicating that transcription repression by RAR $\alpha$ -PLZF involves a histone deacetylase activity. Transiently transfected DNA is also embedded in a nucleosomal structure (Jeong and Stein, 1994). To assess whether HDAC-1 activity is recruited by RAR $\alpha$ -PLZF in transient assays, we co-transfected these expression vectors with the *CSF3R* proximal promoter in 32D cells and compared reporter gene activities with and without TSA. In this assay, TSA did not affect the activity of the promoter alone while repression by RAR $\alpha$ -PLZF was reversed by TSA treatment, as observed in the stable clones (Fig. 7F).

Together, our data support a model where RAR $\alpha$ -PLZF is recruited on C/EBP $\alpha$  consensus sequences by its ability to physically interact with C/EBP $\alpha$ , resulting in HDAC1 recruitment, histone hypoacetylation and decreased expression of C/EBP $\alpha$  target genes.

#### *Lack of CSF3R mRNA in leukemic cells harboring the t(11;17) translocation*

We next addressed the question whether C/EBP $\alpha$  function is diminished in primary murine fetal liver cells expressing RAR $\alpha$ -PLZF and in leukemic cells from



APL patients. We monitored CSF3R mRNA levels as an indicator of C/EBP $\alpha$  activity. Ectopic expression of RAR $\alpha$ -PLZF in CD11b<sup>+</sup> fetal liver cells resulted in a 4-fold repression of the CSF3R mRNA levels when compared to cells transduced with the empty vector (Fig. 8A). Furthermore, RT-PCR performed on primary bone marrow cells from three donors, and three leukemic samples from APL patients diagnosed with the t(15;17) translocation revealed high levels of CSF3R mRNA (Fig. 8B). In contrast, CSF3R transcripts were low in leukemic cells from two patients harboring the t(11;17) translocation. Since myeloid differentiation is arrested at the promyelocyte stage in both t(15;17)APL and t(11;17)APL and CSF3R mRNA levels are four fold lower in the latter, our observations indicate that expression of RAR $\alpha$ -PLZF correlates with impaired C/EBP $\alpha$  activity. The residual levels of CSF3R observed here in the two t(11;17) positive samples, as well as the response to G-CSF and RA observed in an isolated case of t(11;17) APL (Jansen et al., 1999), suggest that in leukemic cells or pre-leukemic cells, RAR $\alpha$ -PLZF is present at levels that are sufficient to interfere with C/EBP $\alpha$  function, without recapitulating a complete loss of C/EBP $\alpha$ . Together, our observations indicate that ectopic expression of the fusion gene RAR $\alpha$ -PLZF severely impairs the expression of *CSF3R*, a C/EBP $\alpha$  target gene.

## Discussion

Most oncogenes affect pathways that control cell proliferation or apoptosis. Despite the recognition that tumors of diverse histological origins exhibit impaired differentiation associated with distinctive clinical features, differentiation arrest is less well characterized at the molecular level. APL harboring the t(15;17) translocation is responsive to differentiation therapy with retinoic acid or arsenic trioxide whereas the t(11;17) APL is a more aggressive disease with poor prognosis. While both translocations disrupt the RAR $\alpha$  pathway, in t(11;17) APL, we show here that C/EBP $\alpha$  function is severely impaired by the RAR $\alpha$ -PLZF oncogene, and this inhibition involves HDAC1 and histone deacetylation at a C/EBP $\alpha$  target locus. Together with recent studies, our observations reveal the

mechanism through which a new type of modifier oncogenes subverts differentiation.

*The molecular basis of RAR $\alpha$ -PLZF as an oncogene*

To define the functional consequences of ectopic RAR $\alpha$ -PLZF expression, we chose the murine 32D myeloid cell line that has retained two critical properties of primary myeloid cells, i.e. the requirement of growth factor for cell survival and the capacity to differentiate with G-CSF or ATRA. This deliberate choice has allowed for a functional screen of transfectants, which led to C/EBP $\alpha$  and to the identification of a novel mechanism of transcription inhibition by the RAR $\alpha$ -PLZF oncoprotein. Here we provide evidence that RAR $\alpha$ -PLZF interacts with C/EBP $\alpha$  tethered to DNA at a target locus and recruits HDAC1, leading to the deacetylation and decreased expression of C/EBP $\alpha$  target genes such as those encoding for CSF3R, lactoferrin, neutrophil elastase and myeloperoxidase. Finally and significantly, we show that primary fetal liver cells and leukemic cells in which RAR $\alpha$ -PLZF is expressed also exhibit impaired C/EBP $\alpha$  function. Since C/EBP $\alpha$  is critical for myeloid differentiation *in vivo* (Zhang et al., 1997), our observations provide molecular insight into the mechanism of RAR $\alpha$ -PLZF as a modifier oncogene.

In addition to histone deacetylation, our study also reveals that RAR $\alpha$ -PLZF delocalizes C/EBP $\alpha$  from its normal punctuate nuclear localization into a diffuse pattern. Previous studies have reported that the subcellular localization of PLZF differs from that of RAR $\alpha$ -PLZF. PLZF can be found in nuclear speckles whereas RAR $\alpha$ -PLZF adopts a more diffuse pattern and is localized in smaller and numerous microspeckles (Reid et al., 1995). Our data not only confirm these reports but also suggest that these differences between the wild type PLZF protein and the chimeric oncoprotein contribute to the pathogenesis of APL as

RAR $\alpha$ -PLZF delocalizes C/EBP $\alpha$  in a manner that allows their interaction. In contrast, PLZF and C/EBP $\alpha$  subcellular localizations are mutually exclusive.

Studies of transgenic mice expressing RAR $\alpha$ -PLZF, or RAR $\alpha$ -PML for that matter, suggested that these fusion proteins are not primary oncogenes, as their roles were revealed only in double transgenic mice. RAR $\alpha$ -PML collaborates with PML-RAR $\alpha$  to increase the penetrance of APL without affecting its onset, and thus does not behave as a classical collaborating oncogene (Pollock et al, 1999). Unlike RAR $\alpha$ -PLZF that harbours the 7 C-terminal zinc finger motives of PLZF, RAR $\alpha$ -PML contains mostly the acidic C terminal domain of PML whose function is unknown. Whether or not RAR $\alpha$ -PML is dominant negative over PML remains to be documented. RAR $\alpha$ -PLZF differs as it acts to modify the phenotype of the tumor, causing differentiation arrest at the promyelocyte stage and converting a CML-like disease into APL (He et al., 2000). Thus, RAR $\alpha$ -PLZF belongs to a novel class of collaborating modifier oncogenes. While RAR $\alpha$ -PLZF could be dominant negative over PLZF at PLZF target loci such as Cyclin A, our study unravels a novel mechanism through which RAR $\alpha$ -PLZF can cause differentiation arrest by diminishing the activity of C/EBP $\alpha$  and delocalizing C/EBP $\alpha$  from its normal subnuclear localization. In addition, as for RAR $\alpha$ -PML, the presence of RAR $\alpha$ -PLZF could facilitate leukemogenesis by eliminating the need for additional hits such as the deletion of the remaining PLZF allele to dysregulate essential cellular controls of proliferation and apoptosis. Thus, He et al., 1999 have shown that the loss of wild type PLZF was sufficient to modify a CML-like disease in PLZF-RAR $\alpha$  transgenic mice into APL, *in lieu* of the co-expression of RAR $\alpha$ -PLZF. RAR $\alpha$ -PLZF expression is found in all t(11;17) patient samples, except one (Grimwade et al., 2000) it would be of interest to verify if there are inactivating mutations in the remaining PLZF allele or in the C/EBP $\alpha$  gene itself.

## *C/EBP $\alpha$ and lineage-specific transcriptional regulators as tumor suppressor genes*

Decreased C/EBP $\alpha$  function has been reported in other myeloid leukemias such as CML (Perrotti et al., 2002), in the M2 subtype of AML, harboring the t(8;21) translocation ((Westendorf et al., 1998; Pabst et al., 2001a)) and in 16% of AML-M2 that lack the t(8;21) translocation (Pabst et al., 2001b). In the present study, we define a novel mechanism of inhibition of C/EBP $\alpha$  function via direct protein-protein interaction and recruitment of HDAC1. Together, the observations suggest that C/EBP $\alpha$  may fulfill a tumor suppressor function in the myeloid lineage and a reduction or loss of function may be necessary to promote the progression of leukemogenesis.

In acute lymphoid leukemias, several oncogenes activated by chromosomal translocations inhibit the function of the E2A transcription factor, essential for both B and T cell differentiation. These include the SCL/TAL1 transcription factor (Herblot et al., 2000), TAN1/Notch (Ordentlich et al., 1998), and possibly TAL2 and Lyl1 in T-ALL (reviewed by (Murre, 2000)). Finally, mutations in the GATA-1 gene, normally required for differentiation in the erythroid and megakaryocytic lineages, are found in acute megakaryoblastic leukemia (Wechsler et al., 2002). Taken together, these reports define a new class of genetic hits in leukemias, and possibly in other types of cancers, that inactivate the function of important transcriptional regulators required for differentiation in specific lineages (reviewed by (Look, 2002)).

## **Materials and Methods**

### *Cells, growth factors*

The murine 32D cell line, a kind gift of Dr Quesenberry, was cultured as previously described (Labrecque et al., 1998). Recombinant hG-CSF (Amgen Inc) was used at a concentration of 10 ng/ml.

### *Plasmids*

The RAR $\alpha$ -PLZF and PLZF-RAR $\alpha$  fusion genes were cloned into the EcoRI site of the retroviral vector pBABE-puro (Chen et al., 1994), MSCV-GFP and MSCV-pac. The human bcl-2 cDNA was cloned in the EcoRI site of the retroviral vector MSCV-neo. RAR $\alpha$ -PLZF was tagged at its N-terminus region by PCR cloning in pcDNA3.1 using EcoRI/BamHI sites downstream and in frame with a HA tag. A GFP-tagged protein RAR $\alpha$ -PLZF was also obtained by subcloning the EcoRI/BamHI fragment containing the cDNA in the pEGFP-C2 expression vector (Clontech). These constructs were verified by sequencing. HA-RAR $\alpha$ -PLZF was also transferred in the HpaI/BglII sites of MSCV-neo. Both the HA and GFP tags did not alter the transcriptional properties of RAR $\alpha$ -PLZF in transient transfection assays.

### *Retroviral mediated gene transfer*

Stable 32D transfectants harboring the fusion genes were obtained through Lipofectin-mediated DNA transfer as previously reported (Aplan et al., 1992; Hoang et al., 1996). Cells were cloned immediately after gene transfer by limiting dilution and the selective pressure applied the following day, at a concentration of 5  $\mu$ g/ml puromycin (Gibco). Stable polyclonal cell lines or fetal liver cells expressing RAR $\alpha$ -PLZF with the GFP marker or tagged with the HA epitope or GFP were obtained by infection with amphotropic retroviral particles produced through transient transfection of 293 GPG cells. Exponentially growing cells from 32D cells or fetal liver cells isolated from 12.5 dpc embryos from C57/BL6 mice were incubated with polybrene (0.8  $\mu$ g/ml) and the viral particles for 24 h. They were either passaged in media containing of 1mg/ml of geneticin (G-418)(Gibco) or sorted on the basis of GFP expression one week post-infection.

### *Flow cytometry analysis*

Surface labeling of 32D cells were performed as described previously (Herblot et al., 2000); (Labrecque et al., 1998). The Gr-1 and CD11b antibodies used were respectively obtained from the hybridomas RB6-8C5 and M1/70.15.11.5HL (ATCC). FITC-conjugated Annexin V (Bioss) and fluorescinated goat-anti mouse (Caltech), fluorescein-conjugated anti-Mac1 and biotinylated Gr-1 antibodies were also used. Dead cells were excluded on the basis of staining with propidium iodide.

### *RNA preparation, Northern blot analysis, cDNA synthesis and PCR analysis*

Total RNA preparation, cDNA synthesis and PCR analysis have been described previously (Herblot et al., 2000). One microgram of total RNA was used as template for first strand DNA synthesis. Oligonucleotide sequences are available upon request. cDNAs were amplified for 30 cycles unless a semi-quantitative PCR was performed. In which case, one fifth of the PCR reaction was removed every third cycle between cycles 18 and 27, loaded on a 1% agarose gel and transferred on a nylon membrane (Nytran, Schleicher and Schuell). Hybridization with a [<sup>32</sup>P] end labeled internal probe (Amersham-Pharmacia Biotechnology) was performed to confirm the specificity of the PCR product. Blots were exposed to a PhosphorImager screen for quantification (Molecular Dynamics). For each amplification of a specific cDNA, S16 was co-amplified as internal control to correct for variations in loading. Specific mRNA levels were calculated as ratio over that of S16, and this ratio in control cells was taken as 1. Northern blot analysis was performed as described previously (Aplan et al., 1992).

### *Electrophoretic mobility shift assays*

DNA binding assays were performed to evaluate STAT binding on c-fos SIE probe (Rajotte et al., 1996) and C/EBP $\alpha$  binding on its site on the *CSF3R* (-57 to -37) promoter: wild type, AAG GTG TTG CAA TCC CCA GCC and mutant AAG GTG TTC ACC AAC CCA GCC (Smith et al., 1996). Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed as described (Lecuyer et al., 2002) using nuclear extracts (10  $\mu$ g) from 32D cells. The binding reaction was allowed to proceed for 30 minutes on ice in 50 mM Tris pH 7.8, 10 mM DTT, 250 mM KCl, 50% glycerol, 5 mg/ml of BSA and 300 ng of dIdC per reaction. Where indicated, proteins were pre-incubated for 30 min on ice with 2  $\mu$ g of rabbit polyclonal antibodies against C/EBP $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  or anti-PU.1 as a control (Santa Cruz Biotechnology), or unlabelled double stranded oligonucleotides were added at a 100 fold molar excess as competitors. Protein-DNA complexes were resolved by electrophoresis on acrylamide gels. Gels were dried and exposed to a PhosphorImager screen for quantitation (Molecular Dynamics).

### *Transient Transfection assay*

32D cells were pretreated for 48 hours with  $10^{-7}$  M of ATRA (Sigma-Aldrich) to upregulate *CSF3R* promoter activity. Exponentially growing cells were then transiently transfected by electroporation using a Gene-Pulser apparatus (Bio-Rad) (320 V, 960  $\mu$ F). MSCV-Pac expression vector (control) or containing RAR $\alpha$ -PLZF or PLZF-RAR $\alpha$  were cotransfected at a ratio of 1:1 with the pXP11 luciferase reporter vector (20  $\mu$ g) with or without rat C/EBP $\alpha$  (kindly provided by Dr Alan Friedman, Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD). The total amount of DNA was kept constant with MSCV-pac as a carrier. The h*CSF3R* proximal promoter (-1324+67) and various deletions and mutations of this construct (-74+67, -40+67, -1324+67 in which the C/EBP binding site was mutated) as well as a tetramer of the C/EBP binding sites of the *CSF3R* promoter were kindly provided by Dr. D.G. Tenen and subcloned in the pXP11 luciferase-

reporter vector. Luciferase assays were done with whole cell extracts prepared from harvested cells by using the Promega luciferase assay system, 39 hours after electroporation, using a Berthold LB953 luminometer. Where indicated, Trichostatin A (10 ng/ml, Calbiochem-Novabiochem Corp.) was added to the culture media immediately after electroporation. For all transfections, results are shown as the mean  $\pm$  SD of replicate determinations.

#### *Co-immunoprecipitations and western blot analysis*

Co-immunoprecipitations were performed using *in vitro* translated proteins or nuclear extracts from stable 32D transfectants expressing RAR $\alpha$ -PLZF. *In vitro* translated radiolabeled HA-RAR $\alpha$ -PLZF and C/EBP $\alpha$  were individually synthesized and preincubated for 30 minutes at 37°C to allow for protein-protein interactions to occur. Binding of the protein complexes with 2  $\mu$ g of anti-C/EBP $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnologies) or species-matched control antibodies (preimmune serum, anti-PU.1 or anti-c-Myc as indicated) was allowed to proceed overnight at 4°C, in a final volume of 350  $\mu$ l in 1% NP-40, 50 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 4% glycerol and a cocktail of protease inhibitors (2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 100  $\mu$ g/ml pepstatin A, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, DTT, 1  $\mu$ g/ml antipain, 1  $\mu$ g/ml chymostatin). Immune complexes were then recovered with formalin-fixed *Staphylococcus aureus* (Pansorbin, Calbiochem-Novabiochem International) (Staph A) (30 minutes at 4°C), followed by four washes. Proteins were eluted by incubating the bound immunoprecipitates in Laemmli buffer for 15 minutes at room temperature. The protein complexes were then resolved by SDS-PAGE. The gels were dried and <sup>35</sup>S-labelled proteins were analyzed using a PhosphorImager screen.

Nuclear extracts or cellular extracts from formaldehyde fixed cells were prepared as previously described (Lecuyer et al., 2002) from a polyclonal 32D cell line that expresses HA-RAR $\alpha$ -PLZF. Co-immunoprecipitations were carried out using 500  $\mu$ g of proteins, essentially as described above and rabbit preimmune serum (Sigma-Aldrich) or anti-PU.1 (Santa Cruz Biotechnologies) was used as a



negative control. Immune complexes were subjected to SDS-PAGE and were transferred to a PVDF membrane (Immobilon P, Millipore Corp.) for Western blotting with the antibodies listed below, according to the manufacturer's protocol (Santa Cruz Biotechnology). Hybridizations were visualized using ECL plus (Amersham-Pharmacia Biotechnology).

Antibodies used for immunoblotting were: anti-C/EBP $\alpha$  rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology), anti-Myc (supernatant from hybridoma, ATCC), anti-HA mouse monoclonal antibody (Covance), anti-HDAC1 mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology), anti-SMRT polyclonal goat antibody (Santa Cruz Biotechnology), goat anti-mouse and rabbit anti-goat peroxidase conjugated polyclonal antibodies (Calbiochem-Novabiochem International) and goat anti-rabbit conjugated HRP polyclonal antibody (Sigma-Aldrich).

#### *Fluorescence microscopy*

Nuclear staining for C/EBP $\alpha$  was performed on cells that had been fixed using Bouin's fixative for 25 minutes at room temperature. The cells were cytocentrifuged on gelatin-coated slides, incubated with normal goat serum to block non-specific labeling, and stained with anti-C/EBP $\alpha$  (Santa-Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:250. Cell-bound C/EBP $\alpha$  was revealed by labeling with Cy3-coupled goat anti-rabbit antibody (Jackson Laboratories). The slides were mounted with anti-fade solution (Molecular probes) for confocal fluorescence microscopy, using a Zeiss LSM 510 Axiovert 100 microscope (Carl Zeiss) and a 63X Plan Aplanachromate objective. The acquisition software was the Zeiss LSM Image Examiner.

#### *Chromatin immunoprecipitation assay*

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed as described previously (Lecuyer et al., 2002) using 500  $\mu$ g of protein per sample and anti-

acetyl histone H3 (Upstate Biotechnologies) or normal rabbit serum as control. PCR reactions were performed for 25 cycles and PCR products were migrated on a 1% agarose gel, transferred on nylon membranes, and hybridized with internal probes as mentioned above.

#### *GST-pulldown assay*

The GST-C/EBP $\alpha$  construct in pGex was kindly given by Dr D.G. Tenen and various constructs of GST-HDAC1 were generously provided by Dr C. Seiser (University of Vienna, Austria) (Taplick et al., 2001). GST-protein purification and pull-down was performed as described previously (Lecuyer et al., 2002). *In vitro* translated HA-RAR $\alpha$ -PLZF was synthesized according to the manufacturer's protocol with the TNT coupled reticulocyte lysate system from Promega. The protein was labeled with [<sup>35</sup>S]-Met (Amersham-Pharmacia) to allow for visualization of binding to GST-proteins.

#### **Acknowledgements**

We are grateful for the contributions of Martin Houle and Marie-Noëlle Harvey to this work. This work was supported by grants from the Leukemia Research Fund of Canada (T.H.) and the Cancer Research Society Inc (T.H.). Nathalie Girard is supported by a studentship award from the Canadian Institutes for Health Research, Jean Labrecque, a post doctoral fellowship award from the Leukemia Research Fund of Canada, Zhu Chen and Sai-Juan Chen, Visiting Scientist awards from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). The Banque de cellules leucémiques du Québec is supported by a grant from the FRSQ.

## References

- Aplan,P.D., Nakahara,K., Orkin,S.H., and Kirsch,I.R. 1992. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO Journal* **11**: 4073-4881.
- Bonnet,D. and Dick,J.E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**: 730-737.
- Calkhoven,C.F., Muller,C., and Leutz,A. 2000. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev.* **14**: 1920-1932.
- Chen,Z., Guidez,F., Rousselot,P., Agadir,A., Chen,S.J., Wang,Z.Y., Degos,L., Zelent,A., Waxman,S., and Chomienne,C. 1994. PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11; 17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 1178-1182.
- Cheng,G.X., Zhu,X.H., Men,X.Q., Wang,L., Huang,Q.H., Jin,X.L., Xiong,S.M., Zhu,J., Guo,W.M., Chen,J.Q., Xu,S.F., So,E., Chan,L.C., Waxman,S., Zelent,A., Chen,G.Q., Dong,S., Liu,J.X., and Chen,S.J. 1999. Distinct leukemia phenotypes in transgenic mice and different corepressor interactions generated by promyelocytic leukemia variant fusion genes PLZF-RARalpha and NPM-RARalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6318-6323.

de The,H., Chomienne,C., Lanotte,M., Degos,L., and Dejean,A. 1990. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* **347**: 558-561.

Ford,A.M., Bennett,C.A., Healy,L.E., Towatari,M., Greaves,M.F., and Enver,T. 1996. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**: 10838-10843.

Grimwade,D., Biondi,A., Mozziconacci,M.J., Hagemeijer,A., Berger,R., Neat,M., Howe,K., Dastugue,N., Jansen,J., Radford-Weiss,I., Lo,C.F., Lessard,M., Hernandez,J.M., Delabesse,E., Head,D., Liso,V., Sainty,D., Flandrin,G., Solomon,E., Birg,F., and Lafage-Pochitaloff,M. 2000. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood* **96**: 1297-1308.

Guidez,F., Huang,W., Tong,J.H., Dubois,C., Balitrand,N., Waxman,S., Michaux,J.L., Martiat,P., Degos,L., Chen,Z., and . 1994. Poor response to all-trans retinoic acid therapy in a t(11;17) PLZF/RAR alpha patient. *Leukemia* **8**: 312-317.

He,L.Z., Bhaumik,M., Tribioli,C., Rego,E.M., Ivins,S., Zelent,A., and Pandolfi,P.P. 2000. Two critical hits for promyelocytic leukemia. *Mol Cell* **6**: 1131-1141.

- He,L.Z., Guidez,F., Tribioli,C., Peruzzi,D., Ruthardt,M., Zelent,A., and Pandolfi,P.P. 1998. Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet* **18**: 126-135.
- He,L.Z., Merghoub,T., and Pandolfi,P.P. 1999. In vivo analysis of the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia in the mouse and its therapeutic implications. *Oncogene* **18**: 5278-5292.
- Herblot,S., Steff,A.M., Hugo,P., Aplan,P.D., and Hoang,T. 2000. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat. Immunol.* **1**: 138-144.
- Hoang,T., Paradis,E., Brady,G., Billia,F., Nakahara,K., Iscove,N.N., and Kirsch,I.R. 1996. Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* **87**: 102-111.
- Jansen,J.H., de Ridder,M.C., Geertsma,W.M., Erpelinck,C.A., van Lom,K., Smit,E.M., Slater,R., vd Reijden,B.A., de Greef,G.E., Sonneveld,P., and Lowenberg,B. 1999. Complete remission of t(11;17) positive acute promyelocytic leukemia induced by all-trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **94**: 39-45.
- Jeong,S.W. and Stein,A. 1994. DNA sequence affects nucleosome ordering on replicating plasmids in transfected COS-1 cells and in vitro. *J. Biol. Chem.* **269**: 2197-2205.

Kastner,P., Lawrence,H.J., Waltzinger,C., Ghyselinck,N.B., Chambon,P., and Chan,S. 2001. Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha. *Blood* **97**: 1314-1320.

Khanna-Gupta,A., Zibello,T., Simkevich,C., Rosmarin,A.G., and Berliner,N. 2000. Sp1 and C/EBP are necessary to activate the lactoferrin gene promoter during myeloid differentiation. *Blood* **95**: 3734-3741.

Labrecque,J., Lohnes,D., Chambon,P., Iscove,N.N., and Hoang,T. 1998. Impaired granulocytic differentiation *in vitro* in hemopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha 1 and gamma. *Blood* **92**: 607-615.

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

Licht,J.D., Chomienne,C., Goy,A., Chen,A., Scott,A.A., Head,D.R., Michaux,J.L., Wu,Y., DeBlasio,A., Miller,W.H., Jr., and . 1995. Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11;17). *Blood* **85**: 1083-1094.

Look,A.T. 2002. A leukemogenic twist for GATA1. *Nat. Genet.* **32**: 83-84.

McKnight,S.L. 2001. McBindall--a better name for CCAAT/enhancer binding proteins? *Cell* **107**: 259-261.

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. *Mol. Cell Biol.* **22**: 1804-1818.

Melnick,A. and Licht,J.D. 1999. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **93**: 3167-3215.

Mistry,A.R., Pedersen,E.W., Solomon,E., and Grimwade,D. 2003. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev.* **17**: 71-97.

Murre,C. 2000. Intertwining proteins in thymocyte development and cancer. *Nat. Immunol.* **1**: 97-98.

Oelgeschlager,M., Nuchprayoon,I., Luscher,B., and Friedman,A.D. 1996. C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol. Cell Biol.* **16**: 4717-4725.

Ordentlich,P., Lin,A., Shen,C.P., Blaumueller,C., Matsuno,K., Artavanis-Tsakonas,S., and Kadesch,T. 1998. Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* **18**: 2230-2239.

Pabst,T., Mueller,B.U., Harakawa,N., Schoch,C., Haferlach,T., Behre,G., Hiddemann,W., Zhang,D.E., and Tenen,D.G. 2001a. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat. Med* **7**: 444-451.

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

Perrotti,D., Cesi,V., Trotta,R., Guerzoni,C., Santilli,G., Campbell,K., Iervolino,A., Condorelli,F., Gambacorti-Passerini,C., Caligiuri,M.A., and Calabretta,B. 2002. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat. Genet.* **30**: 48-58.

Porse,B.T., Pedersen,T.A., Xu,X., Lindberg,B., Wewer,U.M., Friis-Hansen,L., and Nerlov,C. 2001. E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis *in vivo*. *Cell* **107**: 247-258.

Rajotte,D., Sadowski,H.B., Haman,A., Gopalbhai,K., Meloche,S., Liu,L., Krystal,G., and Hoang,T. 1996. Contribution of both STAT and SRF/TCF to c-fos promoter activation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **88**: 2906-2916.

Redner,R.L. 2002. Variations on a theme: the alternate translocations in APL. *Leukemia* **16**: 1927-1932.

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.



- Smith,L.T., Hohaus,S., Gonzalez,D.A., Dziennis,S.E., and Tenen,D.G. 1996. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony- stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* **88**: 1234-1247.
- Tang,Q.Q. and Lane,M.D. 1999. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* **13**: 2231-2241.
- Taplick,J., Kurtev,V., Kroboth,K., Posch,M., Lechner,T., and Seiser,C. 2001. Homo-oligomerisation and nuclear localisation of mouse histone deacetylase 1. *J. Mol. Biol.* **308**: 27-38.
- 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. *Nat. Genet.* **32**: 148-152.
- Westendorf,J.J., Yamamoto,C.M., Lenny,N., Downing,J.R., Selsted,M.E., and Hiebert,S.W. 1998. The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol. Cell Biol.* **18**: 322-333.
- Wong,C.W. and Privalsky,M.L. 1998. Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J Biol Chem* **273**: 27695-27702.
- Zhang,D.E., Zhang,P., Wang,N.D., Hetherington,C.J., Darlington,G.J., and Tenen,D.G. 1997. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and

neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice.

*Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 569-574.

## Figure legends

**Figure 1.** The 32D cell line reproduces the patterns of differentiation observed in primary cells.

**A:** Suppression of apoptosis by IL-3 or G-CSF in 32D immature myeloid cells. The cells were deprived of growth factors, or stimulated with G-CSF or IL-3 for 24 h. Apoptotic cells were labeled with Annexin V-FITC.

**B:** 32D cells undergo terminal myeloid differentiation in the presence of G-CSF. Flow cytometry analysis reveals that 32D cells remain undifferentiated in IL-3 containing media and are mostly Gr-1 negative (left panel), whereas exposure to G-CSF for 6 days causes differentiation into mature, Gr-1 positive granulocytes. The gray lines represent an isotype-matched control antibody whereas the black lines represent cells stained with Gr-1.

**C:** Semi-quantitative RT-PCR analysis reveals an up regulation of CSF3R mRNA as cells undergo differentiation. Amplification of ribosomal S16 serves as a control for variations in input RNA.

**D:** Increased CSF3R expression in mature Gr1<sup>+</sup> granulocytes. Primary bone marrow cells were stained with CD11b and Gr-1. CD11b<sup>+</sup> cells were sorted into three fractions on the basis of Gr1 staining as indicated (left panel). RT-PCR was performed for CSF3R and S16 as in Fig. 1C on the populations of primary bone marrow cells sorted as shown in Fig. 1D (right panel).

**Figure 2.** Ectopic expression of RAR $\alpha$ -PLZF in myeloid cells specifically inhibits G-CSF-dependent cell survival.

**A :** RT-PCR analysis of 32D clones expressing RAR $\alpha$ -PLZF (RP3, RP7, RP11) or PLZF-RAR $\alpha$  (PR1, PR2). Control cells harboring the empty vector (C7) and

parental 32D cells show no amplification for either fusion proteins. S16 amplification serves as a control, as above.

**B :** Cell viability in the presence of IL-3 or on growth factor deprivation. Cells were grown for 24 hours in the presence of mull-3 (10 ng/ml) or without cytokine (none) and labeled with Annexin V-FITC to detect apoptotic cells.

**C :** Flow cytometry analysis of 32D clones maintained in the presence of G-CSF. Cells were maintained with IL-3, washed, exposed to G-CSF for 24 h and labeled with Annexin V-FITC and propidium iodide to exclude dead cells.

**D :** Bcl-2 rescues the viability in RAR $\alpha$ -PLZF expressing cells in G-CSF-containing medium. RP clones (RP3, RP7 and RP11) were either infected with retroviruses harboring the human Bcl-2 cDNA (RP+Bcl2) or the vector alone (RP+MSCV). The cells were exposed to G-CSF for two days, and viable cell counts performed through trypan blue exclusion (average of 3 clones). For comparison, the viability of control cells expressing the empty vector (C7 and C14) or PLZF-RAR $\alpha$  (PR1 and PR2) is also shown (average of 2 clones each). Results represent the average  $\pm$  SD of viable cells and are typical of at least two independent experiments.

**Figure 3.** RAR $\alpha$ -PLZF decreases the expression of C/EBP $\alpha$  target genes.

**A :** RAR $\alpha$ -PLZF decreases STAT activation by G-CSF. Control cells (32D, C7) or RAR $\alpha$ -PLZF (RP3, RP7, RP11) expressing cells were exposed (+) or not (-) to G-CSF (30 min.). Gel retardation analysis of nuclear extracts was performed using a <sup>32</sup>P-labelled c-fos SIE probe.

**B :** Decreased CSF3R mRNA levels in RAR $\alpha$ -PLZF expressing clones. Exponentially growing cells maintained in IL-3 containing medium were harvested and analyzed by RT-PCR. Shown are Southern blots of PCR samples harvested after 18, 21, 24 and 27 cycles of amplification and hybridized with an internal

oligonucleotide probe for CSF3R or for the ribosomal S16 mRNAs as a control as above. After normalisation for S16 levels, CSF3R expression in clones RP3, RP7 and RP11, was 0.6, 0.03 and 0.04 fold of the levels observed in the 32D parental cells, respectively. Shown are representative results of four independent experiments.

**C :** Northern blot analysis shows lower levels of CSF3R mRNA in RAR $\alpha$ -PLZF expressing cell lines. The blot (15 $\mu$ g of total RNA /lane) was sequentially probed for CSF3R and  $\beta$ -actin, as loading control.

**D :** Decreased CSF3R expression in a polyclonal population expressing RAR $\alpha$ -PLZF as analyzed by RT-PCR as in Figure 3B (21 to 27 cycles).

**E :** Stable ectopic expression of human CSF3R in the RP7 cells (RP7/huCSF3R) allows them to survive when exposed to G-CSF for 24hrs as opposed to RP7 or RP7 cells transduced with the empty expression vector (RP7/MSCV). The short term survival of RP7/huCSF3R cells in G-CSF is similar to that of the parental 32D. Flow cytometry analysis was performed as stated in Figure 2C.

**F :** RT-PCR analysis shows that huCSF3R is only detectable in the RP7/huCSF3R cell line. Expression of muCSF3R, C/EBP $\alpha$  and RAR $\alpha$ -PLZF remain unaffected by the ectopic expression of huCSF3R. RT-PCR analysis was performed as described in Figure 1C. S16 amplification served as internal control.

**G :** Expression of huCSF3R in RP7 cells does not rescue long term cell survival in G-CSF. Cells were grown in the presence of G-CSF and viable cells were evaluated by exclusion of the trypan blue dye.

**Figure 4.** C/EBP $\alpha$  target genes are inhibited by RAR $\alpha$ -PLZF.

**A:** Decreased expression of C/EBP $\alpha$  target genes in RAR $\alpha$ -PLZF expressing 32D cells. Semi-quantitative RT-PCR was performed as in Fig. 3B to analyze the

mRNA levels of lactoferrin and neutrophil elastase in parental 32D and clonal RP7 and RP11 cell lines. S16 amplification served as an internal control as above. When compared to parental cells and after normalization for S16 levels, the levels of lactoferrin, neutrophil elastase (as illustrated) and of myeloperoxidase (not shown) were 0.2, 0.05 and 0.3 fold in clone RP7 and 0.1, 0.5 and 0.5 fold in clone RP11, respectively.

**B:** Analysis of Real Time PCR for neutrophil elastase (NE), lactoferrin and myeloperoxidase (MPO) in parental 32D, RP7 and RP11 cells. S16 amplification served as loading and amplification control. Expression levels of NE, MPO and lactoferrin were inhibited by 4 folds in RP7 whereas NE and lactoferrin were reduced by 2 and 4 folds in RP11 cells.

**C:** Protein levels of C/EBP $\alpha$  as determined by Western blot. Nuclear extracts from the indicated cell lines (left panel, 25  $\mu$ g; right panel, 15  $\mu$ g of proteins) were resolved on SDS-polyacrylamide gels, transferred on a PVDF membrane and probed with antibodies against C/EBP $\alpha$  or PTP-1D as loading control. \* indicates non-specific bands. Numbers on the right indicate the migration of molecular weight standards.

**Figure 5.** RAR $\alpha$ -PLZF but not PLZF-RAR $\alpha$  inhibits transcription activation by C/EBP $\alpha$

**A:** RAR $\alpha$ -PLZF inhibits *CSF3R* promoter activity. 32D were electroporated with a chimeric luciferase construct placed under the control of the *CSF3R* promoter, together with PLZF-RAR $\alpha$ , RAR $\alpha$ -PLZF or the empty MSCV vector. Data shown are expressed as % control, which is the basal activity of the full length *CSF3R* promoter in the presence of the empty MSCV vector. Data illustrate typical

results representative 5 experiments and represent the average  $\pm$  SD performed in duplicates or triplicates with 32D cells.

**B:** Repression of the CSF3R promoter activity by RAR $\alpha$ -PLZF is dose-dependent. Cells were electroporated with the -1324+67 CSF3R luciferase reporter and increasing amounts of the expression vector for PLZF-RAR $\alpha$  or RAR $\alpha$ -PLZF. Data shown are expressed as % control which is the basal activity of the promoter in absence of PLZF-RAR $\alpha$  or RAR $\alpha$ -PLZF. Data illustrate typical results and represent the average  $\pm$  SD performed in duplicates or triplicates with 32D cells

**C:** The integrity of the C/EBP binding site is critical for repression of CSF3R promoter activity by RAR $\alpha$ -PLZF. Deletion mutants, or a CSF3R construct harboring a mutation at the C/EBP consensus sequence in the context of the full length promoter were tested by transient transfection as described in A. Data shown are expressed as % control which is the basal activity of the -1324 +67 CSF3R promoter construct used in A (in the presence of the empty MSCV vector) and is representative of n experiments performed in duplicate or triplicate with 32D cells.

**D:** The C/EBP binding site is necessary and sufficient for transcription repression by RAR $\alpha$ -PLZF. 32D were electroporated with a reporter construct containing a multimer of the C/EBP binding site placed upstream of the minimal Tk promoter (Tk81) (upper panel) or a construct in which these sites are mutated (lower panel). RAR $\alpha$ -PLZF or the empty MSCV vector were co-delivered as described in Figure 4A. Data shown are expressed as % control which is the basal activity of the multimer of C/EBP $\alpha$  binding sites construct in 32D cells electroporated with the empty MSCV vector, and is typical of n experiments performed in duplicate or triplicate with 32D cells.

**E:** Gel retardation analysis of nuclear extracts from 32D cells or RAR $\alpha$ -PLZF transfectants, using a  $^{32}\text{P}$ -labeled C/EBP $\alpha$  probe from the *CSF3R* promoter. C/EBP $\alpha$  binding (left arrow) was supershifted (right arrow) with an anti-C/EBP $\alpha$  antibody (lanes 5 and 10) but not anti-C/EBP $\delta$  or  $\epsilon$  (data not shown), or a species-matched control antibody (anti-PU.1, lanes 4 and 9). The specificity of C/EBP $\alpha$  DNA binding was further confirmed by displacement with a 100 fold excess amount of unlabelled double stranded oligonucleotides (lanes 2 and 7) while mutant (lanes 3 and 8) double-stranded oligonucleotides failed to do so.

**F:** The inhibition of the activity of wild type *CSF3R* promoter by RAR $\alpha$ -PLZF in 32D cells is relieved by co-delivery of C/EBP $\alpha$  in a dose-dependent fashion. Cells were electroporated with the  $-1324 +67$  *CSF3R*-luciferase vector and either the empty MSCV vector (open bars) or a C/EBP $\alpha$  expressing vector (filled bars). Data shown are expressed as % control, which is the basal activity of the promoter in the absence of an exogenous source of C/EBP $\alpha$ .

**Figure 6.** RAR $\alpha$ -PLZF associates with C/EBP $\alpha$  and HDAC1 *in vivo*.

**A:** RAR $\alpha$ -PLZF binds to C/EBP $\alpha$  *in vitro*. Pulldown assays were performed with immobilized GST or GST-C/EBP $\alpha$  and radiolabeled RAR $\alpha$ -PLZF. RAR $\alpha$ -PLZF binds to GST-C/EBP $\alpha$  (lane 2) while it was unable to bind GST alone (lane 1). Input (lane 3) represents 10% of the radiolabeled RAR $\alpha$ -PLZF used in lanes 1 and 2. Bound proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and visualized by PhosphorImaging. Numbers on the right indicate the migration of molecular weight standards.

**B:** Co-immunoprecipitation of *in vitro* translated RAR $\alpha$ -PLZF and C/EBP $\alpha$ . Radiolabeled RAR $\alpha$ -PLZF and C/EBP $\alpha$  were subjected to immunoprecipitation with an antibody against C/EBP $\alpha$ . Bound proteins were



resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and visualized by PhosphorImaging. In the presence of control rabbit preimmune serum, anti-c-Myc or a species-matched anti-PU.1 antibody (data shown for the rabbit preimmune serum), the Staph A did not pull down C/EBP $\alpha$  or RAR $\alpha$ -PLZF (control). Note that the anti-C/EBP $\alpha$  brought down RAR $\alpha$ -PLZF in the presence of C/EBP $\alpha$  (left arrows). The input represents 10 % of the mixture that was subjected to immunoprecipitation. Molecular weight standards are indicated.

**C:** *In vivo* co-immunoprecipitations of endogenous C/EBP $\alpha$  with RAR $\alpha$ -PLZF. 32D nuclear extracts were subjected to immunoprecipitation with anti-C/EBP $\alpha$  or a rabbit preimmune serum (control). Immunoprecipitated proteins were revealed by Western blotting with anti-HA. Co-immunoprecipitations were performed with cross-linked cellular extracts, as described for chromatin immunoprecipitation assays, from stably transfected 32D cells expressing RAR $\alpha$ -PLZF (top panel) or 32D cells harboring the empty expression vector (MSCV-HA) (lower panel). Molecular weight standards are indicated.

**D:** RAR $\alpha$ -PLZF co-localizes with C/EBP $\alpha$ . 32D cells were transduced to stably express RAR $\alpha$ -PLZF fused in frame with GFP. Endogenous C/EBP $\alpha$  was revealed by indirect immunofluorescence staining with anti-C/EBP $\alpha$  and Cy3-coupled anti-IgG. Fluorescence images were obtained by confocal microscopy. Note the punctuate staining for C/EBP $\alpha$  in 32D cells, which is shifted to a diffuse fluorescence on expression of RAR $\alpha$ -PLZF

**E:** In contrast to the above, PLZF localizes in nuclear domains distinct from those containing C/EBP $\alpha$ . The experiment was performed as described above with 32D cells transduced to express PLZF fused in frame with GFP.

**Figure 7.** RAR $\alpha$ -PLZF interacts with HDAC1 to modify the chromatin state of the C/EBP $\alpha$  targets.

**A:** Co-Immunoprecipitation of endogenous C/EBP $\alpha$  with HDAC1 but not SMRT in cells expressing RAR $\alpha$ -PLZF. Nuclear extracts of parental 32D cells or cells stably expressing RAR $\alpha$ -PLZF were subjected to immunoprecipitation with anti-C/EBP $\alpha$  or rabbit preimmune serum (control). Immunoprecipitated proteins were revealed by Western blotting with anti-C/EBP $\alpha$ , anti-HDAC1 or anti-SMRT antibodies. Note that the anti-C/EBP $\alpha$  co-immunoprecipitates HDAC1 but not SMRT in cells expressing RAR $\alpha$ -PLZF whereas in parental 32D cells, C/EBP $\alpha$  does not associate with HDAC1 or SMRT. The control is a co-immunoprecipitation performed in the presence of rabbit preimmune serum. Arrowheads point to specific bands. The input represents 10% of the nuclear extract prior to immunoprecipitation. Numbers on the right indicate the migration of molecular weight standards.

**B:** RAR $\alpha$ -PLZF binds to HDAC1. Pulldown assays were performed to map the binding region of HDAC1 to RAR $\alpha$ -PLZF. Radiolabeled RAR $\alpha$ -PLZF was unable to bind GST-alone (lane 1) whereas it was able to bind full length HDAC1 (lane 2). RAR $\alpha$ -PLZF could not associate with the region encompassing amino acids 54 to 130 in the N-terminal region of HDAC1 (lanes 3 and 4), weakly bound the 130-303 region (lane 5) and associated with the C-terminal region (lane 6) and the most N-terminal region (lane 3) of the protein. Input represents 10% of the radiolabeled RAR $\alpha$ -PLZF used (lane 7).

**C:** Chromatin immunoprecipitation of acetylated histone H3 bound to the *CSF3R* and the *c-kit* promoter in parental cells or RAR $\alpha$ -PLZF transfectants. Fragmented chromatin extracts were subjected to immunoprecipitation with anti-acetylated histone H3 or a control rabbit IgG. Semi-quantitative PCR analysis was performed to test for the presence of the *CSF3R* promoter (-476 to +4) and, as a control, the *c-kit* locus (-4191 to -4023). Input chromatin represents 1 % of the amount used in each immunoprecipitation and fourfold serial dilutions of the

immunoprecipitated samples were done prior to amplification. The PCR products were analyzed as in Fig. 3B. When compared to input chromatin, the percentage of *CSF3R* promoter sequences in the anti-acetyl H3 immunoprecipitate in RP7 cells was 0.4 fold that of parental 32D cells, and for c-kit upstream sequences (amplified as control) was 1.2 fold.

**D :** Quantitative analysis of chromatin immunoprecipitation of acetylated histone H3 bound to the *CSF3R* promoter in parental or RAR $\alpha$ -PLZF transfectants. Immunoprecipitation was performed as described in Figure 7C. The percentage of immunoprecipitated promoter was evaluated by comparison to input chromatin. Evaluation of the acetylation of the HPRT promoter in presence or absence of RAR $\alpha$ -PLZF was used as control. Using this control for quantification, results indicate that the presence of RAR $\alpha$ -PLZF reduces approximately by 4 and 5 folds respectively acetylation in RP11 and RP7.

**E:** TSA restores *CSF3R* expression in RAR $\alpha$ -PLZF expressing cells. Cells were exposed to TSA (10 ng/ml) for 6 hours. Semi-quantitative analysis of cDNA samples was performed as in Figure 3B. TSA treatment did not affect S16 mRNA levels in parental cells or in clone RP7. In contrast, there was a 3.2 fold increase in *CSF3R* expression in clone RP7 and 0.4 fold in parental 32D cells.

**F:** TSA relieves the repression of *CSF3R* promoter activity by RAR $\alpha$ -PLZF in transient transfections of 32D cells. Electroporation was performed as described in Fig. 4A. Cells were exposed to TSA (10 ng/ml) post-electroporation until cell lysis. Data represent the average of 3 independent experiments performed in duplicate.

**Figure 8.** Decreased C/EBP $\alpha$  function in t(11;17) APL

**A:** Primary fetal liver cells from 12.5 dpc embryos were transduced with the empty vector or RAR $\alpha$ -PLZF. Total RNA was extracted from GFP<sup>+</sup> cells. Semi-quantitative RT-PCR was performed as in Figure 3B. When normalized with S16,

the CSF3R expression levels in RAR $\alpha$ -PLZF expressing cells was 0.24 fold that of control cells expressing the empty vector.

**B:** CSF3R mRNA levels are decreased in leukemic cells from APL patients with t(11;17) translocation. Total bone marrow cells from three normal donors, three t(15;17) APL patient samples and two t(11;17) patient samples were analyzed by RT-PCR for the presence of human CSF3R transcripts. Human S14 transcripts serve as controls. When calculated as ratio over S14, the average expression levels of CSF3R in normal bone marrow, t(15;17) and t(11;17) cells were 1.2, 2.0 and 0.5 respectively.

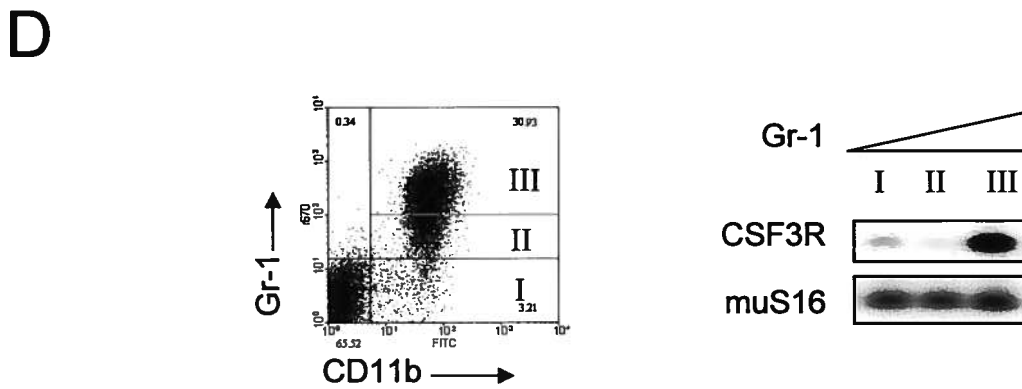
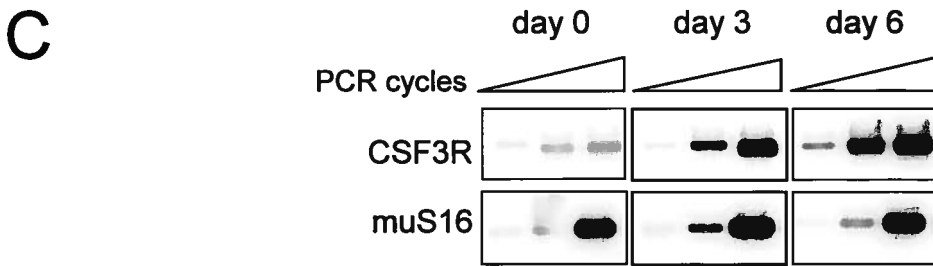
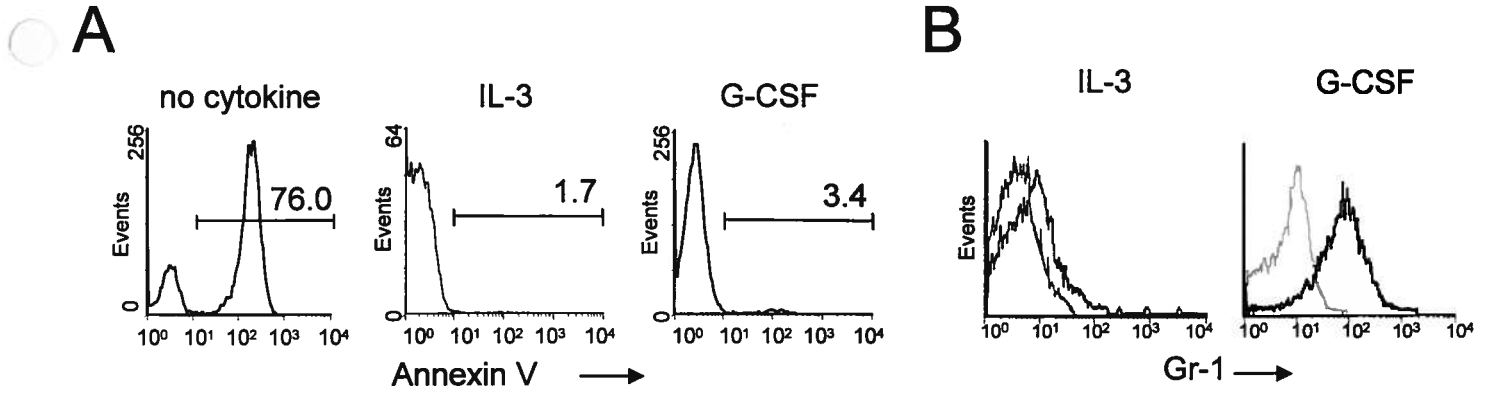
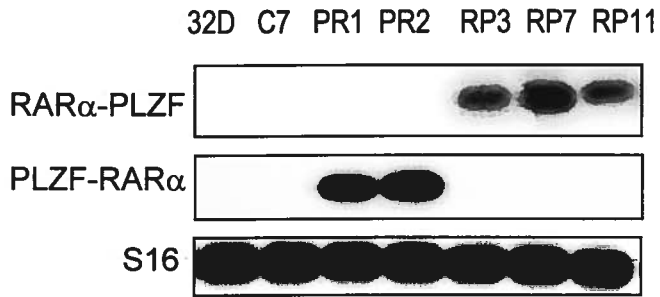


Figure 1

**A****B**

Clone	Annexin V positive cells (%)	
	IL-3	None
C7	5.5	63.9
RP3	5.7	49.6
RP7	3.8	61.9
RP11	4.6	54.7

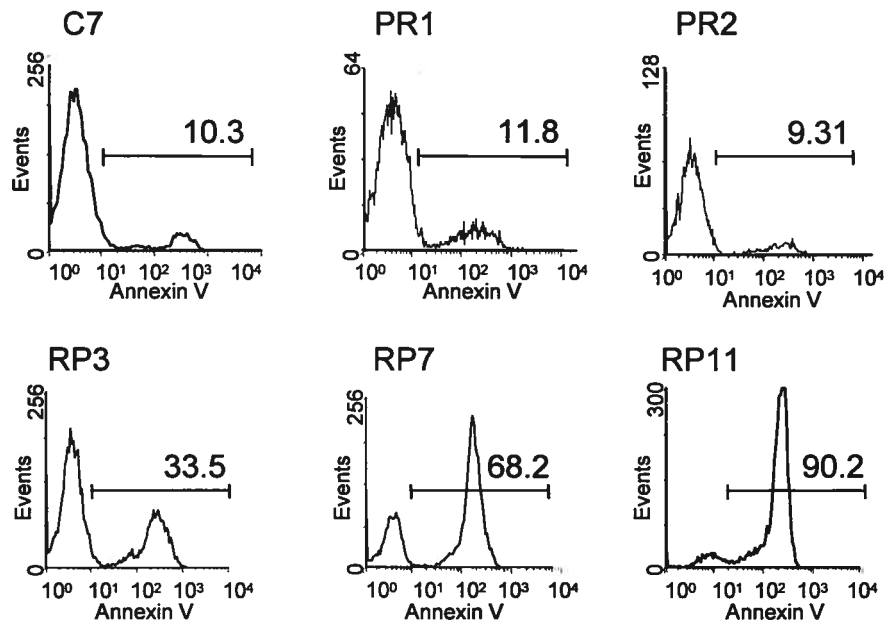
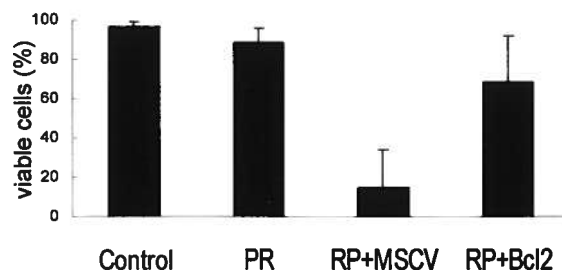
**C****D**

Figure 2

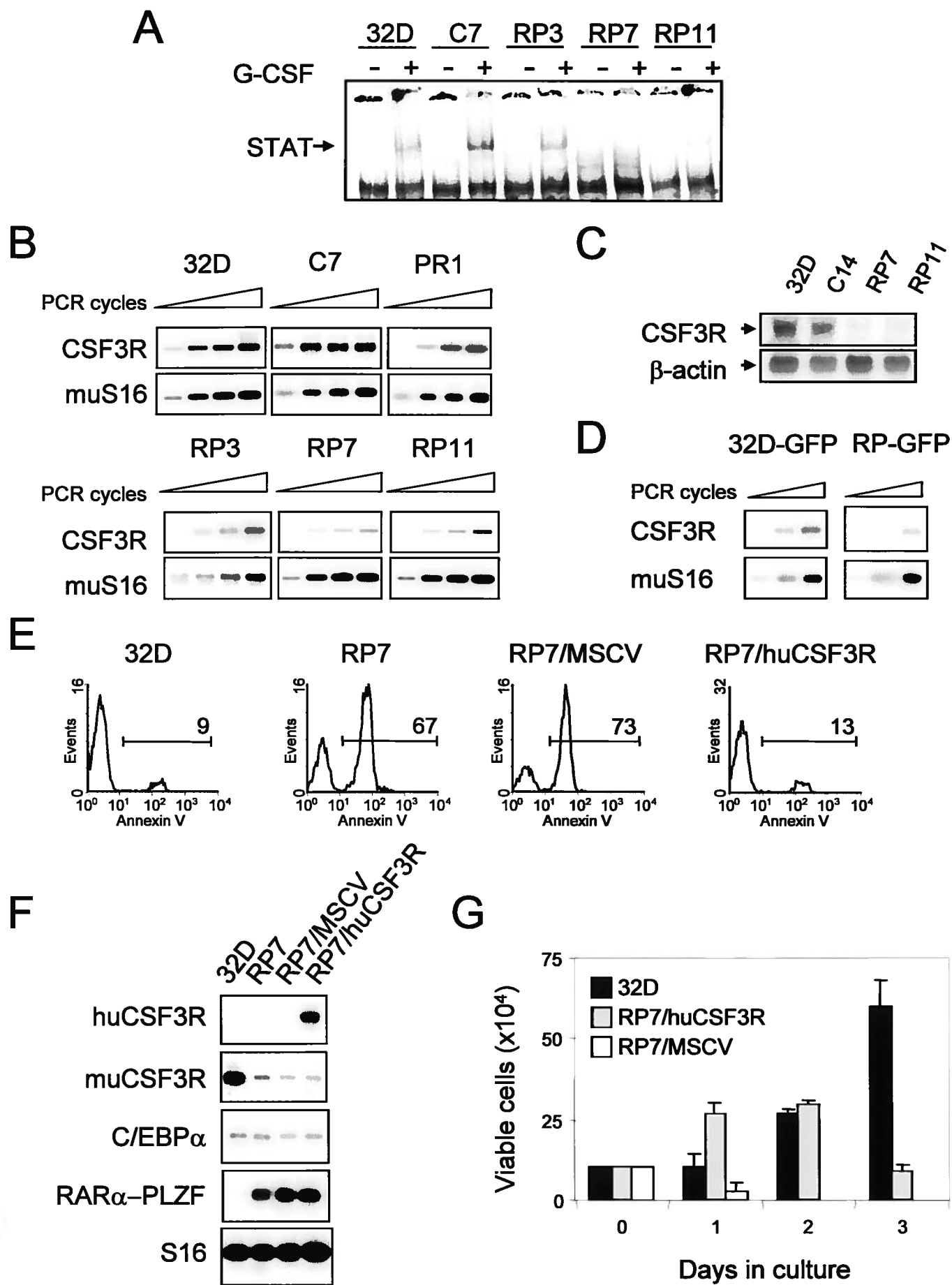


Figure 3

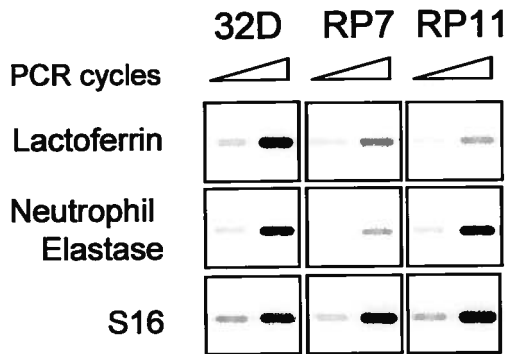
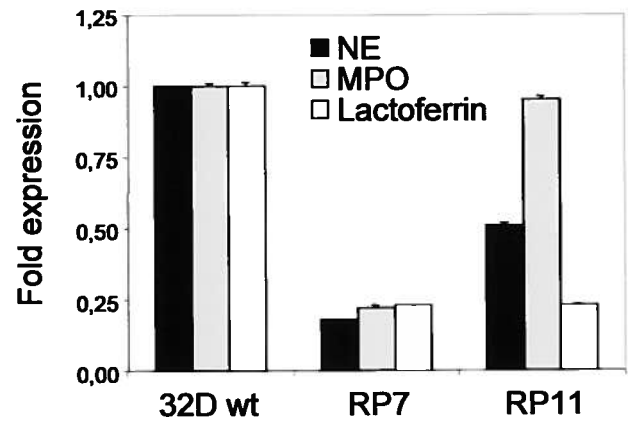
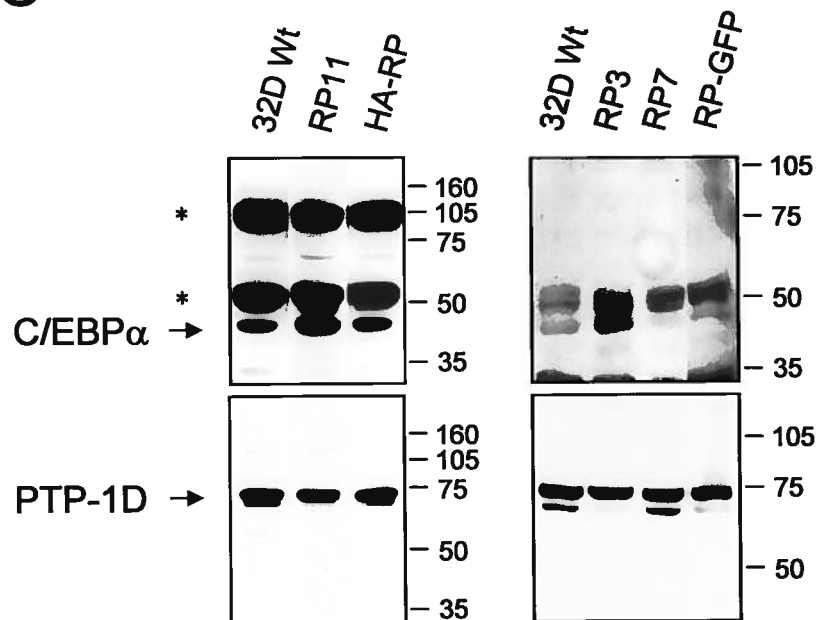
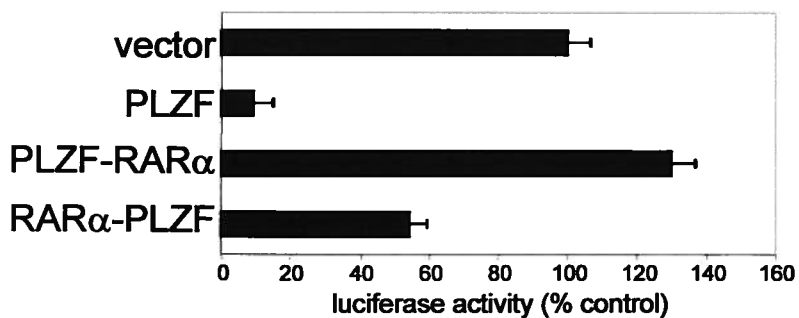
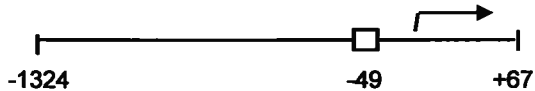
**A****B****C**

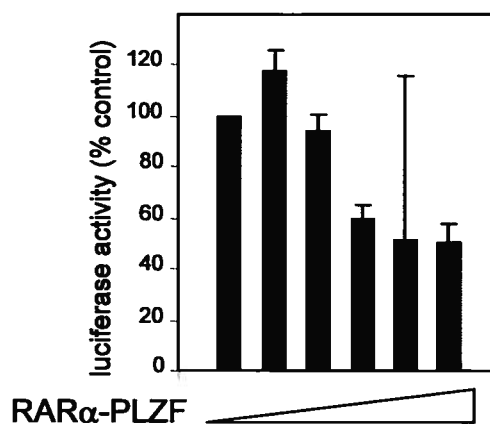
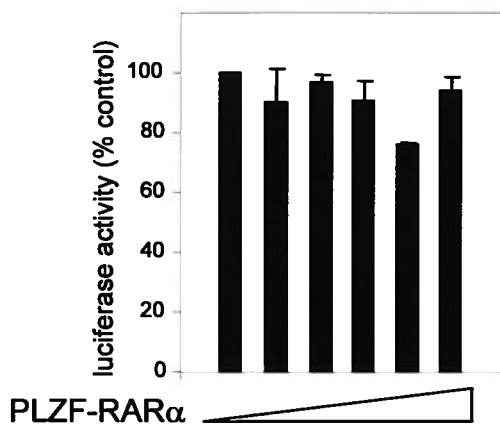
Figure 4



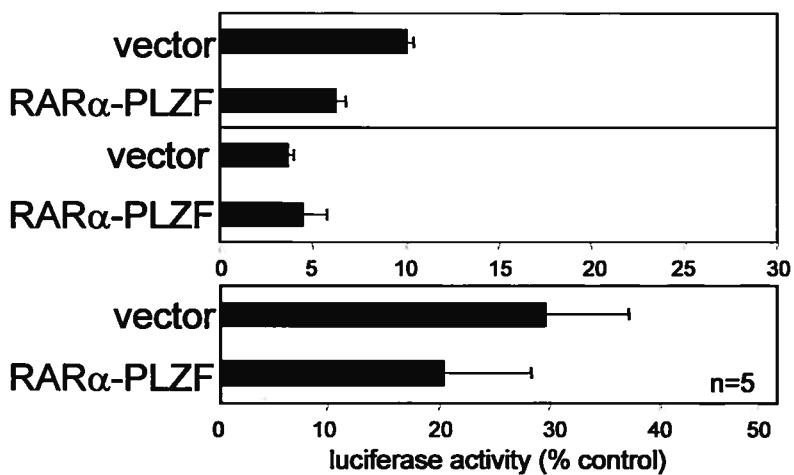
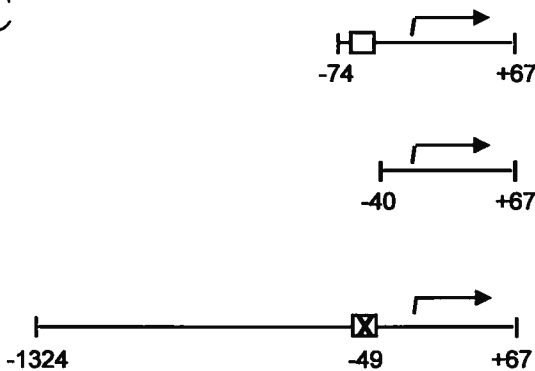
A



B



C



D

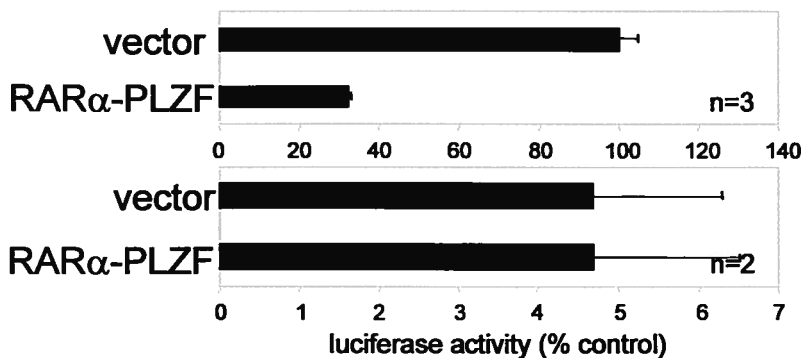
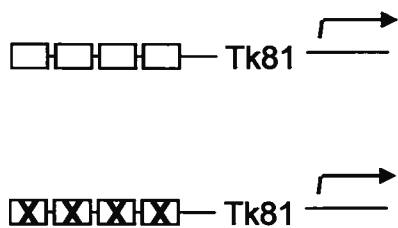


Figure 5

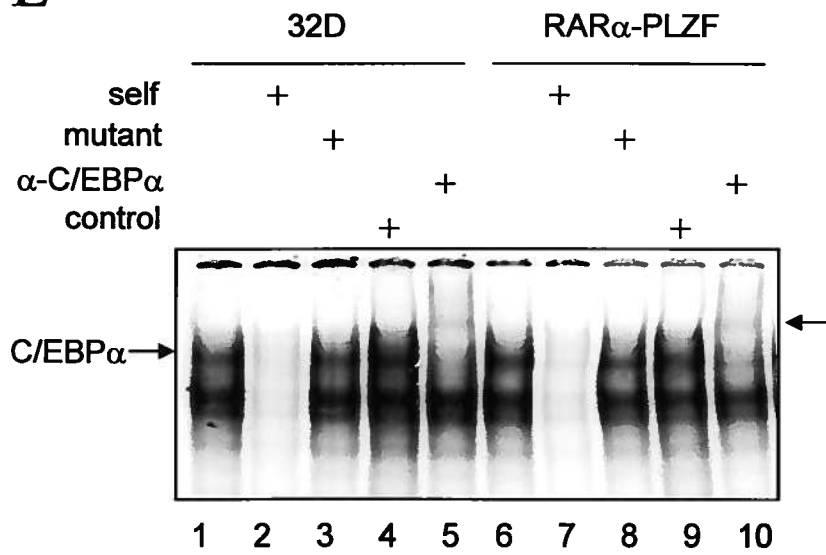
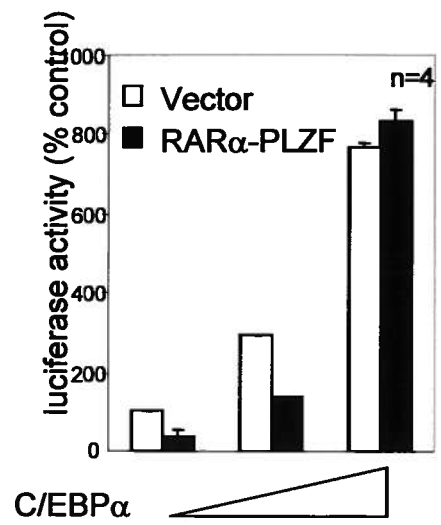
**E****F**

Figure 5

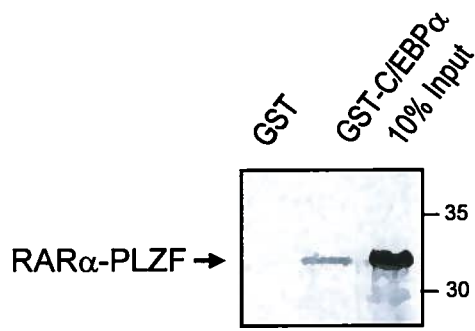
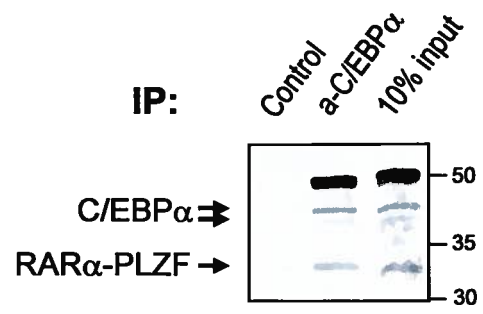
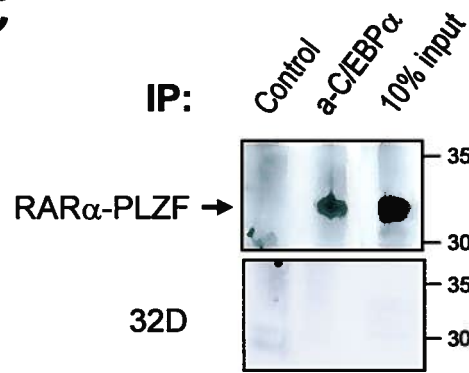
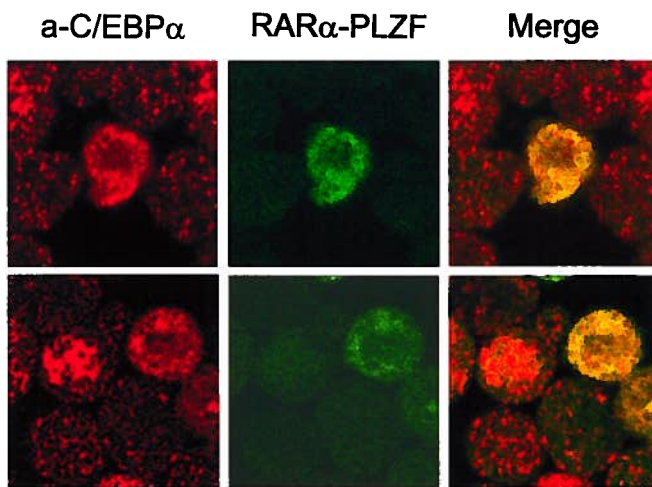
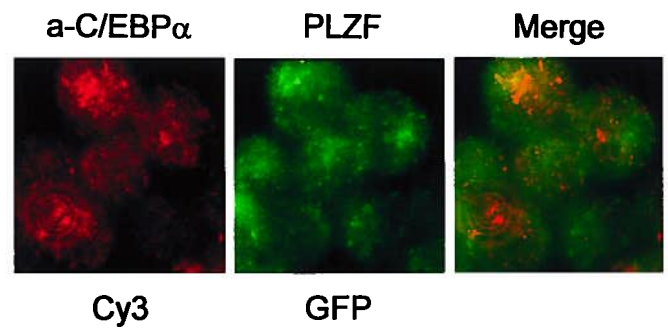
**A****B****C****D****E**

Figure 6

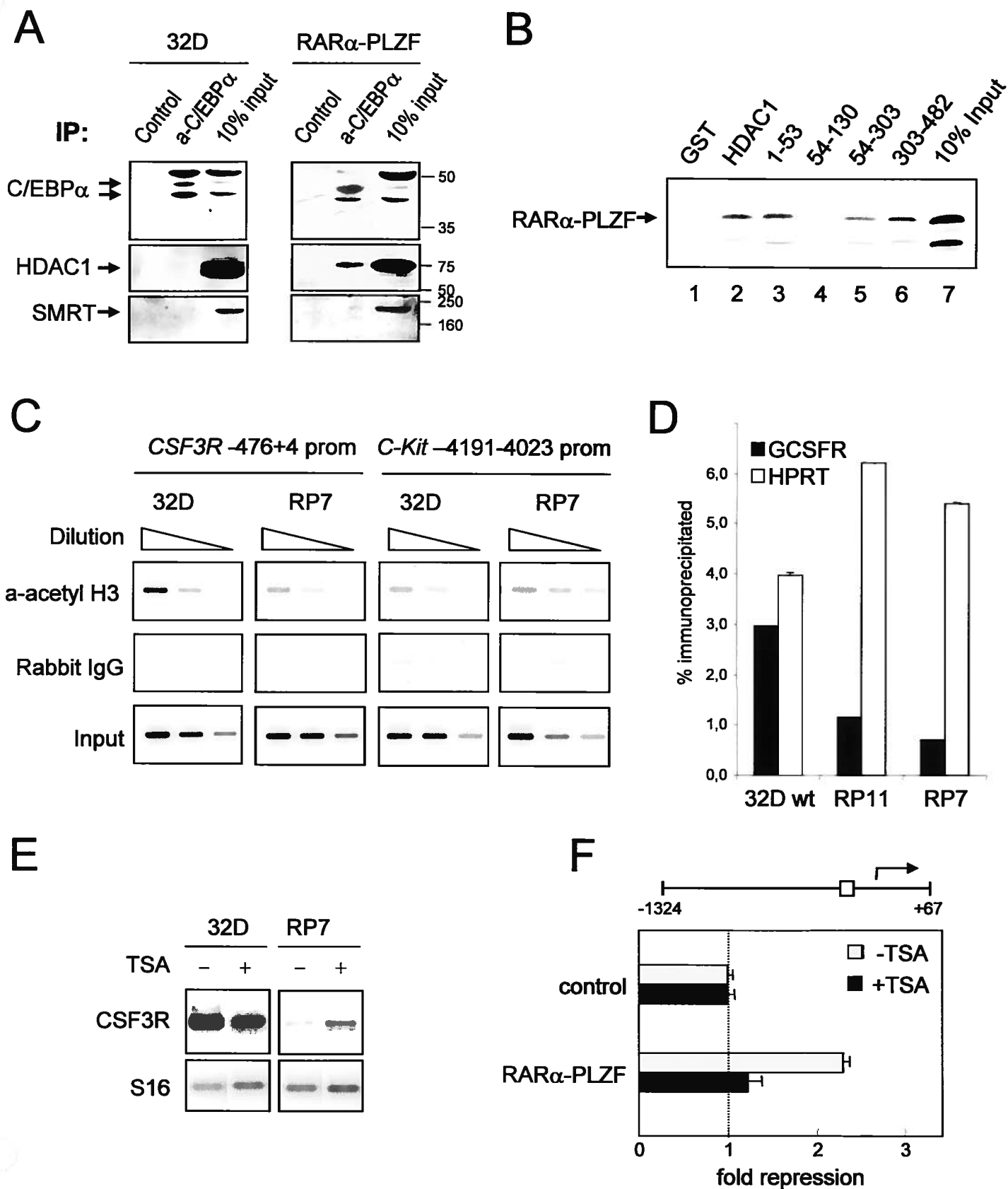
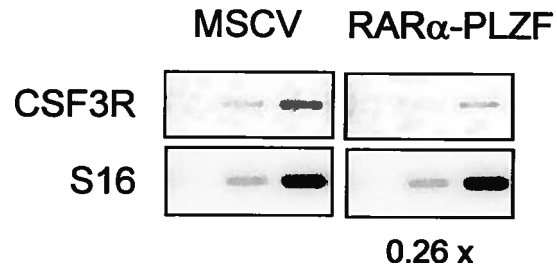


Figure 7

**A**



**B**

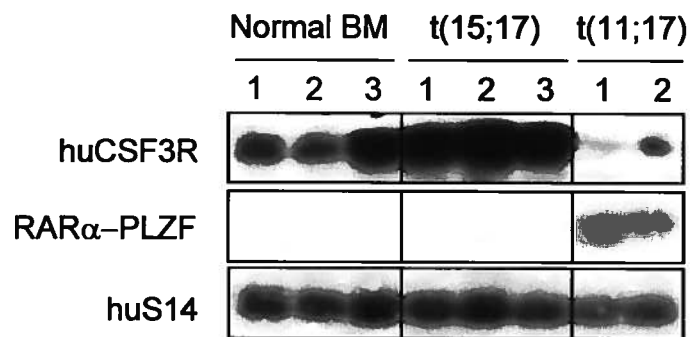


Figure 8

#### **4.0 EFFET DE L'ACTIVITÉ DE RAR $\alpha$ -PLZF SUR LE CYCLE CELLULAIRE**

## 4.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que l'oncoprotéine RAR $\alpha$ -PLZF contribue à la leucémogénèse de l'APL en induisant le blocage de la différenciation myéloïde caractéristique à cette leucémie. Certaines études supplémentaires, de même que certains de nos travaux préliminaires, indiquent que l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF conduit également à une hyperprolifération des cellules hématopoïétiques. En effet, malgré le fait que les souris transgéniques qui expriment RAR $\alpha$ -PLZF (sous le contrôle du promoteur de la Cathepsine G) ne développent pas de leucémies, elles développent un syndrome myéloprolifératif caractérisé par une surabondance dans la moelle et la rate, de cellules myéloïdes <sup>220</sup>. Ce dérèglement a précédemment été imputé à une compétition entre les molécules de RAR $\alpha$ -PLZF et celles de PLZF (produites par l'allèle normale toujours présente dans les cellules leucémiques) pour l'occupation des sites consensus sur le promoteur des cibles transcriptionnelles de PLZF. Mais, il est également possible que la protéine de fusion acquière de nouvelles caractéristiques inexistantes chez PLZF ou altère certaines interactions protéiques, qui lui permettent de dérégler la progression du cycle cellulaire.

La surexpression de PLZF dans des cellules d'origines hématopoïétiques (U937 et 32D), de même que dans une lignée de fibroblastes (NIH 3T3), cause un ralentissement important de la prolifération résultant en fin de compte en un ralentissement ou blocage du cycle cellulaire en phase S <sup>171</sup>. Yeyati *et al* ont associé ce phénomène au fait que PLZF réprime l'activité du promoteur de la Cycline A2 (Cycline A), un régulateur du cycle cellulaire nécessaire pour la progression de la phase S du cycle cellulaire. En effet, ils ont retrouvé sur ce promoteur une séquence de liaison à l'ADN fonctionnelle pour PLZF. Par opposition à PLZF, ils ont démontré que la protéine de fusion RAR $\alpha$ -PLZF dérégule l'expression de la Cycline A en agissant comme un activateur transcriptionnel faible. Dans ce contexte transcriptionnel, RAR $\alpha$ -PLZF semble

également contrer l'activité de PLZF de type sauvage. La résultante de ces activités est une augmentation de l'expression de la Cycline A concomitante avec une augmentation des niveaux de protéines qui pourraient ainsi induire une prolifération accrue dans les cellules exprimant RAR $\alpha$ -PLZF. Récemment, McConnell *et al* <sup>221</sup> ont rapporté que PLZF inhibe également la prolifération cellulaire dans les cellules U937 en réprimant l'expression de c-myc. Toutefois, ils n'ont démontré aucun effet de RAR $\alpha$ -PLZF sur l'expression de cet oncogène.

Nous avons démontré que RAR $\alpha$ -PLZF joue un rôle d'oncogène modificateur dans l'APL en inhibant l'activité de C/EBP $\alpha$  et contribuant ainsi au blocage de la différenciation observé dans l'APL. Or, la différenciation et l'arrêt de la prolifération sont deux processus cellulaires intimement reliés. C/EBP $\alpha$  joue un rôle critique dans la différenciation des granulocytes mais, sa fonction est également essentielle pour obtenir l'arrêt de la prolifération nécessaire pour que la maturation cellulaire se poursuive.

Plusieurs études ont rapporté que la surexpression de C/EBP $\alpha$  dans des lignées cellulaires inhibe la prolifération <sup>222,223</sup> et que l'absence de C/EBP $\alpha$  permet une prolifération accrue <sup>224</sup>. Il est également intéressant de noter que les auteurs de cette dernière étude ont rapporté, en plus, que les lignées d'hépatocytes déficientes en C/EBP $\alpha$ , utilisées comme modèle, accumulaient des anomalies chromosomiques <sup>224</sup>. D'un point de vue mécanistique, dans la lignée granulocytaire, des travaux par Johansen *et al* et Slomiany *et al* ont démontrés que C/EBP $\alpha$  interagit physiquement avec E2F et que cette interaction inhibe l'activité transcriptionnelle de E2F <sup>35,84</sup>. Ces études ont été confirmées *in vivo* par l'utilisation des souris porteuses d'une forme défectueuse de C/EBP $\alpha$  incapable de réprimer l'activité du facteur de transcription E2F. Ces souris présentaient une réduction importante et même, dans plusieurs cas, une absence de granulocytes due à une inhibition de l'arrêt de prolifération nécessaire pour permettre une différenciation normale de cette population hématopoïétique. De plus, certaines



de ces souris développaient des leucémies dont le phénotype des cellules affectées ressemble à celui de granulocytes<sup>36</sup>. Ces résultats démontrent que C/EBP $\alpha$  réprime l'activité E2F, réduisant ainsi l'expression de gènes tels que ceux codant pour la Cycline E, Cycline A et c-Myc<sup>35,225</sup> dont le rôle est d'assurer une progression du cycle cellulaire.

Ces diverses observations et le fait que peu de cibles de RAR $\alpha$ -PLZF ont été identifiées jusqu'à présent, nous ont amené à vérifier les diverses composantes moléculaires impliquées dans le dérèglement du contrôle du cycle cellulaire par RAR $\alpha$ -PLZF. Est-ce qu'un dérèglement de l'expression de la Cycline A est, à elle seule, à l'origine de la prolifération incontrôlée du clone leucémique dans l'APL ou y a-t-il d'autres composantes moléculaires d'impliquées? Nos résultats suggèrent que d'autres éléments sont perturbés par l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF. En plus de réprimer l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\alpha$ , est-ce que RAR $\alpha$ -PLZF inhibe également certaines interactions protéiques de C/EBP $\alpha$ , entre autre celle avec E2F ? Ce dernier deviendrait, si tel est le cas, constitutivement actif et entraînerait, par le fait même, une prolifération accrue.

Pour adresser ces questions, nous allons utiliser une approche d'analyse d'expression génique globale (gene expression array) qui nous permettra de discriminer entre les différentes hypothèses. De plus, ce système devrait nous permettre d'identifier d'autres cibles de RAR $\alpha$ -PLZF impliquées dans divers autres processus cellulaires tels que l'apoptose et le maintien de l'intégrité du génome. Certains de ces gènes seront possiblement des cibles transcriptionnelles directes de RAR $\alpha$ -PLZF.

## 4.2 Résultats et discussion

Pour tenter d'identifier les cibles moléculaires de RAR $\alpha$ -PLZF impliquées dans le dérèglement de la prolifération cellulaire, nous avons utilisé deux systèmes : la lignée myéloïde murine 32D et des cultures primaires de cellules de foies fœtaux

et de moelle osseuse. Dans tous les cas, les cellules ont été transduites pour exprimer RAR $\alpha$ -PLZF, de façon transitoire dans le cas des cultures primaires et, de façon stable dans les cellules 32D.

#### **4.2.1 L'expression de RAR $\alpha$ -PLZF dérègle la progression du cycle cellulaire et la stabilité génétique**

Initialement, nous avons examiné si l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF avait un effet sur la prolifération et le profil du cycle cellulaire des cellules myéloïdes 32D et de foie fœtal transduites. La Figure 4.1 illustre la prolifération observée dans une culture de cellules de foies fœtaux recueillis au jour embryonnaire 12.5 et transduites pour exprimer RAR $\alpha$ -PLZF ou transduites avec le vecteur d'expression vide (MSCV-pac). On observe que, contrairement aux cellules contrôles, les cellules porteuses de la protéine de fusion prolifèrent de façon marquée. Le profil du cycle cellulaire reflète également cette différence dans ces cellules tout comme dans les cellules 32D (Figure 4.1 B et C). En effet, un pourcentage accru de cellules RAR $\alpha$ -PLZF<sup>+</sup> se retrouve dans la phase G<sub>2</sub>/M. On remarque également que l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF dans les cellules de foie fœtal et 32D modifie le profil du cycle cellulaire normalement observé (Figure 4.1 B et 4.4 B). En effet, il y a une apparente disparition de la phase S. Une cause possible de cette anomalie pourrait provenir du fait que l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF semble causer l'accumulation d'un nombre anormal de chromosomes dans ces cellules. Cette quantité anormale d'ADN pourrait ainsi augmenter l'aire sous la courbe du pic de la phase G<sub>1</sub>, empiétant ainsi dans la région de la phase S causant l'apparence d'une perte de cette région. Toutefois cette hypothèse est infirmée par le fait qu'on n'observe pas le même phénomène à la phase G<sub>2</sub>/M. On observe l'ajout d'un plateau qui indique qu'une partie des cellules contiennent jusqu'au double de la quantité normale d'ADN.

Le profil du cycle cellulaire des cellules RAR $\alpha$ -PLZF<sup>+</sup> suggère plutôt qu'il y a une absence de points de contrôle fonctionnels, tout au moins en G<sub>1</sub>/S. Ceci mène à

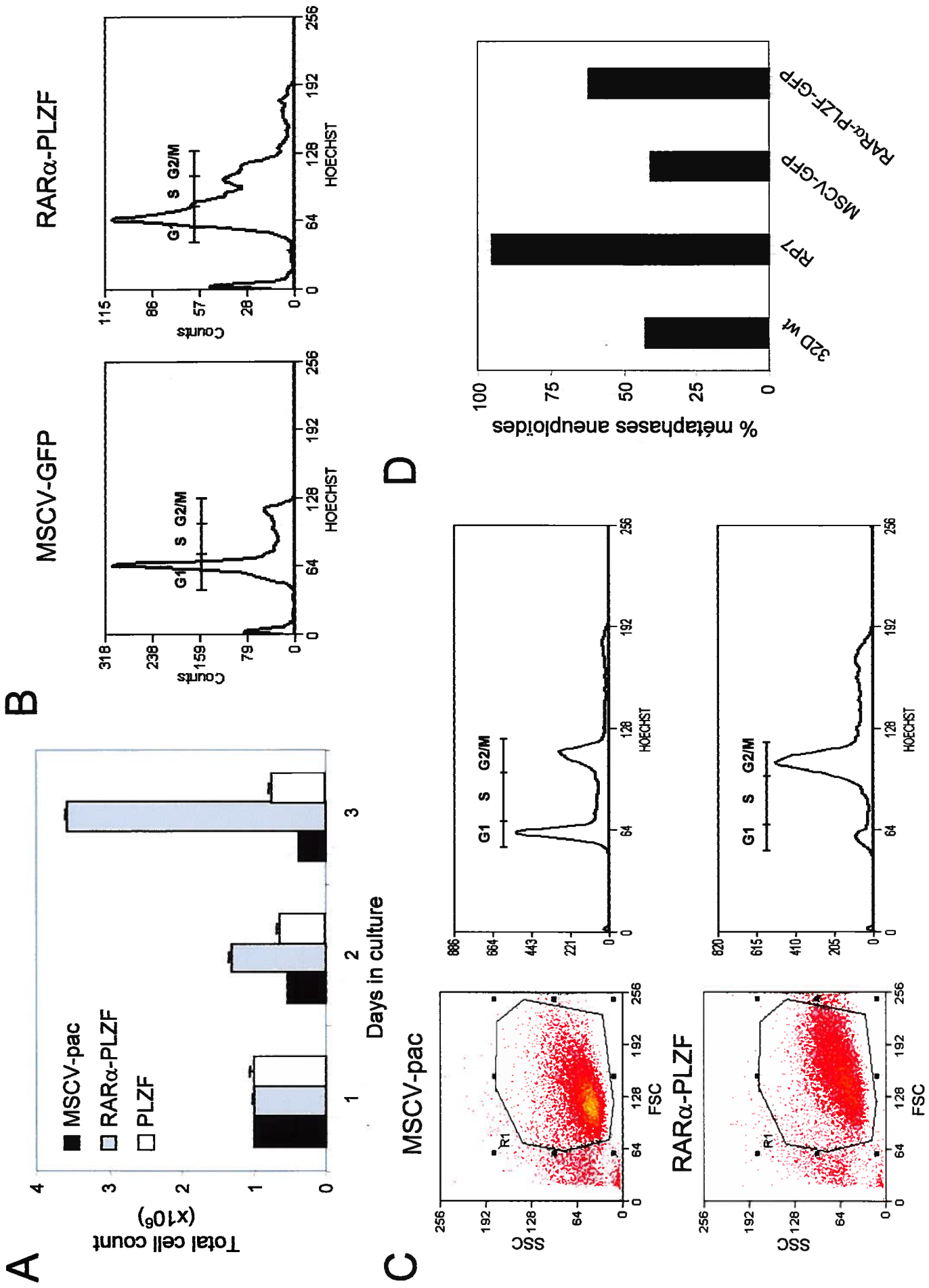


Figure 4.1

**Figure 4.1.** L'expression ectopique de RAR $\alpha$ -PLZF augmente la prolifération des cellules hématopoïétiques, modifie leur cycle cellulaire et induit l'accumulation anormale de chromosomes.

- A. Des cellules de foie fœtal de souris C57, prélevées au jour embryonnaire 12.5, ont été transduites avec le vecteur d'expression vide (MSCV-Pac) ou portant l'ADNc pour PLZF ou RAR $\alpha$ -PLZF. Les cellules sont maintenues dans un milieu contenant 10 ng/ml d'IL-3 et 50 U/ml de SF. Les cellules étaient comptées quotidiennement par exclusion au bleu de trypan. 48 heures post-infection, la présence de RAR $\alpha$ -PLZF induit une augmentation marquée de la prolifération cellulaire comparativement aux cellules contrôles et celles exprimant PLZF.
- B. Analyse du cycle cellulaire des cellules exprimant RAR $\alpha$ -PLZF ou le vecteur vide (MSCV-GFP). L'ADN des cellules de foie fœtales positives pour GFP (donc transduites avec le vecteur d'expression) a été marqué au Hoesch. Les cellules ont ensuite été analysées par FACS pour déterminer leur contenu en ADN. L'expression de RAR $\alpha$ -PLZF induit une augmentation du nombre de cellules dans les phases S et G<sub>2</sub>/M et cause une accumulation anormale du nombre de chromosomes.
- C. Analyse du cycle cellulaire de la lignée myéloïde 32D exprimant RAR $\alpha$ -PLZF ou le vecteur vide (MSCV-Pac) de façon stable. L'analyse a été effectuée comme mentionné en B. L'expression de RAR $\alpha$ -PLZF induit une augmentation dramatique du nombre de cellules dans en phase G<sub>2</sub>/M et cause une accumulation anormale du nombre de chromosomes.
- D. Analyse du pourcentage de cellules aneuploïdes en métaphase. Les cellules contrôles, 32D parentales ou portant le vecteur d'expression MSCV-GFP (MSCV-GFP), et les cellules exprimant RAR $\alpha$ -PLZF à partir du vecteur MSCV-PAC (RP7) ou MSCV-GFP (RAR $\alpha$ -PLZF-GFP) ont été prélevées alors qu'elles

étaient en phase de prolifération exponentielle. La préparation et l'analyse du pourcentage de métaphase aneuploïdes ont été effectuées par la Banque de cellules leucémiques du Québec. L'expression de RAR $\alpha$ -PLZF induit une augmentation du pourcentage de cellules porteuses d'un nombre anormal de chromosomes dans la lignée clonale RP7 et dans la lignée stable RAR $\alpha$ -PLZF-GFP.

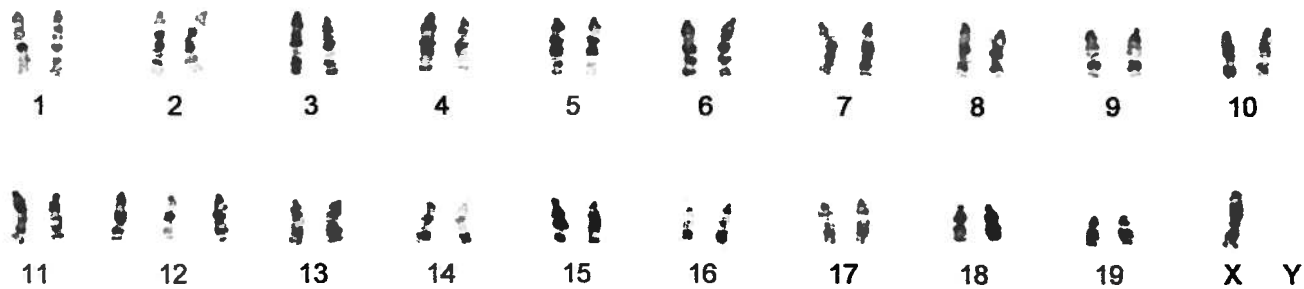
un passage prématuré des cellules dans la phase suivante résultant en un profil anormal où la phase S semble absente. Il n'est pas clair toutefois si cet effet de RAR $\alpha$ -PLZF est direct ou si l'oncoprotéine sensibilise plutôt les cellules à des dommages qui pourraient affecter les composantes du cycle cellulaire.

Tel que mentionné ci-haut, les cellules des cultures de foie fœtal et 32D prolifèrent anormalement et accumulent une quantité anormale d'ADN (Figure 4.1B, C et 4.4 B). Nous avons donc compilé le pourcentage de métaphases aneuploïdes dans quatre lignées stables indépendantes polyclonales ou monoclonales de cellules 32D (la lignée de 32D parentale et celles transduites avec MSCV-GFP ou RAR $\alpha$ -PLZF-GFP) (Figure 4.1D). Malgré le fait que la lignée 32D semble avoir une prédisposition à développer des cellules aneuploïdes, l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF exacerbe le phénomène. Il est intéressant de noter que Soriano *et al*<sup>224</sup> ont rapporté précédemment que des lignées d'hépatocytes établies à partir de souris dans lesquelles l'expression de C/EBP $\alpha$  avait été abolie, accumulaient un nombre irrégulier de chromosomes. Cette observation pourrait supporter notre hypothèse selon laquelle l'interaction RAR $\alpha$ -PLZF/C/EBP $\alpha$  pourrait nuire au contrôle de ce dernier sur le cycle cellulaire.

Lors de l'analyse karyotypique des lignées polyclonales de 32D (MSCV-GFP et RAR $\alpha$ -PLZF-GFP), nous avons constaté que notre lignée parentale de cellules 32D présentait trois modifications chromosomiques récurrentes. Certaines cellules contrôles (MSCV-GFP) portaient un chromosome 12 excédentaire (Figure 4.2 A) et un chromosome X ou Y absent. En plus, certaines cellules portaient le double du nombre attendu de chromosomes. On a retrouvé ces mêmes défauts dans la lignée exprimant RAR $\alpha$ -PLZF (Figure 4.2 B), suggérant qu'ils proviennent de la lignée parentale 32D. Toutefois, en plus, nous avons observé que l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF induit l'apparition de défauts chromosomiques additionnels à ceux mentionnés ci-haut. Malgré une grande variété dans le type des défauts observés, la présence d'un chromosome 7

**A**

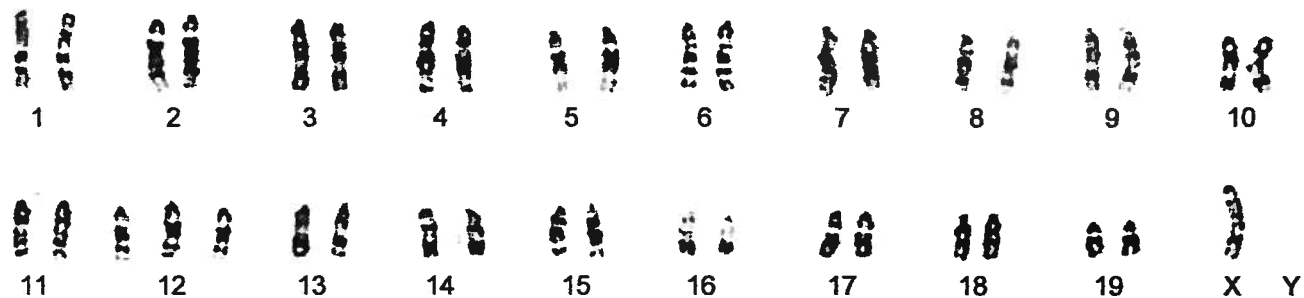
**32D-GFP**



40, X, -Y, +12

**B**

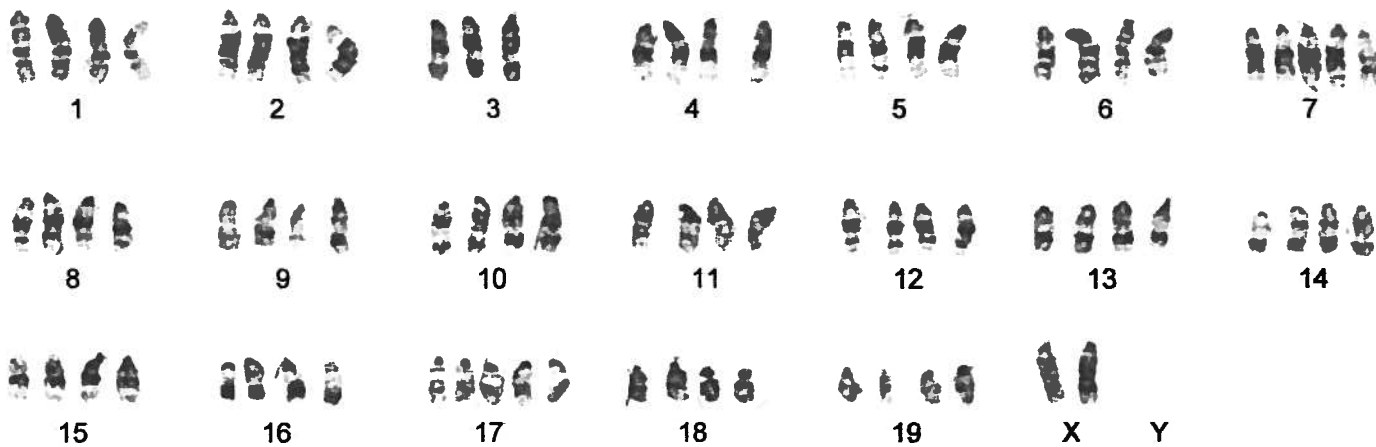
**RP-GFP**



**M**

40, X, -Y, +12, +M

**RP-GFP**



79, XX, -3, +7, +17

Figure 4.2

**Figure 4.2.** L'expression de RAR $\alpha$ -PLZF altère le karyotype des 32D.

- A. L'analyse cytogénétique de cellules 32D porteuses du vecteur d'expression MSCV-GFP a été effectuée à partir de cellules en phase de croissance exponentielle. Certaines métaphases examinées ont révélé que les cellules de la lignée polyclonale stable contrôle présentaient un chromosome 12 excédentaire alors que d'autres présentaient 4n chromosomes.
- B. Le karyotype de 32D exprimant de façon stable RAR $\alpha$ -PLZF a révélé, qu'en plus des défauts chromosomiques observés dans la lignée contrôle, l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF induit l'ajout et la perte de chromosomes. Deux frottis sont présentés. La première cellule (panneau du haut) porte, un fragment de chromosome excédentaire non-identifié alors que dans le frottis de la deuxième cellule (panneau du bas), on note la perte d'un allèle du chromosome 3 et le gain d'un allèle pour les chromosomes 7 et 17. Les frottis présentés dans cette figure sont représentatifs des métaphases observées.



additionnel était fréquente, ce qui suggère possiblement la présence d'un oncogène collaborateur sur ce chromosome.

#### **4.2.2 RAR $\alpha$ -PLZF n'affecte pas l'expression de la Cycline A dans les cellules de foie fœtal et dans les cellules myéloïdes 32D**

Une étude par Yeyati *et al*<sup>171</sup> a suggéré que l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF dans des cellules hématopoïétiques (32D) induit une expression accrue de la Cycline A. Les auteurs de cette étude concluent que cette dérégulation de la Cycline A par RAR $\alpha$ -PLZF est à l'origine de l'hyperprolifération observé dans les cellules exprimant la protéine de fusion. Par RT-PCR semi-quantitatif et par Real Time PCR, nous avons quantifié l'expression de la Cycline A dans les cellules 32D et dans les cellules de foie fœtal pour valider ces observations. Dans les deux cas, nous n'avons pu détecter de différences significatives entre les cellules contrôles transduites avec MSCV-pac et les cellules exprimant l'oncogène (Figure 4.3 A et B).

#### **4.2.3 L'expression de p21 et l'interaction de C/EBP $\alpha$ avec CDK2 et 4 ne sont pas affectées par l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF**

Nous avons déjà établi un rôle de RAR $\alpha$ -PLZF dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription C/EBP $\alpha$  menant au blocage de la différenciation dans les cellules myéloïdes. Nous avons donc posé l'hypothèse que la liaison de RAR $\alpha$ -PLZF avec C/EBP $\alpha$  pourrait empêcher l'arrêt de prolifération normalement induit par C/EBP $\alpha$ . Le contrôle de C/EBP $\alpha$  sur la prolifération cellulaire est tissu-dépendent. Dans les hépatocytes, C/EBP $\alpha$  induit l'expression de P21<sup>WAF/CIP</sup><sup>226,227</sup>, un inhibiteur des kinases de Cyclines qui forme des complexes hétérotrimériques avec les CDK de G1/S<sup>228</sup>. C/EBP $\alpha$  interagit également avec cdk2 et cdk4 pour inhiber leur activité<sup>229</sup>. La combinaison de ces deux cibles mène à l'arrêt de la prolifération des hépatocytes. Dans les

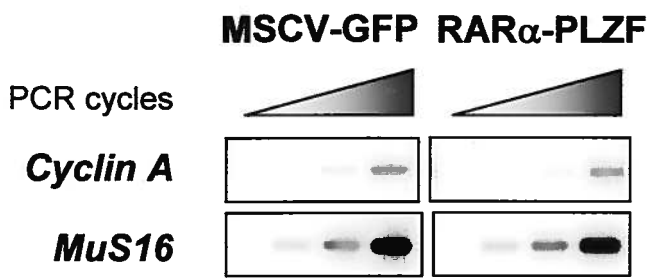
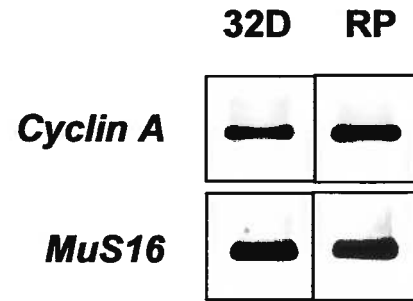
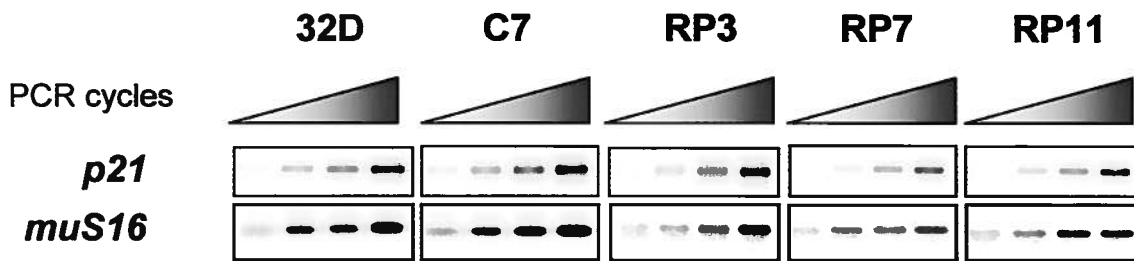
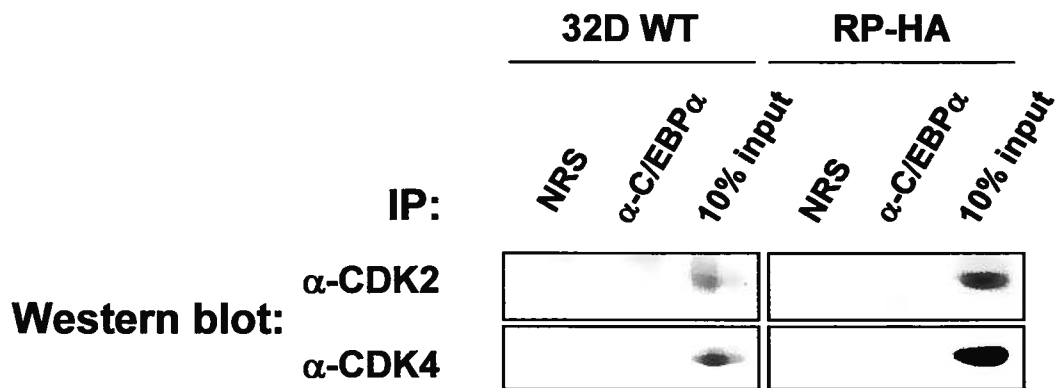
**A****B****C****D**

Figure 4.3

**Figure 4.3.** RAR $\alpha$ -PLZF les niveaux d'expression de p21<sup>WAF/CIP</sup> et de la Cycline A.

- A. Les niveaux d'ARNm de Cycline A ne sont pas affectés par l'expression de l'oncoprotéine RAR $\alpha$ -PLZF. Des cellules de foie foetale transduites tel que mentionné à la figure 4.1 A, ont été analysées par RT-PCR semi-quantitatif. Un échantillon du produit amplifié a été prélevé aux cycles 15, 20, 25 et 30. La figure représente le buvardage de type Southern de la membrane avec un oligonucléotide interne pour la Cycline A ou, comme contrôle interne pour des variations dans l'ARN utilisé, S16.
- B. Les niveaux d'expression de la Cycline A ont également été évalués par REAL Time PCR. L'ARNm d'une lignée polyclonale de cellules 32D exprimant RAR $\alpha$ -PLZF de façon stable a été prélevé à partir de cellules en croissance exponentielle. L'expression de S16 a été utilisée comme contrôle interne pour la quantification. Aucune différence significative n'a été détectée entre les deux échantillons.
- C. L'expression de p21<sup>WAF/CIP</sup> n'est pas modifiée par l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF. La quantité d'ARNm de p21 a été évalué par RT-PCR semi-quantitatif, tel que mentionné en A, dans différentes lignées clonales exprimant RAR $\alpha$ -PLZF ou le vecteur vide (C7) ou aucun vecteur.
- D. C/EBP $\alpha$  et CDK2/CDK4 n'interagissent pas *in vivo*, dans les cellules 32D. La co-immunoprécipitation de C/EBP $\alpha$  et CDK2 ou CDK4 dans des extraits de cellules 32D, exprimant ou non RAR $\alpha$ -PLZF, a été effectuée avec un anticorps dirigé contre C/EBP $\alpha$  ou un sérum pré-immun de lapin (NRS) (contrôle). Les protéines ont été résolues par électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS. Les protéines immunoprécipitées ont été révélées par immunobuvardage de type Western en hybridant avec des anticorps dirigés contre CDK2 ou CDK4. La présence des protéines présentes dans les

extraits cellulaires a été testé en déposant 10% de la quantité utilisée sur le gel. Dans les cellules 32D parentales et dans les cellules exprimant RAR $\alpha$ -PLZF, l'anticorps dirigé contre C/EBP $\alpha$  ne coimmunoprécipite pas ni CDK2 ni CDK4.

adipocytes et les granulocytes, C/EBP $\alpha$  cause un arrêt de prolifération en séquestrant le facteur de transcription E2F dont les cibles transcriptionnelles permettent la progression du cycle cellulaire.

Nous avons donc, premièrement, voulu confirmer si p21 était induit dans les cellules myéloïdes. La figure 4.3 illustre que, par RT-PCR semi-quantitatif, l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF n'induit pas celle de cet inhibiteur de l'activité CDK. Nous avons également vérifié, par co-immunoprécipitation, si C/EBP $\alpha$  interagit avec CDK2 ou CDK4 dans les cellules 32D et si cette liaison potentielle est inhibée par RAR $\alpha$ -PLZF. Les résultats sont présentés à la figure 4.3 et démontrent que C/EBP $\alpha$  est incapable d'interagir avec l'une ou l'autre des CDK dans ce type cellulaire particulier. Nos résultats confirment donc que, dans les cellules myéloïdes, l'arrêt du cycle cellulaire par C/EBP $\alpha$  ne passe pas par des mécanismes tissu-dépendants associés aux hépatocytes soient : une induction de p21 ou une séquestration de CDK2 ou CDK4.

#### **4.2.4 RAR $\alpha$ -PLZF ne semble pas affecter certains gènes cible de E2F**

Plusieurs études ont rapporté que C/EBP $\alpha$  inhibe l'activité du facteur de transcription E2F en le séquestrant. Or, l'activité de E2F est importante pour assurer l'expression de gènes nécessaires pour la progression du cycle cellulaire dont ceux de la Cycline A et E. Nous avons donc évalué leur expression par PCR semi-quantitatif et PCR en temps réel (Real time PCR). Nous avons rapporté ci-haut que les niveaux d'expression de la Cycline A ne sont pas affectés par l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF; il en va de même pour ceux de la Cycline E (les résultats ne sont pas illustrés). Ces résultats suggèrent que l'activité de régulation de E2F par C/EBP $\alpha$  n'est pas affectée par RAR $\alpha$ -PLZF.

#### 4.2.5 Génération de lignées inductibles pour l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF

Suite à ces résultats, des lignées polyclonales et monoclonales de cellules 32D exprimant de façon stable RAR $\alpha$ -PLZF ont été générées dans le but d'effectuer une analyse globale de l'expression des gènes. Nous voulons ainsi identifier les gènes dont les protéines sont impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire et dans le maintien de l'intégrité génomique et qui seraient dérégulés par RAR $\alpha$ -PLZF. D'un point de vue pratique, deux approches peuvent être utilisées. Premièrement, les différents ARNm de lignées clonales et polyclonales de cellules exprimant RAR $\alpha$ -PLZF peut être analysés différentiellement en les comparant avec des contrôles de cellules transduites avec un vecteur d'expression vide. La deuxième approche vise à comparer l'expression des différents gènes dans une lignée inductible en présence ou non de RAR $\alpha$ -PLZF. Le but de cette dernière technique est d'éviter de repérer des gènes qui proviennent de variations clonales et limiter l'identification de cibles indirectes.

Nous avons choisi de tenter d'établir des lignées cellulaires clonales qui exprimeront de façon inductible RAR $\alpha$ -PLZF, dont l'ADNc a été cloné dans le vecteur Retro-Off. La figure 4.4 A représente le résultat d'un RT-PCR effectué pour vérifier les niveaux d'expression de RAR $\alpha$ -PLZF dans les différentes lignées clonales dérivées. Nous avons également vérifié le profil du cycle cellulaire de différentes lignées générées pour s'assurer d'un contenu normal d'ADN (Figure 4.4 B). Nous avons obtenus deux lignées polyclonales (T6 RP et T8 RP), de même que quatre lignées clonales (T6 RP2, T8 RP21 et T8 RP31) dans lesquelles la protéine de fusion est exprimée et deux lignées polyclonales contrôles transduites avec le vecteur d'expression vide (T6 Retro-Off et T8 Retro-Off), de même que quatre lignées clonales dans lesquelles RAR $\alpha$ -PLZF n'est pas exprimé (T6 RP8, T8 RP25 et T8 RP28). Dans ces diverses lignées et, tel que démontré précédemment dans les cellules de foie fœtal, l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF affecte les profils de cycle cellulaire. Cet effet est perceptible dans nos lignées clonales mais, pas dans les polyclonales qui sont constituées de

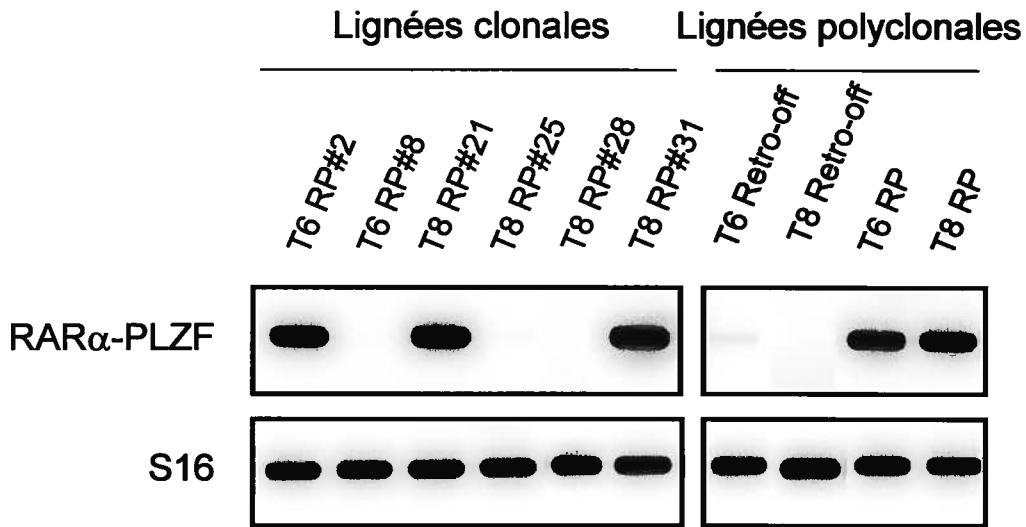
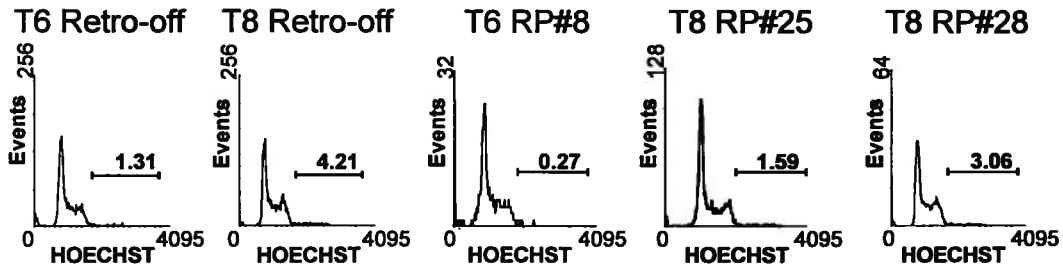
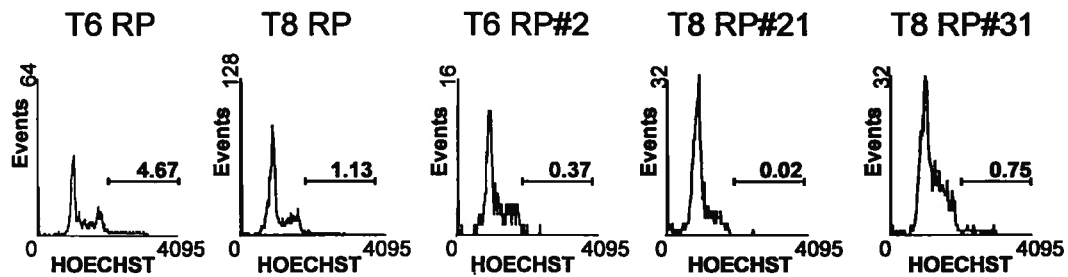
**A****B**RAR $\alpha$ -PLZF<sup>-</sup>RAR $\alpha$ -PLZF<sup>+</sup>

Figure 4.4

**Figure 4.4.** L'expression de RAR $\alpha$ -PLZF dans les lignées clonales et polyclonales de cellules 32D transduites avec le vecteur Retro-off.

A. Analyse par RT-PCR de l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF dans diverse lignées clonales et polyclonales de cellules 32D. L'analyse a été effectuée tel que spécifié dans la figure 4.2 A .

B. Analyse du cycle cellulaire dans les lignées cellulaires mentionnés en A. L'analyse a été effectuée tel qu'expliqué à la figure 4.1 B.



cellules qui expriment et n'expriment pas l'oncoprotéine. L'hétérogénéité de ces populations pourrait masquer l'effet de RAR $\alpha$ -PLZF.

Les résultats de nos tests d'induction démontrent que l'expression de l'oncogène n'était inductible dans aucune des lignées clonales. Les différentes cellules exprimaient la protéine de fusion de façon constitutive ou pas de façon détectable. Pour palier à ce problème, il serait possible d'utiliser les 32D exprimant RAR $\alpha$ -PLZF de façon constitutive et, par siRNA, inhiber cette expression. Alternativement, nous allons analyser le patron d'expression génique globale de plusieurs lignées clonales qui expriment ou non RAR $\alpha$ -PLZF dans le but de limiter les variations clonales. Il faudra toutefois, tenir compte du fait que cette approche risque d'entraîner un risque accru d'identifier des cibles indirectes de RAR $\alpha$ -PLZF. En effet, on peut s'attendre à ce que des variations d'expression de cibles directes de l'oncogène, par effet de cascade, vont affecter d'autres éléments en aval et ce, d'autant plus que nos observations semblent suggérer que RAR $\alpha$ -PLZF contribue à déstabiliser l'intégrité du génome.

### 4.3 Perspectives

L'initiative de cette étude avait pour but d'identifier par quel(s) mécanisme(s) RAR $\alpha$ -PLZF dérégule la prolifération cellulaire dans l'APL. Une étude de divers candidats s'est avérée infructueuse et nous a amené à utiliser une approche d'analyse globale de l'expression des gènes affectés par l'expression de la protéine de fusion.

Nous prévoyons que cette analyse nous fournira deux types de cibles de RAR $\alpha$ -PLZF : les cibles transcriptionnelles directes et les cibles indirectes qui résultent de l'altération de l'activité d'un autre facteur suite à son interaction avec l'oncoprotéine. Nous avons l'intention d'approfondir l'étude des gènes dont les protéines sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire et le maintien de l'intégrité génomique. Ces deux fonctions sont intimement liées et

sont contrôlées par la présence de points de contrôle à différentes étapes de transition dans le cycle cellulaire. Nos résultats suggèrent que, non seulement que les cellules qui expriment RAR $\alpha$ -PLZF prolifèrent de façon accrue comparativement aux cellules ne portant pas l'oncogène mais, en plus, les points de contrôle en G<sub>1</sub>/S et G<sub>2</sub>/M sont défectueux et produisent des cellules possédant un nombre anormal de chromosomes.

Diverses approches moléculaires pourront par la suite être utilisées pour vérifier si les cibles sont directes ou non en documentant, entre autres, les régions de promoteurs responsables de l'effet de RAR $\alpha$ -PLZF. Une séquence consensus de liaison pour PLZF et RAR $\alpha$ -PLZF, de même que pour plusieurs autres facteurs de transcription contrôlant la prolifération cellulaire (entre autres C/EBP), a été décrite et documentée. De plus, pour quelques facteurs de transcription, dont E2F<sup>225</sup>, plusieurs cibles sont connus et pourront être comparés à nos résultats.

#### **4.4 Matériels et méthodes**

##### *Culture cellulaire*

Nous avons utilisé la lignée myéloïde 32D, des cellules de foie fœtal d'embryons de jour 12.5 dpc, de même que des cellules de moelle de souris C57. Les conditions de culture, la production de particules virales portant le vecteur d'expression de RAR $\alpha$ -PLZF ou le vecteur vide, le protocole de transduction et de sélection ont été décrits dans le chapitre 3.

##### *RT-PCR, Real Time PCR, Co-Immunoprécipitation et Immunobuvardage de type Western*

Toutes ces techniques ont été effectuées telles que décrites au chapitre 3.

*Marquage cellulaire au Hoesch pour analyse de cycle cellulaire*

Le protocole utilisé a été décrit précédemment par Herblot et al <sup>230</sup>. Brièvement, les cellules ont été ressuspendues à une concentration de  $2 \times 10^6$  /ml dans une solution de PBS, 2% FCS, 5  $\mu$ g/ml de Hoechst 33342. Suite à une incubation de 30 minutes à 37°C. Les cellules marquées ont été ressuspendues dans une solution de PBS et conservées à 4°C jusqu'à leur analyse par FACS sur un cytomètre (Coulter).

## **5. Discussion**

L'hématopoïèse est un processus qui doit être hautement régulé pour assurer la production normale de cellules sanguines matures essentielles à la survie des organismes. Un dérèglement des processus cellulaires normaux contrôlant la différenciation, la prolifération ou les mécanismes d'apoptose peut résulter en maladie hématopoïétique potentiellement mortelle telle que la leucémie. Phénotypiquement, l'APL est caractérisée par un blocage de la différenciation des cellules de la lignée des granulocytes et une prolifération anormale qui résulte en l'accumulation, dans la moelle, d'un nombre anormalement élevé de cellules ayant l'apparence de promyélocytes. L'identification de la translocation t(11;17) chez certains patients souffrant de ce type de leucémie a permis de mettre en évidence qu'outre le dérangement de la fonction de RAR $\alpha$ , l'identité du partenaire de translocation est non seulement importante pour le processus de leucémogénèse mais elle a un impact important sur le pronostic du patient. En effet, contrairement à l'APL t(15;17) qui est traité avec un niveau de succès élevé par thérapie de différenciation en combinaison avec de la chimiothérapie, l'APL t(11;17) ne répond pas à ce traitement et les patients porteurs de cette translocation ont un mauvais pronostic et doivent plutôt, jusqu'à présent se tourner vers une transplantation de moelle pour de meilleurs résultats.

Les mécanismes selon lesquels les translocations sont associées de façon consistante avec certains types de tumeurs sont inconnus. De plus, dans le cas de l'APL, le stade de différenciation dans lequel se situe la cellule où se produit la translocation n'est pas défini. En effet, la cellule dans laquelle le réarrangement génétique se produit n'est pas reflétée par le phénotype de la cellule leucémique. Nos travaux suggèrent plutôt que le phénotype leucémique est dépendant de l'inactivation de facteurs clés pour la progression de la différenciation cellulaire résultant en un blocage de cette différenciation au stade où ce facteur devient nécessaire pour poursuivre le processus. Parmi les conditions favorables à la recombinaison illégitime des deux partenaires de translocation, il est probable que les régions chromosomiques doivent se retrouver éventuellement à proximité l'une de l'autre <sup>232</sup> et les segments de

chromatine renfermant le point de translocation est accessible aux enzymes potentiellement impliquées dans la translocation. Par conséquent, il est probable que les régions de chromatine dans lesquelles se retrouvent les loci doivent être décompactées. Or, l'expression des gènes transloqués est indicative d'une décompaction de la chromatine dans cette région. On peut donc poser l'hypothèse que la translocation pourrait se produire dans des cellules dans lesquelles les gènes en question sont exprimés. Dans le cas des gènes codant pour RAR $\alpha$  et PLZF, il y a un recoupement des patrons d'expression dans les précurseurs précoces hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>. Cette hypothèse demande toutefois à être confirmée.

Les différentes translocations récurrentes caractéristiques de l'APL ont clairement été impliquées dans la leucémogénèse. Toutefois, leur rôle et cibles moléculaires restent, du moins partiellement, nébuleux. Or, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires du développement cellulaire normal et de quelle(s) façon(s) les protéines de fusion les dérèglent permettrait de solutionner des questions sur l'origine des leucémies et ouvrirait des voies de traitement possibles pour ces maladies.

D'un point de vue mécanistique moléculaire, de nombreuses études ont démontré que les protéines de fusion retrouvées chez les patients souffrant de l'APL t(11;17) contribuent à la leucémogénèse de deux façons. Premièrement, PLZF et RAR $\alpha$  sont deux facteurs de transcription dont une partie de leur rôle est de rendre silencieux leurs gènes cibles en modifiant la chromatine de ces loci, en y recrutant un complexe de déacétylation des histones, ce qui mène à une compaction de la chromatine. En plus, RAR $\alpha$ , en présence de son ligand, transactive l'expression de ses cibles en y recrutant un complexe comprenant des protéines avec une activité d'acétylation des histones et ultimement les composantes de la machinerie basale de transcription. PLZF-RAR $\alpha$  et RAR $\alpha$ -PLZF modifient incorrectement la chromatine où se trouvent les gènes cibles de PLZF et RAR $\alpha$  à cause de leur affinité qui est différente de celle des protéines

parentales et de leur capacité à recruter différents membres des différents complexes impliqués dans la modification de la chromatine. Par conséquent, le patron d'expression des gènes cibles de RAR $\alpha$  et de PLZF est incorrect. Deuxièmement, comme dans le cas précédent, la fusion de domaines provenant de deux protéines non-apparentées telles que RAR $\alpha$  et PLZF résulte en la production de protéines chimérique dont la structure protéique différente de celle de l'une ou l'autre des protéines sauvages. Les oncoprotéines produites risquent donc d'interagir différemment avec certains partenaires protéiques de PLZF et RAR $\alpha$ . Or, parmi ces partenaires, on retrouve différents facteurs de transcription tels que SP1 et GATA-2. On peut émettre l'hypothèse que RAR $\alpha$ -PLZF et PLZF-RAR $\alpha$  pourraient posséder des caractéristiques distinctes leur permettant de moduler inadéquatement l'activité de ces différents facteurs. De plus, les patrons d'expression spatio-temporels pourraient également avoir un rôle décisif dans le potentiel oncogénique de PLZF-RAR $\alpha$  et RAR $\alpha$ -PLZF. Nos travaux ont d'ailleurs démontré que RAR $\alpha$ -PLZF possède un patron de localisation subcellulaire diffus qui est différent de celui de PLZF et qui induit une relocalisation de C/EBP $\alpha$ .

### 5.1 L'oncogène modificateur RAR $\alpha$ -PLZF

Peu d'études visant à déterminer la contribution de RAR $\alpha$ -PLZF au processus de leucémogénèse ont été effectuées. Toutefois, un rôle déterminant pour cette protéine a été mis en évidence grâce aux travaux de He *et al*<sup>220</sup>. En effet, cette équipe a démontré que, malgré le fait que l'expression ectopique de PLZF-RAR $\alpha$  dans le compartiment myéloïde du système hématopoïétique induit une leucémie myéloïde, celle-ci est différente de l'APL, les cellules leucémiques ne présentant pas le blocage de différenciation caractéristique. Par contre, les souris transgéniques exprimant les deux protéines de fusion développent une leucémie similaire à celle observée chez les humains. Une contribution importante de RAR $\alpha$ -PLZF au processus de leucémogénèse semble donc consister en un

blocage de la différenciation des cellules myéloïde. Le changement de phénotype (de CML à APL) induit par RAR $\alpha$ -PLZF suggère donc que ce dernier pourrait être considéré comme un oncogène modificateur.

Une étude menée par Yeyati *et al* <sup>171</sup> avait suggéré que RAR $\alpha$ -PLZF serait dominant négatif sur l'activité de répresseur transcriptionnel de PLZF. Par conséquent, le promoteur des cibles transcriptionnelles de PLZF (tel que celui de la Cycline A) n'est plus réprimé en présence de RAR $\alpha$ -PLZF et est même faiblement activé. Toutefois, plusieurs études ont rapporté récemment que PLZF semble jouer de nombreux rôles, en plus de son effet transcriptionnel. Il module, par des interactions protéiques, d'autres facteurs de transcription tels que GATA-1 et 2 et SP-1. Il a également été démontré que PLZF-RAR $\alpha$  affecte différemment l'activité de ces partenaires comparativement à PLZF. Toutefois, peu de cibles de PLZF sont identifiées et le mécanisme par lequel RAR $\alpha$ -PLZF peut induire un blocage de la différenciation n'est pas connu. Le but de mes travaux visait donc à élucider ce problème.

Dans le cadre de mes travaux, j'ai choisi de déterminer le rôle de RAR $\alpha$ -PLZF dans plusieurs types cellulaires. Premièrement, un modèle de lignée cellulaire murine, les cellules 32D, a été principalement utilisé pour décortiquer les mécanismes moléculaires par lesquels RAR $\alpha$ -PLZF contribue à la leucémogénèse. Ces cellules sont d'origine myéloïde et permettent donc d'élucider le rôle de l'oncogène dans un système biologique pertinent. En effet, des interactions tissu-spécifiques pourraient être absentes dans un système hétérologue. Ce modèle permet également d'éliminer d'autres mécanismes qui pourraient être présents dans d'autres types tissulaires mais absents dans les cellules myéloïdes. Un autre avantage considérable de notre système est que les 32D sont également des cellules qui ont conservé les caractéristiques primaires des cellules myéloïdes normales malgré leur immortalité. Elles doivent être maintenues en présence de cytokines pour survivre (IL-3, G-CSF). Elles conservent également la capacité à se différencier de façon terminale en



granulocytes lorsque que le G-CSF et l'acide rétinoïque sont ajoutés au milieu de culture.

Pour valider les cibles et les mécanismes affectés par RAR $\alpha$ -PLZF et élucidés grâce aux 32D, nous avons transduit et étudié des cultures primaires de cellules de moelle osseuse et de foie foetal, de même que des échantillons de cellules leucémiques de patients.

## **5.2 Rôle de RAR $\alpha$ -PLZF dans le blocage de la différenciation cellulaire dans l'APL**

Les travaux présentés au chapitre 3 sont le résultat d'expériences qui nous ont permis d'élucider de quelle façon RAR $\alpha$ -PLZF cause le blocage du processus de différenciation dans les cellules leucémiques. Nous avons déterminé que l'expression ectopique de RAR $\alpha$ -PLZF inhibe la capacité des cellules 32D à se différencier en présence de ATRA et de G-CSF. En effet, lorsqu'elles sont mises dans un milieu qui ne contient que du G-CSF comme facteur de survie, les cellules meurent par apoptose. Cette absence apparente de capacité à répondre au G-CSF provient du fait que l'expression du récepteur pour cette cytokine est diminuée de façon importante. La surexpression du G-CSF-R dans une lignée clonale exprimant RAR $\alpha$ -PLZF (RP7) ramène l'expression du récepteur à des niveaux similaire à ceux observés dans les lignées parentales et contrôles. En dépit de cet état de fait, elle permet seulement un sauvetage à court terme du défaut de survie cellulaire, suggérant un problème plus important. Une étude plus approfondie grâce à des analyses de RT-PCR semi-quantitatif et d'immunobuvardage de type Western nous ont permis de déterminer que la réduction de l'expression du G-CSF-R est due à une diminution de l'activité de la protéine C/EBP $\alpha$ . C/EBP $\alpha$  est un facteur de transcription exprimé, dans le tissu hématopoïétique, spécifiquement dans les cellules myéloïdes. Il est essentiel à la production de granulocytes matures. Les niveaux d'expression de l'ARNm ou de

la protéine C/EBP $\alpha$  ne semblent pas être modifiés par l'oncogène et, pourtant, l'activité des promoteurs de ses gènes cibles est réduite en présence de RAR $\alpha$ -PLZF. Nous avons déterminé qu'il en résulte une réduction des niveaux d'ARNm du G-CSF-R, de même que celle de la myéloperoxidase (MPO), la neutrophile élastase et la lactoferrine en présence de l'oncoprotéine.

Diverses études de transactivation, co-immunoprécipitation, pulldown, co-localisation, de traitement de lignées cellulaires avec un inhibiteur d'histone déacétylase et précipitation de la chromatine, nous ont permis de déterminer que RAR $\alpha$ -PLZF inhibe l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\alpha$ . Pour se faire, C/EBP $\alpha$  recrute indirectement, sur le promoteur de ses gènes cibles, HDAC1, grâce à sa capacité à interagir physiquement avec RAR $\alpha$ -PLZF. HDAC1, une protéine qui possède la capacité de déacétyler les histones, peut alors modifier la chromatine de ces régions. Il en résulte une répression de l'expression des gènes cibles de C/EBP $\alpha$  qui sont importants pour la différenciation cellulaire.

Nos travaux démontrent également que l'oncogène RAR $\alpha$ -PLZF altère la localisation subcellulaire normale de C/EBP $\alpha$ . Dans les cellules 32D parentales et dans celles exprimant PLZF, C/EBP $\alpha$  se retrouve normalement dans des domaines globulaires bien définis. Dans les cellules exprimant RAR $\alpha$ -PLZF sa localisation devient diffuse, suggérant que la localisation des différents partenaires protéiques de la protéine de fusion a un impact sur leurs fonctions et que tout dérangement de compartimentation peut altérer leurs rôles et contribuer à la leucémogénèse .

Dans leur ensemble, nos résultats démontrent que RAR $\alpha$ -PLZF module l'activité transcriptionnelle d'un facteur de transcription essentiel à la différenciation myéloïde, C/EBP $\alpha$ , résultant en une inhibition de l'expression de ses gènes cibles. Ce nouveau mode d'action de RAR $\alpha$ -PLZF s'ajoute à sa capacité de modifier l'activité transcriptionnelle des promoteurs de cibles directes de PLZF.

De plus, nos travaux viennent appuyer l'hypothèse selon laquelle C/EBP $\alpha$  joue un rôle de suppresseur de tumeur dans la lignée myéloïde. En effet, la fonction et l'intégrité protéique de C/EBP $\alpha$  est affectée dans d'autres désordres myéloïdes. Chez les patients souffrant d'une CML en crise blastique, Perrotti *et al*<sup>233</sup> ont démontré que BCR-ABL supprime l'expression protéique de C/EBP $\alpha$ . AML1-ETO le produit de la translocation t(8;21) retrouvé dans certains cas d'AML inhibe également l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\alpha$ <sup>234-235</sup>. Finalement, le gène codant pour C/EBP $\alpha$  est muté dans d'autres cas d'AML et de syndromes myélodysplasiques<sup>236-237</sup>. La présence d'une cible commune dans ces différents cancers suggère non seulement l'importance de ce facteur de transcription dans la lignée myéloïde mais, également un rôle en tant que suppresseur de tumeur. Une thérapie transcriptionnelle permettant d'induire une surexpression d'un C/EBP $\alpha$  fonctionnel dans les cellules leucémiques pourrait non seulement permettre le traitement de l'APL t(11;17) mais également plusieurs autres leucémies.

### 5.3 Rôle de RAR $\alpha$ -PLZF dans le dérèglement du cycle cellulaire

Le contrôle de RAR $\alpha$ -PLZF sur la prolifération cellulaire avait initialement été suggéré suite à certaines études *in vitro* qui ont culminé avec le rapport de Yeyati *et al*<sup>171</sup>. Ces derniers ont identifié le gène de la Cycline A comme une cible transcriptionnelle de PLZF dérégulée par la présence de la protéine de fusion. L'importance de ce rôle *in vivo* a été mis en évidence par l'étude de souris transgéniques exprimant RAR $\alpha$ -PLZF sous le contrôle du promoteur de la Cathepsine G, un gène spécifique au stade de promyélocyte. Même si elles ne développent pas de leucémies en termes stricts, ces souris présentent un syndrome myéloprolifératif caractérisé par une surabondance dans la moelle et la rate de cellules myéloïdes conservant la capacité à se différencier de façon terminale<sup>220</sup>.

Des travaux préliminaires que nous avons effectués dans nos modèles de cellules 32D, de culture primaire de cellules de foie fœtal et de cellules de moelle exprimant RAR $\alpha$ -PLZF, ont confirmé un rôle pour cette oncoprotéine dans le dérèglement de la prolifération cellulaire et le profil du cycle cellulaire. De plus, nous avons noté que ces cellules, contrairement aux lignées parentales ou contrôles, présentaient des pourcentages élevés de chromosomes surnuméraires et une absence de point de contrôle au cours de leur cycle cellulaire. Ces observations suggèrent un rôle supplémentaire de RAR $\alpha$ -PLZF dans le maintien de l'intégrité génomique. La présence de cette protéine de fusion pourrait donc être importante pour l'acquisition des mutations supplémentaires essentielles au développement de l'APL.

Nous avons ensuite tenté de déterminer les mécanismes sous-jacents associés avec le défaut prolifératif induit par RAR $\alpha$ -PLZF. Nous avons initialement exploré le dérèglement transcriptionnel de l'expression de la Cycline A par RAR $\alpha$ -PLZF. Une analyse par RT-PCR semi-quantitatif et PCR quantitatif (Real-Time PCR) ne nous ont pas permis de détecter de différences d'expression de la Cycline A dans des cellules de foie fœtal ou des cellules 32D exprimant RAR $\alpha$ -PLZF et vont à l'encontre des résultats de Yeyati *et al*<sup>171</sup>.

La différenciation et l'arrêt de la prolifération sont deux processus cellulaires intimement reliés et plusieurs études ont démontré que C/EBP $\alpha$  joue un rôle essentiel dans la différenciation des granulocytes et dans l'arrêt de la prolifération nécessaire pour que cette différenciation se produise. En effet, la surexpression de C/EBP $\alpha$  dans des lignées cellulaires inhibe la prolifération<sup>222-223</sup>. De plus, C/EBP $\alpha$  inhibe l'activité transcriptionnelle de E2F, un facteur de transcription nécessaire pour la progression du cycle cellulaire étant important pour la transcription de gènes tels que c-myc, Cycline A et Cycline E, menant à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire<sup>35-36,84</sup>. Cette inhibition serait due à la séquestration de E2F par C/EBP $\alpha$ .

En outre, deux études renforcent l'hypothèse selon laquelle en inhibant l'activité de C/EBP $\alpha$ , RAR $\alpha$ -PLZF pourrait, en plus de réprimer son effet sur la différenciation, altérer sa capacité à arrêter la progression du cycle cellulaire. Johansen *et al*<sup>35</sup> ont observé, qu'une lignée de souris dans lesquelles on avait substitué le gène de C/EBP $\alpha$  par un gène codant pour une forme de C/EBP $\alpha$  mutée, incapable d'interagir avec E2F, était prédisposée à développer des leucémies de type granulocytaire. Soriano *et al*<sup>224</sup> ont obtenu des lignées d'hépatocytes à partir de souris qui n'expriment pas C/EBP $\alpha$ . Ils ont rapporté que ces cellules proliféraient plus rapidement que celles obtenues à partir de souris de type sauvage et que, tout comme notre lignée cellulaire et nos cellules primaires exprimant RAR $\alpha$ -PLZF, elles accumulaient des anomalies chromosomiques.

Dans le but de déterminer si, en plus d'inhiber l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\alpha$ , contribuant ainsi au blocage de la différenciation observé dans l'APL, RAR $\alpha$ -PLZF pourrait nuire au contrôle de prolifération cellulaire par C/EBP $\alpha$ , nous avons évalué les niveaux d'expression de deux cibles de E2F dans nos cellules exprimant RAR $\alpha$ -PLZF: la Cycline A et la Cycline E. L'expression de ces facteurs est toutefois contrôlée par de nombreux autres éléments intrinsèques et extrinsèques. Par conséquent, malgré l'absence de variations d'expression de ces facteurs dans notre lignée polyclonale, nous allons effectuer un essai qui nous permettra de confirmer ou infirmer l'implication de C/EBP $\alpha$  et E2F dans la prolifération cellulaire anormale des cellules RAR $\alpha$ -PLZF<sup>+</sup> en effectuant une analyse d'expression génique globale, ce qui nous permettra de vérifier les niveaux d'expression d'un nombre élevé de cibles de E2F. Le patron d'expression différentielle entre les cellules exprimant RAR $\alpha$ -PLZF et les cellules contrôles devraient nous révéler certains gènes dont le contrôle transcriptionnel dérégule le cycle cellulaire des cellules myéloïdes. Le patron d'expression des cibles de E2F a déjà été rapporté<sup>238</sup>. Il sera donc possible de le comparer avec nos résultats pour déterminer si RAR $\alpha$ -PLZF empêche l'inhibition de E2F par

C/EBP $\alpha$ . Ces résultats nous indiqueront également potentiellement, d'autres cibles de RAR $\alpha$ -PLZF. Le problème auquel nous faisons face toutefois, provient du fait que nous voulons évaluer les cibles transcriptionnelles directes de RAR $\alpha$ -PLZF ou celles du/des facteurs affectés directement par RAR $\alpha$ -PLZF. Pour ce faire, idéalement, il faudrait un système qui nous permette d'évaluer l'expression génique relativement rapidement après l'induction de l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF. L'utilisation de lignées dans lesquelles l'expression de l'oncogène est inductible serait idéal pour contrôler le délai entre l'apparition de la protéine de fusion et la prise des échantillons. De plus, un avantage supplémentaire significatif de cette approche est que le contrôle est constitué des mêmes cellules, avant induction. Ce qui limite les variations clonales sans intérêt qui pourraient conduire à l'identification de fausses cibles.

Malheureusement, une tentative pour créer des lignées clonales inductibles n'a pas été concluante. En effet, aucune des lignées de 32D obtenues n'étaient inductibles; certaines exprimaient RAR $\alpha$ -PLZF de façon constitutive alors que d'autres ne l'exprimaient pas. Il serait tout de même possible d'utiliser ces lignées et conjointement avec une approche de siRNA qui permettrait d'évaluer les variations d'expression lors de l'extinction de l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF plutôt que lors de son apparition tel qu'originellement prévu. Toutefois, un problème potentiel avec cette approche provient du fait que RAR $\alpha$ -PLZF cause l'apparition d'événements génétiques anormaux supplémentaires. Les cibles trouvés devront donc être testées dans plusieurs lignées pour éliminer les modifications génétiques aléatoires dues à l'instabilité génomique induite par l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF.

Finalement, différentes approches de protéomique (tel que le séquençage des protéines qui interagissent avec la protéine de fusion par exemple) pourraient être utilisées conjointement avec l'analyse génique globale pour identifier les différents partenaires protéiques de RAR $\alpha$ -PLZF. L'intégration des deux

approches pourrait conduire à l'identification de cibles directes, de nouveaux partenaires protéiques et des cibles de ces derniers qui sont affectés par l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF. Il en résulterait, potentiellement, une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels cet oncogène contribue à la dérégulation de la prolifération cellulaire et du maintien de l'intégrité génomique.

## **6. Conclusions et perspectives**



Le but des travaux présentés dans ce document visait à étudier la contribution de l'oncogène RAR $\alpha$ -PLZF retrouvé dans la leucémie promyélocytaire aiguë caractérisée par la translocation t(11;17), au processus de leucémogénèse. Nous avons déterminé que RAR $\alpha$ -PLZF inhibe la différenciation des granulocytes en réprimant l'activité du facteur de transcription C/EBP $\alpha$  dans notre modèle de lignée myéloïde, de même que dans des cellules primaires de foie fœtaux et de moelle osseuse et dans les cellules primaires de patients leucémiques. L'expression des cibles de C/EBP $\alpha$  est essentielle à la différenciation des cellules myéloïdes. Le recrutement de HDAC1 sur le promoteur de ces gènes par RAR $\alpha$ -PLZF, grâce à son interaction avec C/EBP $\alpha$ , mène à une déacétylation de la chromatine la rendant plus compacte et silencieuse. Nos résultats supportent un rôle de suppresseur de tumeur pour C/EBP $\alpha$ , la fonction de ce dernier étant diminuée dans plusieurs autres leucémies myéloïdes. Nous avons également rapporté que l'expression de RAR $\alpha$ -PLZF induit une prolifération accrue des cellules myéloïdes et, est à l'origine d'une instabilité génomique.

Plusieurs outils et modèles ont été développés au cours des dernières années. La mise au point de modèles de souris transgéniques pour l'une ou l'autre ou les deux protéines de fusion retrouvées dans l'APL t(11;17), la disponibilité de puces permettant l'analyse globale de l'expression génique et l'expansion des approches protéomiques donnent la possibilité d'envisager une analyse extensive du processus de leucémogénèse et des approches thérapeutiques qui pourront être utilisées dans le futur.

Presque toutes les études, mes travaux y compris, publiées jusqu'à présent sur l'APL t(11;17) ont tenté de déterminer le rôle de ces protéines de fusion dans le processus de leucémogénèse. Toutefois, l'étude des souris doubles transgéniques pour RAR $\alpha$ -PLZF et PLZF-RAR $\alpha$  a démontré que même si les

protéines de fusion jouent un rôle déterminant dans l'apparition de la leucémie, leur expression est insuffisante à elle seule pour causer la leucémie. En effet, il y a une période de latence de 6 mois après la naissance avant d'observer une leucémie avec un phénotype similaire à celui de l'APL humaine. Cette période de latence suggère que l'acquisition d'événements génétiques supplémentaires sont nécessaires pour la transformation du syndrome myéloprolifératif observé durant la période de latence en APL. L'existence du modèle d'APL chez la souris et de la technologie de l'analyse d'expression génique globale pourrait permettre de suivre les différentes étapes de transformation chez les doubles transgéniques en vérifier quels gènes présentent une expression différentielle entre les souris en période de latence et celles qui présente la leucémie.

Une autre question qu'il serait intéressant d'adresser est : est-ce que RAR $\alpha$ -PLZF et PLZF-RAR $\alpha$  affectent des cibles transcriptionnelles et protéiques qui sont différentes des cibles naturelles de PLZF et RAR $\alpha$ ? Donc, est-ce que l'APL est causée seulement par le dérangement de la fonction de RAR $\alpha$  et PLZF ou est-ce que les protéines de fusion affectent des cibles qui ne sont normalement pas régulées par ces protéines parentales. Récemment, deux études ont rapporté les profils d'expression génique de PLZF et PLZF-RAR $\alpha$  dans un système cellulaire myéloïde (U937). Ces informations peuvent servir de base pour identifier les cibles transcriptionnelles des différentes protéines.

L'investigation de ces différentes questions pourrait mener à l'identification de gènes ou protéines déréglés par les protéines de fusion. Il en résulterait une meilleure compréhension du processus de leucémogénèse et l'obtention de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, il serait sans doute possible de déterminer si certains facteurs altérés par la leucémie sont communs à d'autres types d'APL ou AML, ce qui pourrait potentiellement permettre une uniformisation des approches thérapeutiques.

**Remerciements**

Je tiens à remercier Dr Trang Hoang qui m'a accueilli dans son laboratoire et permis d'acquérir de nombreuses connaissances. Je considère que mes études sous sa supervision m'ont permis d'évoluer dans mon cheminement professionnel et personnel. Je suis également reconnaissante envers mes collègues présents et passés qui ont contribué à rendre cette expérience enrichissante et intéressante. Chacun a vu à ce qu'il règne, dans le laboratoire, une atmosphère amicale de collaboration qui donnait lieu à des discussions stimulantes et une entre aide indispensable.

Je dois une reconnaissance accrue à Martin Lefrançois, Sabine Herblot, Eric Lécuyer, Gorazd Krosi et André Haman. Ces cinq personnes m'ont accueilli dans le laboratoire et m'ont consacré un temps précieux. Nos diverses discussions et collaborations techniques ont contribué à la progression de mon travail.

Virginie Sanguin-Gendreau, Marie-Noëlle Harvey et Mathieu Tremblay ont également joué un rôle de support important non seulement grâce à nos interactions professionnelles mais, également grâce à leur amitié qui m'est précieuse.

Je dois une reconnaissance éternelle à mes parents, Nicole Bessette et Jean Girard, qui m'ont soutenu tout au long de ces études au-delà de ce que n'importe qui aurait pu rêver. Leur rôle indispensable a été instrumental au succès de ce travail. Ils ont été de véritables supporters ; extrêmement patients, généreux et compréhensifs face aux diverses difficultés qu'impliquent des études graduées. Je les remercie de tout mon cœur.

Finalement, j'ai trouvé un autre supporter inconditionnel en la personne de Martin Houle. Il a toujours été là pour me soutenir, m'écouter patiemment et me conseiller lors des moments difficiles. Je le remercie profondément pour sa présence à mes côtés et sa confiance en moi.

**Bibliographie**

- (1) Jordan CT, Lemischka IR. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev.* 1990;4:220-232.
- (2) Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.* 1997;88:287-298.
- (3) Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988;241:58-62.
- (4) Hodgson GS, Bradley TR. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell? *Nature.* 1979;281:381-382.
- (5) Cheng T, Rodrigues N, Shen H et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science.* 2000;287:1804-1808.
- (6) Harrison DE, Astle CM, Delaittre JA. Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging. *J Exp Med.* 1978;147:1526-1531.
- (7) Harrison DE, Astle CM. Loss of stem cell repopulating ability upon transplantation. Effects of donor age, cell number, and transplantation procedure. *J Exp Med.* 1982;156:1767-1779.
- (8) Keller G, Snodgrass R. Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *J Exp Med.* 1990;171:1407-1418.
- (9) Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993;81:2844-2853.
- (10) Orkin SH. Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem.* 1995;270:4955-4958.

- (11) COHN ZA, HIRSCH JG. The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 1960;112:1015-22.:1015-1022.
- (12) Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci.* 1993;18:43-47.
- (13) Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest.* 1973;52:741-744.
- (14) Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem.* 1994;269:24519-24522.
- (15) Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 2001;487:318-322.
- (16) Savill J, Haslett C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol.* 1995;6:385-393.
- (17) Savill JS, Wyllie AH, Henson JE et al. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest.* 1989;83:865-875.
- (18) Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today.* 1993;14:131-136.
- (19) Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000;404:193-197.
- (20) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976;33:451-458.

- (21) Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*. 1994;84:1737-1746.
- (22) Dalrymple SA, Lucian LA, Slattery R et al. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infect Immun*. 1995;63:2262-2268.
- (23) Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996;84:321-330.
- (24) Wang Q, Stacy T, Binder M et al. 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*. 1996;93:3444-3449.
- (25) Robb L, Lyons I, Li R et al. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7075-7079.
- (26) Chen HM, Zhang P, Voso MT et al. Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood*. 1995;85:2918-2928.
- (27) Rekhtman N, Radparvar F, Evans T, Skoutchi AI. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev*. 1999;13:1398-1411.
- (28) Zhang P, Behre G, Pan J et al. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8705-8710.
- (29) Reddy VA, Iwama A, Iotzova G et al. Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood*. 2002;100:483-490.



- (30) Radomska HS, Huettner CS, Zhang P et al. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol.* 1998;18:4301-4314.
- (31) Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood.* 1996;88:1234-1247.
- (32) Iwama A, Zhang P, Darlington GJ et al. Use of RDA analysis of knockout mice to identify myeloid genes regulated in vivo by PU.1 and C/EBPalpha. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:3034-3043.
- (33) Zhang P, Iwama A, Datta MW et al. Upregulation of interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor receptors by transcription factor CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha) is critical for granulopoiesis. *J Exp Med.* 1998;188:1173-1184.
- (34) Zhang DE, Zhang P, Wang ND et al. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:569-574.
- (35) Johansen LM, Iwama A, Lodie TA et al. c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3789-3806.
- (36) Porse BT, Pedersen TA, Xu X et al. E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell.* 2001;107:247-258.
- (37) Moreau-Gachelin F, Tavitian A, Tambourin P. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature.* 1988;331:277-280.

- (38) Paul R, Schuetze S, Kozak SL, Kozak CA, Kabat D. The Sfpi-1 proviral integration site of Friend erythroleukemia encodes the ets-related transcription factor Pu.1. *J Virol.* 1991;65:464-467.
- (39) Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell.* 1990;61:113-124.
- (40) Voso MT, Burn TC, Wulf G et al. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:7932-7936.
- (41) Miyamoto T, Iwasaki H, Reizis B et al. Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell.* 2002;3:137-147.
- (42) Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science.* 1994;265:1573-1577.
- (43) McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL et al. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* 1996;15:5647-5658.
- (44) Bassuk AG, Leiden JM. A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. *Immunity.* 1995;3:223-237.
- (45) Weintraub SJ, Chow KN, Luo RX et al. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature.* 1995;375:812-815.
- (46) Hagemeyer C, Bannister AJ, Cook A, Kouzarides T. The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID in vitro: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:1580-1584.

- (47) Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*. 1997;90:489-519.
- (48) Zhang DE, Hetherington CJ, Chen HM, Tenen DG. The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol*. 1994;14:373-381.
- (49) Reddy MA, Yang BS, Yue X et al. Opposing actions of c-ets/PU.1 and c-myb protooncogene products in regulating the macrophage-specific promoters of the human and mouse colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms) genes. *J Exp Med*. 1994;180:2309-2319.
- (50) Kominato Y, Galson D, Waterman WR, Webb AC, Auron PE. Monocyte expression of the human prointerleukin 1 beta gene (IL1B) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. *Mol Cell Biol*. 1995;15:59-68.
- (51) Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT et al. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol*. 1995;15:5830-5845.
- (52) Jones LC, Lin ML, Chen SS et al. Expression of C/EBPbeta from the C/ebpalpha gene locus is sufficient for normal hematopoiesis in vivo. *Blood*. 2002;99:2032-2036.
- (53) Ford AM, Bennett CA, Healy LE et al. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:10838-10843.
- (54) Oelgeschlager M, Nuchprayoon I, Luscher B, Friedman AD. C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4717-4725.

- (55) Park DJ, Chumakov AM, Vuong PT et al. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment. *J Clin Invest.* 1999;103:1399-1408.
- (56) Chumakov AM, Grillier I, Chumakova E et al. Cloning of the novel human myeloid-cell-specific C/EBP-epsilon transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1997;17:1375-1386.
- (57) Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J et al. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:13187-13192.
- (58) Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is critical for effective neutrophil-mediated response to inflammatory challenge. *Blood.* 1999;93:3096-3105.
- (59) Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 1995;83:841-850.
- (60) Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell.* 1995;83:859-869.
- (61) Leid M, Kastner P, Chambon P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci.* 1992;17:427-433.
- (62) Stunnenberg HG. Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors. *Bioessays.* 1993;15:309-315.
- (63) Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 1992;11:1003-1013.
- (64) Lehmann JM, Jong L, Fanjul A et al. Retinoids selective for retinoid X receptor response pathways. *Science.* 1992;258:1944-1946.

- (65) Allenby G, Bocquel MT, Saunders M et al. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:30-34.
- (66) Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 1995;377:397-404.
- (67) Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 1995;377:454-457.
- (68) Sande S, Privalsky ML. Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol*. 1996;10:813-825.
- (69) Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*. 2000;14:121-141.
- (70) Ghosh J, Das S. A study on the effect of vitamin A deficiency and supplementation on tumorigenesis in mice. *Neoplasma*. 1988;35:41-49.
- (71) Wolbach SB, Howe PR. Nutrition Classics. *The Journal of Experimental Medicine* 42: 753-77, 1925. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. S. Burt Wolbach and Percy R. Howe. *Nutr Rev*. 1978;36:16-19.
- (72) Hodges RE, Sauberlich HE, Canham JE et al. Hematopoietic studies in vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr*. 1978;31:876-885.
- (73) Kuwata T, Wang IM, Tamura T et al. Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood*. 2000;95:3349-3356.
- (74) Lufkin T, Lohnes D, Mark M et al. High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:7225-7229.

- (75) Ghyselinck NB, Dupe V, Dierich A et al. Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. *Int J Dev Biol.* 1997;41:425-447.
- (76) Lohnes D, Kastner P, Dierich A et al. Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell.* 1993;73:643-658.
- (77) Kastner P, Chan S. Function of RARalpha during the maturation of neutrophils. *Oncogene.* 2001;20:7178-7185.
- (78) Zhu J, Heyworth CM, Glasow A et al. Lineage restriction of the RARalpha gene expression in myeloid differentiation. *Blood.* 2001;98:2563-2567.
- (79) Labrecque J, Allan D, Chambon P et al. Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha1 and gamma. *Blood.* 1998;92:607-615.
- (80) Gratas C, Menot ML, Dresch C, Chomienne C. Retinoid acid supports granulocytic but not erythroid differentiation of myeloid progenitors in normal bone marrow cells. *Leukemia.* 1993;7:1156-1162.
- (81) Tocci A, Parolini I, Gabbianelli M et al. Dual action of retinoic acid on human embryonic/fetal hematopoiesis: blockade of primitive progenitor proliferation and shift from multipotent/erythroid/monocytic to granulocytic differentiation program. *Blood.* 1996;88:2878-2888.
- (82) Kogan SC, Hong SH, Shultz DB, Privalsky ML, Bishop JM. Leukemia initiated by PMLRARalpha: the PML domain plays a critical role while retinoic acid-mediated transactivation is dispensable. *Blood.* 2000;95:1541-1550.
- (83) Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 2000;60:3689-3695.

- (84) Slomiany BA, D'Arigo KL, Kelly MM, Kurtz DT. C/EBPalpha inhibits cell growth via direct repression of E2F-DP-mediated transcription. *Mol Cell Biol.* 2000;20:5986-5997.
- (85) Jain M, Arvanitis C, Chu K et al. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science.* 2002;297:102-104.
- (86) Shaffer AL, Yu X, He Y et al. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity.* 2000;13:199-212.
- (87) Dimberg A, Oberg F. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines. *Leuk Lymphoma.* 2003;44:1641-1650.
- (88) Hirama T, Koeffler HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood.* 1995;86:841-854.
- (89) Dictor M, Ehinger M, Mertens F, Akervall J, Wennerberg J. Abnormal cell cycle regulation in malignancy. *Am J Clin Pathol.* 1999;112:S40-S52.
- (90) Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998;12:2245-2262.
- (91) Nevins JR. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.* 1998;9:585-593.
- (92) Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell.* 1991;65:1053-1061.
- (93) Sellers WR, Rodgers JW, Kaelin WG, Jr. A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:11544-11548.

- (94) Brehm A, Miska EA, McCance DJ et al. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 1998;391:597-601.
- (95) Luo RX, Postigo AA, Dean DC. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*. 1998;92:463-473.
- (96) Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I et al. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*. 1998;391:601-605.
- (97) Arroyo M, Raychaudhuri P. Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein. *Nucleic Acids Res*. 1992;20:5947-5954.
- (98) Leone G, DeGregori J, Yan Z et al. E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev*. 1998;12:2120-2130.
- (99) Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res*. 1997;237:7-13.
- (100) Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:676-684.
- (101) Dimberg A, Bahram F, Karlberg I et al. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines is associated with sequential down-regulation of c-Myc and cyclin E and posttranscriptional up-regulation of p27(Kip1). *Blood*. 2002;99:2199-2206.
- (102) Liu M, Iavarone A, Freedman LP. Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem*. 1996;271:31723-31728.



- (103) Walkley CR, Purton LE, Snelling HJ et al. Identification of the molecular requirements for an RAR alpha-mediated cell cycle arrest during granulocytic differentiation. *Blood*. 2004;103:1286-1295.
- (104) el Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993;75:817-825.
- (105) Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:261-91.:261-291.
- (106) Rabbits TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. 1994;372:143-149.
- (107) Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. 1997;278:1059-1064.
- (108) Douer D, Preston-Martin S, Chang E et al. High frequency of acute promyelocytic leukemia among Latinos with acute myeloid leukemia. *Blood*. 1996;87:308-313.
- (109) Avvisati G, Mele A, Stazi MA et al. Epidemiology of acute promyelocytic leukemia in Italy. APL Collaborating Group. *Ann Oncol*. 1991;2:405-408.
- (110) Chen Z, Brand NJ, Chen A et al. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J*. 1993;12:1161-1167.
- (111) Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood*. 1996;87:882-886.
- (112) Wells RA, Catzavelos C, Kamel-Reid S. Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant

translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nat Genet.* 1997;17:109-113.

- (113) Arnould C, Philippe C, Bourdon V et al. The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet.* 1999;8:1741-1749.
- (114) Grimwade D, Lo CF. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2002;16:1959-1973.
- (115) Slack JL, Yu M. Constitutive expression of the promyelocytic leukemia-associated oncogene PML-RARalpha in TF1 cells: isoform-specific and retinoic acid-dependent effects on growth, bcl-2 expression, and apoptosis. *Blood.* 1998;91:3347-3356.
- (116) De Botton S, Chevret S, Sanz M et al. Additional chromosomal abnormalities in patients with acute promyelocytic leukaemia (APL) do not confer poor prognosis: results of APL 93 trial. *Br J Haematol.* 2000;111:801-806.
- (117) Dombret H, Scrobohaci ML, Ghorra P et al. Coagulation disorders associated with acute promyelocytic leukemia: corrective effect of all-trans retinoic acid treatment. *Leukemia.* 1993;7:2-9.
- (118) Paietta E, Andersen J, Gallagher R et al. The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG study. *Leukemia.* 1994;8:1108-1112.
- (119) Guglielmi C, Martelli MP, Diverio D et al. Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. *Br J Haematol.* 1998;102:1035-1041.

- (120) Ferrara F, Morabito F, Martino B et al. CD56 expression is an indicator of poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous all-trans-retinoic acid and chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2000;18:1295-1300.
- (121) de The H, Lavau C, Marchio A et al. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell.* 1991;66:675-684.
- (122) Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev.* 2003;17:71-97.
- (123) Chen Z, Guidez F, Rousselot P et al. PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:1178-1182.
- (124) Pandolfi PP. PML, PLZF and NPM genes in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica.* 1996;81:472-482.
- (125) Licht JD, Shaknovich R, English MA et al. Reduced and altered DNA-binding and transcriptional properties of the PLZF-retinoic acid receptor-alpha chimera generated in t(11;17)-associated acute promyelocytic leukemia. *Oncogene.* 1996;12:323-336.
- (126) Kakizuka A, Miller WH, Jr., Umesono K et al. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell.* 1991;66:663-674.
- (127) Kastner P, Perez A, Lutz Y et al. Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in

acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBO J.* 1992;11:629-642.

- (128) Pandolfi PP, Grignani F, Alcalay M et al. Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene.* 1991;6:1285-1292.
- (129) Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C et al. Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha. *Blood.* 2001;97:1314-1320.
- (130) Reddy BA, Etkin LD, Freemont PS. A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins. *Trends Biochem Sci.* 1992;17:344-345.
- (131) Goddard AD, Borrow J, Freemont PS, Solomon E. Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science.* 1991;254:1371-1374.
- (132) Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1999;93:3167-3215.
- (133) Terris B, Baldin V, Dubois S et al. PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res.* 1995;55:1590-1597.
- (134) Koken MH, Linares-Cruz G, Quignon F et al. The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene.* 1995;10:1315-1324.
- (135) Gambacorta M, Flenghi L, Fagioli M et al. Heterogeneous nuclear expression of the promyelocytic leukemia (PML) protein in normal and neoplastic human tissues. *Am J Pathol.* 1996;149:2023-2035.

- (136) Flenghi L, Fagioli M, Tomassoni L et al. Characterization of a new monoclonal antibody (PG-M3) directed against the aminoterminal portion of the PML gene product: immunocytochemical evidence for high expression of PML proteins on activated macrophages, endothelial cells, and epithelia. *Blood*. 1995;85:1871-1880.
- (137) Nason-Burchenal K, Gandini D, Botto M et al. Interferon augments PML and PML/RAR alpha expression in normal myeloid and acute promyelocytic cells and cooperates with all-trans retinoic acid to induce maturation of a retinoid-resistant promyelocytic cell line. *Blood*. 1996;88:3926-3936.
- (138) Daniel MT, Koken M, Romagne O et al. PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*. 1993;82:1858-1867.
- (139) Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S et al. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet*. 1998;20:266-272.
- (140) Dyck JA, Maul GG, Miller WH, Jr. et al. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell*. 1994;76:333-343.
- (141) Koken MH, Puvion-Dutilleul F, Guillemain MC et al. The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J*. 1994;13:1073-1083.
- (142) Cohen N, Sharma M, Kentsis A et al. PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J*. 2001;20:4547-4559.
- (143) Strudwick S, Borden KL. The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation*. 2002;70:10-22.

- (144) Alcalay M, Tomassoni L, Colombo E et al. The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* 1998;18:1084-1093.
- (145) Negorev D, Maul GG. Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene.* 2001;20:7234-7242.
- (146) Ruthardt M, Orleth A, Tomassoni L et al. The acute promyelocytic leukaemia specific PML and PLZF proteins localize to adjacent and functionally distinct nuclear bodies. *Oncogene.* 1998;16:1945-1953.
- (147) Borden KL. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol.* 2002;22:5259-5269.
- (148) Ruggero D, Wang ZG, Pandolfi PP. The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *Bioessays.* 2000;22:827-835.
- (149) Alcalay M, Zangrilli D, Fagioli M et al. Expression pattern of the RAR alpha-PML fusion gene in acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:4840-4844.
- (150) Grimwade D, Howe K, Langabeer S et al. Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia: cytogenetic, molecular and PML immunofluorescence assessment of patients entered into the M.R.C. ATRA trial. M.R.C. Adult Leukaemia Working Party. *Br J Haematol.* 1996;94:557-573.
- (151) Grisolan JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ. Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood.* 1997;89:376-387.

- (152) He LZ, Tribioli C, Rivi R et al. Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:5302-5307.
- (153) Brown D, Kogan S, Lagasse E et al. A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:2551-2556.
- (154) Pollock JL, Westervelt P, Kurichety AK et al. A bcr-3 isoform of RARalpha-PML potentiates the development of PML-RARalpha-driven acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:15103-15108.
- (155) Jansen JH, Mahfoudi A, Rambaud S et al. Multimeric complexes of the PML-retinoic acid receptor alpha fusion protein in acute promyelocytic leukemia cells and interference with retinoid and peroxisome-proliferator signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7401-7405.
- (156) Pandolfi PP, Alcalay M, Fagioli M et al. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* 1992;11:1397-1407.
- (157) Chen Z, Brand NJ, Chen A et al. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* 1993;12:1161-1167.
- (158) Akimaru H, Chen Y, Dai P et al. Drosophila CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *Nature.* 1997;386:735-738.
- (159) Chen SJ, Zelent A, Tong JH et al. Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest.* 1993;91:2260-2267.

- (160) Li JY, English MA, Ball HJ et al. Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem.* 1997;272:22447-22455.
- (161) Ahmad KF, Engel CK, Prive GG. Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:12123-12128.
- (162) Dong S, Zhu J, Reid A et al. Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor-alpha fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:3624-3629.
- (163) Koken MH, Reid A, Quignon F et al. Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10255-10260.
- (164) Davies JM, Hawe N, Kabarowski J et al. Novel BTB/POZ domain zinc-finger protein, LRF, is a potential target of the LAZ-3/BCL-6 oncogene. *Oncogene.* 1999;18:365-375.
- (165) Hoatlin ME, Zhi Y, Ball H et al. A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood.* 1999;94:3737-3747.
- (166) Dhordain P, Albagli O, Honore N et al. Colocalization and heteromerization between the two human oncogene POZ/zinc finger proteins, LAZ3 (BCL6) and PLZF. *Oncogene.* 2000;19:6240-6250.
- (167) Reid A, Gould A, Brand N et al. Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood.* 1995;86:4544-4552.
- (168) Barna M, Hawe N, Niswander L, Pandolfi PP. Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet.* 2000;25:166-172.



- (169) Bavisotto L, Kaushansky K, Lin N, Hromas R. Antisense oligonucleotides from the stage-specific myeloid zinc finger gene MZF-1 inhibit granulopoiesis in vitro. *J Exp Med.* 1991;174:1097-1101.
- (170) Shaknovich R, Yeyati PL, Ivins S et al. The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1998;18:5533-5545.
- (171) Yeyati PL, Shaknovich R, Boterashvili S et al. Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene.* 1999;18:925-934.
- (172) Eaves CJ, Cashman JD, Kay RJ et al. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. *Blood.* 1991;78:110-117.
- (173) McLoughlin P, Ehler E, Carlile G, Licht JD, Schafer BW. The LIM-only protein DRAL/FHL2 interacts with and is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem.* 2002;277:37045-37053.
- (174) Barna M, Merghoub T, Costoya JA et al. Plzf mediates transcriptional repression of HoxD gene expression through chromatin remodeling. *Dev Cell.* 2002;3:499-510.
- (175) Labbaye C, Quaranta MT, Pagliuca A et al. PLZF induces megakaryocytic development, activates Tpo receptor expression and interacts with GATA1 protein. *Oncogene.* 2002;21:6669-6679.
- (176) Lee DK, Suh D, Edenberg HJ, Hur MW. 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.* 2002;277:26761-26768.

- (177) Martin PJ, Delmotte MH, Formstecher P, Lefebvre P. PLZF is a negative regulator of retinoic acid receptor transcriptional activity. *Nucl Recept*. 2003;1:6.
- (178) Dumbar TS, Gentry GA, Olson MO. Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry*. 1989;28:9495-9501.
- (179) Smetana K, Ochs R, Lischwe MA et al. Immunofluorescence studies on proteins B23 and C23 in nucleoli of human lymphocytes. *Exp Cell Res*. 1984;152:195-203.
- (180) Spector DL, Ochs RL, Busch H. Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma*. 1984;90:139-148.
- (181) Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*. 1989;56:379-390.
- (182) Szebeni A, Mehrotra B, Baumann A et al. Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry*. 1997;36:3941-3949.
- (183) Chang JH, Lin JY, Wu MH, Yung BY. Evidence for the ability of nucleophosmin/B23 to bind ATP. *Biochem J*. 1998;329:539-544.
- (184) Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol*. 2002;4:529-533.
- (185) Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1995;267:316-317.

- (186) Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R et al. Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Blood*. 1995;86:1954-1960.
- (187) Cheng GX, Zhu XH, Men XQ et al. Distinct leukemia phenotypes in transgenic mice and different corepressor interactions generated by promyelocytic leukemia variant fusion genes PLZF-RARalpha and NPM-RARalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:6318-6323.
- (188) Ruthardt M, Testa U, Nervi C et al. Opposite effects of the acute promyelocytic leukemia PML-retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and PLZF-RAR alpha fusion proteins on retinoic acid signalling. *Mol Cell Biol*. 1997;17:4859-4869.
- (189) Shekhter-Levin S, Gollin SM, Kaplan SS, Redner RL. Involvement of the MLL and RARalpha genes in a patient with acute monocytic leukemia with t(11;17)(q23;q12). *Leukemia*. 2000;14:520-522.
- (190) Redner RL, Chen JD, Rush EA, Li H, Pollock SL. The t(5;17) acute promyelocytic leukemia fusion protein NPM-RAR interacts with co-repressor and co-activator proteins and exhibits both positive and negative transcriptional properties. *Blood*. 2000;95:2683-2690.
- (191) So CW, Dong S, So CK et al. The impact of differential binding of wild-type RARalpha, PML-, PLZF- and NPM-RARalpha fusion proteins towards transcriptional co-activator, RIP-140, on retinoic acid responses in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2000;14:77-83.
- (192) Harborth J, Weber K, Osborn M. Epitope mapping and direct visualization of the parallel, in-register arrangement of the double-stranded coiled-coil in the NuMA protein. *EMBO J*. 1995;14:2447-2460.

- (193) Compton DA, Szilak I, Cleveland DW. Primary structure of NuMA, an intranuclear protein that defines a novel pathway for segregation of proteins at mitosis. *J Cell Biol.* 1992;116:1395-1408.
- (194) Compton DA, Cleveland DW. NuMA, a nuclear protein involved in mitosis and nuclear reformation. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6:343-346.
- (195) He D, Zeng C, Brinkley BR. Nuclear matrix proteins as structural and functional components of the mitotic apparatus. *Int Rev Cytol.* 1995;162B:1-74.:1-74.
- (196) Saredi A, Howard L, Compton DA. NuMA assembles into an extensive filamentous structure when expressed in the cell cytoplasm. *J Cell Sci.* 1996;109:619-630.
- (197) Dong S, Qiu J, Stenoien DL et al. Essential role for the dimerization domain of NuMA-RARalpha in its oncogenic activities and localization to NuMA sites within the nucleus. *Oncogene.* 2003;22:858-868.
- (198) Snow JW, Abraham N, Ma MC et al. STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2002;99:95-101.
- (199) Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000;19:2474-2488.
- (200) Dong S, Tweardy DJ. Interactions of STAT5b-RARalpha, a novel acute promyelocytic leukemia fusion protein, with retinoic acid receptor and STAT3 signaling pathways. *Blood.* 2002;99:2637-2646.
- (201) Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP et al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor-alpha fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. *Blood.* 1992;80:492-497.

- (202) Castaigne S, Balitrand N, de The H et al. A PML/retinoic acid receptor alpha fusion transcript is constantly detected by RNA-based polymerase chain reaction in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1992;79:3110-3115.
- (203) Huang W, Sun GL, Li XS et al. Acute promyelocytic leukemia: clinical relevance of two major PML-RAR alpha isoforms and detection of minimal residual disease by retrotranscriptase/polymerase chain reaction to predict relapse. *Blood*. 1993;82:1264-1269.
- (204) Lo CF, Diverio D, Avvisati G et al. Therapy of molecular relapse in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:2225-2229.
- (205) Huang ME, Ye YC, Chen SR et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1988;72:567-572.
- (206) Cassinat B, Chomienne C. Biological features of primary APL blasts: their relevance to the understanding of granulopoiesis, leukemogenesis and patient management. *Oncogene*. 2001;20:7154-7160.
- (207) Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood*. 1990;76:1704-1709.
- (208) Degos L, Wang ZY. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 2001;20:7140-7145.
- (209) Warrell RP, Jr., Maslak P, Eardley A et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid: an update of the New York experience. *Leukemia*. 1994;8:929-933.
- (210) Warrell RP, Jr., de The H, Wang ZY, Degos L. Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1993;329:177-189.

- (211) Fagioli M, Grignani F, Ferrucci PF et al. Effect of the acute promyelocytic leukemia PML/RAR alpha protein on differentiation and survival of myeloid precursors. *Leukemia*. 1994;8 Suppl 1:S7-11.:S7-11.
- (212) Kalantry S, Delva L, Gaboli M et al. Gene rearrangements in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *J Cell Physiol*. 1997;173:288-296.
- (213) Fenaux P, Chastang C, Chevret S et al. A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood*. 1999;94:1192-1200.
- (214) Kwong YL, Au WY, Chim CS et al. Arsenic trioxide- and idarubicin-induced remissions in relapsed acute promyelocytic leukaemia: clinicopathological and molecular features of a pilot study. *Am J Hematol*. 2001;66:274-279.
- (215) Soignet SL, Frankel SR, Douer D et al. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2001;19:3852-3860.
- (216) Ohnishi K, Yoshida H, Shigeno K et al. Arsenic trioxide therapy for relapsed or refractory Japanese patients with acute promyelocytic leukemia: need for careful electrocardiogram monitoring. *Leukemia*. 2002;16:617-622.
- (217) Lu DP, Qiu JY, Jiang B et al. Tetra-arsenic tetra-sulfide for the treatment of acute promyelocytic leukemia: a pilot report. *Blood*. 2002;99:3136-3143.
- (218) Miller WH, Jr., Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res*. 2002;62:3893-3903.
- (219) Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the

European Working Party. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood*. 2000;96:1297-1308.

- (220) He LZ, Bhaumik M, Tribioli C et al. Two critical hits for promyelocytic leukemia. *Mol Cell*. 2000;6:1131-1141.
- (221) McConnell MJ, Chevallier N, Berkofsky-Fessler W et al. Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol Cell Biol*. 2003;23:9375-9388.
- (222) Hendricks-Taylor LR, Darlington GJ. Inhibition of cell proliferation by C/EBP alpha occurs in many cell types, does not require the presence of p53 or Rb, and is not affected by large T-antigen. *Nucleic Acids Res*. 1995;23:4726-4733.
- (223) Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*. 1998;273:28545-28548.
- (224) Soriano HE, Kang DC, Finegold MJ et al. Lack of C/EBP alpha gene expression results in increased DNA synthesis and an increased frequency of immortalization of freshly isolated mice [correction of rat] hepatocytes. *Hepatology*. 1998;27:392-401.
- (225) Ren B, Cam H, Takahashi Y et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev*. 2002;16:245-256.
- (226) Park JS, Qiao L, Gilfor D et al. A role for both Ets and C/EBP transcription factors and mRNA stabilization in the MAPK-dependent increase in p21

- (Cip-1/WAF1/mda6) protein levels in primary hepatocytes. *Mol Biol Cell*. 2000;11:2915-2932.
- (227) Timchenko NA, Harris TE, Wilde M et al. CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol Cell Biol*. 1997;17:7353-7361.
- (228) Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:222-231.
- (229) Wang H, Iakova P, Wilde M et al. C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell*. 2001;8:817-828.
- (230) Herblot S, Aplan PD, Hoang T. Gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol Cell Biol*. 2002;22:886-900.
- (231) Edwards, S.W *Biochemistry and physiology of the neutrophil*. © 1994 Cambridge University Press, New York.
- (232) Sachs RK, Chen AM, Brenners DJ. Review: proximity effects in the production of chromosome aberrations by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 1997 Jan;71(1):1-19.
- (233) Perrotti D, Cesi V, Trotta R et al. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat. Genet*. 2002;30:48-58.
- (234) Westendorf JJ, Yamamoto CM, Lenny N et al. The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol. Cell Biol*. 1998;18:322-333.



- (235) Pabst T, Mueller BU, Harakawa N et al. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat. Med* 2001;7: 444-451.
- (236) Pabst T, Mueller BU, Zhang P et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* 2001;27: 263-270.
- (237) Gombart AF, Hofmann WK, Kawano S et al. Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood.* 2002;99:1332-40.
- (238) Ren B, Cam H, Takahashi, Y et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2M checkpoints. *Genes & Development* 2002;16:245-256.
- (239) Lane AA and Ley TJ. Neutrophil elastase cleaves PML-RAR $\alpha$  and is important for the development of acute promyelocytic leukemia in mice. *Cell* 2003; 115: 305-318.
- (240) Lin RJ and Evans RM. Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Cell* 2000; 5: 821-830.

