

2m11.3411.2

Université de Montréal

**NOUVEAU RÔLE D'E2A ET HEB DANS LA RÉGULATION DU
FACTEUR DE TRANSCRIPTION HÉMATOPOIÉTIQUE SCL**

Par

Marianne Desrosiers

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

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



Mai 2006

© Marianne Desrosiers, 2006

QH

506

U54

2006

v.028

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**NOUVEAU RÔLE D'E2A ET HEB DANS LA RÉGULATION DU
FACTEUR DE TRANSCRIPTION HÉMATOPOIÉTIQUE SCL**

Présenté par :

Marianne Desrosiers

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr Muriel Aubry

Membre du jury : Dr Mark Featherstone

Directeur de recherche : Dr Trang Hoang

Mémoire accepté le : _____

RÉSUMÉ

Le système hématopoïétique possède de nombreux mécanismes et effecteurs, tel que les facteurs de transcription pour assurer la régulation appropriée de l'expression génique. Le facteur de transcription Stem Cell Leukemia (SCL) qui fait partie de la famille des protéines à domaine bHLH joue un rôle essentiel pour la spécification et le développement du système hématopoïétique ainsi que pour le choix de lignée pendant la différenciation. SCL assure donc la nucléation d'un complexe composé de protéines d'ancrage à l'ADN (E2A, HEB et GATA) ainsi que de protéines d'échaffaudage (LMO2 et LDB-1). Des translocations chromosomiques qui causent l'expression inappropriée de SCL dans le compartiment lymphoïde sont associées avec le développement de la leucémie lymphoblastique T aigue chez l'enfant. Mon étude sur les différents mécanismes de régulation du facteur de transcription SCL a permis de découvrir que l'interaction physique entre SCL et les protéines E, E2A et HEB, est nécessaire à la nucléation du complexe SCL et à sa fonction en régulant de façon intrinsèque la stabilité, la dégradation et la localisation cellulaire de SCL. Le rôle crucial des protéines E est révélé par les embryons de souris délétés pour ces gènes présentant une diminution des niveaux protéiques de SCL et du nombre de progéniteurs érythroïdes, ce qui cause une réduction quantitative des cellules érythroïdes matures en plus d'entraîner un grave problème de développement de la queue. Ces observations m'ont donc permis de révéler un nouveau mécanisme de régulation du facteur de transcription SCL, un régulateur essentiel de l'hématopoïèse et possiblement de l'ostéogénèse.

Mots clés: Hématopoïèse, Mécanismes de régulation, Facteurs de transcription, bHLH, SCL, E2A, HEB

SUMMARY

The hematopoietic system possesses a variety of mechanisms and effectors, like the transcription factors, to appropriately regulate gene expression. The bHLH transcription factor Stem Cell Leukemia (SCL) plays an essential role in the specification and development of hematopoiesis as well as lineage choice during differentiation process. SCL is known to mediate the nucleation of a protein complex composed of DNA binding proteins (E2A, HEB and GATA) and scaffolding proteins (LMO2 and LDB-1). However, chromosomal translocations causing inappropriate expression of SCL in the lymphoid compartment is associated with the development of T acute lymphoblastic leukemia in children. Studying the different mechanisms which regulate SCL, I discovered that the physical interaction between SCL and the E proteins E2A and HEB is essential for the nucleation of the SCL complex and its function by intrinsically regulating the stability, the degradation and the cellular localization of SCL. The role of these E proteins was also revealed *in vivo* by the decreased protein levels of SCL and the lower generation of erythroid progenitors, causing a quantitative reduction in erythroid cell output without affecting their maturation to TER119 positive cells, as well as the major developmental anomaly of tail development in the embryos $E2a^{-/-}$ or $Heb^{-/-}$. My study therefore allowed the discovery of a novel regulation mechanism of the transcription factor SCL, a crucial regulator of hematopoiesis and possibly osteogenesis.

Key words: Hematopoiesis, Regulation mechanism, Transcription factors, bHLH, SCL, E2A, HEB

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	ix
DÉDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS	xvi

CHAPITRE 1 1

REVUE DE LITTÉRATURE	2
1.1 L'HÉMATOPOÏÈSE	2
1.1.1 Définition	2
1.1.2 Les cellules souches hématopoïétiques	3
1.1.3 Les progéniteurs et les différentes lignées hématopoïétiques	7
1.1.4 Développement du système hématopoïétique.....	9
1.1.5 L'apoptose.....	11
1.1.6 La leucémie.....	13
1.2 LES RÉGULATEURS DE L'HÉMATOPOÏÈSE	15
1.2.1 Les facteurs extrinsèques.....	15
1.2.2 La niche hématopoïétique	16
1.2.3 Le concept de division asymétrique	18
1.2.4 Les facteurs intrinsèques	19
1.2.5 Modèle stochastique versus instructif.....	21
1.3 LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE <i>bHLH</i>	22
1.4 LE COMPLEXE SCL	24
1.4.1 La composition.....	24
1.4.2 Les gènes cibles.....	27
1.5 LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION SCL.....	28
1.5.1 Le gène.....	28
1.5.2 La protéine	30
1.5.3 Le patron d'expression	31
1.5.4 Les fonctions de SCL	32
1.6 LES PROTÉINES E.....	35
1.6.1 E2A	35
1.6.2 HEB.....	38
1.6.3 E2-2.....	39
1.7 LES AUTRES MEMBRES DU COMPLEXE.....	40
1.7.1 LMO2 et LDB-1.....	40
1.7.2 GATA-1/2	43
1.8 EN RÉSUMÉ... ..	44
RATIONALISATION DU PROJET.....	45

CHAPITRE 2	46
PRÉSENTATION DU MANUSCRIT	47
ABSTRACT	48
INTRODUCTION.....	49
EXPERIMENTAL PROCEDURES	51
RESULTS	58
2.1 The coexpression of E proteins is essential for SCL	58
2.2 Post-translational regulation of SCL by E2A	59
2.3 E2A has a dual effect on the stability and the cellular localization of SCL.....	60
2.4 E2A and HEB regulate SCL protein levels <i>in vivo</i> and erythroid lineage outcome.....	61
DISCUSSION	63
ACKNOWLEDGEMENTS	65
REFERENCES.....	66
FIGURES	71
CHAPITRE 3	79
DISCUSSION	80
3.1 La régulation transcriptionnelle.....	81
3.2 La régulation traductionnelle.....	82
3.3 Les modifications post-traductionnelles	84
3.4 Les interactions protéiques.....	86
3.5 La stabilité protéique.....	87
3.6 Le transport intra-cellulaire.....	90
3.7 Les implications <i>in vivo</i>	92
CONCLUSION	96
INDEX ANALYTIQUE	97
BIBLIOGRAPHIE	104
ANNEXES	131

LISTE DES FIGURES

Figure I	L'hématopoïèse normale chez l'adulte	4
Figure II	Les caractéristiques du système hématopoïétique.....	4
Figure III	La caractérisation des HSC par des études fonctionnelles	6
Figure IV	L'origine du système hématopoïétique	10
Figure V	L'apoptose	12
Figure VI	Guérir la leucémie par la greffe de moelle osseuse.....	14B
Figure VII	La niche hématopoïétique	17
Figure VIII	La structure des protéines bHLH	23
Figure IX	Le complexe SCL comme activateur transcriptionnel	26
Figure X	Structure du gène et de l'ARNm de SCL.....	29
Figure XI	Phénotype de la délétion du gène SCL chez la souris.....	33
Figure 1	E2A and HEB are essentials partners for SCL.....	73
Figure 2	E2A does not perturb the biosynthesis of the SCL protein.	74
Figure 3	E2A stabilizes and affects the cellular distribution of SCL.	75
Figure 4	Coexpression of E2A increases SCL nuclear localization.	76
Figure 5	<i>In vivo</i> disturbance of SCL levels in E2A and HEB knock-out mice.	77
Figure 6	E2A and HEB deficiency perturbs erythroid lineage cells.....	78
Figure 7	Phénotype anormal de la queue des embryons $E2a^{-/-}$ et les souris $E2a^{+/-}Heb^{+/-}$	94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Description des membres retrouvés dans le complexe SCL	25
-----------	--	----

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
5'-UTR	5'-Upstream Translated Region
5FU	5-fluorouracil
A	Adénosine
ABL	Ableson Leukemia Virus
ADN	Acide déoxyribonucléotide
AGM	Région de l'aorte, des gonades et du mésonéphros chez l'embryon
AHR	Aromatic Hydrocarbon Receptor
AKT	Protein Kinase B
ALL	Acute Lymphocytic Leukemia
AML	Acute Myeloid Leukemia
ANG-1	Angiopoietin-1, ligand du récepteur tyrosine-kinase Tie2
APL	Acute Promyelocytic Leukemia
ARNm	Acide ribonucléotide messenger
ARNT	AHR Nuclear-Translocator
ATP	Adénosine Triphosphate
B220	Marqueur de surface pour les lymphocytes B
BCL2	B-cell CLL/lymphoma Protein 2
BCR	Breakpoint Cluster Region Protein
BCRP1	Breast Cancer Resistance Protein-1
BFU-E	Blast Colony-Forming Units – Erythroid
BH3	Domaine retrouvé chez quelques protéines anti-apoptotiques
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BL-CFC	Blast-Colony Forming Cell
BMSC	Bone Marrow Stromal Cells
<i>Brcal</i>	Breast Cancer 1 Gene
BRCA1	Breast Cancer 1 Protein
C	Cytosine
CBP	CREB Binding Protein
CD11b	Marqueur de surface cellulaire pour les monocytes/macrophages
CD34	Hematopoietic progenitor cell antigen CD34 precursor

CD4+	Cellule exprimant le marqueur de surface CD4
CD41a	Cellule exprimant le marqueur de surface CD41a
CD8+	Cellule exprimant le marqueur de surface CD8
CDC42	Cell Division Cycle Protein 42
cDNA	Acide déoxyribonucléotide complémentaire
CEBP α/β	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha
CFU-GM	Colony-Forming Unit – Granulocyte –Macrophage
CFU-S	Colony-Forming-Unit Spleen Assay
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
c-KIT	Récepteur tyrosine-kinase du ligand Steel Factor, Marqueur de surface des HSC
CLP	Commun Lymphoid Progenitor
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité I
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité II
CML	Chronic Myelogenous Leukemia
CMP	Commun Myeloid Progenitor
Ct	Domaine en C-terminal
CTIP	CTBP-Interacting Protein
DN1/4	Étape de transition des thymocytes double-négatifs pour CD4 et CD8 pendant leur différenciation
DP	Stade de différenciation des thymocytes CD4 + et CD8+
E12 / E47	Isoformes du gène <i>E2a</i>
E2-2	Transcription factor 4 (TCF4)
E2A	Enhancer Binding Factor E12/E47 Protein
E7.5	Jour embryonnaire 7.5
ECM	Extra-cellular Matrix
eIF	Eukaryotic Translation Initiation Factor
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assays
EPO	Érythropoïétine
EPOr	Récepteur de l'érythropoïétine
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase
ES	Embryonic Stem Cell
EST	Express Sequence Tag
ETO	Eight-Twenty One Protein
ETO-2	Chromosome Eight Region Twenty-One Protein-2
FADD	Fas (TNFRSF6)-Associated via Death Domain
FC ϵ R1	Marqueur de surface des mastocytes

FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FLIP	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (CFLAR)
FLK-1	Fetal Liver Kinase-1
g	Gramme
G	Guanosine
G0	Phase d'arrêt du cycle cellulaire
G1	Phase du cycle cellulaire de croissance et de préparation à la réplication de l'ADN
G2	Phase du cycle cellulaire de croissance et de préparation à la mitose
GAP	Jonctions de communication entre les cellules
GATA1/2	GATA-Binding Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GMP	Granulocyte/Monocyte Progenitor
GPA	Glycophorin A
GR1	Marqueur de surface des granulocytes
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
HD	Homeodomain
HDAC1/3	Histone Deacetylase 1/3
<i>Heb</i>	HeLa Ebox Binding Gene
HEB	HeLa Ebox Binding Protein
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha
<i>Hlf</i>	Hepatic Leukemia Factor
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
Id	Inhibitor of DNA Binding Protein (HLH)
IFN- γ	Interferon- γ
<i>IgH</i>	Immunoglobulin Heavy Constant Gene
IkB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
IL7	Interleukin-7, Marqueur de surface des lymphocytes T
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
KSL	Population triée de HSC (c-Kit+, Sca+, Lin-)
L	litre
LacZ	Gene encoding the β -galactosidase
LDB-1	LIM domain-binding protein
LIM 1/2	Domaine riche en cystéines pouvant lier le zinc
LMO1/2/4	LIM-only protein-1/2/4

LT-HSC	Long-term HSC
M	Molaire
M	Phase de mitose du cycle cellulaire
MAD	Max Dimerization Protein
MAPk	Mitogen-Activated-protein kinase
MAX	MYC associated factor X
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MegP	Progéniteur des mégacaryocytes
MEP	Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitor
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
MNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1
MPP	Prégéniteur multipotent
mSIN3A	Mammalian Sin 3 A Protein
MTGR1	Myeloid Tumor Related Gene 1
MXI	Max Interacting Protein 1
MYC	Myelocytomatosis Oncogene Protein
MYF3	Myogenic Factor 3/5
MyoD	Myogenic Differentiation Protein
N-CoR	Nuclear Receptor Co-Repressor
NES	Nuclear Export Signal
NeuroD	Neurogenic Differentiation Protein
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NK	Cellules tueuses naturelles
NLS	Nuclear Localization Signal
NPC	Nuclear Pore Complex
Nt	Domaine amino-terminal
OTX-1	Orthodenticle Homolog-1
P/CAF	p300/CBP-Associated Factor
P/CAF	p300/CBP-Associated Factor
p21	Ras-Oncogene-Encoded p21 Protein
p300	Protein p300
P4.2	Protein 4.2 Gene
PAS	Domaine protéique nommé d'après les protéines : Per- period circadian protein, Arnt- Ah receptor nuclear translocator protein et Sim- single-minded protein
Pb	Paire de bases

<i>Pbx</i>	Pre-B-cell Leukemia Transcription Factor
Pi3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PLZF	Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein
Pré-T	Précurseur commis des lymphocytes T
Pro-B	Progéniteur des lymphocytes B
Pro-NK	Progéniteur des cellules NK
Pro-T	Progéniteur des lymphocytes T
PTH	Parathyroid Hormone
PTP-1D	Protein-tyrosine phosphatase-1D
PTP-1D	SH2 Domain-containing Tyrosine Phosphatase
PU.1	Purine-Rich Protein 1
QPCR	Quantitative PCR
<i>Rag</i>	Recombination Activating Gene
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand
RAR α	Retinoic Acid Receptor Alpha
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RUNX1	Runt-related Transcription Factor 1 Protein
<i>Runx2</i>	Runt-related Transcription Factor 1 Gene
<i>Runx2^{-/-}</i>	Knock-out Mice for the Runt-related Transcription Factor 2 gene
S	Phase de réplication de l'ADN du cycle cellulaire
SCA-1	Spinocerebellar Ataxia Protein 1
<i>Scl^{-/-}</i>	Souris délétée pour le gène SCL
<i>Scl^{tg}</i>	Souris transgénique pour le gène SCL
<i>Scl</i>	Stem Cell Leukemia Gene
SCL	Stem Cell Leukemia Protein
SCL-FL	Mutant d'interaction avec E2A
SCL-M13	Mutant d'interaction avec les protéines LMO
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SF	Steel Factor, Ligand of c-kit
<i>Sil</i>	TAL1 (SCL) Interrupting Locus
SIN3A	Histone deacetylase complex subunit Sin3a
<i>SL3-3</i>	Murine Leukemia Virus SL3-3
Smac	Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase
SP1/3	Sp1/3 Transcription Factor
SPI-B	Facteur de Transcription SPI-B de la famille ETS

SREBP-1	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1
<i>Sst2</i>	Gène encodant le récepteur Somatostatin-2
ST-HSC	Short-time HSC
T	Thymidine
TAF	TATA box-Binding Protein Associated Factor
T-ALL	Leucémies lymphoïdes aiguës des cellules T chez l'enfant
TAL-RE	Novel Protein Recognition Motif in the Silencer of SCL
TAP	Tandem-Affinity Purification for proteins
TATA	Site consensus de liaison à l'ADN
TBP	TATA Binding Protein
TCR α/β	Récepteur des cellules T alpha/beta
TER119	Marqueur de surface pour les érythrocytes
TFE3	Transcription factor binding to IGHM enhancer 3
TFII-D	TAF RNA Polymerase II-D
TIE2	Tyrosine Kinase with Immunoglobulin and Epidermal Growth Factor Homology Domains-2
TNF- β	Tumour-Necrosis-Factor- β
TOF	Time-of-Flight
TOP	Terminal Oligopyrimidine Tract
TPO	Thrombopoïétine
uORF	Upstream Open Reading Frame
<i>Vegf</i> ^{lo/lo}	Homozygous VEGF Hypomorph Mice
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wild Type / Sauvage

DÉDICACE

À tous ceux qui ont cru en moi ...

REMERCIEMENTS

Ce que représentent pour moi ces trois dernières années... La découverte... Tout simplement... La découverte de la science, de la recherche, de l'endurance, de la persévérance, des mes limites, de ma curiosité et enfin de la vie...

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de laboratoire, Dr Trang Hoang, pour avoir su m'offrir un environnement d'étude qui m'a permis de me surpasser. J'ai énormément appris dans votre laboratoire, tant sur le plan académique que technique. J'aimerais également remercier tous les membres de mon laboratoire pour leur présence dans les moments difficiles, leurs blagues, les mauvais-coups pour taquiner, leur compagnie aux nombreux 5@7 le vendredi et bien évidemment pour leurs précieux conseils. Et surtout merci encore une fois pour avoir enduré mes gaffes et cafouillages pendant tout ce temps ! Je ne pourrais pas oublier de remercier tout particulièrement Mathieu Tremblay qui m'a tellement aidé pendant ces années au laboratoire grâce à son esprit scientifique.

Je tiens à remercier ma famille qui m'a vraiment aidée et encouragée pendant ces trois années. Votre soutien inconditionnel a été très important pour moi, et je vous attribue une grande part à cette réalisation pour laquelle j'ai travaillé si fort.

Que dire du soutien que m'ont apporté mes copines Stéfanie Miller, Vicky Arsenault et Justine Rousseau !! Et de mon très cher ami Guillaume Thibault ! J'ai vraiment apprécié votre écoute et vos conseils. Tous ces petits moments où vous avez pris soin de moi, je m'en rappellerai toujours ! J'aimerais également ajouter un gros merci à tous ceux que je ne peux nommer !!

J'aimerais finalement prendre le temps de remercier le Fonds de la Recherche en Santé du Québec ainsi que du programme de Biologie Moléculaire pour leur soutien financier pendant ma maîtrise.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

Depuis les microorganismes unicellulaires apparus sur terre il y a des milliards d'années, l'évolution a permis une spécialisation et une collaboration entre les cellules pour former des organismes ayant des structures de plus en plus complexes. Le corps humain, avec ses milliards de cellules différentes interagissant les unes avec les autres, ressemble à une machine dont chaque circuit dépend du bon fonctionnement des autres. L'homéostasie du corps doit être régulée très finement, et le système hématopoïétique y joue un rôle crucial. Que ce soit en transportant de l'oxygène, en détruisant les microbes ou en permettant la coagulation, les différentes cellules hématopoïétiques ont des fonctions particulières et l'équilibre entre chacune de ces populations doit absolument être maintenu ou rétabli suite à un stress.

Cette revue de littérature s'attardera à introduire les concepts clés de l'hématopoïèse, les différents mécanismes moléculaires nécessaires à sa régulation ainsi que les différents événements cellulaires pouvant conduire à l'apparition d'une leucémie. Plusieurs facteurs de transcription interviennent au cours de l'hématopoïèse et les facteurs SCL, E2A et HEB y exercent des fonctions vitales. Les rôles de ces facteurs de transcription de la famille des protéines à motif bHLH (basic Helix-loop-helix) dans le complexe transcriptionnel SCL seront discutés en détail tout au long de mon mémoire.

1.1 L'HÉMATOPOÏÈSE

1.1.1 Définition

L'hématopoïèse est un processus hiérarchique permettant à des cellules souches hématopoïétiques (HSC) multipotentes de se diviser successivement vers les progéniteurs puis vers une douzaine de lignées matures, en réduisant graduellement leur potentiel prolifératif de manière irréversible et en acquérant des propriétés fonctionnelles particulières (Figure I).

1.1.2 Les cellules souches hématopoïétiques

Le processus complexe qu'est l'hématopoïèse repose essentiellement sur une toute petite population de cellules de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (HSC). L'activation de patrons de gènes spécifiques au cours du développement embryonnaire permet la spécification du destin de ces cellules. Ce type cellulaire primitif présente trois caractéristiques fondamentales. Tout d'abord, les HSC sont capables de s'auto-renouveler indéfiniment, c'est-à-dire de générer d'autres HSC pour conserver le bassin de ces cellules pendant toute la durée de vie. De plus, elles présentent un potentiel de prolifération cellulaire très élevé pour expandre la population de cellules hématopoïétiques en fonction des besoins de l'organisme (Figure II). Les HSC sont également caractérisées par leur capacité à se différencier de manière progressive pour former plusieurs types cellulaires, en limitant le potentiel des progéniteurs à chaque stade de différenciation (Lessard et al., 2004) (Figure I).

Les HSC ne sont pas en perpétuel processus d'auto-renouvellement. En effet, elles sont retrouvées dans un état quiescent *in vivo* dans la moelle osseuse (Hall and Watt, 1989; Potten and Loeffler, 1990). Le cycle cellulaire des eucaryotes supérieurs comprend quatre phases qui se succèdent dans l'ordre suivant: la phase de croissance et préparation de la réplication de l'ADN (G_1), la phase de synthèse de l'ADN (S), la phase de croissance et préparation à la mitose (G_2) et la phase de mitose (M) durant laquelle il y a partage des chromosomes entre les cellules filles. Après la mitose, les cellules retournent en G_1 ou entrent en G_0 , un stade quiescent de non-division (Malumbres and Barbacid, 2001). Dans la moelle osseuse, environ 75% des HSC sont retrouvées en phase G_0 , permettant à l'organisme de conserver un bassin de HSC saines et intactes. (Cheshier et al., 1999) En effet, chaque cycle de réplication cellulaire accélère l'érosion des télomères, accroît la possibilité de mutagenèse en plus d'augmenter l'exposition aux R.O.S. (Reactive Oxygen Species). Le contrôle du cycle cellulaire des HSC dans un état de quiescence permet ainsi de conserver à long terme leur capacité de cellule souche, tout en étant capable de répondre aux besoins de l'organisme lorsqu'un stress physiologique survient.

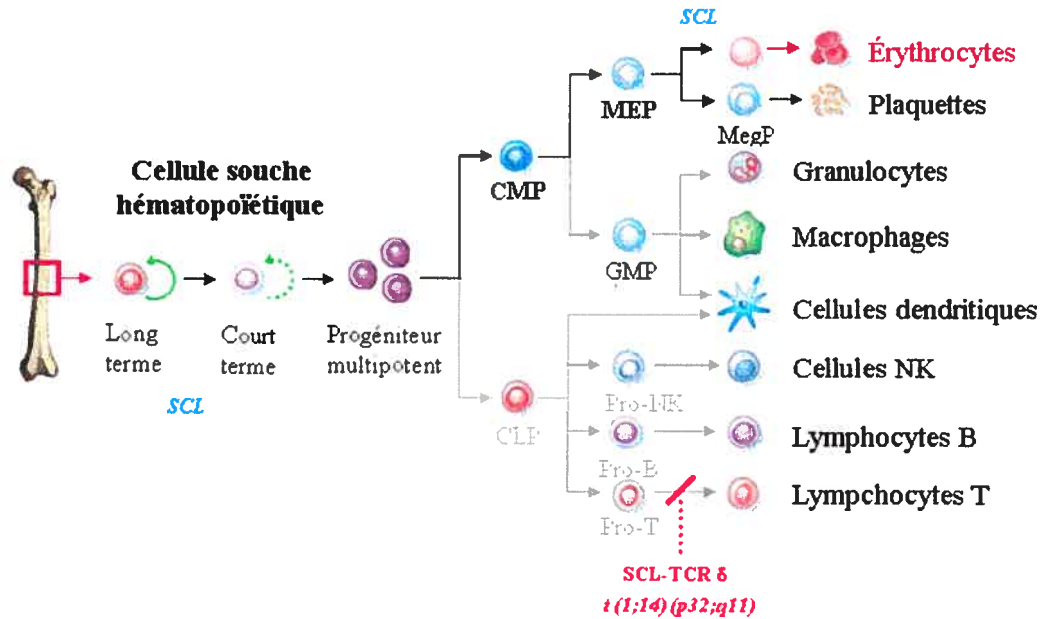


Figure I L'hématopoïèse normale chez l'adulte

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) au potentiel prolifératif variable se différencient en progéniteurs multipotents ne pouvant plus s'auto-renouveler. Ils donnent naissance aux progéniteurs des lignées spécifiques (CMP et CLP). Les CLP se différencient progressivement en lymphocytes T, B et cellules NK alors que les CMP génèrent les MEP et les GMP qui engendrent respectivement les érythrocytes / mégacaryocytes et les granulocytes / macrophages. Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: [Nature] (Reya et al., 2001), copyright (2001).

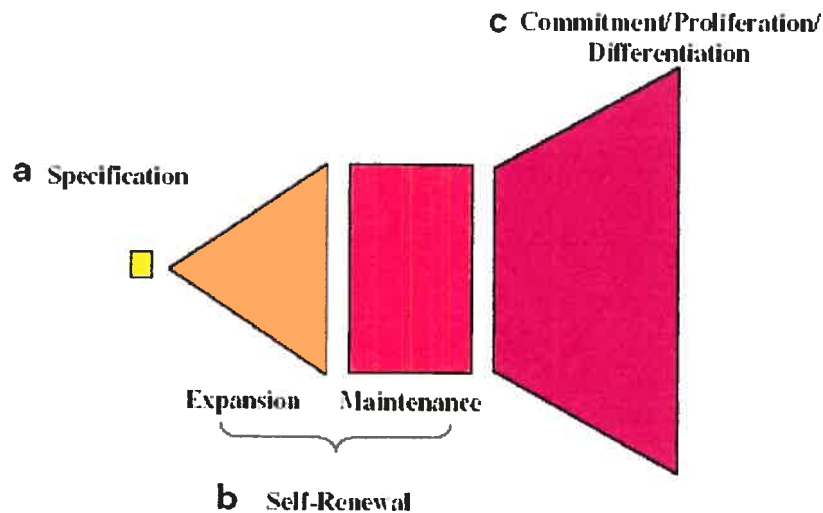


Figure II Les caractéristiques du système hématopoïétique

Au moins trois programmes génétiques sont requis pour le développement du système hématopoïétique. (a) La spécification ou genèse des HSC (jaune), (b) l'auto-renouvellement des HSC, incluant l'expansion (orange) et le maintien (rouge) et (c) l'engagement, la différenciation et la prolifération vers une lignée cellulaire particulière (pourpre). Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: [Nature] (Lessard et al., 2004), copyright (2004)

L'existence des HSC a d'abord été révélée par la transplantation de moelle osseuse dans une souris irradiée de manière à détruire son système hématopoïétique. Des cellules clonogéniques appelées CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen) apparaissaient sur la rate en formant des colonies et elles démontraient une grande capacité d'auto-renouvellement et de prolifération suite à une transplantation secondaire. Ces observations ont donné naissance au concept de cellule souche. (TILL and McCULLOCH, 1961; BECKER et al., 1963)

L'identification de protéines de surface spécifiques aux HSC permet de les analyser et de les purifier par cytométrie en flux. D'après les travaux d'Akashi et ses collègues (Akashi et al., 2000), les HSC sont maintenant triées en fonction de l'expression des marqueurs de cellules souches c-KIT et SCA-1 ainsi que par l'absence des marqueurs de lignées matures (Lin^-) tel que GR1 (granulocytes), CD11b (monocytes/macrophages), TER119 (érythrocytes), B220 (lymphocytes B), FC ϵ RI (mastocytes) et IL7 (lymphocytes T). Des colorants comme le Hoechst ou la rhodamine peuvent également être utilisés pour marquer les HSC. Elles sont systématiquement moins colorées puisqu'elles possèdent des transporteurs ABC, tel que BCRP1 qui rejettent ces marqueurs colorimétriques. (Zhou et al., 2001; Chen et al., 2003)

Cette population de HSC triée dite KSL ($\text{Kit}^+\text{Sca}^+\text{Lin}^-$) demeure tout de même hétérogène puisqu'on retrouve des HSC aux potentiels d'auto-renouvellement différents. Ce constat a été réalisé suite à des études fonctionnelles où une seule HSC triée est transplantée chez un hôte dont le système hématopoïétique a été détruit. Cette unique HSC permet la reconstitution de tout le système hématopoïétique pour quelques mois (ST-HSC, Short-Term HSC) ou encore, le reconstitue pour le restant de la vie de l'hôte (LT-HSC, Long-Term HSC) (Morrison and Weissman, 1994).

Des études fonctionnelles permettent de révéler le rôle de certains gènes régulant les HSC. En forçant leur expression dans la moelle par des rétrovirus ou en croisant des souris transgéniques pour ces gènes, il est possible d'évaluer des différences dans leurs propriétés de prolifération, d'auto-renouvellement et de différenciation par leur culture

en milieu semi-solide ou par des transplantations dans des souris hôtes. Ainsi, il est possible de déterminer l'effet du gène étudié sur l'hématopoïèse normale et la leucémogénèse (Figure III).

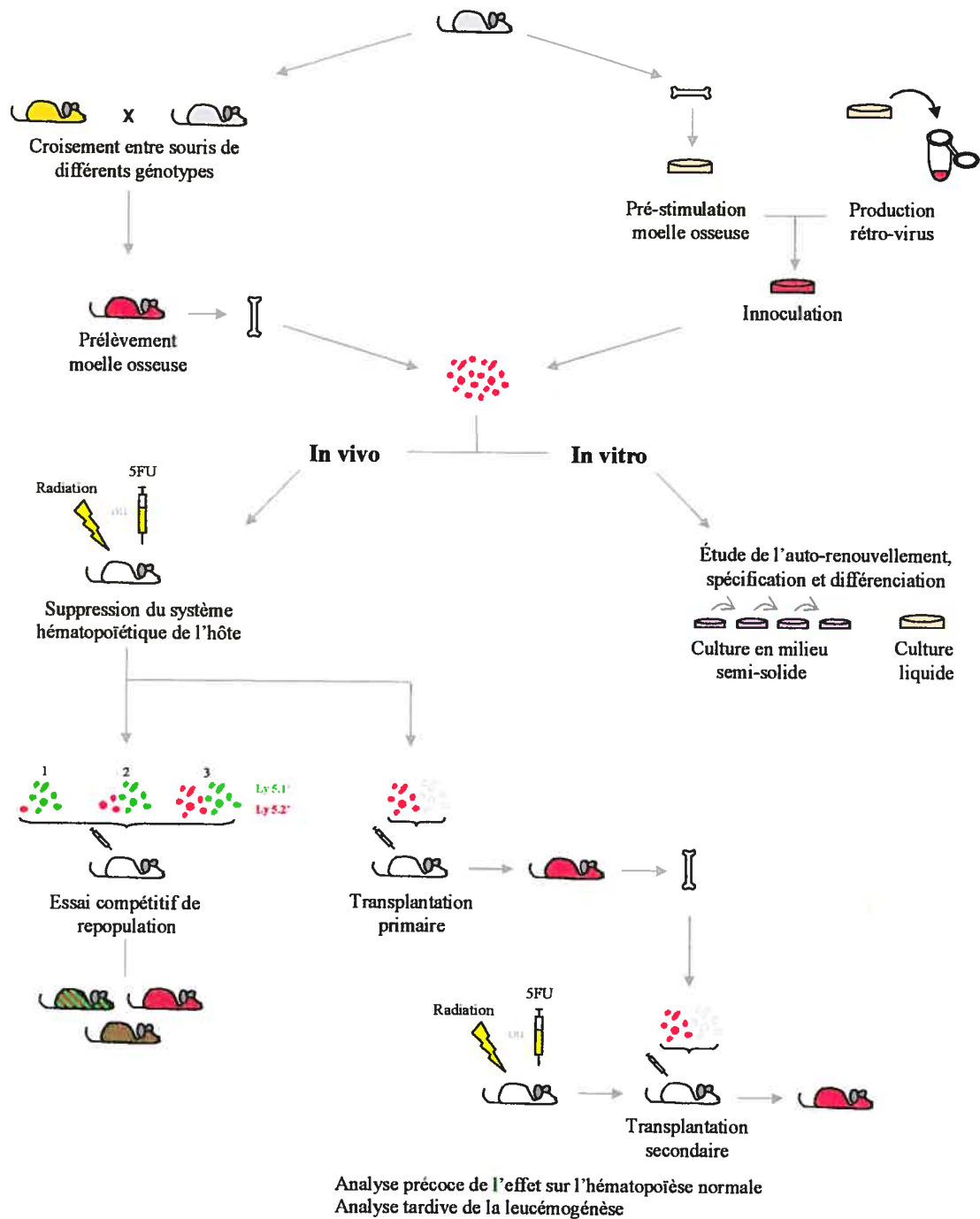


Figure III La caractérisation des HSC par des études fonctionnelles
Schéma illustrant quelques stratégies pour étudier de manière fonctionnelle le système hématopoïétique.

1.1.3 Les progéniteurs et les différentes lignées hématopoïétiques

Les HSC se différencient tout d'abord en progéniteurs, soit vers la voie lymphoïde (CLP, Common Lymphoid Progenitor) ou soit vers la voie myéloïde (CMP, Common Myeloid Progenitor). À partir de ces progéniteurs multipotents, il y a ensuite formation de précurseurs engagés vers les lignées érythroïdes, myéloïdes ou lymphoïdes. (Orkin, 2000; Passegue et al., 2003) (Figure I)

La réponse immunitaire adaptative hautement spécifique pour un pathogène particulier est assurée par la lignée lymphoïde. Les progéniteurs de cette lignée, les CLP, génèrent les progéniteurs des cellules B (Pro-B) dans la moelle osseuse et les progéniteurs des cellules T (Pro-T) qui vont migrer vers le thymus pour y poursuivre leur maturation. Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale en produisant des anticorps. Ils se différencient au niveau moléculaire par le réarrangement des gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines ainsi que par l'acquisition d'antigènes de surface qui caractérisent les lymphocytes B. Les Pro-B deviennent successivement des Pré-B, des cellules B immatures puis des lymphocytes B matures, mais naïfs. Suite à une activation par un antigène, ils se transforment en plasmocytes producteurs d'anticorps puis en cellule B mémoire (Engel and Murre, 2001).

Lorsque les précurseurs T arrivent dans le thymus, leur différenciation est marquée par plusieurs événements. C'est le réarrangement des gènes codant pour le récepteur T (TCR) qui permet de passer de Pro-T aux différents stades de Pré-T (DN1 à DN4). Les thymocytes passent ensuite de manière transitoire par le stade DP (CD4+CD8+) avant la différenciation terminale. Il y a alors génération de deux sous-populations responsables de l'immunité cellulaire, soit les lymphocytes T de phénotype auxiliaire (CD4+) principaux producteurs de cytokines régulatrices de la réponse immune ou soit les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) (Engel and Murre, 2001).

La différenciation des cellules NK (Natural Killer) s'effectue à partir de progéniteurs retrouvés dans la moelle osseuse, les Pro-NK. Ces cellules tueuses assurent une

réponse immunitaire non spécifique dans le cas d'une infection virale ou d'une transformation maligne. Les cellules transformées cessent d'exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), ce qui pousse spontanément les cellules NK à éliminer ces cellules anormales. Elles libèrent soit le TNF- β , une cytokine à activité cytotoxique ou de l'IFN- γ pour activer les macrophages. (Filep et al., 1996)

L'immunité innée permettant une protection immédiate contre différents pathogènes est assurée par la lignée myéloïde. Les CMP (Common Myeloid Progenitor) engendrent deux autres progéniteurs plus différenciés, les GMP (Granulocyte-Monocyte Progenitor) et les MEP (Megakaryocyte-Erythroid Progenitor). Les GMP se différencient en monocytes dont la fonction principale est la phagocytose. Après un bref séjour dans le sang, le monocyte migre rapidement dans les tissus par diapédèse où il se transforme en macrophage suite à son activation. Les macrophages assurent la défense de première ligne en phagocytant pathogènes et débris cellulaires ainsi qu'en produisant des protéines antimicrobiennes et des cytokines pro-inflammatoires. Ils activent ensuite les cellules lymphoïdes en leur présentant des antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Les GMP se différencient aussi en granulocytes ou neutrophiles pour intervenir dans les réactions de défense non-spécifiques. Attirés par chimiotactisme, ils reconnaissent la cible, la phagocytent et la dégradent grâce aux lysosomes qui produisent plusieurs substances bactéricides (Barreda et al., 2004).

Les MEP donnent lieu à la lignée érythroïde par leur différenciation successive en proérythroblastes puis en érythroblastes. C'est grâce à l'érythropoïétine (EPO) que la maturation finale des érythrocytes s'effectue, via une réduction progressive du volume cellulaire et une condensation de la chromatine avant l'énucléation du globule rouge. Ils peuvent alors transporter l'oxygène et le dioxyde de carbone grâce aux tétramères d'hémoglobine. Les précurseurs MEP génèrent aussi les mégacaryocytes qui, une fois stimulés par la thrombopoïétine (TPO), produisent les plaquettes essentielles à la coagulation sanguine. Les différentes cellules de la voie érythroïde jouent donc un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme.

1.1.4 Développement du système hématopoïétique

L'établissement de l'hématopoïèse s'effectue en plusieurs étapes dans différentes régions embryonnaires, en commençant par une phase primitive suivie de la phase définitive. Cette complexité nécessite une coordination spatio-temporelle de l'expression génique afin d'assurer la régulation de l'embryogénèse (Figure IV).

Suite à leur fertilisation, les gamètes murins se divisent jusqu'à la formation de la morula. Elle se transforme alors en blastocyste où une masse de cellules regroupées (ICM, Inner Cell Mass) commence à former le double feuillet de l'épiblaste et de l'hypoblaste (Zon, 1995). Pendant la gastrulation, les cellules de l'épiblaste commencent à s'invaginer et les cellules qui colonisent cet espace vont former le mésoderme, le feuillet d'où proviennent toutes les cellules hématopoïétiques (Kinder et al., 1999). En plus de donner naissance aux composantes embryonnaires du système vasculaire et hématopoïétique, le mésoderme contribue aussi aux structures extra-embryonnaires, dont le sac vitellin. C'est au jour E7.0 que les îlots sanguins commencent à s'y développer et que ces derniers vont générer des globules rouges primitifs exprimant les gènes de globines embryonnaires (ζ , ϵ/β H1) (Wong et al., 1986). Cette première vague de l'hématopoïèse primitive assure temporairement un apport d'oxygène suffisant à l'embryon suite à l'établissement de la circulation au jour E8.25 (Zon, 1995).

Il subsiste un dilemme quant à l'origine des précurseurs du système hématopoïétique. En effet, le sac vitellin demeure actif dans la production de certains progéniteurs de l'hématopoïèse définitive jusqu'au jour E12.5 malgré le fait que globules rouges primitifs disparaissent au jour E9.0 (Palis et al., 1999). Cependant, l'AGM (Aorto-Gonado-Mésonéphros), une région intra-embryonnaire d'origine mésodermale, commence elle aussi à générer des précurseurs hématopoïétiques au jour E7.5. (Medvinsky et al., 1993; Sanchez et al., 1996). C'est également dans cette région que les premières HSC définitives ont été retrouvées (Jaffredo et al., 2005). De plus, les précurseurs retrouvés dans l'AGM, nommés les hémangioblastes, sont à la fois des précurseurs de la lignée vasculaire et de la lignée hématopoïétique, soulignant un peu plus l'hypothèse selon laquelle l'hématopoïèse définitive proviendrait

vraisemblablement plus de l'AGM que du sac vitellin. (Jaffredo et al., 1998; Kubo and Alitalo, 2003).

Suite à une colonisation de cellules d'origine intra ou extra-embryonnaire, le foie fœtal devient donc le siège de l'hématopoïèse définitive à partir du jour E9.5, et ce jusqu'à la naissance. (Morrison et al., 1995). Les HSC responsable de l'hématopoïèse définitive chez l'adulte migreront alors vers leur destination finale, la moelle osseuse (Figure IV).

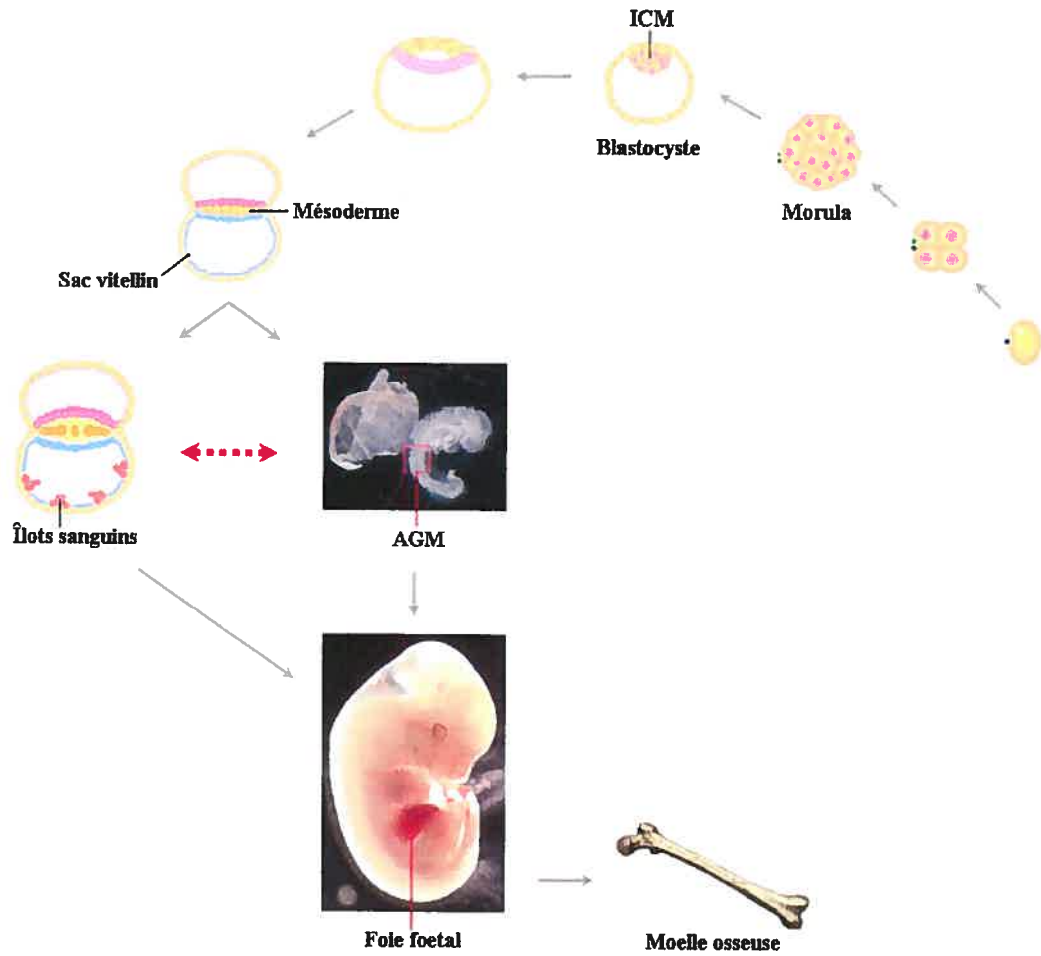


Figure IV L'origine du système hématopoïétique

Les gamètes fécondés se divisent pour former la morula puis le blastocyste. La gastrulation génère le mésoderme. Les cellules sanguines d'origine extra-embryonnaire apparaissent dans les îlots sanguins du sac vitellin. Des précurseurs hématopoïétiques d'origine intra-embryonnaire sont retrouvés dans la région de l'AGM. Les cellules responsables de l'hématopoïèse définitive colonisent ensuite le foie fœtal, et migrent dans la moelle osseuse avant la naissance. L'utilisation des photos d'embryons prises par Richard Martin pendant ses études doctorales a été permise par ce dernier (Annexe 4).

1.1.5 L'apoptose

Toutes les cellules du système hématopoïétique possèdent un processus de mort cellulaire programmée. En plus de renouveler constamment le bassin de cellules fonctionnelles, l'apoptose permet d'éliminer les cellules auto-réactives lors de la sélection du répertoire immunologique.

L'apoptose est activée par différents mécanismes (Figure V). La voie endogène est déclenchée par des altérations à l'intégrité de la membrane mitochondriale. Des dommages intracellulaires activent les protéines sentinelles BH3 retrouvées dans le cytosol ou associées au cytosquelette. Elles antagonisent l'activité des protéines pro-survie, comme le stabilisateur de la membrane mitochondriale BCL-2. Les BH3 s'oligomérisent pour former des pores permettant le relargage du cytochrome C dans le cytosol, ce qui active la procaspase-9 par un clivage auto-catalytique. La réaction en chaîne qui en résulte active ainsi tous les médiateurs de l'apoptose. Normalement, les procaspases initiatrices de la voie endogène sont inhibées par les IAP. Cependant, les protéines mitochondriales DIABLO et SMAC les inhibent à leur tour lorsque l'apoptose est enclenchée dans la cellule (Cory and Adams, 2002).

La voie exogène de l'apoptose est médiée par l'activation à la surface des cellules des récepteurs de mort cellulaire, dont les récepteurs de la famille TNF. Une fois activé par son ligand, le domaine intracellulaire du récepteur s'associe avec la protéine d'échafaudage FADD qui recrute et active les procaspases initiatrices 8 et 10. La voie exogène peut être régulée par FLIP qui lie ces procaspases initiatrices et empêche leur activation au complexe de signalisation (Igney and Krammer, 2002).

Le déclenchement de l'apoptose repose sur un équilibre fragile entre les molécules pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Une fois activées, les caspases initiatrices déclenchent des cascades d'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7. Ces caspases clivent de nombreux substrats cellulaires qui induisent des modifications biochimiques et morphologiques caractéristiques au processus d'apoptose. Ainsi, le clivage des lamines

nucléaires et le relargage d'endonucléases permet la condensation et la fragmentation de la chromatine. En plus de la fragmentation du cytosquelette, cette destruction progressive de la cellule mène à la formation de corps apoptotiques. Ces structures sont finalement reconnues et détruites par les macrophages (Cory and Adams, 2002).

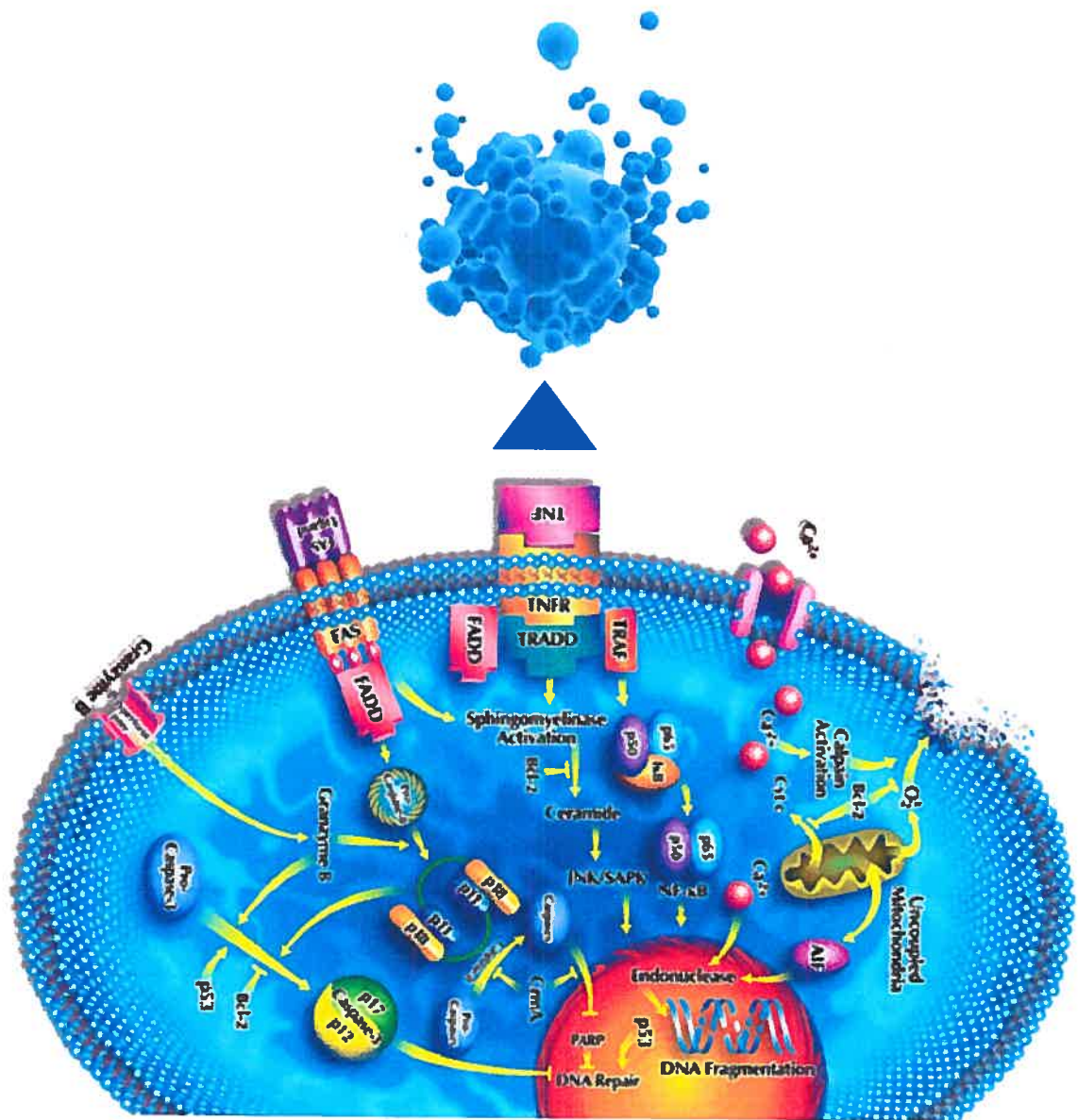


Figure V L'apoptose

Schéma de l'apoptose résumant les différents effecteurs des voies d'activation endogènes et exogènes. Reproduit avec la permission d'EMD Biosciences-Calbiochem.

1.1.6 La leucémie

Les cellules leucémiques parviennent à survivre indéfiniment en échappant au mécanisme d'apoptose. Elles ne réagissent plus aux signaux de régulation de l'environnement normalement essentiels pour promouvoir la survie des cellules hématopoïétiques. L'équilibre entre l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation est alors perturbé. Ces cellules transformées présentent des translocations chromosomiques ou des mutations ponctuelles qui provoquent un arrêt de la différenciation ainsi qu'une augmentation spectaculaire de son potentiel de prolifération (Bockamp et al., 1994; Look, 1997). En remplaçant les cellules effectrices normales, les cellules leucémiques engendrent une dégénérescence de la moelle osseuse normale qui ne peut répondre aux besoins de l'organisme (Medline, 2005).

La leucémie ALL (Acute Lymphocytic Leukemia) est causée par une prolifération massive de précurseurs immatures lymphoïdes B ou T. Ce cancer très agressif représente près de 80% des cas de leucémies infantiles (Medline, 2005). L'exemple de la translocation $t(1;14)(p32;q11)$ permet de comprendre l'importance du contrôle de l'expression des gènes clés de la régulation de la lymphopoïèse. En effet, le gène SCL se retrouve alors sous le contrôle des éléments de régulation du TCR δ causant ainsi son expression erronée dans le compartiment lymphoïde. Il forme alors des complexes illégitimes et modifie l'expression de certains gènes (Begley et al., 1989a) (Figure I).

La leucémie APL (Acute Promyelocytic Leukemia) affecte les adultes et les enfants. Une des translocations chromosomiques les plus étudiées implique les gènes PLZF et RAR α dans la translocation $t(11;17)(q23;q21)$. Nous avons montré au laboratoire que l'oncogène RAR α -PLZF inhibe la différenciation myéloïde par une interaction directe avec C/EBP α . La désacétylation subséquente de la chromatine est causée par le recrutement de HDAC1 (Histone Déacétylase 1), ce qui perturbe l'expression des gènes cibles de C/EBP α . (Girard et al., 2005, En soumission). De plus, l'oncogène complémentaire PLZF-RAR α agit comme dominant négatif sur PLZF. La transcription de ses gènes cibles est alors grandement affectée (Melnick and Licht, 1999).

La leucémie CML (Chronic Myelogenous Leukemia) est représentée 20% de tous les cas de cancers retrouvés chez les adultes et les enfants (Medline, 2005). Des analyses cytogénétiques par FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) ont révélé dans 95% des cas la présence anormale du chromosome de Philadelphie, résultant de la translocation chromosomique $t(9;22)(q34;q11)$. La conséquence moléculaire de cette translocation est la création du gène BCR-ABL provenant de la fusion de l'oncogène ABL avec une séquence du gène BCR (Sawyers, 1999). L'oncogène tyrosine-kinase BCR-ABL peut alors d'auto-activer et cette activité accrue provoque la prolifération des précurseurs myéloïdes immatures (Mauro and Druker, 2001).

La leucémie AML (Acute Myeloid Leukemia) peut se développer à n'importe quel âge, mais affecte particulièrement les adultes et les enfants de moins d'un an (Medline, 2005). La translocation chromosomique $t(8;21)(q22;q22)$ causant le plus fréquemment ce type de leucémie implique les gènes *Aml* et *Eto*. La protéine de fusion générée pourrait donc contribuer à la leucémogénèse en interagissant avec des complexes de co-répresseurs nucléaires, tel que les histones déacétylases et les méthyltransférases. Ces nouvelles interactions entraînent la répression de gènes cibles, ce qui inhibe l'hématopoïèse normale et bloque la différenciation érythroïde (Grisolano et al., 2003).

Les leucémies représentent moins de 5% de tous les cancers, mais elles constituent néanmoins 40% des cas de cancers chez les enfants (Medline, 2005). L'augmentation de la fréquence de cette pathologie chez les enfants peut être expliquée par l'immaturation du système hématopoïétique lorsque ces événements génétiques surviennent, empêchant ainsi la détection de ces cellules transformées. La leucémie chez l'adulte peut être causée par un traitement de chimiothérapie pour un autre cancer, des radiations ionisantes ou par des facteurs génétiques. Si la combinaison de la chimiothérapie et de la radiothérapie ne réussit pas à détruire totalement le lymphome, le patient doit généralement subir une transplantation de moelle osseuse compatible. Cette greffe représente alors un dernier espoir pour ces patients (Medline, 2005) (Figure VI).

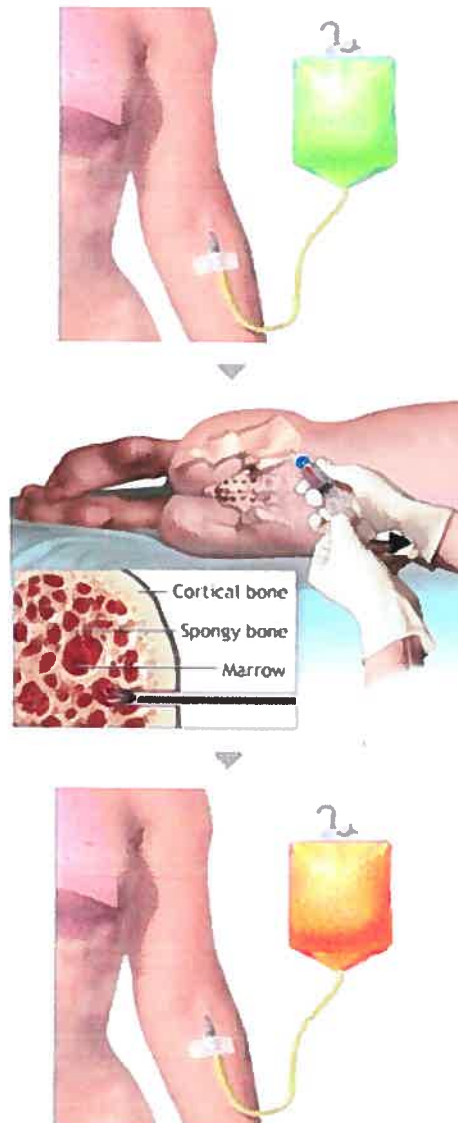


Figure VI Guérir la leucémie par la greffe de moelle osseuse

Suite à la destruction de toutes les cellules hématopoïétiques du patient (haut), la moelle osseuse du donneur compatible est prélevée (milieu) et transplantée par transfusion sanguine (bas). (Adapté avec la permission de Medline, 2005)

1.2 LES RÉGULATEURS DE L'HÉMATOPOÏÈSE

Puisque l'hématopoïèse est un système hiérarchique hautement dynamique, il doit répondre à des stimuli pour moduler la formation et l'activité des cellules hématopoïétiques en fonction des besoins de l'organisme.

1.2.1 Les facteurs extrinsèques

Les signaux extrinsèques à la cellule hématopoïétique sont en fait des hormones, des facteurs de croissance ou encore des cytokines sécrétés dans l'environnement par d'autres cellules. Ces signaux qui assurent la survie de la cellule hématopoïétique enclenchent également la différenciation cellulaire. Les contacts cellule-cellule ou cellule-matrice peuvent aussi influencer la cellule hématopoïétique, via les cadhérines, les intégrines ou les jonctions GAP. Ces stimuli activent des cascades de signalisation dans la cellule. Grâce à leur nombreux intermédiaires qui s'activent de façon séquentielle, les voies de signalisation transmettent des signaux depuis l'extérieur de la cellule jusqu'au noyau, causant une activation spécifique de programmes génétiques.

Le rôle crucial des molécules de signalisation est illustré par l'influence de l'érythropoïétine (EPO) dans la différenciation des érythrocytes, induite rapidement en cas d'hypoxie. Cette cytokine est essentielle puisque les souris déficientes en l'EPO ou pour son récepteur meurent au jour embryonnaire E13.5 dû à un problème de l'érythropoïèse définitive (Wu et al., 1995). Ces souris peuvent toujours produire des progéniteurs érythroïdes à des niveaux presque normaux, mais incapables de se différencier en érythrocytes matures. Dans notre laboratoire, il a été possible d'identifier que la stimulation de EPOr stimule la voie de signalisation de ERK1/2-MNK1-eIF4E. Les effecteurs de cette voie de signalisation conduisent à une augmentation de l'expression du gène SCL, ce qui promouvoit la survie et la différenciation érythroïde (Lahlil et al., 2005, En soumission).

De plus, l'environnement cellulaire influence grandement le destin des cellules hématopoïétiques. Des études de transplantation de cellules souches adultes dans des

blastocystes ont permis de démontrer l'importance de l'environnement cellulaire. Une fois transplantées, les HSC adultes réexpriment les gènes de globine embryonnaires, plutôt que les globines adultes. Similairement, des progéniteurs embryonnaires ou fœtaux transplantés dans des hôtes adultes commencent à exprimer des gènes de globine adulte (Geiger et al., 1998). Ainsi, les cellules souches et les progéniteurs semblent être influencés ou reprogrammés par leur environnement.

1.2.2 La niche hématopoïétique

Les HSC sont donc soumises à une régulation par des signaux extérieurs émis principalement par leurs cellules voisines dans la niche hématopoïétique. Ce micro-environnement est composé par une population hétérogène de cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC) comprenant des fibroblastes, des macrophages, des cellules endothéliales et des adipocytes. (Taichman, 2005) (Figure VII).

La création de la niche hématopoïétique est enclenchée par les ostéoclastes. Leur activité protéolytique permet une résorption de l'os dans la région trabiculaire. (Rodan and Martin, 1981; Roodman, 2004). Les ostéoclastes sont des cellules hématopoïétiques dont l'expansion et la maturation est engagée par les ostéoblastes via la sécrétion de RANKL, de M-CSF ou de la PTH (Yasuda et al., 1998). Les ostéoblastes induisent la colonisation de la niche par les HSC en médiant des interactions cellule-cellule et en sécrétant des molécules de signalisation. Par exemple, le ligand ANG-1 du récepteur tyrosine kinase TIE2 exprimé par les HSC, permet une forte adhésion des HSC aux ostéoblastes dans la niche. Cette forte adhésion à la niche favorise la quiescence des HSC empêchant ainsi la déplétion de la population de HSC responsable de la reconstitution à long terme du système hématopoïétique (Arai et al., 2004).

L'importance de la niche sur le développement du système hématopoïétique a été révélée notamment par la délétion du gène encodant le facteur de transcription *Runx2*. Les multiples malformations de ces souris qui meurent peu après la naissance démontrent une perturbation majeure du développement osseux. De plus, le squelette de ces animaux est totalement vide de moelle osseuse. Ces défauts sont causés par un arrêt

de la maturation des ostéoblastes (Lee et al., 1997; Ducy et al., 1997). La délétion de *Runx2* en tant que tel ne semble pas affecter l'hématopoïèse, puisque l'ontogénie et le nombre de précurseurs hématopoïétiques retrouvés dans le sac vitellin au jour E10.5 et dans le foie fœtal au jour E12.5 est similaire aux souris normales. Toutefois, ces animaux développent une hématopoïèse extra-médullaire excessive dans le foie et la rate juste avant la naissance (Deguchi et al., 1999).

En temps normal, le processus de développement osseux coordonne la création de la niche dans les cavités nouvellement creusées dans l'os et le cartilage embryonnaire avec la migration des précurseurs hématopoïétiques. Il semble donc que la migration des précurseurs hématopoïétiques *Runx2*^{-/-} soit perturbée à une période cruciale où ils auraient dû migrer vers la niche hématopoïétique de la moelle osseuse, témoignant de l'importance de ce micro-environnement.

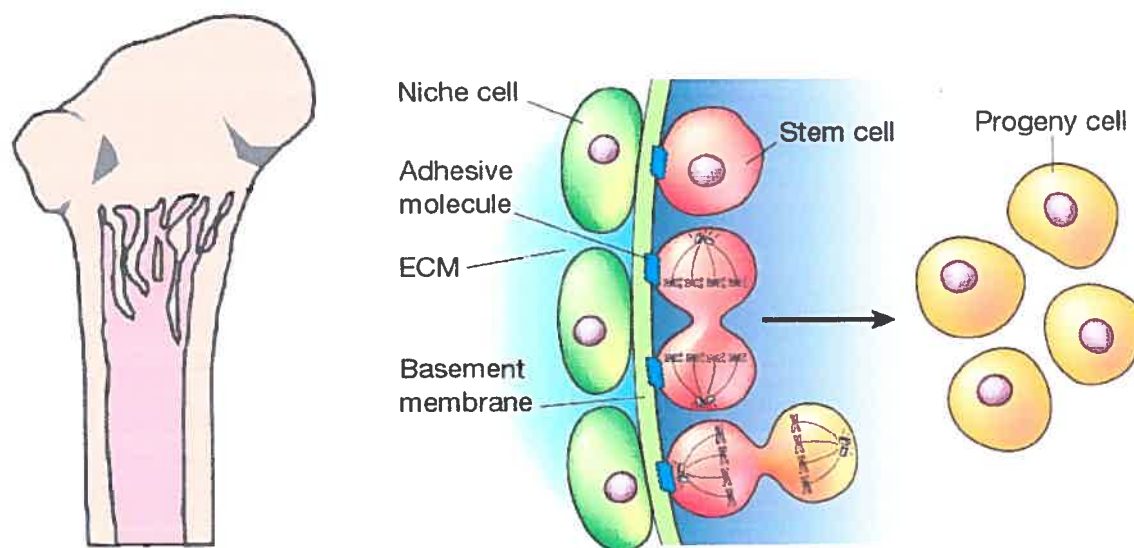


Figure VII La niche hématopoïétique

Les cellules de la niche (vert) retrouvées sur la membrane basale signalent aux HSC (rouge) de bloquer leur différenciation et de réguler leur division cellulaire (haut). Les HSC mitotiques peuvent se diviser de manière asymétrique (jaune) et se différencier lorsque la cellule fille n'est pas rattachée à la niche par des molécules d'adhésion (bas), alors qu'elles peuvent se diviser symétriquement lorsqu'elles partagent le même micro-environnement que la cellule mère (centre). Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: [Nature] (Spradling et al., 2001), copyright (2001) Adapté à partir de (Suda et al., 2005), Hematopoietic stem cells and their niche, Trends Immunol., 2005m Aug;26(8):426-33 avec la permission de l'éditeur.

1.2.3 Le concept de division asymétrique

La division des HSC dans la niche hématopoïétique peut s'effectuer selon trois scénarios: i) la division symétrique mène à une expansion nette de la population des HSC, ii) la division asymétrique produit une cellule souche et une cellule différenciée ou encore iii) la division symétrique génère deux cellules filles différenciées (Spradling et al., 2001; Faubert et al., 2004) (Figure VII). La division asymétrique découle de la distribution inégale de déterminants pendant la division cellulaire, que ce soit par une localisation sélective des ARN messagers, par un transport préférentiel de protéines ou par des mécanismes distincts de dégradation protéique (Jan and Jan, 1998a). Une étude *in vitro* a permis d'estimer que 20% des progéniteurs se divisaient de façon asymétrique. Une fois triées par cytométrie en flux, des HSC cultivées individuellement avec différents cocktails de cytokines furent séparées après la première division cellulaire, et leur progéniture a permis de quantifier la fréquence des divisions asymétriques (Leary et al., 1984; Jan and Jan, 1998b).

Les divisions asymétriques ont été bien caractérisées chez des organismes modèles simples. Pendant le bourgeonnement de la levure, la régulation du destin cellulaire s'effectue grâce à la protéine CDC42 (Cell Division Cycle Protein 42) qui oriente l'axe de division cellulaire en se localisant toujours dans la future cellule fille (Chant, 1999; Segal and Bloom, 2001; Liakopoulos et al., 2003). Chez la drosophile, les précurseurs neuronaux distribuent de façon inégale dans leurs cellules filles la protéine NUMB, qui altère la signalisation de du récepteur NOTCH. Ce dernier est normalement activé par le ligand DELTA, puis clivé et transloqué dans noyau où il régule des gènes cibles. Cette localisation asymétrique de Numb permet donc d'acquérir différents destins cellulaires. (Santolini et al., 2000; O'Connor-Giles and Skeath, 2003). Les exemples de *Cdc42* et de *Numb* sont intéressants puisque leurs homologues humains et murins sont exprimés dans certaines populations de la moelle osseuse, en plus d'être surexprimés dans le tiers des cas de leucémies pour *Cdc42* et dans 90% des cas pour *Numb* (Faubert et al., 2004). Il serait intéressant d'étudier le rôle que pourrait avoir ces protéines dans la régulation des divisions asymétriques des cellules hématopoïétiques.

1.2.4 Les facteurs intrinsèques

En plus d'être régulées par des signaux extérieurs, les cellules hématopoïétiques sont gouvernées par des facteurs intrinsèques. Le principal médiateur de cette régulation est le facteur de transcription, une protéine capable d'influencer grandement la transcription des gènes.

Le facteur de transcription peut agir en liant des séquences spécifiques d'ADN des promoteurs et des *enhancers* grâce à des domaines particuliers retrouvés dans sa structure. Par exemple, la protéine GATA-1 possède un motif d'environ 30 acides aminés où deux cystéine et deux histidine coordonnent un atome de zinc. Cette structure en forme de doigt ainsi formée interagit avec des séquences spécifiques de la double hélice d'ADN (Diakun et al., 1986). Le facteur de transcription peut également médier des interactions protéiques avec lui-même ou avec d'autres partenaires. La spécificité de ces interactions est dictée par l'affinité entre ces structures protéiques tridimensionnelles. Les facteurs de transcription peuvent donc former des complexes dont la composition change en fonction de leur expression spatio-temporelle dans la cellule. Cette variabilité de la combinaison des facteurs de transcription est cruciale afin d'assurer une régulation spécifique de l'hématopoïèse.

Les facteurs de transcription hématopoïétiques peuvent interagir en coopération, comme dans le cas du complexe SCL (Wadman et al., 1997; Lecuyer et al., 2002) qui sera décrit en détail dans les prochaines sections de cette revue de littérature. Ainsi, les complexes transcriptionnels recrutent spécifiquement des co-activateurs qui modifient la chromatine pour la relâcher et la rendre accessible en plus de faciliter le recrutement de la machinerie basale de la transcription. Les ARNm synthétisés sont ensuite traduits en protéines qui viendront assurer la régulation des cellules hématopoïétiques.

Ces protéines peuvent également agir en boucles d'auto-régulation, positives ou négatives. Le facteur de transcription hématopoïétique PU.1 est requis pour le développement des lignées myéloïdes ainsi que dans la lignée des lymphocytes B. Des

études de mutations du promoteur de PU.1 et d'essais d'empreintes *in vivo* (In Vivo Footprinting) ont montré que PU.1 lie lui-même des éléments de son promoteur, avec SPI-B, un autre membre de la famille ETS, permettant ainsi une auto-régulation positive dans les cellules myéloïdes. (Chen et al., 1995)

De plus, ces facteurs intrinsèques peuvent s'antagoniser, comme dans le cas de PU.1 et GATA. En effet, PU.1 réprime l'activation transcriptionnelle de GATA-1 essentielle à la différenciation érythroïde. L'expression ectopique de PU.1 dans les embryons de *Xenopus* est suffisante pour bloquer la différenciation érythroïde pendant le développement normal, alors que l'introduction exogène de GATA-1 dans ces mêmes embryons ou dans une lignée cellulaire myéloïde abolit le blocage de la différenciation érythroïde imposé par PU.1. De ce fait, lorsqu'il est exprimé de façon erronée dans les précurseurs érythroïdes, PU.1 agit comme oncogène vu son grand potentiel d'action en tant qu'antagoniste (Rekhtman et al., 1999).

Les facteurs de transcription sont donc des régulateurs intrinsèques de l'hématopoïèse qui agissent de façon spatio-temporelle grâce à leur potentiel multiple de former des complexes dont la stœchiométrie relative est cruciale. Par exemple, l'expression de PU.1 à de bas niveaux permet la différenciation vers la lignée B, alors que son expression à de hauts niveaux spécifie plutôt la lignée myéloïde (DeKoter and Singh, 2000). De plus, le dosage des protéines E détermine les choix de différenciation des lymphocytes B et T. L'augmentation du dosage de E2A favorise son homodimérisation plutôt que son hétérodimérisation avec HEB, ce qui dirige la différenciation plutôt vers la lignée B (Hoang, 2004).

Ces exemples illustrent bien qu'une différence dans la quantité d'un facteur de transcription donné est suffisante pour changer l'équilibre vers la formation d'un autre complexe de transactivation. La stœchiométrie des facteurs de transcription aux fonctions opposées est donc un déterminant crucial de l'homéostasie cellulaire. Les cellules ont ainsi développé plusieurs mécanismes pour assurer la régulation des facteurs de transcription.

1.2.5 Modèle stochastique versus instructif

Les mécanismes expliquant la diversité cellulaire et les décisions prises par le système hématopoïétique pour y parvenir n'ont pas encore été élucidés et sont au cœur d'un débat. Les HSC effectuent un choix crucial à chaque division cellulaire entre l'auto-renouvellement et la différenciation, ce qui implique soit une conservation des propriétés prolifératives, soit une diminution du potentiel de choix de lignée et de prolifération. Cependant, la restriction du potentiel de lignée se fait-elle de façon graduelle et ordonnée à l'intérieur de la cellule ? Au contraire, l'hyper-sensibilité du système hématopoïétique à des petites variations de conditions rend-elle plutôt ces choix chaotiques ?

Répondre à cette question n'est chose facile. En étudiant les cellules individuellement, la progéniture des précurseurs multipotents semble hétérogène et aléatoire; alors que dans son ensemble, le système hématopoïétique semble se comporter de façon très ordonnée. Selon l'hypothèse instructive, ce sont les stimuli externes provenant de l'environnement qui dirigent le destin cellulaire. Cependant, l'hypothèse stochastique propose que le choix de lignée serait gouverné par des événements internes et aléatoires dans la cellule (Hoang, 2004).

L'origine du modèle stochastique repose sur les chances qu'ont ces facteurs de transcription de s'assembler sur l'ADN dans des complexes appropriés pour activer ou réprimer leurs gènes cibles. L'instabilité dynamique des facteurs de transcription dans une cellule engendre la diversification stochastique des types cellulaires par une diminution de la diversité des molécules menant à la réduction de la complexité des dynamiques cellulaires (Furusawa and Kaneko, 2001). La sécrétion de cytokines dans l'environnement des cellules hématopoïétiques altère donc le dosage des facteurs de transcription. Les modifications dans la composition des complexes de régulation transcriptionnelle changent alors le destin cellulaire. Le modèle stochastique et le modèle instructif semblent donc interreliés plutôt que d'être mutuellement exclusifs.

Ces théories sont corroborées par des analyses globales de libraires de cDNA de cellules primaires hématopoïétiques qui ont montré que les HSC exprimaient des marqueurs de lignées matures (érythroïdes et myéloïdes) et que leurs niveaux diminuaient en fonction des choix de différenciation (Billia et al., 2001). Il semble donc que les HSC expriment tous les gènes affiliés aux lignées matures à de faibles niveaux avant le choix de lignée, mais que la différenciation consolide ou réprime les patrons de gènes de chaque voie selon le choix qui a été fait (Bruno et al., 2004).

En résumé, les HSC sont ciblées par des mécanismes de contrôle qui déterminent le destin cellulaire dans le système hématopoïétique. Les processus stochastiques à l'intérieur de la cellule qui initient la différenciation des progéniteurs multipotents peuvent être régulés par des signaux extérieurs. Il n'est pas très clair à quel point ces choix deviennent irréversibles ni comment, mais ce scénario combinant à la fois les modèles stochastiques et instructifs à chaque étape de différenciation du système hématopoïétique semble définitivement plausible.

1.3. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE bHLH

Les protéines bHLH font partie d'une très grande famille de facteurs de transcription assurant des fonctions de régulation transcriptionnelle. Ces protéines nucléaires interviennent dans les processus d'hématopoïèse, de neurogénèse, de myogénèse, de la détermination du sexe ainsi que dans le développement du cœur et du pancréas (Weintraub, 1993; Jan and Jan, 1993; Massari and Murre, 2000; Hassan and Bellen, 2000; Vervoort and Ledent, 2001).

Ces facteurs de transcription sont caractérisés par leur domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix), un domaine d'une soixantaine d'acides aminés qui comprend un domaine basique de liaison à l'ADN suivi d'une région HLH comprenant deux hélices alpha séparées par une boucle. Le HLH médie des interactions protéiques par homo- ou hétérodimérisation avec d'autres membres de la famille bHLH. (Massari and Murre, 2000) Cette interaction entre deux HLH conjugue les domaines basiques des facteurs de transcription pour lier une séquence spécifique sur l'ADN de six nucléotides

(CANNTG) appelée les boîtes E. Ces séquences sont retrouvées dans les promoteurs, des *enhancers* ou des *silencers* des gènes cibles qu'ils régulent (Ledent et al., 2002).

Les bHLH sont séparés en sept classes majeures. La classe I regroupe des bHLH exprimés dans plusieurs tissus et qui peuvent s'homo- ou s'hétérodimériser avec d'autres bHLH. Elle inclut les protéines E E2A, HEB et E2-2 ainsi que Daughterless. La spécificité de liaison à l'ADN de ces protéines se limite aux boîtes E (Murre et al., 1989b). Les bHLH de classe II présentent des patrons d'expression tissu-spécifique et incluent les membres SCL, MyoD, Myogenin, Atonal et NeuroD. À quelques exceptions près, ils sont incapables de former des homodimères et s'hétérodimérisent préférentiellement avec les protéines E pour lier des boîtes E canoniques et non-canoniques (Murre et al., 1989b) (Figure VIII). La classe III inclut les membres de la famille MYC, tel que MYC, TFE3 et SREBP-1. Ces protéines présentent un motif leucine-zipper adjacent au bHLH (Henthorn et al., 1991; Zhao et al., 1993b) Les bHLH de classe IV définissent une famille de molécules comprenant MAD, MAX et MXI capables de se dimériser entre-elles ou avec les protéines MYC (Blackwood and Eisenman, 1991; Ayer et al., 1993; Zhao et al., 1993a; Zervos et al., 1994).

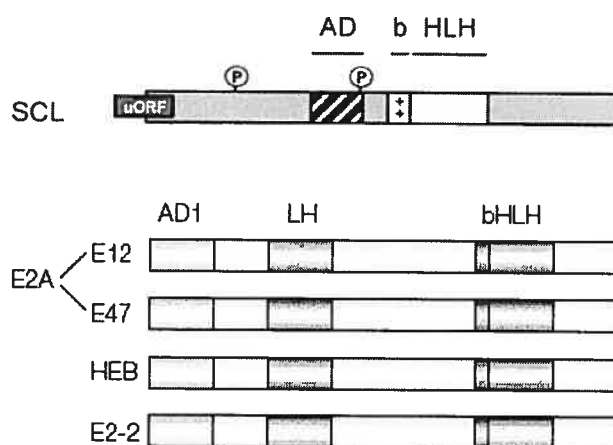


Figure VIII La structure des protéines bHLH

Structure schématique des domaines d'interaction protéique et de liaison à l'ADN du facteur de transcription hématopoïétique SCL ainsi que des protéines E ubiquitaires E2A (E47, E12), HEB et E2-2. Adapté de *Experimental Hematology*, 2004 Jan;32(1):11-24, Lecuyer E et Hoang T, SCL: From the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia, Copyright (2004), avec la permission de International Society for Experimental Hematology. Reproduit avec la permission de *Nature Reviews Immunology* (Engel and Murre, 2001) copyright (2001) Macmillan Magazines Ltd.

La classe V regroupe des protéines comme Id qui agissent comme dominants négatifs des bHLH de classe I. Puisqu'il ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN, ils titrent les protéines E en formant des complexes inactifs (Benezra et al., 1990; Ellis et al., 1990; Garrell and Modolell, 1990). Les protéines de la classe VI sont caractérisées par la présence d'une proline dans leur région basique. Ce groupe inclut les protéines Hairy et Enhancer-of-split retrouvées chez la drosophile (Klambt et al., 1989; Rushlow et al., 1989). Finalement, les facteurs de transcription bHLH de classe VII possédant un domaine bHLH-PAS incluent les membres AHR, ARNT, HIF-1 α et les protéines Single-minded et Period isolées chez la drosophile (Crews, 1998).

Des études de phylogénie ont identifié 39 gènes de bHLH différents chez *Caenorhabditis elegans*, 58 chez *Drosophila Melanogaster* et 125 chez l'humain. Presque tous ces gènes ont été classés par catégorie dans les 44 familles d'orthologues établies. Puisque 43 des 44 familles incluait des gènes des trois organismes étudiés, il a été suggéré que la diversification des gènes de bHLH soit directement liée à l'acquisition de caractères évolutifs complexes. Ainsi, l'ancêtre commun de toutes ces espèces a sûrement possédé au moins 43 différents types de bHLH (Ledent et al., 2002).

1.4 LE COMPLEXE SCL

La régulation transcriptionnelle effectuée par les facteurs de transcription est déterminante dans l'hématopoïèse normale. L'apparition d'une leucémie résulte presque toujours de translocations chromosomiques impliquant des facteurs de transcription (Look, 1997). Le complexe SCL fait partie de ces régulateurs majeurs de l'expression génique et son fonctionnement adéquat est requis pour maintenir l'équilibre dans le système hématopoïétique.

1.4.1 La composition

Le complexe SCL est composé de plusieurs facteurs de transcriptions possédant des patrons d'expression spatio-temporels distincts, assurant une grande spécificité et flexibilité de la régulation transcriptionnelle des gènes cibles (Tableau I).

Tableau I Description des membres retrouvés dans le complexe SCL

Facteur de transcription	Nom complet	Famille
SCL (TAL1) (TCL5)	Stem Cell Leukemia	basic Helix-Loop-Helix
E2A (TCF3)	Enhancer binding factors E12/E47	bHLH
HEB (TCF12)	HeLa Ebox binding protein	bHLH
E2-2 (TCF4)	Transcription factor 4	bHLH
LMO2	LIM-only protein 2	LIM domain
LDB-1	LIM domain-binding protein 1	LIM domain
GATA-1/2	GATA binding protein 1 or 2	Zinc finger
SP1	Specificity protein 1	Zinc finger

La formation du complexe est coordonnée par le facteur de transcription SCL qui recrute deux protéines d'ancrage à l'ADN. L'interaction entre SCL et E2A est cruciale puisque la liaison de SCL à l'ADN est totalement dépendante du contact protéine-protéine avec E2A. De plus, le recrutement de E2A au complexe amène un domaine de transactivation fonctionnel dans le complexe (Hsu et al., 1994a). GATA-1/2 est recruté de façon indirecte au complexe grâce aux protéines d'échaffaudage LMO2 et LDB-1. C'est par la liaison de LMO2 à SCL que cette portion du complexe est recrutée (Wadman et al., 1997).

La caractérisation moléculaire des interactions entre SCL et ses partenaires du complexe a été facilitée suite à la génération de plusieurs mutants ponctuels dans la région du bHLH de SCL. En effet, un mutant de la première hélice du bHLH, SCL-FL, ne peut former de liaison avec E2A, ce qui abroge tout potentiel de liaison à l'ADN ainsi que la formation du complexe SCL (Lecuyer et al., 2002). De plus, un mutant de la boucle du bHLH, SCL-M13, ne peut plus interagir avec LMO2, abrogeant ainsi la nucléation du complexe SCL et son activité transcriptionnelle (Lecuyer et al, En préparation).

Alors que l'on croyait que les membres du complexe SCL étaient recrutés tour à tour sur l'ADN, de nouvelles évidences soulèvent la possibilité que le complexe soit déjà formé dans la cellule avant son recrutement à la chromatine. Des nouveaux partenaires peuvent

y être recrutés en fonction du contexte cellulaire, permettant ainsi la modification de l'activité du complexe. Des études effectuées dans notre laboratoire ont permis de montrer que le recrutement du corépresseur ETO-2 par une interaction avec E2A ou HEB altère l'activité du complexe SCL (Nicolas Goardon et al., 2006) (Figure IX).

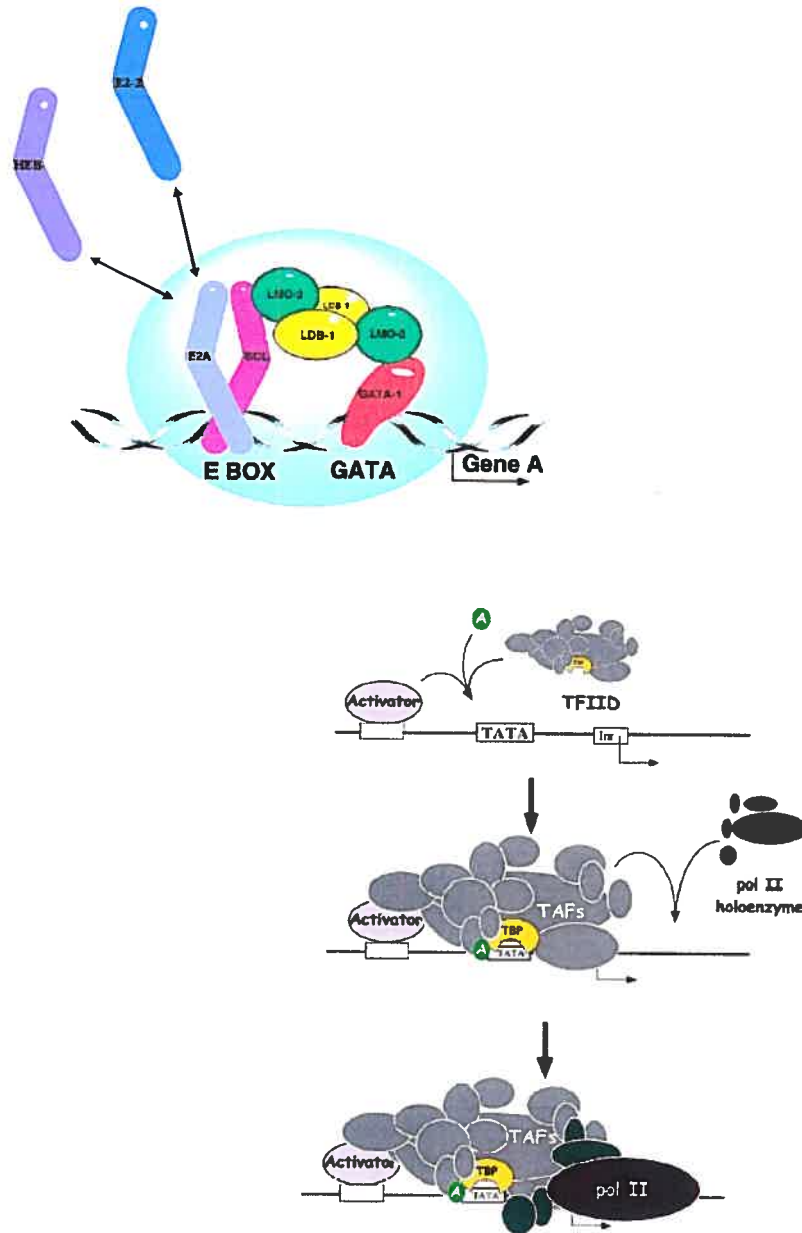


Figure IX Le complexe SCL comme activateur transcriptionnel

SCL fait partie d'un complexe multi-protéique avec d'autres facteurs de transcription dans les cellules érythroïdes, dont GATA-1, LMO-2, LDB-1 et les protéines E, dont E2A, HEB ou E2-2. Conséquemment, le gène cible A est régulé de façon appropriée. Adapté de Begley CG et Green AR, *The SCL Gene: From Case Report to Critical Hematopoietic Regulator*, Blood, Vol. 93 No. 9 (May 1), 1999: pp. 2760-2770 avec la permission de l'éditeur American Society of Hematology.

1.4.2 Les gènes cibles

Peu de gènes cibles de SCL ont été identifiés et caractérisés jusqu'à ce jour. Le gène *c-kit* a été l'un des premiers gènes cibles identifiés. Ce récepteur tyrosine-kinase est normalement activé suite à la liaison de son ligand Steel Factor. Il peut ensuite s'autophosphoryler et s'associer avec d'autres substrats, comme la Pi3K, déclenchant ensuite une cascade de signalisation. Des études de pertes de fonction ont démontré que la régulation du gène *c-kit* et de son ligand est essentielle pour le développement des mélanocytes, des cellules germinales, des HSC et des progéniteurs hématopoïétiques (Russell, 1979). La délétion homozygote du gène *c-kit* entraîne l'anémie, l'infertilité et l'albinisme, alors qu'une mutation hétérozygote cause le piébaldisme, une maladie génétique autosomale dominante caractérisée par la décoloration partielle de la peau et des cheveux. L'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *c-kit* a montré que le facteur de transcription SCL permet d'assembler un complexe activateur composé à la fois de facteurs de transcription ubiquitaires E2A, SP1 et LDB-1 ainsi que des facteurs hémato-spécifiques LMO2, GATA-1/2. (Krosi et al., 1998; Lecuyer et al., 2002).

Le complexe SCL contrôle également l'expression du gène de la glycophorine A (GPA), un important marqueur de la différenciation érythroïde. GPA est la protéine la plus abondante dans les membranes des érythrocytes. Elle y induit fortement la charge négative de la membrane des globules rouges grâce à son domaine extra-cellulaire riche en acide sialique fortement glycosylé. Les motifs de liaison à l'ADN de type boîte E, GATA et SP1 du gène *Gpa* sont occupés par un complexe composé de SCL, LMO2, GATA-1, E47, SP1 et LDB-1 qui permet son expression (Lahlil et al., 2003).

Le dernier gène cible connu du complexe SCL est la protéine 4.2 (P4.2), un membre de la famille des transglutaminases. En étant le principal constituant de la membrane des érythrocytes, P4.2 permet la régulation de la forme et des propriétés mécaniques de la cellule en interagissant avec le cytosquelette (Cohen et al., 1993). Des délétions géniques ou des mutations ponctuelles dans le locus de *P4.2* entraînent une anémie hémolytique chronique due à la surabondance de globules rouges sphériques, soit la

maladie de sphérocytose héréditaire. Le promoteur du gène *P4.2* permet le recrutement du complexe SCL grâce à ses motifs de liaison à l'ADN de type boîte E et GATA. Les facteurs de transcription SCL, E47, GATA-1, LMO2 et LDB-1 permettent donc l'expression du gène *P4.2* pendant la différenciation érythroïde (Xu et al., 2003).

1.5 LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION SCL

Le facteur de transcription Stem Cell Leukemia (SCL) a tout d'abord été identifié suite à son implication dans la leucémie T aigüe de l'enfant (T-ALL). Dans ce cancer du sang, le gène SCL est presque toujours impliqué dans des translocations chromosomiques. Cette modification de l'ADN résulte en l'expression erronée de SCL dans un autre compartiment cellulaire où il agit comme oncogène. L'impact de la mauvaise régulation de ce gène dans la leucémie a donc poussé les chercheurs à étudier son rôle dans l'hématopoïèse normale.

1.5.1 Le gène

Le gène SCL comporte 8 exons répartis dans le génome sur environ 20 Kb. Plus précisément, la séquence codante de SCL se retrouve dans les exons 4, 5 et 6 (Aplan et al., 1990) (Figure X). La structure du gène SCL est très conservée entre la souris et l'homme, les séquences de nucléotides et d'acides aminés étant respectivement homologues à 88% et 94% alors que les domaines bHLH sont identiques (Begley et al., 1991; Begley et al., 1994).

Le gène SCL présente plusieurs éléments de régulation qui ont été identifiés grâce à des études de marquage par empreinte ou par cartographie des régions hypersensibles à la DNase I. Ces études ont identifié des régions actives de la chromatine associées à des promoteurs, des *enhancers* ou des *silencers* (Leroy-Viard et al., 1994; Gottgens et al., 1997; Fordham et al., 1999).

Plusieurs éléments en cis assurent une régulation positive du gène SCL. Chacun de ces *enhancers* régule l'expression de SCL de façon spatio-temporelle dans le compartiment

hématopoïétique. Un premier *enhancer* en 3' (+ 18/19 Kb) dirige l'expression de SCL dans les HSC et les progéniteurs (Sanchez et al., 1999; Gottgens et al., 2002), alors que celui en 5' (-3.2 Kb) permet l'expression de SCL dans les progéniteurs hématopoïétiques et dans l'endothélium (Gottgens et al., 2004). De plus, quatre autres *enhancers* permettent l'expression de SCL dans des compartiments non-hématopoïétiques. Trois se retrouvent en 5' du gène pour diriger son expression dans l'endothélium, le mésencéphale, le cerveau postérieur et la moelle épinière (Sinclair et al., 1999) alors que celui en 3' est crucial pour une expression dans le cerveau postérieur (Gottgens et al., 2000).

Des séquences promotrices hautement conservées entre l'homme et la souris ont été identifiées en 5' du gène SCL, soit dans l'exon 1a (-187, +26) et dans l'exon 1b (+209, +353) (Aplan et al., 1990; Bockamp et al., 1995). Ces promoteurs démontrent des activités spécifiques et distinctes en fonction du contexte cellulaire. C'est le promoteur de l'exon 1a qui est le plus actif, grâce à sa collaboration avec l'enhancer en 3' (+18/19 Kb) qui permet de réguler l'expression de SCL dans les cellules érythrocytaires et mastocytaires grâce notamment à GATA-1. Le promoteur de l'exon 1b est plutôt actif dans les cellules myéloïdes et mastocytaires où il est activé par PU.1, SP1 et SP3 (Aplan et al., 1992b; Gottgens et al., 1997; Bockamp et al., 1997; Bockamp et al., 1998).

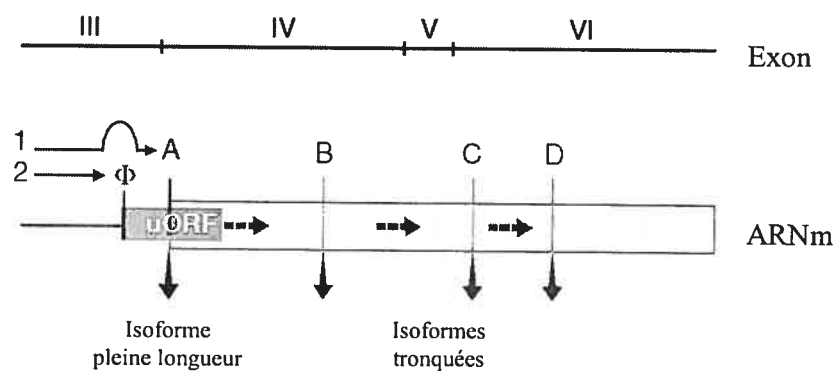


Figure X Structure de la gène et de l'ARNm de SCL

(Haut) Représentation de la structure du gène SCL hautement conservée chez les vertébrés. La séquence codante de SCL se retrouve dans les exons IV, V et VI. (Bas) Modèle des différentes alternatives de traduction de l'ARNm de SCL en plusieurs isoformes. Adapté avec la permission de Cold Spring Harbor Laboratory Press de Calkhoven C., Müller C., Martin R., Kros G., Hoang T., Leutz A., Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice, *Genes and Development*, Vol. 17, No. 8, pp. 959-964, April 15, 2003.

1.5.2 La protéine

Dans une cellule, la traduction d'un ARNm s'effectue par la liaison de ribosomes en 5' sur le codon d'initiation de la traduction (uAUG). L'ARNm de SCL a la particularité de générer différentes isoformes, soit celle de 42 kDa de pleine longueur (pp42^{SCL}) et la tronquée de 22 kDa (pp22^{SCL}) (Pulford et al., 1995) (Figure X). Cette génération d'isoformes s'explique par la présence d'un uORF (upstream Open Reading Frame) qui permet l'ouverture d'un cadre de lecture en amont de la séquence codante pour SCL. Ce n'est donc pas un clivage protéolytique qui génère les différentes isoformes de la protéine SCL (Calkhoven et al., 2000; Calkhoven et al., 2003).

Malgré le fait que ces isoformes exhibent toutes les deux un bHLH intact, elles divergent par leur extrémité Nt (Amino-terminale). En effet, l'isoforme tronquée de pp22^{SCL} ne possède pas le domaine putatif de transactivation (Aplan et al., 1990; Begley et al., 1991; Cheng et al., 1993b; Barton et al., 1999). Les deux isoformes peuvent donc médier différents effets biologiques dans les processus de choix de lignée et de différenciation. En effet, la lignée érythroïde est favorisée par l'expression de pp22^{SCL}, alors que pp42^{SCL} induit plutôt la différenciation vers la lignée des mégacaryocytes (Calkhoven et al., 2003).

De plus, la protéine SCL peut subir des modifications post-traductionnelles, ce qui engendre des modifications de son activité dans les cellules hématopoïétiques. SCL est notamment acétylé par P/CAF dans la boucle du bHLH au niveau d'un motif riche en lysines. Cette acétylation augmente la liaison de SCL à l'ADN en plus d'inhiber l'interaction avec le co-répresseur transcriptionnel mSIN3A, favorisant ainsi la différenciation érythroïde (Huang et al., 2000). SCL peut également être phosphorylé sur plusieurs résidus, tel que le résidu Ser¹²² par la MAP kinase ERK1, le résidu Ser¹⁷² par la PKA et sur le résidu Thr⁹⁰ par AKT. Ces modifications post-traductionnelles augmentent son activité en modifiant sa capacité de discrimination entre différents sites spécifiques de liaison à l'ADN (Goldfarb et al., 1992; Cheng et al., 1993a; Prasad et al., 1995a; Prasad et al., 1995b; Palamarchuk et al., 2005).

1.5.3 Le patron d'expression

La localisation tissulaire et cellulaire de SCL a tout d'abord été établie grâce à l'analyse de l'expression des ARNm de SCL (Begley et al., 1989b; Green et al., 1991; Visvader et al., 1991; Green et al., 1992; Hwang et al., 1993), et ensuite par des expériences d'immunohistochimie (Kallianpur et al., 1994). Cette première utilisation d'un anticorps polyclonal a permis de caractériser sommairement le patron d'expression de SCL pendant le développement murin ainsi que chez la souris adulte. L'intégration rétrovirale dans le génome de la souris du gène rapporteur LacZ sous le contrôle du promoteur de SCL a permis de mieux affiner le patron d'expression de SCL dans les différents types cellulaires grâce à la coloration de type beta-galactosidase.

Pendant l'hématopoïèse primitive, SCL est exprimé dans les sites extra- (îlots sanguins) et intra-embryonnaires (AGM). SCL est ensuite exprimé dans les précurseurs retrouvés dans le foie fœtal, ce qui correspond à l'établissement de l'hématopoïèse définitive. Chez l'adulte, SCL est donc exprimé dans les HSC et dans les progéniteurs multipotents (Kallianpur et al., 1994; Elefanty et al., 1998; Akashi et al., 2000). Cette expression n'est pas maintenue dans toutes les lignées hématopoïétiques puisque la différenciation des HSC corrèle avec la diminution de SCL, à l'exception de la lignée érythroïde où l'expression de SCL est maintenue dans les érythroblastes, les mégacaryocytes et les mastocytes (Kallianpur et al., 1994; Hoang et al., 1996; Elefanty et al., 1999). L'expression de SCL peut également être détectée dans plusieurs autres tissus. Dans le système vasculaire, SCL est exprimé dans l'endocarde du cœur ainsi que dans les hémangioblastes et l'endothélium des îlots sanguins et des organes nouvellement vascularisés. De plus, le système nerveux présente une expression de SCL dans le mésencéphale, le cerveau postérieur et la moelle épinière lors du développement embryonnaire (Green et al., 1992; Kallianpur et al., 1994; Sinclair et al., 1999). L'étude du patron d'expression de SCL chez plusieurs espèces de vertébrés a révélé qu'il semble être hautement conservé (Barton et al., 1999; Gottgens et al., 2002).

1.5.4 Les fonctions de SCL

Le facteur de transcription SCL est un déterminant essentiel de l'hématopoïèse puisqu'il y joue un rôle actif dans les trois grandes étapes (Figure II) qui caractérisent l'hématopoïèse.

SCL est essentiel à la spécification du système hématopoïétique et endothélial à partir du mésoderme.

Les cellules des îlots sanguins et de l'AGM partagent une relation intime puisqu'ils dérivent d'un précurseur commun, l'hémangioblaste. L'existence de ce type cellulaire primitif a été démontrée par la différenciation *in vitro* de cellules E.S. (Embryonic Stem Cell). Ce système permet d'isoler des hémangioblastes, les BL-CFC (Blast-Colony Forming Cell), présentant ce double potentiel de générer deux types cellulaires (Kennedy et al., 1997; Choi et al., 1998). De plus, ces cellules coexpriment les protéines CD34, FLK-1, TIE2, c-KIT, GATA-2, LMO2 et RUNX-1 qui caractérisent à la fois les cellules hématopoïétiques et les cellules endothéliales (Risau and Flamme, 1995; Minegishi et al., 1999; Orkin and Zon, 2002).

Plusieurs études ont montré que SCL est un régulateur important pour la spécification de l'hémangioblaste à partir du mésoderme et par conséquent, pour les processus d'angiogénèse et d'hématopoïèse. En effet, des cellules E.S. SCL^{-/-} ne contribuent pas à la formation de précurseurs BL-CFC en culture liquide (Nishikawa et al., 1998; Chung et al., 2002). De plus, la surexpression ectopique de SCL dans des embryons de poisson zèbre cause une augmentation anormale du nombre d'hémangioblastes. Un développement excessif du sang et de l'endothélium se fait alors aux dépens des autres tissus d'origine mésodermale (Gering et al., 1998; Mead et al., 1998).

Dans cette population d'hémangioblastes embryonnaires, le marqueur endothélial précoce FLK-1 et SCL sont coexprimés. Ce récepteur tyrosine-kinase et son ligand VEGF fonctionnent dans la même voie génétique que SCL pour favoriser les deux destins cellulaires. En effet, la délétion génique de *Flk-1* entraîne des défauts sévères

dans la formation de cellules endothéliales et hématopoïétiques (Shalaby et al., 1995; Shalaby et al., 1997). De plus, la létalité des embryons $VEGF^{lo/lo}$ causée par une absence d'érythrocytes primitifs peut être sauvée par le transgène *Scl* (Martin et al., 2004). Le facteur de transcription SCL semble donc un régulateur crucial de la spécification du système hématopoïétique et endothélial.

*SCL joue un rôle crucial dans le développement
du système hématopoïétique.*

Ce sont des études de perte de fonction qui ont permis de montrer le rôle crucial de SCL dans l'hématopoïèse, puisque la délétion de ce gène dans le génome des souris est létale. Tel qu'illustré à la Figure X, les embryons sont caractérisés au jour E9.5 par absence totale de cellules sanguines primitives et de système vasculaire. D'ailleurs, ces embryons nuls pour le gène *Scl* sont pâles, oedémateux présentent un important retard de croissance au jour E8.75 (Shivdasani et al., 1995b; Robb et al., 1996).

Le rôle déterminant de SCL dans l'hématopoïèse définitive a été défini par l'étude de souris chimériques créées par l'injection de cellules E.S. $Scl^{-/-}$. Ces cellules délétées pour le gène *Scl* ne contribuent d'aucune façon à la formation du système hématopoïétique (Robb et al., 1996; Porcher et al., 1996).

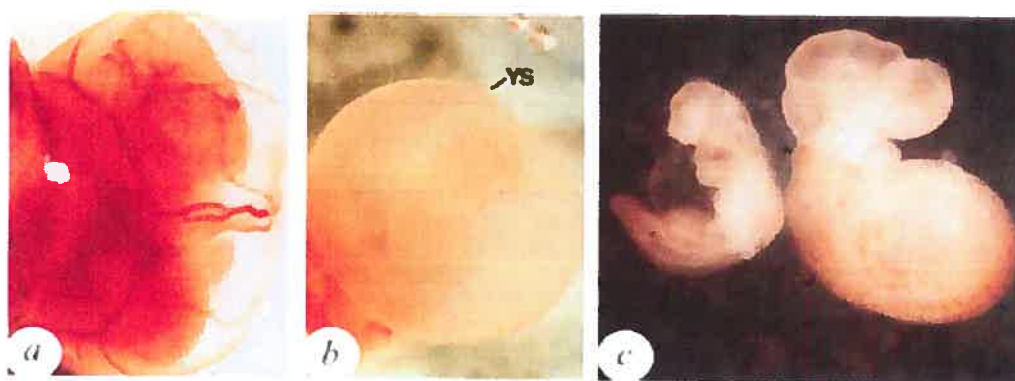


Figure XI Phénotype de la délétion du gène SCL chez la souris

Les embryons E10.0 sauvages (a) présentent une vascularisation normale du sac vitellin (YS) et de l'embryon, contrairement aux embryons nuls pour le gène *Scl* (b). La dissection des embryons E9.5 hors du sac vitellin (c) montre la différence de croissance entre la progéniture normale (à droite) et les embryons nuls pour *Scl* (gauche). Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: [Nature] (Shivdasani et al., 1995a), copyright (1995)

Une autre étude sur l'impact de SCL a été réalisée suite à la création d'une lignée cellulaire de ES *Scl*^{-/-} dans laquelle l'expression ectopique de SCL peut être induite par un traitement au tamoxifène. La différenciation de ces cellules E.S. *Scl*^{-/-} ne génère pas de cellules hématopoïétiques. Cependant, la réactivation de l'expression de SCL dans ces cellules en différenciation permet de sauver l'hématopoïèse primitive et définitive (Endoh et al., 2002), montrant ainsi le rôle essentiel ce facteur de transcription.

*SCL est essentiel pendant la différenciation
pour le choix de lignée.*

Le système hématopoïétique est caractérisé par une hiérarchie complexe de lignées cellulaires où chaque étape de différenciation est finement régulée. Les HSC restreignent donc leur potentiel en formant successivement des progéniteurs multipotents, des précurseurs de chaque lignée cellulaire et finalement des cellules matures au destin cellulaire défini.

Afin d'étudier le rôle de SCL dans l'hématopoïèse adulte, la délétion conditionnelle de *Scl* dans le génome de la souris a permis d'éviter la létalité embryonnaire. Suite à l'insertion de sites Lox-P entre certains exons du gène dans le génome de la souris, l'ablation conditionnelle de *Scl* est accomplie par l'injection de PIPC (PolyInosinic-PolyCytidylic Acid). L'induction de l'expression de la Cre-recombinase entraîne donc la délétion du gène. Ces études suggèrent que SCL n'est pas nécessaire pour l'auto-renouvellement des LT-HSC (Long-Term HSC), mais qu'il est requis plutôt pour le bon fonctionnement de la différenciation des ST-HSC (Short-Term HSC) en érythrocytes et en mégacaryocytes (Curtis et al., 1997; Mikkola et al., 2003; Hall et al., 2003; Curtis et al., 2004).

Le rôle de SCL a également été investigué en le surexprimant dans des cellules primaires de moelle osseuse et dans des lignées cellulaires hématopoïétiques. Ces études ont révélé que SCL favorise la différenciation de la voie érythroïde, en plus d'empêcher la différenciation vers les voies méyoïdes et lymphoïdes (Aplan et al., 1992b; Tanigawa

et al., 1995; Hoang et al., 1996; Condorelli et al., 1997; Elwood et al., 1998; Valtieri et al., 1998).

De plus, l'expression d'un antisens dans des lignées cellulaires hématopoïétiques a démontré que SCL régule la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules érythroïdes multipotentes (Green et al., 1991). Dans une autre étude, la différenciation érythroïde de lignées cellulaires induite par l'EPO ou d'autres agents chimiques cause une augmentation des niveaux d'ARNm de SCL. Inversement, lors de la différenciation myéloïde vers les macrophages, une diminution de SCL est observée, ce qui concorde donc avec le rôle positif de SCL dans l'érythropoïèse (Cross et al., 1994).

Bref, les rôles de SCL dans la spécification et l'établissement du système hématopoïétique ainsi que dans les choix de lignée pendant la différenciation corrélient donc avec son patron d'expression décrit précédemment. La régulation de ce facteur de transcription est donc capitale puisqu'il remplit différentes fonctions à chaque niveau de la hiérarchie du système hématopoïétique.

1.6 LES PROTÉINES E

1.6.1 E2A

Situé sur le chromosome 19, le gène *E2a* encode deux protéines bHLH distinctes, soit E12 et E47 suite à l'épissage alternatif d'un exon qui encode la région bHLH (Murre et al., 1989a; Trask et al., 1992; Massari and Murre, 2000). En cherchant des protéines régulant l'expression des immunoglobulines, *E12* a été identifié par le criblage d'une librairie de cDNA provenant d'un lymphome humain des cellules B. *E47* a ensuite été découvert par un recriblage de cette même librairie avec le cDNA d'*E12*. Des études *in vitro* ont ensuite montré que ces protéines E peuvent lier les boîtes E (CANNTG) en homo- ou hétérodimère. (Murre et al., 1989a). Cependant, *E47* le fait avec une grande affinité, alors que *E12* interagit faiblement avec cette séquence d'ADN (Sun and Baltimore, 1991).

Les éléments de régulation du gène *E2a* ont été peu étudiés, mais un promoteur putatif a été caractérisé récemment dans la région -267, -238. Ce dernier pourrait influencer l'activité basale du promoteur, et donc réguler l'expression de E2A (Hata and Mizuguchi, 2004).

E2A présente un patron d'expression plutôt ubiquitaire dans l'organisme, notamment dans le système hématopoïétique, les lignées B et T, et les muscles squelettiques. En plus de jouer des rôles importants dans la neurogénèse, E2A joue un rôle au niveau de l'hématopoïèse, où ce facteur de transcription active ou réprime l'expression de gènes cibles, comme les gènes *IgH* et *Rag* (Schlissel et al., 1991; Sigvardsson et al., 1997; Kee and Murre, 1998).

Tout dépendant du contexte cellulaire, les protéines E12 et E47 régulées par différents mécanismes. Elles peuvent être inhibées par une interaction physique avec un autre partenaire tel que les protéines Id1 et Id4 (Benezra et al., 1990). De plus, des modifications post-traductionnelles peuvent également affecter l'activité des protéines E2A. E47 peut aussi être régulé par la phosphorylation. Ainsi, la déphosphorylation de E47 sur certains résidus favorise son homodimérisation, ce qui modifie alors la spécificité de son activité transcriptionnelle (Sloan et al., 1996).

L'activité de E2A peut être altérée grâce aux domaines d'activation (AD) très conservés qui permettent de recruter des co-activateurs et des co-répresseurs, comme ETO, ETO-2 et MTGR1 (Aronheim et al., 1993; Quong et al., 1993; Massari et al., 1996; Zhang et al., 2004). Ces répresseurs de la famille ETO peuvent lier les co-répresseurs nucléaires N-CoR, Sin3A, HDAC1 et HDAC3. Grâce à ce domaine d'activation, E2A recrute des histones acétyltransférases (CBP et p300) pour modifier la structure de la chromatine et l'état d'expression de ses gènes cibles (Qiu et al., 1998).

E2A joue un rôle crucial dans la différenciation de la lignée lymphoïde. En plus d'être létale pour la souris, la délétion du gène *E2a* entraîne chez l'embryon un blocage du développement de la lignée B puisque ces lymphocytes ne procèdent pas au

réarrangement des gènes d'immunoglobulines. Le développement d'autres lignées, telles que celles des granulocytes, des macrophages, et des érythroïdes, semble pourtant normal (Zhuang et al., 1994; Bain et al., 1994). Cette délétion d'*E2a* est haplo-insuffisante, c'est-à-dire que la délétion d'un seul allèle entraîne la réduction de la moitié du nombre de lymphocytes B. E2A joue donc un rôle anti-prolifératif dans les progéniteurs B en collaboration avec p21, un régulateur du cycle cellulaire (Herblot et al., 2002).

De plus, l'étude de souris transgéniques surexprimant Id1, un dominant-négatif d'E2A, suggère que la réduction de l'expression de ce dernier est nécessaire pour qu'E2A joue son rôle crucial dans la différenciation normale des lymphocytes B (Sun, 1994). Ainsi, la régulation médiée par E2A dans le développement des lymphocytes B se fait de façon dose-dépendante, puisque les bas niveaux d'E2A sont suffisants pour contrôler la croissance cellulaire, alors que des niveaux élevés favorisent la différenciation (Herblot et al., 2002).

La maturation des thymocytes du stade pré-T est normalement associée à la diminution de l'expression de SCL et LMO1/2 et à l'augmentation de l'expression d'E2A et HEB. Ces deux protéines E peuvent s'hétérodimériser et réguler l'expression du gène du pT α (Tremblay et al., 2003) qui est essentiel à la sélection, la prolifération et la survie des thymocytes exprimant le β -TCR (Chaffin et al., 1990; Godfrey and Zlotnik, 1993; von Boehmer et al., 1999). Les souris nulles pour *E2a* montrent une très faible cellularité dans le thymus et un blocage de la différenciation des cellules T qui précède parfois leur transformation en lymphome (Bain et al., 1997). Dans les leucémies T-ALL, c'est la surexpression de SCL et LMO1 qui empêche E2A et HEB de médier leur effet pendant la différenciation des thymocytes. (Lowsky et al., 1997; Begley and Green, 1999; Herblot et al., 2000; Murre, 2000) E2A semble donc jouer un rôle de suppresseur de tumeur dans les thymocytes en développement.

Dans les cas de leucémies B-ALL associées aux translocations t(1;19) et t(17;19), la fonction antiproliférative de E2A suggère que la perte d'un seul allèle peut contribuer à

la leucémogénèse, en plus de l'action anormale des protéines de fusion générées (Herblot et al., 2002). En effet, ces translocations entre les gènes *E2a* et *Pbx* ou *Hlf*. Dans les deux cas, le domaine de transactivation dans la région Ct est fusionné aux domaines de dimérisation de PBX ou HLF. Puisque ces protéines de fusion ne lient pas les mêmes séquences sur l'ADN, elles peuvent alors réguler de façon aberrante d'autres gènes, causer une inhibition de type dominant-négatif ou encore empêcher E2A de remplir ses fonctions en dehors de la chromatine (Honda et al., 1999). Ces évidences génétiques et moléculaires révèlent donc le rôle crucial qu'E2A occupe dans la régulation de l'hématopoïèse.

1.6.2 HEB

HEB est un bHLH distinct d'E2A, même si ces facteurs de transcription sont très similaires. HEB est exprimé dans une variété de tissus, dont le thymus, les muscles squelettiques, les lignées lymphocytaires du système hématopoïétique ainsi que dans le système nerveux central en développement (Zhang et al., 1995).

Le gène *Heb* contient 21 exons répartis sur une distance d'environ 370 Kb (Zhang et al., 1995; Gan et al., 2002). Suite au clonage du cDNA de *Heb* (Zhang et al., 1991; Hu et al., 1992), l'étude de ce facteur de transcription a permis de découvrir que l'épissage alternatif et l'utilisation différentielle des exons entraîne la formation de trois isoformes (Gan et al., 2002). Des essais *in vitro* ont montré que HEB forme des hétérodimères avec des bHLH de classe I (E2A, HEB) et II (SCL, MYF3) et classe V (Id) (Zhang and Bina, 1992). HEB se lie sur des boîtes E des *enhancers* des gènes TCR- α/β et CD4 contrôlant le développement des thymocytes (Barndt et al., 1999).

Le fait que les dimères HEB-SCL interagissent peu avec certains gènes cibles de HEB (Doyle et al., 1994) pourrait expliquer la leucémogénèse qu'entraîne SCL lorsqu'il est exprimé dans les lignées lymphocytaires, puisqu'il pourrait y agir comme régulateur transcriptionnel négatif en formant des complexes illégitimes avec les protéines E dans ce contexte cellulaire. Le très haut niveau d'expression de HEB détecté dans certaines

lignées T immortalisées corrèle avec le rôle de ce facteur de transcription dans la régulation transcriptionnelle des cellules T (Hu et al., 1992; Sawada and Littman, 1993; Doyle et al., 1994; Zhang et al., 1995).

La délétion génique de *Heb* cause une réduction du nombre de cellules pro-B dans les embryons murins, mais n'affecte pas l'établissement en tant que tel de la lignée B. Ce phénomène est probablement dû à une redondance fonctionnelle entre les différentes protéines E. De plus, l'insertion du gène *Heb* dans le locus du gène *E2a* chez la souris permet de substituer parfaitement les fonctions de dernier dans le choix et la différenciation de la lignée B. Ainsi, la létalité causée par l'absence du gène *E2a* peut être sauvée par *Heb* (Zhuang et al., 1998).

L'absence de HEB ou la surexpression de SCL et LMO1 dans la lignée T a un effet similaire, en diminuant de 5 à 10 fois le nombre de thymocytes, dont la différenciation est dramatiquement arrêtée entre les stades DN et DP (Zhuang et al., 1996; Barndt et al., 1999; Herblot et al., 2000) Le facteur de transcription HEB est donc un régulateur important de certains niveaux hiérarchiques de l'hématopoïèse.

1.6.3 E2-2

Le gène *E2-2* a initialement été cloné à partir de thymocytes humains où on y détectait une variété d'ARNm. C'est un processus d'épissage alternatif qui permet de générer les trois isoformes d'E2-2. Le patron d'expression de E2-2 se localise à la fois chez l'adulte et l'embryon dans plusieurs tissus, dont le cerveau, le cœur, le placenta, les muscles squelettiques et les poumons (Corneliussen et al., 1991b).

La caractérisation moléculaire de ce bHLH a montré que E2-2 agit en régulateur transcriptionnel en liant préférentiellement les séquences d'ADN consensus 5'-ACANNTGT-3' ou 5'-CCANNTGG-3' en homo- ou hétérodimère. Malgré le fait E2-2 peut lier plusieurs partenaires, un criblage double-hybride chez la levure a démontré que

E2-2 et SCL n'interagissaient pas ensemble avec une forte affinité contrairement à ses autres partenaires Id et MyoD (Goldfarb et al., 1996).

E2-2 a tout d'abord été identifié comme une protéine nucléaire capable de lier à un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) dans l'*enhancer* du virus murin *SL3-3* causant une leucémie. (Corneliusson et al., 1991b) De plus, E2-2 a aussi été identifié sur l'*enhancer* Mu-E5/KE5 du gène de la chaîne lourde et sur l'*enhancer* kappa-E2 de la chaîne légère des immunoglobulines (Corneliusson et al., 1991a). Par criblage d'une librairie murine de cDNA de cerveau, E2-2 a été détecté sur un motif de type boîte E présent sur le gène *Sst2* où il y recrute TFIID de la machinerie basale de transcription (Pscherer et al., 1996).

De plus, la délétion génique d'E2-2 est létale pour la souris. Elle cause une réduction du nombre de cellules pro-B dans les embryons murins, mais n'affecte pas l'établissement en tant que tel de la lignée B. (Zhuang et al., 1996; Barndt et al., 1999) La délétion conditionnelle du gène a permis de montrer que E2-2 contrôle non seulement le développement des cellules B, mais également la différenciation des cellules T puisque ces cellules étaient sous-représentées (Bergqvist et al., 2000). E2-2 apparaît donc un facteur de transcription important dans l'hématopoïèse.

1.7 LES AUTRES MEMBRES DU COMPLEXE

1.7.1 LMO2 et LDB-1

Les facteurs de transcription LMO2 et LDB-1 font partie de la famille des protéines à domaine LIM. Un fragment d'ADN de 70 kb encodant *Lmo2* a été cloné dans un site de translocations systématiquement impliqué dans les leucémies T-ALL [t(11;14)(p13q11)] (Royer-Pokora et al., 1991). *Ldb-1* a été cloné par un criblage de protéines nucléaires capables d'interagir avec le domaine LIM, qui ont été ensuite identifiées chez la souris (Agulnick et al., 1996; Jurata et al., 1996; Jurata and Gill, 1997; Bach et al., 1997) Un groupe a finalement cloné l'homologue humain grâce à l'analyse d'une banque de données d'EST (Express Sequence Tags) suivi d'un criblage d'une librairie de cDNA

crâno-faciale (Semina et al., 1998) Ainsi, le cDNA de *Ldb-1* long de 1953 bp encode des protéines d'environ 375 acides aminés.

LMO2 est une petite molécule riche en cystéines qui peut médier des interactions protéiques spécifiques, sans toutefois pouvoir lier l'ADN directement (Dawid et al., 1998). LMO2 comprend deux domaines LIM1 et LIM2 responsables de la création d'une interface d'interaction protéique (Schmeichel and Beckerle, 1994). En plus d'interagir avec LDB-1 avec son domaine LIM1 (Jurata et al., 1996; Deane et al., 2003), LMO2 peut interagir avec différentes protéines, dont les protéines GATA (Osada et al., 1995; Agulnick et al., 1996; Jurata et al., 1996; Visvader et al., 1997; Wadman et al., 1997; Ono et al., 1997; Bach et al., 1997; Valge-Archer et al., 1998).

LMO2 joue un rôle d'adaptateur qui permet d'assembler de larges complexes protéiques, comme dans le complexe SCL où il fait le pont entre SCL et GATA-1/2 (Feuerstein et al., 1994; Arber and Caroni, 1996; Wadman et al., 1997; Dawid et al., 1998). Dans le complexe, LDB-1 semble agir en homodimère pour aider LMO2 dans son rôle d'adaptateur (Jurata et al., 1996).

LMO2 partage le même patron d'expression que SCL dans les sites primitifs de l'hématopoïèse et dans les lignées hématopoïétiques adultes. En effet, il est exprimé dans les lignées érythroïdes et myéloïdes ainsi que dans le système nerveux central, les poumons, les reins, le foie et la rate, mais pas dans le thymus (Feroni et al., 1992; Warren et al., 1994; Brady et al., 1995; Dong et al., 1996; Silver and Palis, 1997; Delassus et al., 1999; Manaia et al., 2000). Comme LMO2, LDB-1 est exprimé dans le foie fœtal et dans les lignées érythroïdes (Visvader et al., 1997).

La perte de fonction de *Lmo2* entraîne le même phénotype que la délétion de *Scl* chez les souris, soit une mort embryonnaire au jour E9-10. Cet effet majeur sur l'érythropoïèse primitive est donc consistant avec la grande affinité avec laquelle SCL et LMO2 interagissent physiquement. De plus, les cellules E.S. nulles pour *Lmo2* ne contribuent à aucune lignée hématopoïétique dans la souris chimérique, montrant l'effet crucial de

LMO2 sur l'hématopoïèse adulte, même si LMO2 n'influence pas l'angiogénèse en tant que tel (Warren et al., 1994; Osada et al., 1995; Yamada et al., 1998; Yamada et al., 2000).

La délétion conditionnelle de LMO2 a toutefois révélé que LMO2 n'est pas essentiel chez l'adulte pour maintenir la lymphopoïèse. En effet, ces souris ne présentent aucun défaut dans le développement lymphocytaire, contrairement aux données des leucémies T-ALL où LMO2 a un rôle tumoral. En plus d'être un partenaire d'interaction avec SCL dans le complexe, LMO2 est collabore avec ce dernier dans les cas de leucémies T-ALL. Lorsqu'il est exprimé de façon erronée suite à des translocations chromosomiques, il agit alors comme oncogène en perturbant la différenciation des lymphocytes (Rabbitts, 1998; Murre, 2000). L'expression erronée de LMO2 et la formation de nouveaux complexes illégitimes reprogramme la régulation des gènes cibles, ce qui affecte particulièrement la transition DN2-DN3 des cellules T en différenciation (McCormack et al., 2003). Ces données concordent avec les défauts majeurs observés uniquement dans les lignées T des souris transgéniques surexprimant LMO2 (Larson et al., 1994; Larson et al., 1995; Neale et al., 1995).

Des études de surexpression de LMO2 et LDB-1 dans des lignées proérythroblastes montrent que ces protéines ont un effet dominant négatif sur le développement érythrocytaire puisqu'ils empêchent la différenciation. Ces données concordent avec la diminution de ces gènes lors de la différenciation érythroïde normale, suggérant qu'ils aient un rôle dans le maintien des précurseurs érythroïdes à un stade immature (Visvader et al., 1997).

Finalement, LDB-1 est également associé dans des complexes multi-protéiques dans des compartiments cellulaires autres que le système hématopoïétique. En effet, LDB-1 est associé avec LMO4, CTIP et BRCA1 pour former un complexe répresseur du gène *Brcal* dans les tissus mammaires (Sum et al., 2002). Ces protéines à domaine LIM remplissent donc des fonctions cruciales dans plusieurs types cellulaires.

1.7.2 GATA-1/2

GATA-1 et GATA-2, des partenaires du complexe SCL, sont des facteurs de transcription de la famille des protéines à doigt de zinc. Ce domaine permet de médier des interactions ADN-protéines sur des sites de liaison consensus T/A GATA T/A retrouvés dans les régions régulatrices de certains gènes (Martin and Orkin, 1990).

Ces protéines sont principalement exprimés dans le système hématopoïétique (Ohneda and Yamamoto, 2002). L'expression de GATA-2 précède celle de GATA-1 dans la hiérarchie des différentes populations de cellules hématopoïétique. Ainsi, GATA-2 est détecté dans les cellules souches et les progéniteurs non-différenciés. Son expression diminue par la suite dans les précurseurs des lignées myéloïdes, érythrocytaires et mégacaryocytaires lorsque GATA-2 commence à y être exprimé. Les cellules matures de ces lignées y expriment donc fortement GATA-2 (Simon et al., 1992; Ohneda and Yamamoto, 2002; Perry and Soreq, 2002).

Le rôle important de GATA-2 dans l'hématopoïèse primitive a été démontré par sa délétion génétique chez la souris, causant de graves défauts hématopoïétiques précoces. En effet, ces embryons meurent vers le jour E10-11 des suites d'une anémie causée par la diminution drastique du nombre de globules rouges primitifs. GATA-2 semble donc nécessaire aux progéniteurs hématopoïétiques et aux HSC pour leur maintien et leur prolifération de. (Tsai et al., 1994; Tsai and Orkin, 1997).

Des études d'ablation génétique dans les souris et les analyses de cellules E.S. nulles pour le gène de *Gata-1* ont montré que ce facteur de transcription est essentiel à la survie de progéniteurs érythrocytaires et de leur différenciation terminale (Pevny et al., 1991; Simon et al., 1992; Weiss et al., 1994; Weiss and Orkin, 1995; Pevny et al., 1995; Ohneda and Yamamoto, 2002). De plus, la surexpression de GATA-1 dans les HSC et dans des lignées cellulaires provoque la perte de la capacité d'auto-renouvellement des HSC et une différenciation exclusive vers la lignée érythroïde et mégacaryocytaires

(Visvader et al., 1992; Shivdasani and Orkin, 1996; Shivdasani et al., 1997; Iwasaki et al., 2003).

Ainsi, GATA-1 semble donc jouer un rôle important dans le choix de lignée et dans l'érythropoïèse définitive, tout comme SCL. La présence de ce partenaire est donc essentielle au bon fonctionnement du complexe SCL en médiant des interactions protéiques avec plusieurs partenaires et en servant de point d'encrage supplémentaire sur la chromatine.

1.8 EN RÉSUMÉ...

L'hématopoïèse est un système hiérarchique où l'établissement, le maintien, la prolifération et la différenciation des cellules souches, des progéniteurs et des différentes lignées matures sont finement régulés. La régulation du système hématopoïétique est assurée par une combinaison de signaux environnementaux et de facteurs de transcription exprimés de façon spatio-temporelle. Pour cibler l'expression de certains gènes, le facteur de transcription hémato-spécifique SCL assure la nucléation d'un complexe transcriptionnel avec ses partenaires E2A, LMO2, LDB-1 et GATA-1/2. La perturbation de l'intégrité du locus et du patron d'expression de SCL et de ses partenaires entraîne malheureusement la transformation maligne des cellules et l'apparition de leucémies. Ces mécanismes moléculaires assurant la régulation de l'hématopoïèse doivent donc être maintenus à tout prix.

RATIONALISATION DU PROJET

Le système hématopoïétique est un modèle de choix pour étudier les mécanismes et les effecteurs de la régulation de l'expression génétique. Des années d'efforts ont permis d'approfondir les connaissances sur SCL, un facteur de transcription essentiel pour la spécification et le développement du système hématopoïétique ainsi que le choix de lignée pendant la différenciation. Puisque les domaines de transactivation et de liaison à l'ADN de SCL ne sont pas essentiels, la fonction de nucléation qu'assure SCL entre des protéines d'ancrage à l'ADN (E2A et GATA) et des protéines d'échaffaudage (LMO2 et LDB-1) apparaît donc capitale. (Aplan et al., 1997; Chervinsky et al., 1999; Porcher et al., 1999; O'Neil et al., 2001; Juarez et al., 2005)

La caractérisation des mécanismes de régulation du facteur de transcription SCL est la thématique dans laquelle s'inscrit de mon projet de maîtrise. Les modifications de la structure de la chromatine, la régulation transcriptionnelle du gène et les diverses modifications post-traductionnelles de la protéine sont déjà connues pour réguler SCL. Une hypothèse émergente implique que l'interaction physique entre les facteurs de transcription nécessaires à la formation du complexe permet leur régulation mutuelle. Cette régulation intrinsèque affecterait donc leur stabilité, leur dégradation et les mécanismes de transport responsables de leur distribution spatio-temporelle. Je propose donc d'examiner les interactions physiques entre SCL et ses partenaires de dimérisation: les protéines E2A et HEB. Le rôle crucial de l'interaction avec E2A est notamment illustré par SCL-FL, un mutant de la première hélice du bHLH ayant perdu la capacité de former le complexe sur la chromatine puisqu'il est incapable d'interagir avec E2A (Lecuyer et al., 2002). L'abrogation de l'interaction avec E2A ou l'absence de ce dernier corrèle avec la diminution des niveaux protéiques de SCL. Mes travaux ont donc permis de découvrir un nouveau mécanisme de régulation du facteur de transcription hématopoïétique SCL par les protéines E2A et HEB. Les prochains chapitres s'attarderont à décrire et analyser les résultats que j'ai obtenus pendant les trois années que j'ai consacrées au développement de ce projet.

CHAPITRE 2

PRÉSENTATION DU MANUSCRIT

Le manuscrit suivant synthétise et commente les résultats que j'ai obtenus dans le cadre de mon projet de maîtrise et il sera soumis sous peu à un journal scientifique.

DECIPHERING A NOVEL ROLE OF E2A AND HEB ON THE HEMATOPOIETIC TRANSCRIPTION FACTOR SCL

Marianne Desrosiers, Eric Lécuyer, Sabine Herblot, Mathieu Tremblay, Julie Lambert,
Pierre Thibault and Trang Hoang

Institute for Research in Immunology and Cancer, University of Montreal.

This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research and National Cancer Institute of Canada (T.H.) and studentships from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (M.D. et M.T.) and from the Canadian Institutes of Health Research (E.L., M.T. and J.L.) in addition to a post-doctoral award from the Leukemia Research Fund of Canada (S.H.)

RUNNING TITLE : Novel role of the E proteins E2A and HEB on SCL

Correspondence to:

Dr Trang Hoang
Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC)
University of Montreal
P.O. Box 6128, Downtown Station
Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7
Tel.: (514) 343-6970
Fax : (514) 343-6945
E-mail: trang.hoang@umontreal.ca

ABSTRACT

SCL/TAL1, a basic helix-loop-helix transcription factor (bHLH), is essential for the development of erythroid cells. SCL requires heterodimerization with E proteins, members of a bHLH subfamily, to bind DNA and activate transcription. Strikingly, we show here that this heterodimerization is essential to stabilize the SCL protein and to direct its nuclear localization. Proteomic analysis of SCL partners in erythroid progenitors reveal marked differences among E proteins as HEB and E2A are more abundant than E2-2. Consistent with this differential abundance, E2A and HEB strongly enhance SCL protein while the effect of E2-2 is minimal. Finally, E2A or HEB deficiency causes a reduction in SCL protein levels in developing fetal liver cells, associated with decreased red cell production. Together, our data unravel an essential role of E protein heterodimerization in establishing SCL levels in hematopoietic cells and setting the production of erythroid cells.

INTRODUCTION

The generation of blood cells is governed by a highly coordinated process of multi-lineage differentiation from pluripotent hematopoietic stem cells (HSCs) and committed progenitors. Due to their differential spatio-temporal expression and combination, transcription factor complexes act as key regulators at important check-points between cell proliferation and differentiation (Nicolas Goardon et al., 2006). Therefore, transcription factors must be finely regulated to allow for the timely activation or repression of specific gene expression programs. Transcription factors of the bHLH family are crucial regulators of hematopoiesis, neurogenesis, and myogenesis (Weintraub, 1993; Jan and Jan, 1993; Massari and Murre, 2000; Hassan and Bellen, 2000; Vervoort and Ledent, 2001). These factors are either expressed ubiquitously (HEB, E2A) or present a tissue-specific distribution (SCL, MyoD). SCL is expressed in hematopoietic stem cells, as well as multipotent, erythroid, and megakaryocytic progenitors (Kallianpur et al., 1994; Elefanty et al., 1998; Akashi et al., 2000) and SCL deficiency disrupts the formation of erythrocytes and megakaryocytes (Robb et al., 1995; Vyas et al., 1999; Mikkola et al., 2003; Hall et al., 2003), while SCL misexpression in the lymphoid lineage driven by chromosomal rearrangements cause thymocyte differentiation arrest (Larson et al., 1996; Herblot et al., 2000) and induce leukemia (Aplan et al., 1992a; Larson et al., 1996; Lecuyer and Hoang, 2004). Thus, the regulation of SCL levels is an important determinant of cell fate decision in the hematopoietic system. Much effort has been dedicated to studying the transcriptional regulation of the SCL locus, revealing the existence of complex regulatory sequences that drive SCL expression in adult stem cells and fetal brain *in vivo* (Green et al., 1992; Gottgens et al., 2002). The determinants of erythroid expression have been defined *in vitro* (Lecointe et al., 1994; Leroy-Viard et al., 1994; Courtes et al., 2000) but not *in vivo*. Finally, the post-transcriptional regulation of SCL is largely unexplored.

SCL has been shown to drive the transcription of erythroid genes (Lahlil et al., 2003; Xu et al., 2003; Nicolas Goardon et al., 2006) and this function requires the nucleation of a

multiprotein complex largely mediated by the HLH domain of SCL (Hsu et al., 1994b; Porcher et al., 1999; Lecuyer et al., 2002). The role of E2A, a member of the E protein family, in this complex is essential in transcription activation and in setting the expression levels of endogenous SCL target genes in erythroid progenitors (Lecuyer et al., 2002; Lahlil et al., 2003). What is the contribution of E2A at the molecular and subcellular levels remains to be clarified. It was first shown that SCL does not bind DNA on its own and requires heterodimerization with E2A for high affinity association to DNA via E boxes (Hsu et al., 1991). However, later reports indicate that the SCL complex can be tethered to DNA by GATA sites and GC boxes in the absence of E boxes (Lecuyer et al., 2002; Lahlil et al., 2003; Xu et al., 2003), raising the possibility that E2A has other functions. Indeed, we have previously shown that within the SCL complex, E2A brings its transactivation domain (Lecuyer et al., 2002; Lahlil et al., 2003) and a truncated mutant in which the bHLH domains are intact is dominant negative over wild type E2A. Nonetheless, E2A deficiency does not mirror SCL deficiency in hematopoiesis (Zhuang et al., 1994).

E proteins include E12 and E47, both encoded by the *E2a* gene, HEB and E2-2 (Quong et al., 2002), all of which are expressed in hematopoietic progenitors (Nicolas Goardon et al., 2006). In the present study, we provide evidence that both E2A and HEB have a critical function in setting SCL protein levels in erythroid progenitors, thus defining erythroid lineage outcome *in vivo*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice : E2A^{-/-} and HEB^{-/-} mice were kindly provided by Dr. Y. Zhuang (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA) and bred in C57Bl6/J background for more than ten generations. Heterozygous animals were crossed to get homozygous knockout mice, and all the litters were genotyped by PCR as described (Zhuang et al., 1992; Bain et al., 1994). Animals were maintained under pathogen-free conditions according to institutional animal care and use guidelines.

DNA constructs : The MSCVneo_SCL plasmids was described previously (Hawley et al., 1994; Calkhoven et al., 2003). The pRC-CMV_SCL was kindly given by Dr IR Kirsch (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) (Aplan et al., 1992b), MSCVpgk_EGFP from Dr G Sauvageau (Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal, QC, Canada) (Kroon et al., 2001). The expression vectors for pcDNA1_E47(rat) and pcDNA1_E12(rat) were generously provided by Dr J Drouin (Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, QC, Canada) (Nelson et al., 1990). The pcDNA3_HEB was created by subcloning a SmaI derived HEB cDNA fragment of pSM_HEB received from Dr DR Littman (Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York, New York, USA) (Sawada and Littman, 1993). For the constructs MSCVneo_GFP, and pcDNA3.1(-)_GFP, the GFP cDNA was prepared from pBSGFP_NoMSC kindly provided by Dr. S. Meloche (Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal, QC, Canada) with EcoRI and BamHI. The MSCVneo and pcDNA3.1(-) plasmids were respectively digested with BglII and EcoRI or BamHI and EcoRI before ligation with the cDNA.

Cell culture and transfection : Cultures were maintained in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a humidified incubator at 37°C in 5% CO₂. The cells were passaged with trypsin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). BOSC cells were plated at 300 000 cells/ml whereas NIH 3T3 and COS cells were plated at 100 000

cells/ml. After 24 h, calcium phosphate was used to transfect different expression vectors. The following morning, the cells were washed twice with room temperature phosphate buffered saline (PBS) and medium was changed. Protein extraction was done 36 h following the transfections. For primary hematopoietic cells, foetal livers cells from E14.5 embryos were dissected, disaggregated into single-cell suspensions in IMDM containing 10% FCS and later washed in phosphate-buffered saline PBS.

Hematopoietic Colony Assay : Hematopoietic colonies were obtained by plating fetal liver cells from day E14.5 embryos at 2×10^4 cells/mL in IMDM supplemented with 1% methylcellulose (Fluka, Ronkonka, NY, USA), 10% FCS, 200 $\mu\text{g/mL}$ transferrin, 2% BSA, 5 ng/mL IL-3, 10 ng/mL TPO (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) and 2.5×10^{-15} M Mono Ethylen Glycol. IL-3, SF, EPO and IL-11 were derived from media conditioned by COS cells transfected with corresponding expression vectors and titrated against a recombinant source. After 7 days of culture, erythroid (BFU-E) and myeloid (CFU-GM) colonies were scored and their frequencies were calculated per 10 000 cells.

RNA Preparation, cDNA Synthesis and PCR Amplification : Total RNA was prepared as described before (Chomczynski and Sacchi, 1987), using tRNA as carrier for ethanol precipitation. First-strand cDNA synthesis was performed as described (Herblot et al., 2000), except for the modified DNase treatment. The reaction was done in a final volume of 20 μL of 1X React 2 buffer, 50 units of DNaseI, 15 units of RNasin combined with 2.5 units of restriction enzymes (EcoRI, AvaII, HinfI, SacI, TaqI and MscI) (all from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to remove the plasmids used to transfect the cells that coprecipitated with the RNA. SyberGreen quantitative PCR was performed on a MX3000 apparatus (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. To amplify the SCL and the internal controls S14 and GFP, one μL of the cDNA sample was added in the PCR mixture containing respectively 0.2, 0.4 and 0.5 μM of each specific 5' and 3' primers (Biocorp, Montreal, QC, Canada), Rox passive dye (1/13380) and 10 μL of Brilliant SYBR Green QPCR Core Reagent Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in a final volume of 20 μL . Forty cycles of amplification were performed, followed by 38 cycles of denaturation-annealing

steps. Amplification plots and dissociation curves were analyzed with the MX3000 (Stratagene, La Jolla, QC, Canada) and Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) Softwares. The primer sequences for are the following:

(hSCL_Fw) tcctatgttcaccaccaac (hSCL_Rv) gatgtgtgggatcagctt
 (hS14_Fw) ggcagaccgagatgaatcctc (hS14_Rv) caggtccaggggtcttggtcc
 (GFP_Fw) gtaaacggccacaagttcag (GFP_Rv) cttgaagaagtcgtgctgct

Immunofluorescence and Microscopy : Transfected BOSC cells were detached using trypsin, fixed for 20 min in 500 μ L of Bouin's, washed in PBS, and spread onto gelatinized slides by cyto-centrifugation. For indirect immunofluorescence analysis, cells were blocked for 1 h and then labeled for 2 h with primary antibodies. After 3 washes in PBS, cells were labeled for 1 h with solution containing the secondary antibodies conjugated with FITC or Cy3. Following PBS washes and Hoechst counterstaining, cells were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and analyzed by confocal microscopy. Images were analyzed using Zeiss LSM Image Examiner 2.50 (Carl Zeiss, Jena, Germany) and Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) softwares.

FACS analysis : Fetal liver cells were labelled with phycoerythrin-conjugated murine Ter119 antibody (PharMingen, Mississauga, On, Canada) in staining buffer (PBS + 2% FCS). A LSR II apparatus (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was used to assess to analyse the fluorescence of stained cells. Dead cells were excluded by adding 1 μ g of propidium iodide/ml prior to detection.

Protein extraction : The nuclear extracts were prepared as described previously (Poulin et al., 1997). Transfected cells were harvested using cold PBS and gently spun down. The supernatant was removed, and the cells were resuspended in buffer A (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA and 0.1 mM EGTA). The cells were left on ice for 15 min to swell, and then Nonidet P-40 was added to a final concentration of 0.66%. The cells were then vortexed for 30 sec and centrifuged at 12 000 rpm. The supernatant

was subsequently kept as cytoplasmic extract, and the pellet of nuclei was resuspended in buffer C (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA and 0.1 mM EGTA). The nuclei were then shaken for 1 h at 4°C. The supernatant was kept at -70°C after a centrifugation at 13000 rpm at 4°C. Buffer T used to extract and immunoprecipitate the ³⁵S-labelled proteins contained 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0 and 1% Triton-X, whereas buffer N used for cycloheximide extraction was composed of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS and 1% Nonidet P-40. After 30 min of lysis, the dishes were tilted to collect the extracts, followed by a centrifugation step of 20 min at 13 000 rpm at 4°C. The supernatant was then subjected to immunoprecipitation. To recover both soluble and insoluble proteins, transfected cells were lysed in diluted Laemmli buffer (58.3 mM Tris-HCl pH 6.8, 1.6 % SDS, 5% glycerol, 38.3 mM β-mercaptoethanol) heated at 100°C. The dishes were scraped with policemen and the recovered lysates were centrifuged for 20 min at 13 000 rpm at 4°C. The supernatants were kept at -70°C. Total protein extracts of fetal liver mice cells (E14.5) were obtained by resuspending the cells in RIPA buffer (10 mM Tris pH 8.0, 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM EDTA pH 8.0, 0.1% deoxycholate, 0.1% SDS) and keep it on ice for 15 minutes. Following a 20 min centrifugation at 13 000 rpm at 4°C, the supernatants was kept at -70°C. All the lysis buffers contained a cocktail of inhibitors composed of 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100 µg/mL pepstatin A, 10 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, 1 mM DTT, 1 µg/mL antipain, 1 µg/mL chymostatin).

Western-blot : The concentrations of protein extracts were determined by Bradford staining (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were then separated on sodium dodecyl sulfate-PAGE (SDS-PAGE) and transferred on poly(vinylidene difluoride) (PVDF) membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The following immunodetection was revealed by means of ECL Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). The signal was quantified with Multi-Gauge (Fujifilm, Tokyo, Japan), Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) and Graph Pad Prism 4 (San Diego, CA, USA) softwares.

Immunoprecipitations : Following the protein extraction, an aliquot of extract was kept as an input, and the samples were precleared for 30 min at 4°C with formalin-fixed *Staphylococcus aureus* (Staph A) (Pansorbin, Calbiochem-Novabiochem International, La Jolla, CA, USA). The immunoprecipitations were performed overnight at 4°C with 500 mg of total extracts, and 10 µg of specific antibody against SCL (5µg BTL73 and 5µg 2TL136) or control Ig in a final volume of 1 mL in buffer T. Immune complexes were then recovered with Staph A for 30 min at 4°C and washed 3 times with buffer T. The proteins were then eluted in Laemmli buffer and boiled in glycerol at 110°C for 10 min and migrated on SDS-PAGE. Specific signal was then revealed by western-blot or fluorography.

Tandem Affinity Purification : The tandem affinity purification (TAP) tag was cloned in frame at the C-terminal end of a cDNA encoding full-length SCL within the MSCV retroviral vector. Alternatively, the TAP fragment was cloned in an empty MSCV vector as a negative control for SCL complexes purification. Retroviruses carrying these constructions were used to infect TF-1 cells, as described above. After 1 week of G-418 selection, the nuclear proteins were extracted as previously described (Krosli et al., 1998) and dialysed against IPP 100G buffer (10 mM Tris pH8, 100 mM NaCl, 0.1% Triton 100X, 10% glycerol). Nuclear extracts were then subjected to purification with a protocol adapted from Seraphin's lab and Coulombe's lab (Rigaut et al., 1999; Jeronimo et al., 2004). Briefly, SCL-tap nuclear extract and its negative control TAP were immobilized on IgG beads in IPP 100G buffer for 1 hour at 4°C. The TEV protease was added overnight to allow release of bound complexes. In the second affinity purification, the complexes were recover upon binding to calmodulin beads (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in CBB 100G buffer (10mM Tris pH8, 100mM NaCl 1mM Immidazole, 1mM Mg acetate, 2mM CaCl₂, 0.1% Triton, 10% glycerol, 10mM β-mercaptoethanol). After several washes, the bound proteins were eluted with CEB 100 buffer (10mM Tris pH8, 100mM NaCl, 1mM Immidazole 1mM Mg acetate, 2mM EGTA, 10mM β-mercaptoethanol). One tenth of the TAP eluates was separated by SDS-PAGE and transferred on PVDF membranes for western blotting with anti-SCL (BTL-73) antibody in order to confirm the presence of SCL in the final elution. The remaining TAP eluates

were run in sodium dodecyl sulfate (SDS) gel and silver stained. The major bands were cut-off from the gel and subjected to in-gel tryptic digestion. The resulting peptides were separated, ionized and identified by HPLC-ESI-MS/MS analysis.

³⁵S Protein Labeling : Transfected BOSC cells were washed two times and starved of methionine and cysteine for 30 min in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) lacking these nutrients containing 10% dialyzed Fetal Calf Serum (FCS) (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). The medium was then replaced and ³⁵S-labeled methionine and cysteine (300 μ Ci/mL) (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) were then added to the medium. The cells were incubated for 7 min in a humidified incubator at 37°C in 5% CO₂ in air. After two washes with cold PBS, the proteins were extracted in buffer T and immunoprecipitated as described above. The gels were stained with Coomassie blue, soaked with Amplify (Amersham Biosciences, Piscataway, CA, USA), dried and detected by fluorography. *In vitro* translated SCL and SCL-FL were labelled with ³⁵S-methionine with the TNT coupled reticulocyte lysate system from Promega (Madison, WI, USA). The IVT's were then subjected to SDS-PAGE and the dried gels were then detected by fluorography.

Cycloheximide-Chase : The transfected cells were treated with cycloheximide (100 μ g/mL) (Sigma, Milwaukee, WI, USA) for the indicated time periods, washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) and instantaneously frozen on liquid nitrogen. Afterward, the dishes were placed on ice and upon thawing, the proteins were extracted with buffer N as described above. The supernatant was then subjected to western-blot analysis.

Antibodies : The membranes were blocked and the antibodies were diluted in 5% dried milk in TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20), except for the immunofluorescence assays (PBS with 10 % (blocking) or 1% (antibodies) of NGS). The mouse monoclonal antibodies SCL(BTL73) and SCL(2TL136) were generously provided by Dr D. Mathieu (Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier, France). SCL(BTL73) was diluted 1/1000 for western-blot, 1/100 for immunofluorescence and 5

μg of both SCL antibodies were used for immunoprecipitations. The E2A(YAE) sc-416 mouse polyclonal antibody, E47(N-649) sc-763X rabbit polyclonal antibody, E2A(E12) sc-349 rabbit polyclonal antibody, HEB(A20) sc-357 rabbit polyclonal antibody, GFP(FL) sc-8334 rabbit polyclonal antibody and RNA Pol. II (N-20) sc-899 rabbit polyclonal antibody were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). For western-blot, E2A(YAE) and GFP(FL) were diluted at $1 \mu\text{g}/\text{mL}$, E47(N-647) at $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ and HEB(A20) and RNA Pol. II (N-20) at $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$. For the immunofluorescence, E2A(E12) was diluted at $0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$. The mouse antiserum for PTP-1D/SHP2 MAb # 610622 and SC35 # 5556363 from BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA, USA) were used for western-blot at dilution of $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$. The α -Tubulin monoclonal mouse antibody from Sigma (Milwaukee, WI, USA) was used for western-blot at dilution of 1/10 000. For Western-blots, the secondary antibodies goat against mouse IgG(H+L)-HRP Conjugate (170-6516) and goat against rabbit IgG(H+L)-HRP Conjugate (170-6515) from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) were diluted at a concentration of 1/50 000. As for the immunofluorescence assays, the secondary FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(H+L) (115-095-100) and Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) were diluted 1/100 and 1/300. For the FACS analysis, the phycoerythrin-conjugated murine Ter119 antibody (Pharmingen, Mississauga, On, Canada) was diluted at 1/500 in staining buffer (PBS + 2% FCS).

RESULTS

2.1 The coexpression of E proteins is essential for SCL

Transcription activation by the SCL complex critically depends on the capacity of SCL to nucleate a large complex on DNA (Lahlil et al., 2003) and a mutant that fails to interact with E2A (SCL-FL) is also transcriptionally inactive. To define the importance of the interaction of SCL with E2A, expression vectors encoding these two proteins were cotransfected in three different cell lines, NIH-3T3, BOSC and COS cells, and protein levels were assessed by Western blotting (Figure 1A). In the absence of E2A, SCL protein levels were at the limit of detection of the assay. However, when E2A was cotransfected, SCL protein levels increased by 8.9, 3.5 and 7.6 fold in all three cell lines, respectively, indicating that the effect of E2A was not cell type-specific. Furthermore, E2A did not influence the expression levels of GFP which was co-delivered with SCL as a control. These observations indicate that E2A specifically and significantly increased SCL protein levels.

E2A, a member of the E protein family that also includes HEB and E2-2, codes for two isoforms, E47 and E12, by alternative splicing. As shown in Figure 1B, the coexpression of E47, E12 or HEB increased at least 20 times SCL protein levels of. In comparison, the outcome observed with E2-2 was much more modest. Since the interaction between SCL and E2-2 is of low affinity, these results suggest that SCL protein levels are modulated by its heterodimerization with these E proteins, a hypothesis that we directly addressed using the SCL-FL mutant. This mutant harbours a point mutation in the first helix of the HLH, and disrupts SCL interaction with E2A. Both wild type and the SCL-FL mutant were efficiently translated *in vitro* (Figure 1C). However, when cotransfected with E2A, the mutation also disrupts the capacity of E2A to increase SCL protein levels. Together, our results indicate that the heterodimerization between SCL and E proteins governs their capacity to enhance SCL protein levels.

All E proteins are expressed in hematopoietic cells (Nicolas Goardon et al., 2006). We therefore assessed which of these proteins are found in a complex with SCL in TF-1 cells, by co-immunoprecipitation with a monoclonal antibody against SCL (data not shown) and by mass-spectrometry identification of proteins that co-purify with a TAP-tagged SCL. As shown in Figure 1 D, HEB, E2A and E2-2 were identified by mass spectrometry analysis, albeit with noticeable differences. Both the coverage and the number of peptides recovered were highest for HEB, and lowest for E2-2. These results suggest that heterodimerization partners that directly associate with SCL in the TF-1 progenitor cell line follow this order: HEB, E2A and E2-2.

2.2 Post-translational regulation of SCL by E2A

To determine whether or not increased protein levels are a consequence of increased translation, we monitored SCL biosynthesis by *in vivo* protein radiolabelling with ^{35}S -labelled methionine and cysteine for a short period of time (7 min), followed by immunoprecipitation with the monoclonal anti-SCL antibody. In parallel, we also immunoprecipitated SCL in the absence of radiolabelling as a control. As shown by Western blotting in Figure 2A, SCL protein levels at steady-state show the same modulation by E2A whether in the input, or in the immunoprecipitated proteins. Furthermore, the anti-SCL antibody immunoprecipitates SCL and co-immunoprecipitates E2A without bringing down GFP, indicating its specificity. In parallel, immunoprecipitated proteins that were pulse-labeled by ^{35}S incorporation were resolved on an SDS gel and exposed to a PhosphoImager screen. Surprisingly, despite differing steady-state protein levels, the radio-labeling of SCL was not affected by E2A, indicating that E2A does not increase SCL biosynthesis.

To evaluate a potential influence on SCL transcription, we analyzed SCL mRNA levels by quantitative RT-PCR (Figure 2B) and by semi-quantitative RT-PCR (data not shown) and show that the mRNA levels of SCL are not significantly increased in the presence or in the absence of E2A.

To check if E2A was not simply releasing a sequestered pool of SCL protein already present in the cell, we used a technique that allows for the extraction of all insoluble proteins. As shown in Figure 2C, the total protein levels of SCL remained very low in the absence of E2A and increased 5.9 times on coexpression, consistent with the view that the effect of E2A was not due to a higher release of SCL from an intracellular pool (Figure 2C). Finally, the MSCV-LTR has three putative binding sites for the E2A-SCL heterodimer. To strictly rule out the possibility that the SCL-E2A heterodimer may increase LTR-dependent transcription, we placed the GFP gene directly under the control of the LTR in the MSCV vector. As shown in Figure 2C, E2A caused a dramatic increase in SCL protein levels as expected, while the variations in GFP levels were not significant. Together, our data are consistent with the view that E2A specifically increases the steady state levels of SCL without affecting its biosynthesis, and this effect requires direct protein-protein interaction.

2.3 E2A has a dual effect on the stability and the cellular localization of SCL

The above observations suggest that the physical interaction between E2A and SCL could protect SCL from degradation processes that would otherwise deplete its total pool in the cell. To address this question, we determined the half-life of the SCL protein in the presence or absence of E2A through cycloheximide-chase. As shown in Figure 3A, the half life of the SCL protein increased from 6 h to 17 h on co-delivery of E2A. Furthermore, the lower isoform p40 appeared to be more unstable than p42, with a half-life of 2.6 h. Nonetheless, this isoform was also stabilized in the presence of E2A as its half-life increased to 10 h. Together, our results indicate that the interaction between SCL and E2A stabilizes the SCL protein.

To address the possibility that this interaction may also result in more efficient nuclear localization, we determined the effect of E2A on SCL protein levels in the nucleus and the cytosol. The relative purity of these fractions is confirmed by the enrichment for tubulin in the cytoplasmic fraction and for RNA polymerase II and the SR protein SC35 in the nuclear fraction. As observed above with nuclear SCL, cytoplasmic SCL is

particularly low in the absence of E2A and increased when its partners is coexpressed (Figure 3B). Surprisingly, we found that the coexpression of E2A not only raises the protein levels of SCL in both fractions, but that it also increased by 4.1 fold the nuclear localization of SCL. The nuclear/cytoplasmic distribution of SCL was further confirmed by immunofluorescence assays on transfected cells. When SCL is expressed alone, the fluorescence signal is very faint and it is detected mostly in the cytoplasm. The signal becomes distributed to the nucleus upon its coexpression with E2A, where both signals perfectly merge (Figure 4). Our observations therefore suggest that SCL heterodimerization to E2A results in more efficient nuclear localization and stabilization of the protein

2.4 E2A and HEB regulate SCL protein levels *in vivo* and erythroid lineage outcome.

SCL is essential for the development of the erythroid lineage. Furthermore, our proteomic analyses of the SCL complex in erythroid cells indicate that both E2A and HEB are recruited to the complex (Nicolas Goardon et al., 2006). To investigate the importance of E2A and HEB on SCL levels and SCL function *in vivo*, we analyzed mice that are E2A or HEB-deficient. These mice do not come to term and we therefore analyzed the fetal liver at 14.5 d.p.c., which is the first site of definitive erythropoiesis during embryonic development. Western-blot analysis of protein extracts from fetal livers showed a 60% decrease in SCL levels in E2A and HEB knock-out mice (Figure 5).

This decrease in SCL is not due to an imbalance in the cellular composition since the percentage of Ter119⁺ erythroid cells in the fetal liver does not show significant variation between wild-type, heterozygous and knock-out littermates (Figure 6A). In contrast, the fetal liver was smaller and the total number of erythroid cells per embryo showed a 2 to 6 fold reduction when compared to wild type embryos. To determine whether the decrease in erythroid cell output is due to an intrinsic defect in erythroid progenitors or a non-cell autonomous defect, we quantified the frequency of

hematopoietic progenitors in the fetal livers, through methylcellulose culture (Figure 6B). E2A deficiency significantly impaired the frequency of erythroid progenitors (BFU-E) in the fetal liver without affecting the frequency of granulocyte macrophage progenitors (CFU-GM).

Together, our data indicate that E2A deficiency impairs SCL protein levels and the generation of erythroid progenitors, causing a quantitative reduction in erythroid cell output without affecting their maturation to TER119 positive cells.

DISCUSSION

In the present study, we provide evidence that E proteins influence the fate of the SCL protein and erythroid lineage outcome. We show that the interaction between SCL and E2A or HEB is essential for SCL expression and function in the developing embryo.

Transcription factors of the bHLH family have been shown to determine cell fate. Thus, SCL is essential for the formation of erythroid cells (Robb et al., 1995; Mikkola et al., 2003; Hall et al., 2003), MyoD for muscle development (Weintraub et al., 1991) and E2A for B lineage cells (Zhuang et al., 1996; Murre, 2000). SCL determines erythroid cell fate by driving the expression of erythroid genes such as glycophorin A (Lahlil et al., 2003), band 4.2 (Xu et al., 2003) and globin genes (Elefanty et al., 1997; Goardon et al., 2002), as well as cell cycle genes (Nicolas Goardon et al., 2006), in addition to specifying cell survival (Martin et al., 2004). SCL therefore, fulfills the role of a master regulator of the erythroid lineage. The regulation of SCL expression is therefore critical in shaping the erythroid lineage and has been investigated intensively at the transcriptional level (Lecointe et al., 1994; Leroy-Viard et al., 1994; Gottgens et al., 2000; Courtes et al., 2000; Gottgens et al., 2002). Whether or not SCL is regulated at the post-transcriptional level remains to be documented. SCL requires interaction with E2A to bind DNA at specific E boxes (Hsu et al., 1991) However, previous work suggests that SCL can regulate transcription in the absence of direct DNA binding, via the nucleation of a large transcription complex that is tethered to DNA by GATA sites and GC boxes (Lecuyer et al., 2002; Lahlil et al., 2003; Xu et al., 2003). In this context, SCL still requires heterodimerization with E proteins, since a mutant that is unable to form heterodimers also fails to activate transcription (Lecuyer et al., 2002). Here we show that E proteins are essential heterodimers that stabilize the SCL protein *in vivo*. Furthermore, heterodimerization with E proteins also increases SCL nuclear localization. These observations are reminiscent of the heterodimerization of MyoD with E2A (Lingbeck et al., 2005) and suggests that post-translational regulation via protein-protein interaction may be more general than anticipated in gene expression and cell fate determination.

Not all E proteins are equal dimerization partners, and the specificity of interaction has been attributed to residues within the HLH. Indeed, E2-2 has low affinity for SCL and associates with higher affinity to Id2 and MyoD (Goldfarb et al., 1996). Consistent with this low affinity interaction, the recovery of E2-2 in our proteomics analysis of tandem affinity purified SCL was lower than that of E2A and HEB, and the enhancing effects of E2-2 on SCL protein was also much lower. Furthermore, although the effects of HEB, E12 and E47 on SCL protein were indistinguishable, there were mild differences in their abundance as assessed by mass spectrometry analysis and biological outcome. Indeed, the relative abundance of E2A in complex with SCL was somewhat lower than that of HEB, and the deficiency in E2A also had a more modest effect on TER119 cells. This difference is likely to reflect the relative expression of E2A and HEB in the erythroid lineage. Finally, in the absence of E2A or of HEB in fetal liver cells, some SCL protein was still detected and erythropoiesis still takes place in the fetal liver, albeit at reduced levels, while the absence of SCL causes a complete deficiency in erythroid lineage cells. These observations are in good agreement with our proteomics analysis, indicating that both E2A and HEB associate with SCL in erythroid cells and probably have overlapping and redundant functions as SCL partners.

Transcription regulation by SCL requires the nucleation of a multiprotein complex that functions in an all or nothing fashion, through a mechanism that we refer to as coincidence detection, in which the simultaneous presence of all partners is essential for transcription to occur (Lecuyer et al., 2002; Lahlil et al., 2003). In this complex, each protein partner contributes specific functions, GATA factors tether the complex to DNA, SCL and LMO2 are required for protein-protein interaction and E2A or HEB contribute their activation domains. The present study unravels a novel role for the E2A/HEB transcription factor in stabilizing the SCL protein and favoring its nuclear localization.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Philippe Coulombe for advice on protein half life determination, Danièle Gagné and Christian Charbonneau (IRIC) for their assistance with cell sorting and microscopy, André Haman for technical help and Annie Perreault for the mice handling. The work was funded by grants from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the National Cancer Institute of Canada (NCIC). M. Desrosiers was supported by a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, E. Lecuyer, M. Tremblay and J. Lambert by doctoral awards from the Canadian Institutes for Health Research and S. Herblot by a postdoctoral fellowship from the Leukemia Research Fund of Canada.

REFERENCES

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

Aplan,P.D., Lombardi,D.P., Reaman,G.H., Sather,H.N., Hammond,G.D., and

Kirsch,I.R. (1992a). Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79, 1327-1333.

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

Bain,G., Maandag,E.C., Izon,D.J., Amsen,D., Kruisbeek,A.M., Weintraub,B.C., Krop,I., Schlissel,M.S., Feeney,A.J., van Roon,M., and . (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79, 885-892.

Calkhoven,C.F., Muller,C., Martin,R., KrosI,G., Hoang,T., and Leutz,A. (2003). Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. *Genes Dev.* 17, 959-964.

Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.

Courtes,C., Lecointe,N., Le Cam,L., Baudoin,F., Sardet,C., and Mathieu-Mahul,D. (2000). Erythroid-specific inhibition of the tal-1 intragenic promoter is due to binding of a repressor to a novel silencer. *J. Biol. Chem.* 275, 949-958.

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

Elefanty,A.G., Robb,L., Birner,R., and Begley,C.G. (1997). Hematopoietic-specific genes are not induced during *in vitro* differentiation of scl-null embryonic stem cells. *Blood* 90, 1435-1447.

Goardon,N., Schuh,A., Hajar,I., Ma,X., Jouault,H., Dzierzak,E., Romeo,P.H., and Maouche-Chretien,L. (2002). Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B- and T-lymphoid differentiation. *Blood* 100, 491-500.

Goldfarb,A.N., Lewandowska,K., and Shoham,M. (1996). Determinants of helix-loop-helix dimerization affinity. Random mutational analysis of SCL/tal. *J. Biol. Chem.* 271, 2683-2688.

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

Gottgens,B., Nastos,A., Kinston,S., Piltz,S., Delabesse,E.C., Stanley,M., Sanchez,M.J., Ciau-Uitz,A., Patient,R., and Green,A.R. (2002). Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J.* 21, 3039-3050.

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

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

Hassan,B.A. and Bellen,H.J. (2000). Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev.* 14, 1852-1865.

Hawley,R.G., Lieu,F.H., Fong,A.Z., and Hawley,T.S. (1994). Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther.* 1, 136-138.

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

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

Hsu,H.L., Wadman,I., Tsan,J.T., and Baer,R. (1994). Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 5947-5951.

Jan,Y.N. and Jan,L.Y. (1993). HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* 75, 827-830.

Jeronimo,C., Langelier,M.F., Zeghouf,M., Cojocar,M., Bergeron,D., Baali,D., Forget,D., Mnaimneh,S., Davierwala,A.P., Pootoolal,J., Chandy,M., Canadien,V., Beattie,B.K., Richards,D.P., Workman,J.L., Hughes,T.R., Greenblatt,J., and

- Coulombe,B. (2004). RPAP1, a novel human RNA polymerase II-associated protein affinity purified with recombinant wild-type and mutated polymerase subunits. *Mol. Cell Biol.* 24, 7043-7058.
- Kallianpur,A.R., Jordan,J.E., and Brandt,S.J. (1994). The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* 83, 1200-1208.
- Kroon,E., Thorsteinsdottir,U., Mayotte,N., Nakamura,T., and Sauvageau,G. (2001). NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *Embo Journal* 20, 350-361.
- KrosI,G., He,G., Lefrancois,M., Charron,F., Romeo,P.H., Jolicoeur,P., Kirsch,I.R., Nemer,M., and Hoang,T. (1998). Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* 188, 439-450.
- Lahlil,R., Lecuyer,E., Herblot,S., and Hoang,T. (2003). SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A gene expression. Submitted.
- Larson,R.C., Lavenir,I., Larson,T.A., Baer,R., Warren,A.J., Wadman,I., Nottage,K., and Rabbitts,T.H. (1996). Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 15, 1021-1027.
- Lecointe,N., Bernard,O., Naert,K., Joulin,V., Larsen,C.J., Romeo,P.H., and Mathieu-Mahul,D. (1994). GATA-and SP1-binding sites are required for the full activity of the tissue-specific promoter of the tal-1 gene. *Oncogene* 9, 2623-2632.
- Lecuyer, E and Hoang, T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp.Hematol.* 2004.
Ref Type: In Press
- Lecuyer,E., Herblot,S., Saint-Denis,M., Martin,R., Begley,C.G., Porcher,C., Orkin,S.H., and Hoang,T. (2002). The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* 100, 2430-2440.
- Leroy-Viard,K., Vinit,M.A., Lecointe,N., Mathieu-Mahul,D., and Romeo,P.H. (1994). Distinct DNase-I hypersensitive sites are associated with TAL-1 transcription in erythroid and T-cell lines. *Blood* 84, 3819-3827.
- Lingbeck,J.M., Trausch-Azar,J.S., Ciechanover,A., and Schwartz,A.L. (2005). E12 and E47 modulate cellular localization and proteasome-mediated degradation of MyoD and Id1. *Oncogene* 24, 6376-6384.
- Martin,R., Lahlil,R., Damert,A., Miquerol,L., Nagy,A., Keller,G., and Hoang,T. (2004). SCL interacts with VEGF to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development* 131, 693-702.

Massari, M.E. and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell Biol.* 20, 429-440.

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

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

Nelson, C., Shen, L.P., Meister, A., Fodor, E., and Rutter, W.J. (1990). Pan - A Transcriptional Regulator That Binds Chymotrypsin, Insulin, and Ap-4 Enhancer Motifs. *Genes & Development* 4, 1035-1043.

Nicolas Goardon, Julie Alexandra Lambert, Patrick Rodriguez, Philippe Nissaire, Sabine Herblot, Pierre Thibault, Dominique Dumenil, John Strouboulis, Paul-Henri Romeo, and Trang Hoang. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. 2006. *The EMBO Journal*.

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

Poulin, G., Turgeon, B., and Drouin, J. (1997). NeuroD1/beta 2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Molecular and Cellular Biology* 17, 6673-6682.

Quong, M.W., Romanow, W.J., and Murre, C. (2002). E protein function in lymphocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* 20:301-22., 301-322.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* 17, 1030-1032.

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

Sawada, S. and Littman, D.R. (1993). A Heterodimer of Heb and An E12-Related Protein Interacts with the Cd4 Enhancer and Regulates Its Activity in T-Cell Lines. *Molecular and Cellular Biology* 13, 5620-5628.

Vervoort, M. and Ledent, V. (2001). The evolution of the neural basic Helix-Loop-Helix proteins. *ScientificWorldJournal.* 1, 396-426.

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

Weintraub,H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244.

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

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

Zhuang,Y., Cheng,P., and Weintraub,H. (1996). B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol. Cell Biol.* 16, 2898-2905.

Zhuang,Y., Kim,C.G., Bartelmez,S., Cheng,P., Groudine,M., and Weintraub,H. (1992). Helix-loop-helix transcription factors E12 and E47 are not essential for skeletal or cardiac myogenesis, erythropoiesis, chondrogenesis, or neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 12132-12136.

Zhuang,Y., Soriano,P., and Weintraub,H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 79, 875-884.

FIGURES

Figure 1. E2A and HEB are essential partners for SCL. (A) Effect of E2A on the protein levels of SCL. NIH 3T3, BOSC and COS cells were transfected with the indicated expression vectors (10 μ g each in 10 cm culture dish). Nuclear extracts (10 μ g) were immunoblotted with the antibodies shown on the right. (B) Effect of different E proteins. Nuclear extracts (10 μ g) of transfected NIH 3T3 cells were immunoblotted as above. Arrows point to specific signal, the star in the E2A(YAE) panel indicate the remaining signal of the previous E2A (E12) blot. (C) Effect of E2A on the SCL-FL mutant. The SCL-FL mutant harbours point mutations in helix 1 which disrupt its ability to interact with E2A. Immunoblotting was performed with 20 μ g of nuclear extracts from transfected NIH 3T3. SCL and SCL-FL were *in vitro* translated with of 35 S- Met, resolved by SDS-PAGE and revealed by autoradiography.

Figure 2. E2A does not perturb the biosynthesis of the SCL protein. (A) Effect of E2A on the biosynthesis of SCL. BOSC cells were transfected with the indicated expression vectors (10 μ g each in 10 cm culture dish). For radiolabelling, cells were incubated with 35 S-labeled amino acids. In parallel, control cells were transfected without radiolabelling. The lysates were immunoprecipitated with the antibodies as shown (IP), resolved by SDS-PAGE and detected by autoradiography (left panel) or by Western-blot with the indicated antibodies (right panel). Arrows point to specific signals. (B) Effect of E2A on SCL RNA level. BOSC cells were transfected with the indicated expression vectors and analyzed for SCL expression by quantitative RT-PCR. Data shown are normalized to the levels of co-transfected GFP and the endogenous S14 levels. (C) Effect of E2A on total protein levels of SCL. Hot Laemmli buffer extracts of BOSC (10 μ g) transfected with the indicated expression vectors (10 μ g in 10 cm culture dish) were immunoblotted with the antibodies as shown. (D) Specificity of the effect of E2A. The coexpression of E2A has no effect on a control protein (GFP) cloned in the

same expression vector as SCL. Transfection, nuclear extracts (10 μ g) and immunoblotting as in Figure 1B.

Figure 3. E2A stabilizes and affects the cellular distribution of SCL. (A) Effect of E2A on the half-life of SCL. BOSC cells were transfected with the indicated expression vectors and treated with cycloheximide (100 μ g /mL) for the indicated times. Nuclear extracts (10 μ g) were immunoblotted with the antibodies as shown. (B) Effect of E2A on the localization of SCL. Total, cytoplasmic and nuclear extracts of transfected BOSC (20 μ g) were immunoblotted as in panel A. SC35 and RNA Pol. II served as nuclear markers and Tubulin as a cytoplasmic marker of the fractionation. The signal of SCL was normalized on GFP levels before calculating of the nuclear-cytoplasmic ratio.

Figure 4. Coexpression of E2A increases SCL nuclear localization. (A) BOSC cells transfected with the indicated expression vectors (1750 ng each in 60 mm culture dishes) were subjected to immunofluorescence assays with the indicated antibodies.

Figure 5. *In vivo* disturbance of SCL levels in E2A and HEB knock-out mice. (A) E2A and HEB genetic deletion perturbs the protein levels of SCL. Fetal livers from E14.5 embryos were dissected and disaggregated into single-cell suspensions. The cells were lysed with RIPA buffer and 50 μ g were immunoblotted with the indicated antibodies. (B) SCL protein levels were normalized to those of PTP-1D and the median of the control group (+/+) was taken as 1.

Figure 6. E2A and HEB deficiency perturbs erythroid lineage cells. (A) Decrease in Ter119⁺ cells per embryo caused by E2A and HEB deficiency. Single-cell suspensions from E14.5 fetal livers were quantified for the number of Ter119⁺ by flow cytometry analysis. (B) Specific decrease in erythroid (BFU-E) colonies caused by E2A deficiency (left). Granulocyte macrophage (CFU-GM) colonies were not affected (right).

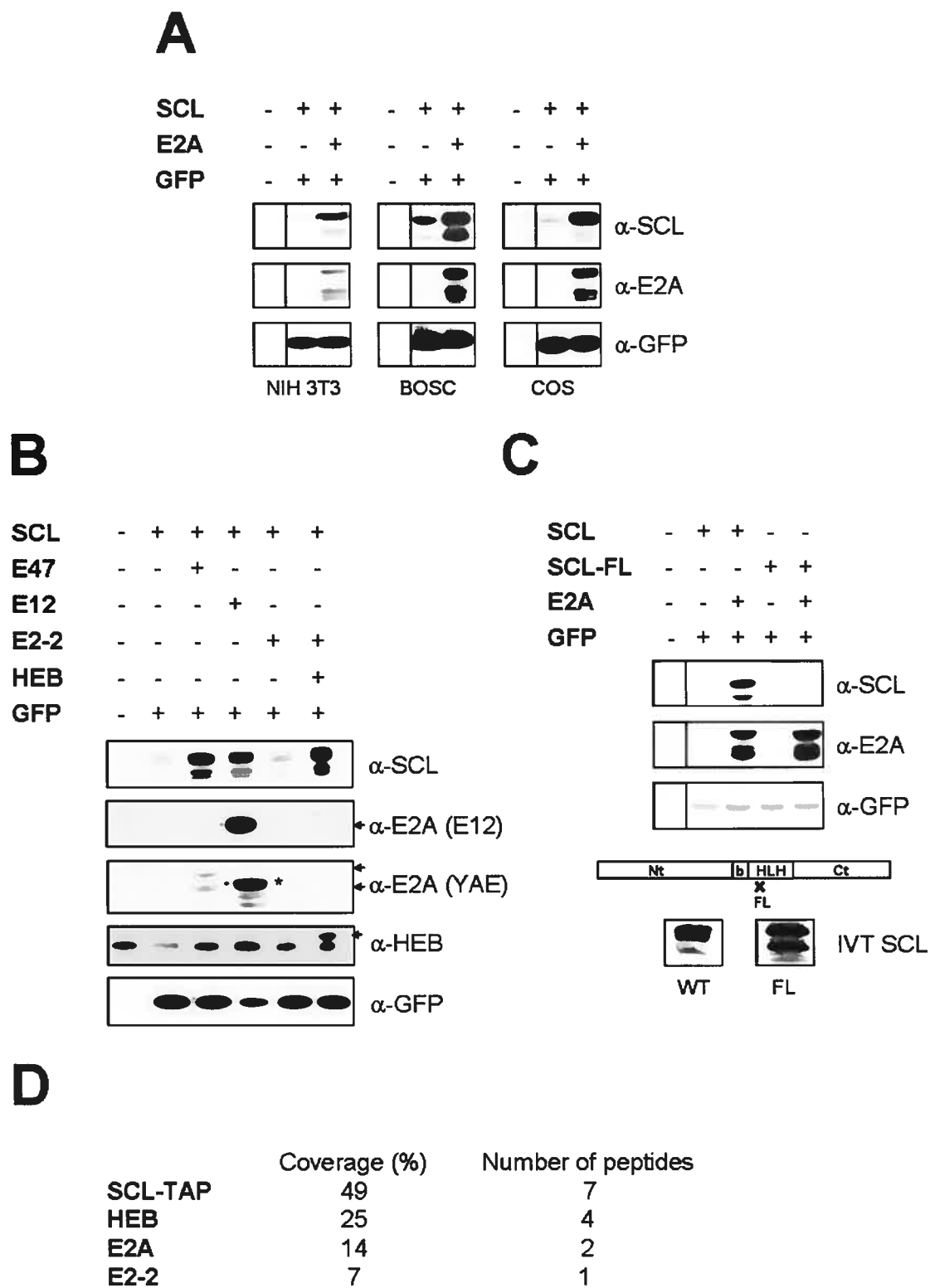


Figure 1 E2A and HEB are essential partners for SCL.

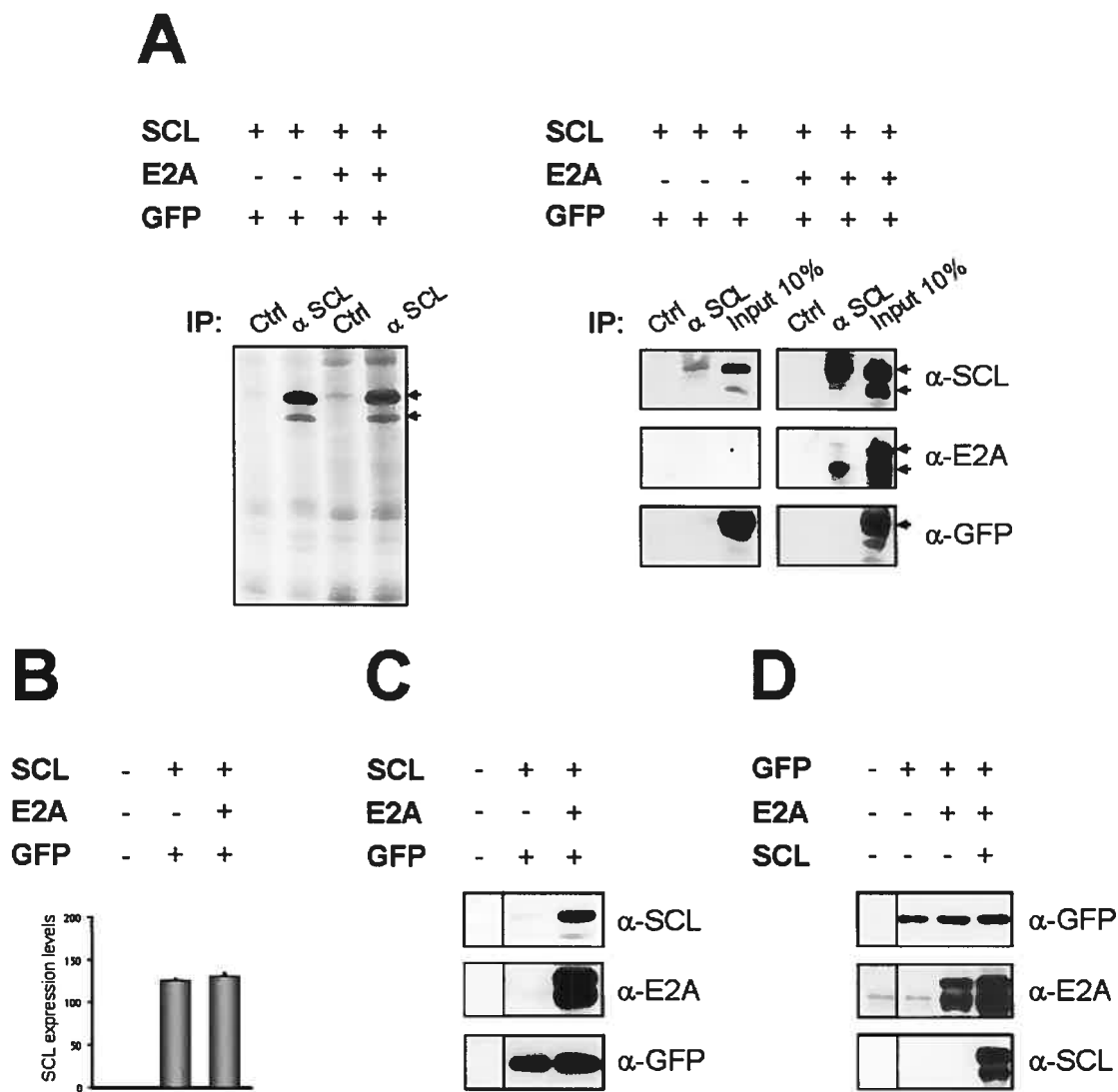
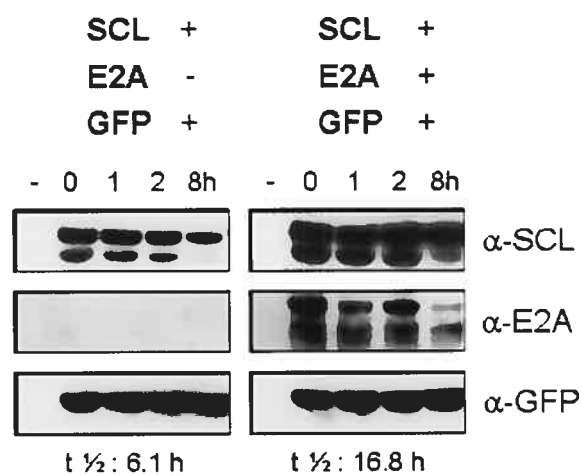
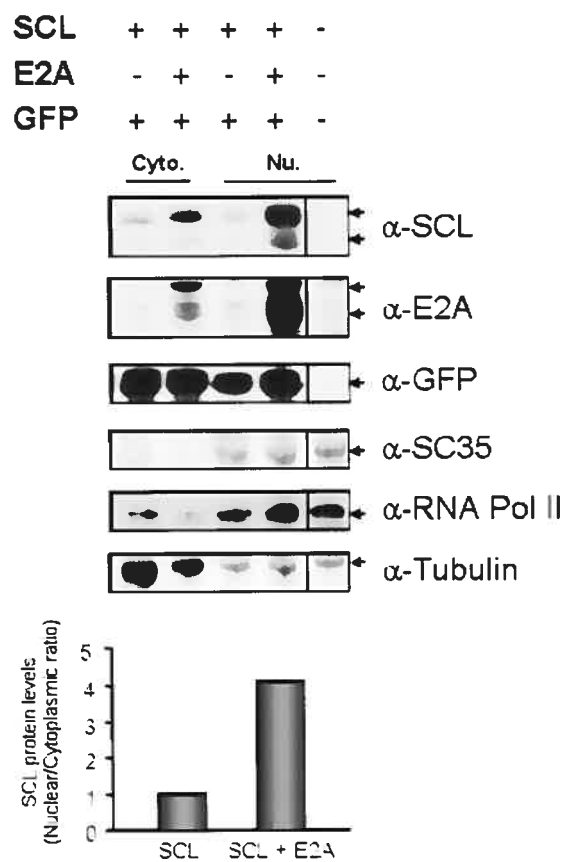


Figure 2

E2A does not perturb the biosynthesis of the SCL protein.

A**B****Figure 3****E2A stabilizes and affects the cellular distribution of SCL.**

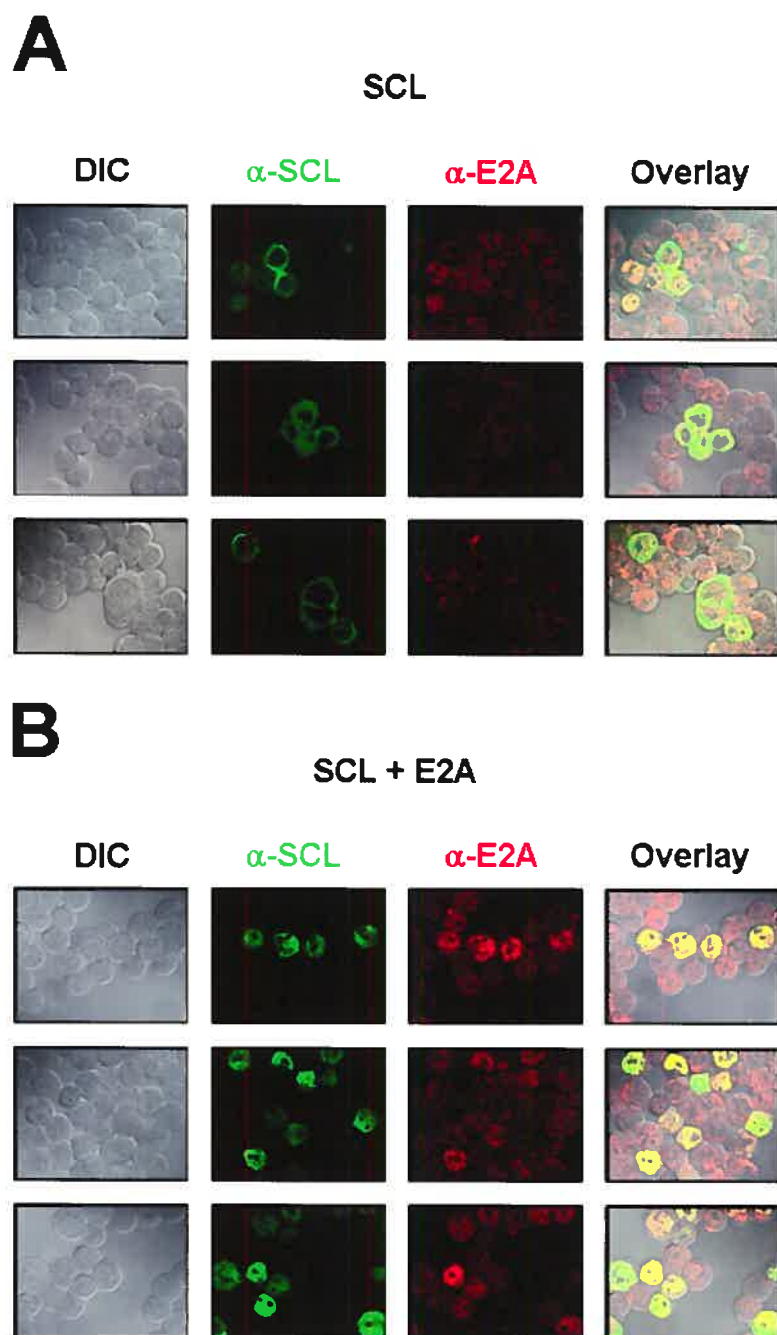


Figure 4 Coexpression of E2A increases SCL nuclear localization.

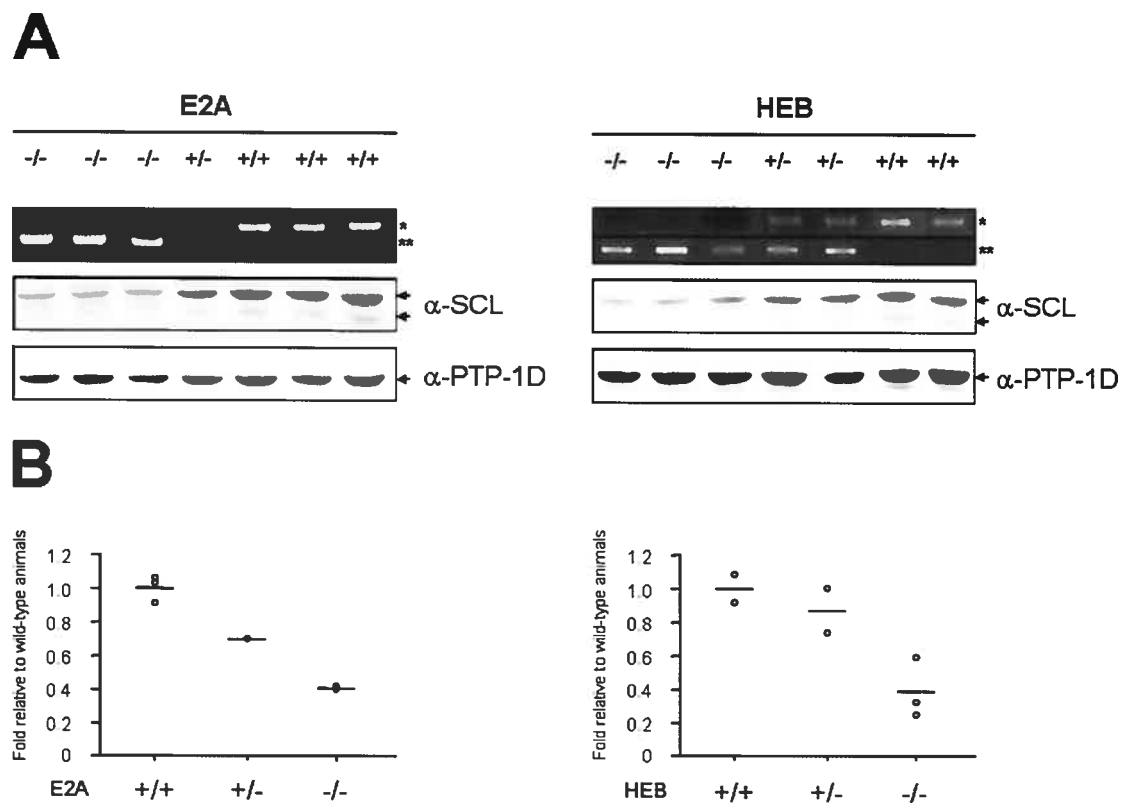


Figure 5 *In vivo* disturbance of SCL levels in E2A and HEB knock-out mice.

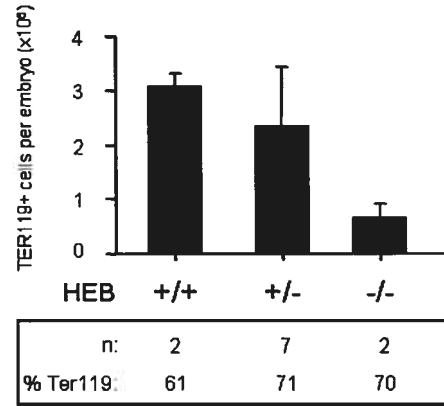
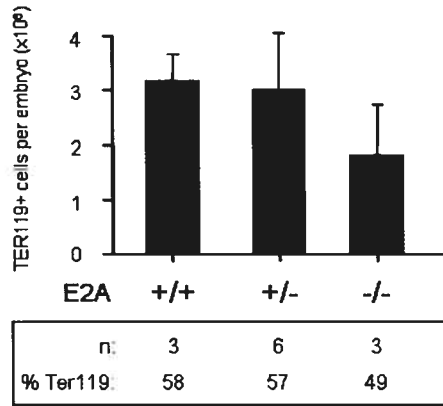
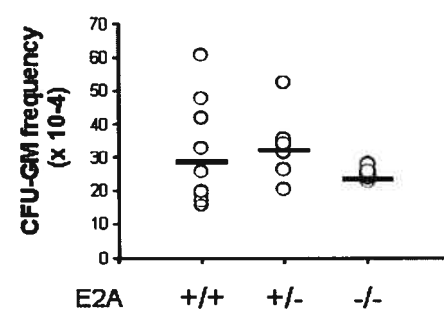
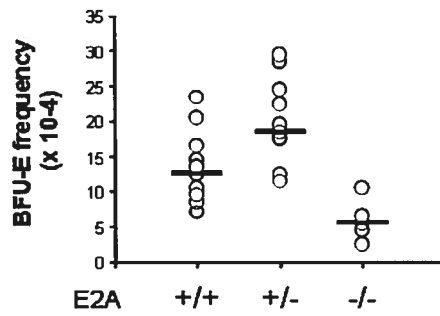
A**B**

Figure 6 E2A and HEB deficiency perturbs erythroid lineage cells.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

L'hématopoïèse est un système hiérarchique où l'auto-renouvellement, la différenciation et l'arrêt de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont des processus gouvernés par une combinaison de signaux environnementaux et de facteurs de transcription tissu-spécifiques. Le facteur bHLH hémato-spécifique *Stem Cell Leukemia* (SCL) fait partie de cette famille de régulateur clé de l'hématopoïèse (Shivdasani et al., 1995a; Robb et al., 1996; Mikkola et al., 2003). En effet, l'expression erronée dans le compartiment lymphoïde de ce facteur de transcription suite à des translocations chromosomiques est l'une des étapes menant à la transformation leucémique des cellules T (Begley and Green, 1999). Normalement, l'expression de SCL est limitée aux HSC, aux progéniteurs multipotents ainsi que dans la lignée érythroïde dans les érythroblastes, les mégakaryocytes et les mastocytes. SCL y assure un rôle dans la spécification et l'établissement du système hématopoïétique ainsi que dans les choix de lignée pendant la différenciation érythrocytaire et mégacaryocytaire (Kallianpur et al., 1994; Elefanty et al., 1998; Akashi et al., 2000). La régulation de ce facteur de transcription est capitale, mais la connaissance de ces différents mécanismes demeure encore très superficielle.

De nombreuses études avaient entrepris de décrire les différents mécanismes de régulation de SCL, tant au niveau transcriptionnel, traductionnel que post-traductionnel. La présente étude vient suggérer l'existence d'un nouveau mode de régulation du facteur de transcription bHLH SCL par ses partenaires d'interaction E2A et HEB. Ainsi, la coexpression des protéines E2A et HEB augmente les niveaux protéiques de SCL. Cette augmentation de la stabilité de SCL corrèle avec une augmentation de sa localisation nucléaire. Ce mécanisme de régulation entre partenaires d'un même complexe transcriptionnel semble également présent dans les souris. La délétion génique d'*E2a* et *Heb* induit une diminution sévère des niveaux protéiques de SCL, une diminution de la population érythroïde et de leurs progéniteurs dans le foie fœtal embryonnaire. Ce travail

constitue donc la première étude sur la fonction régulatrice des protéines E, notamment E2A et HEB, sur le facteur de transcription SCL.

3.1 La régulation transcriptionnelle

Les différences phénotypiques observées entre chacune des lignées hématopoïétiques sont dues en grande partie à des différences dans l'expression de certains gènes. Les cascades de signalisation induites par des cytokines ou autres événements intracellulaires entraînent la formation dans le noyau de complexes de facteurs de transcription responsables de l'activation spécifique de programmes génétiques. Ces complexes s'associent spécifiquement sur les promoteurs ou sur les *enhancers* dans les régions accessibles de la chromatine. Selon le ratio des différents cofacteurs activateurs ou inhibiteurs liés par ces complexes, la machinerie de base de transcription est à son tour recrutée sur le promoteur. La polymérisation de ribonucléotides en ARN messenger complémentaire à l'ADN génomique est assurée par l'ARN polymérase II en collaboration avec ses nombreux partenaires d'initiation de la transcription dont TBP et les TAF (Pugh, 2000). L'ARNm peut également subir différentes modifications par épissage alternatif d'exons.

SCL joue un rôle crucial dans la hiérarchie hématopoïétique. La régulation transcriptionnelle de ce gène au niveau de ses séquences régulatrices, promoteurs, *enhancers* et *silencers* a été étudiée *in vitro* et *in vivo*, par transgénèse. De nombreuses études portant sur les éléments de régulation du gène *Scl* ont permis d'identifier des séquences promotrices en 5' du gène *Scl*, soit dans l'exon 1a (-187, +26) et dans l'exon 1b (+209, +353) possédant des activités spécifiques et distinctes en fonction du contexte cellulaire (Aplan et al., 1990; Bockamp et al., 1995). De plus, plusieurs éléments en cis assurent une régulation positive de l'expression du gène *Scl* dans le compartiment hématopoïétique. Le promoteur de l'exon 1a est notamment activé grâce à sa collaboration avec un *enhancer* en 3' (+18/19 Kb) qui permet de réguler l'expression de *Scl* dans les cellules érythroïdes et mastocytaires grâce à GATA-1 (Gottgens et al., 1997). De plus, un *enhancer* en 5' (-3.2 Kb) dirige l'expression de *Scl* dans les

progéniteurs hématopoïétiques et dans l'endothélium (Gottgens et al., 2004). Des études effectuées au laboratoire sur le promoteur de l'exon 1a nous ont permis d'observer que l'expression de SCL dans la lignée érythroïde était régulée par OTX-1, un membre de la famille bicoïde à homéodomaine, ainsi que par la protéine à doigt de zinc GATA-1 (Martin et al., En préparation). Le promoteur de l'exon 1b est, quant à lui, plutôt actif dans les cellules myéloïdes et mastocytaires où il est activé par PU.1, SP1 et SP3 (Aplan et al., 1992b; Gottgens et al., 1997; Bockamp et al., 1997; Bockamp et al., 1998). Comme nous venons de le voir, plusieurs éléments de régulation assurent l'expression appropriée de SCL pour permettre à celui-ci d'activer spécifiquement des patrons de gènes impliqués dans différents aspects de l'hématopoïèse.

Malgré le fait qu'une grande partie de la régulation de SCL se fasse de façon transcriptionnelle, l'effet de E2A sur les niveaux protéiques de SCL n'est pas dû à une augmentation des niveaux d'ARNm de SCL lorsqu'ils sont coexprimés de manière ectopique dans un système hétérologue (Figure 2). Ce système a comme avantage principal d'éviter les mécanismes endogènes de régulation transcriptionnelle de SCL. De plus, même si le vecteur dans lequel SCL est cloné présente des sites de liaison putatifs pour le dimère SCL-E2A, E2A ne semble pas être en mesure d'augmenter la transcription de l'ARNm. Ces résultats m'ont donc amenée à investiguer l'effet d'E2A au niveau de la régulation traductionnelle.

3.2 La régulation traductionnelle

Un des mécanismes utilisés par les eucaryotes pour réguler l'expression des gènes est le contrôle de la traduction. La régulation traductionnelle est importante puisqu'elle joue un rôle critique dans la croissance cellulaire, la prolifération et le développement. Ce mode de régulation permet une réponse rapide aux besoins cellulaires sans passer par la transcription (Gingras et al., 1999).

Cette régulation traductionnelle peut être effectuée à chacune des étapes, soit pendant l'initiation, l'élongation et la terminaison. Cependant, celle-ci se fait principalement

pendant l'initiation lors du recrutement des ribosomes sur le codon d'initiation d'un ARNm donné. En effet, les éléments de régulation en cis de l'ARNm permettent de moduler efficacement la traduction grâce aux séquences flanquant le codon d'initiation, à la structure secondaire du 5'-UTR, les cadres de lecture ouverts en amont (uORF, upstream Open Reading Frames), les sites de liaison spécifiques à certaines protéines régulatrices, les motifs d'oligopyrimidines (TOP) adjacents à la coiffe m⁷GpppX de l'ARNm ainsi que les sites internes d'entrée des ribosomes (IRES, *Internal Ribosome Entry Sites*) (Pelletier and Sonenberg, 1985; Cigan et al., 1988; Kozak, 1989; Jackson and Kaminski, 1995; Hentze and Kuhn, 1996; Belsham and Sonenberg, 1996).

L'initiation de la traduction consiste donc en plusieurs étapes séquentielles catalysées par les protéines eIF (Eukaryotic Initiation Factor). Tout d'abord, le complexe ribosomal 80S préexistant se dissocie, grâce à la liaison de eIF6 à la sous-unité 60S et à la liaison de eIF3 et eIF1A à la sous-unité 40S. La deuxième étape consiste en la liaison du complexe eIF2-GTP-Met-tRNA à la sous-unité 40S pour former le complexe de pré-initiation 43S. Grâce à la collaboration des eIF4 et à l'hydrolyse d'ATP, ce complexe peut alors se déplacer progressivement vers l'extrémité 3' et se lier sur le 5'UTR (upstream translated region) de l'ARNm. Un complexe initiateur 48S est alors formé sur le codon de départ. Les facteurs d'initiation associés au complexe sont alors relâchés grâce à l'activité GTPasique d'eIF2 lui-même activé par eIF5. La sous-unité 60S est alors recrutée, permettant ainsi le début de l'élongation du polypeptide (Gingras et al., 1999).

La régulation traductionnelle des isoformes de plusieurs facteurs de transcription tels que GATA-1, C/EBP α et C/EBP β est capable d'affecter la prolifération et la différenciation de manière décisive. Ces dernières recrutent différemment des protéines de remodelage de la chromatine et de facteurs de transcription (Calligaris et al., 1995; Kowenz-Leutz and Leutz, 1999; Calkhoven et al., 2000; Pedersen et al., 2001). Ainsi, la régulation de la traduction des ARNm encodant les facteurs de transcription cruciaux pour l'hématopoïèse est importante pour maintenir l'homéostasie cellulaire.

Or, SCL n'échappe pas à ce type de régulation. Plusieurs isoformes de tailles différentes sont produites à partir d'un même ARNm contenant l'entière séquence codante de SCL (Pulford et al 1994). Les isoformes de pleine longueur ou encore tronquées dans l'extrémité amino-terminale sont exprimées différenciellement dans les différentes lignées hématopoïétiques et influencent la spécification et la différenciation de certaines lignées. En effet, au cours de la différenciation érythroïde, les régulateurs de l'initiation de la traduction eIF2 et eIF4E sont activés résultant en l'augmentation de la traduction d'isoformes plus courtes de SCL (Calkhoven et al., 2003). De plus, l'expression ectopique d'isoformes pleine longueur de SCL dans des lignées cellulaires ou des cellules primaires montre respectivement une forte augmentation du marqueur mégacaryocytaire CD41a ainsi qu'une augmentation du nombre de colonies poussant en milieu semi-solide. Ces données indiquent donc que les longues isoformes favorisent préférentiellement la mégacaryopoïèse contrairement aux isoformes tronquées de SCL (Calkhoven et al., 2003).

Des résultats obtenus dans notre laboratoire ont permis de révéler que l'EPO qui induit la différenciation érythroïde cause une augmentation de la traduction de l'ARNm de SCL. En effet, l'induction de SCL corrèle avec la liaison d'eIF4E et eIF4G ainsi que l'association des ribosomes sur la coiffe de l'ARNm de SCL (Lahlil et al., En préparation). Par contre, mes résultats montrent que l'effet d'E2A sur SCL ne se fait pas par une augmentation de la traduction (Figure 2). Cette observation m'a amenée à considérer que l'effet des protéines E pourrait se faire au niveau post-traductionnel.

3.3 Les modifications post-traductionnelles

Les facteurs de transcription subissent de nombreuses modifications chimiques qui peuvent être cotraductionnelles et se produisent alors que la traduction se poursuit encore et que le peptide naissant est encore attaché au ribosome. Ensuite, les modifications post-traductionnelles proprement dites ont lieu soit dans la cellule, dans les organelles ou hors de la cellule. Elles consistent en l'ajout ou le retrait de différents groupements chimiques (acétylation, amidation, biotinylation, carboxylation,

hydroxylation, méthylation, phosphorylation, sulfatage), d'acides gras (acylation, glypiation, isoprénylation, S-acylation, myristoylation), de glucides simples ou complexes (c-mannosylation, poly-ADP-ribosylation, acétylglucosamination) ou encore de polypeptides (ubiquitination, sumoylation, neddylation). Ces modifications covalentes sont des méthodes simples et efficaces employées par la cellule pour modifier les propriétés et la conformation des protéines. Ces modifications post-traductionnelles peuvent servir (1) à la régulation de l'activité des protéines, (2) à leur étiquetage pour qu'elles soient reconnues par des partenaires métaboliques ou par des systèmes de dégradation, (3) à les ancrer dans une membrane, (4) à les faire participer à des cascades de signalisation, (5) à leur adressage pour qu'elles se rendent au bon endroit dans la cellule, (6) à définir une identité immunologique, etc. Il est également possible de considérer le clivage protéolytique comme un événement post-traductionnel important dans la régulation de l'activité d'un facteur de transcription (Mann and Jensen, 2003).

La phosphorylation de SCL a été observée sur les sérines 122 et 172, grâce à l'activité catalytique d'ERK-1 et de la PKA. Cette phosphorylation altère l'affinité de SCL envers ses différents sites de liaison à l'ADN. La phosphorylation de SCL peut notamment être induite dans des précurseurs érythroïdes suite à une stimulation à l'EPO (Cheng et al., 1993a; Wadman et al., 1994; Prasad and Brandt, 1997; Tang et al., 1999). Dans des thymocytes immatures exprimant le pré-TCR, l'expression ectopique de Notch3 induit l'expression et la phosphorylation de SCL de façon aberrante, ainsi que la prolifération de ces cellules. Celle-ci est dépendante de l'activité de SCL et semble passer par l'expression de la cycline D1, un gène cible impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Cette régulation de l'activité de SCL par phosphorylation passe par la voie de signalisation d'ERK qui se trouve en aval du pré-TCR (Talora et al., 2005).

Il a aussi été montré que SCL peut s'associer avec des co-activateurs ou co-répresseurs transcriptionnels, comme p300 et P/CAF. L'association de P/CAF à SCL entraîne son acétylation sur un motif riche en lysines dans la région de la boucle, ce qui augmente la liaison de SCL à l'ADN tout en diminuant son affinité pour son co-répresseur mSin3A. Cette acétylation de SCL a aussi été montrée pour promouvoir la différenciation érythroïde (Huang et al., 2000).

Comme nous venons de le voir, l'activité de SCL peut être régulée par différentes modifications post-traductionnelles. Il est donc possible d'imaginer qu'E2A pourrait permettre le recrutement de nouveaux partenaires qui modifieraient covalamment SCL. Cependant, aucune modification dans le poids moléculaire de SCL n'est visible par western-blot (Figure 1). Pour obtenir une réponse plus sensible, la technique d'analyse par spectrométrie de masse suite à une purification de la protéine SCL permettrait de révéler les modifications post-traductionnelles de SCL en comparant les différents temps de vol (TOF, Time-of-Flight) des peptides SCL avec des bases de données. Cette avenue reste donc à être explorée...

3.4 Les interactions protéiques

L'activité d'un facteur de transcription peut également être régulée grâce aux protéines avec lesquelles il interagit. Selon le contexte cellulaire, la présence de cofacteurs peut moduler l'activité des facteurs de transcription en permettant une synergie entre les différents partenaires. À l'opposé, il arrive parfois que des partenaires de haute affinité agissent en dominant-négatifs en séquestrant le facteur de transcription en question hors d'un complexe. Lorsque SCL est surexprimé dans les thymocytes en différenciation, ce bHLH peut également réprimer l'activité transcriptionnelle des dimères E2A-HEB. En effet, la présence de SCL affecte le dosage des protéines E, empêchant ainsi l'expression du gène *pT α* qui est essentiel à la différenciation des thymocytes (Tremblay et al., 2003). Les protéines Id jouent également ce rôle dominant-négatif puisqu'elles ne sont composées que d'un domaine bHLH qui vient titrer les autres bHLH de classe I et II hors de leurs cibles sur l'ADN (Rivera and Murre, 2001). La régulation des bHLH est donc très importante pour favoriser la survie, de la prolifération, de la différenciation de nombreuses lignées hématopoïétiques.

En caractérisant les interactions entre les partenaires du complexe SCL, j'ai pu montrer que la coexpression d'E2A est essentielle pour détecter la protéine SCL. De plus, E2A semble causer cet effet grâce à son interaction avec SCL puisque les niveaux protéiques d'un mutant ponctuel de SCL incapable d'interagir avec E2A ne sont pas influencés par

E2A (Figure 1). À la lumière de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'interaction physique entre les facteurs de transcription nécessaires à la formation du complexe SCL permet leur régulation mutuelle. L'augmentation de la stabilité du facteur de nucléation d'un complexe transcriptionnel essentiel à la régulation de gènes hématopoïétiques par la présence de ses partenaires permettrait une utilisation très efficace des ressources dans la cellule ainsi qu'une augmentation de l'efficacité du complexe.

De plus, les deux isoformes du gène *E2a*, E12 et E47 ainsi que HEB permettent d'augmenter les niveaux protéiques de SCL (Figure 1). Cet effet était quelque peu prévisible puisque les protéines E2A et HEB sont très homologues tant au niveau structurel que fonctionnel (Vervoort and Ledent, 2001; Ledent et al., 2002) assurant leur redondance fonctionnelle. En effet, l'insertion du gène *Heb* dans le locus du gène *E2a* chez la souris permet de substituer parfaitement les fonctions de ce dernier dans le choix et la différenciation de la lignée B ainsi que de sauver la létalité associée à l'absence du gène *E2a* (Zhuang et al., 1998). Nous avons cependant noté que la coexpression d'E2-2 n'avait aucun effet sur SCL. Ceci pourrait s'expliquer par une faible affinité d'interaction entre ces deux facteurs de transcription. En étudiant l'affinité entre différents bHLH par criblage double-hybride chez la levure, il a été possible de montrer qu'E2-2 se liait avec une affinité beaucoup plus forte avec Id2 et MyoD qu'avec SCL. Ils ont réussi à augmenter l'affinité de SCL pour E2-2 en mutant certains résidus conservés chez les partenaires de fortes interactions (Goldfarb et al., 1996). Contrairement à E2A et HEB, E2-2 n'a peut-être pas un grand rôle à jouer envers les niveaux protéiques de SCL *in vivo*, puisqu'il est très faiblement détecté par spectrométrie de masse lors de la purification par affinité en tandem (TAP) de SCL, contrairement à E2A et HEB (Figure 1). Bref, les protéines E2A et HEB semblent avoir un effet spécifique sur les niveaux protéiques de SCL grâce à leur interaction physique.

3.5 La stabilité protéique

La cellule a développé un mécanisme de dégradation spécifique de certaines protéines afin de moduler leur temps d'action en fonction du contexte cellulaire. Le protéasome

26S dégrade spécifiquement les protéines poly-ubiquitinées. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés qui est ajoutée sur des résidus lysines ou à l'extrémité amino-terminale des protéines cibles. En se liant successivement sur la lysine K48 de l'extrémité carboxy-terminale de la précédente, elles forment une longue chaîne qui permet l'accostage de la protéine sur des sites de reconnaissance localisés sur la particule régulatrice du protéasome 26S. La protéine est ensuite déroulée par des ATPases avant d'être dégradée (Welchman et al., 2005; Devoy et al., 2005). Le processus d'ubiquitination est effectué par trois complexes enzymatiques, en commençant avec une enzyme activatrice E1, une enzyme de conjugaison E2 qui fournit l'ubiquitine et une ligase E3 qui permet l'association à la cible et la spécificité d'action. De plus, une enzyme E4 semble faciliter l'allongement de la chaîne poly-ubiquitine (Hershko et al., 1983).

La régulation du facteur de transcription NFκB est un exemple classique de régulation fonctionnelle par ubiquitination et dégradation par le protéasome. En effet, NFκB est normalement maintenu dans le cytoplasme par son association avec le répresseur IκB. Suite à un signal pro-inflammatoire approprié, IκB est phosphorylé le rendant apte à l'ubiquitination. Suite à la dégradation de ce répresseur par le protéasome, NFκB peut alors migrer vers le noyau et lier spécifiquement l'ADN (Magnani et al., 2000). Le protéasome vient donc jouer un grand rôle au niveau du contrôle des facteurs de transcription.

Moduler la stabilité des facteurs de transcription est l'un des paramètres essentiels permettant d'assurer la régulation appropriée des gènes cibles. Mon étude montre que la dimérisation entre E2A et SCL permet d'augmenter la demi-vie du facteur de transcription hématopoïétique SCL, et ce plus particulièrement pour l'isoforme p40 comparativement à p42 (Figure 3). Cette modulation de la stabilité entre partenaires d'un même complexe est très intéressante puisque SCL est le facteur de nucléation du complexe, ce qui permet donc d'en moduler l'activité transcriptionnelle.

À première vue, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'E2A protégerait SCL de la dégradation par le protéasome. En effet, la dimérisation entre SCL et E2A pourrait permettre de cacher certains sites sensibles à des modifications post-traductionnelles qui favoriseraient la dégradation de SCL. Cette interaction pourrait également modifier la conformation tri-dimensionnelle de SCL. En effet, il a déjà été montré que SCL nécessite la présence d'E2A pour lier l'ADN malgré le fait qu'il possède un domaine de liaison à l'ADN (Lecuyer et al., 2002). Cette interaction pourrait causer des changements allostériques dans cette région de la protéine pour lui permettre de remplir sa fonction de liaison à l'ADN.

De plus, la présence d'E2A pourrait permettre le recrutement d'autres protéines au sein du complexe qui viendraient moduler la stabilité de SCL. Ainsi, la différence de stabilité observée entre les isoformes p40 et p42, qui ne diffèrent que par l'extrémité aminoterminal, pourrait peut-être s'expliquer par la capacité de p42 à recruter des partenaires différents de p40. Des essais de criblage double-hybride chez la levure ont montré que SCL peut lier la sous-unité p44 du facteur basal de transcription TFIIH (Zhao and Aplan, 1999). L'activité E3 ubiquitine-ligase de la sous-unité p44 a déjà été montrée chez la levure pour réguler la réponse transcriptionnelle suite à un dommage à l'ADN (Takagi et al., 2005). Il serait donc possible que les niveaux protéiques très bas de SCL en absence d'E2A soient dû à une ubiquitination de SCL par p44 causant sa dégradation par le protéasome. Cependant, l'interaction entre SCL et p44 n'est pas affectée par la présence d'E2A (Zhao and Aplan, 1999), mais ce dernier pourrait affecter le recrutement de cofacteurs nécessaires à la dégradation de SCL.

Plusieurs techniques pourraient nous aider à identifier ces nouveaux partenaires qui aideraient à augmenter la stabilité de SCL en présence d'E2A. Des études d'interactions protéiques par criblage double-hybride chez la levure ou encore de purification d'affinité en tandem (TAP) permettraient d'identifier ces nouveaux partenaires. De plus, suite à des analyses *in silico* de bases de données, des candidats potentiels pourraient être confirmés par immunoprécipitation ou encore par *pull-down*.

Nous sommes présentement à vérifier si les niveaux protéiques de SCL sont protégés par E2A d'une dégradation par le protéasome. En traitant les cellules transfectées avec des inhibiteurs du protéasome, tel que le MG132 ou la lactacystine, il sera possible de vérifier l'accumulation de SCL par western-blot en absence de E2A. Le rôle potentiel du protéasome dans la stabilité de SCL est une éventualité tout à fait possible. Suite à un stimuli angiogénique d'hypoxie dans une lignée de cellules endothéliales, il a déjà été montré que SCL subit une phosphorylation par la MAPk sur la sérine 122, suivi d'une poly-ubiquitination entraînant sa dégradation par le protéasome (Tang et al., 2002). De plus, le rôle stabilisateur d'E2A sur les niveaux protéiques d'un autre bHLH de classe II, soit le facteur de transcription MyoD a été montré récemment. La coexpression de bHLH de classe I permettait également d'augmenter significativement la demi-vie de MyoD en empêchant sa dégradation par le protéasome. (Lingbeck et al., 2005) Comme SCL et MyoD sont tous les deux des facteurs de transcription bHLH d'expression tissu-spécifique, il est fortement probable que le protéasome régule les niveaux protéiques de SCL et que le rôle d'E2A en soit de protéger contre ce mécanisme de dégradation.

3.6 Le transport intra-cellulaire

Les cellules eukaryotes sont équipées de machineries responsables du transport d'une vaste quantité de molécules entre le cytoplasme et le noyau. La circulation des protéines et des complexes ARN-protéines est essentielle pour qu'ils puissent s'acquitter de leurs tâches normales dans la cellule. Des récepteurs de transport nucléaire transloquent leur cargo à travers les pores nucléaire (NPC, Nuclear Pore Complex), des méga-structures protéiques. Les protéines transportées par cette machinerie nucléo-cytoplasmique sont identifiées par les signaux de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signal). Ces signaux consistent généralement en une courte séquence retrouvée n'importe où dans la séquence de la protéine (souvent entre 4 et 8 acides aminés) souvent riche en acide aminés chargé positivement (lysine, arginine) et parfois en prolines. Le transport nucléaire actif débute par la fixation de la protéine possédant un NLS sur la protéine adaptatrice importine- α , qui peut alors reconnaître son récepteur, l'importine- β ainsi que la protéine RanGDP (Weis, 1998; Dingwall and Laskey, 1998; Gorlich, 1998). Ce

complexe se fixe ensuite sur une séquence riche en phénylalanine et glycine des nucléoporines situées à l'interface cytoplasmique du NPC. Après avoir été transporté dans le nucléoplasme, le complexe récepteur-adaptateur est libéré du cargo par un mécanisme allostérique grâce à la liaison de RanGTP facilitée par RanGEF (Ran-GTP Exchange Factor) (Nakielny and Dreyfuss, 1999).

Les protéines destinées à sortir du noyau portant une courte séquence d'export nucléaire (NES, Nuclear Export Signal) riche en leucine ou autre résidus hydrophobiques sont reconnues par les exportines en fixant le RanGTP. Le processus d'exportation s'effectue selon des principes qui sont très proches de ceux des processus d'importation. Dans le cytoplasme, le complexe se fixe à RanGAP (Ran-GTPase Activating Protein) qui hydrolyse RanGTP en RanGDP et P_i . Ceci entraîne la dissociation du complexe et le relargage du cargo dans le cytoplasme. Le transport nucléaire est donc une suite d'importation et d'exportation de protéines qui sont gouvernées par un gradient de RanGDP / RanGTP entre le cytoplasme et le noyau. (Nakielny and Dreyfuss, 1999)

Les expériences que j'ai réalisées dans le cadre de mon projet m'ont permis de montrer que la localisation subcellulaire de SCL est influencée par la coexpression d'E2A. En effet, SCL est exprimé à de très faibles niveaux dans le cytoplasme, alors qu'il se retrouve fortement exprimé dans le noyau en présence d'E2A (Figure 3 et 4). Il n'est pas impossible d'imaginer que la présence d'E2A pourrait stabiliser les niveaux protéiques de SCL en l'excluant d'un compartiment cellulaire où il pourrait se lier à des partenaires favorisant sa dégradation. Il a déjà été démontré que SCL possède un signal de localisation nucléaire (NLS) putatif dans son domaine basique (Goldfarb and Lewandowska, 1994). Lorsqu'il est très fortement exprimé dans une lignée cellulaire hétérologue, la délétion de ce domaine empêche SCL de se localiser dans le noyau. De plus, la coexpression de son partenaire d'hétérodimérisation E2/5, une autre isoforme du gène *E2A*, permet de restaurer la présence de ce mutant dans le noyau (Goldfarb and Lewandowska, 1994). Le même phénomène a déjà été observé dans le cas de MyoD et E2A. En plus d'éviter une dégradation par le protéasome, MyoD peut être également transporté au noyau grâce à son interaction avec E2A, particulièrement lorsque son NLS

est muté. (Lingbeck et al., 2005) Ces données suggèrent donc que la dimérisation des facteurs de transcription bHLH pourrait s'établir dans le cytoplasme, avant leur localisation dans le noyau. Pour caractériser un peu plus le mécanisme de transport de SCL vers le noyau, il serait possible de traiter les cellules avec différents inhibiteurs de certaines voies de transport, tel que la leptomycine B (LMB) qui inhibe le transport par la voie CRM-1 (Fornerod et al., 1997; Stade et al., 1997).

3.7 Les implications *in vivo*

Les résultats que j'ai obtenus dans le cadre de mon projet de maîtrise contribuent donc à continuer la réflexion sur l'importance de la fonction de SCL. Comme nous l'avons vu précédemment, SCL joue un rôle clé dans la nucléation d'un complexe d'activation transcriptionnelle composé à la fois des facteurs de transcription ubiquitaires E2A, SP1 et LDB-1 ainsi que des facteurs hématospécifiques LMO2 et GATA-1/2. (Krosel et al., 1998; Lecuyer et al., 2002) Plusieurs gènes cibles de SCL ont été identifiés jusqu'à ce jour, soit les protéines érythrocytaires GPA et P4.2 ainsi que le récepteur tyrosine-kinase des HSC c-Kit (Cohen et al., 1993; Lahlil et al., 2003).

La découverte d'un phénomène de régulation du facteur de transcription SCL par son partenaire d'interaction E2A amène un nouvel aspect quant à la fonction de SCL. En effet, l'effet d'E2A dans la relocalisation au noyau et la stabilisation des niveaux protéiques de SCL révèle à quel point l'interdépendance entre les facteurs de transcription d'un même complexe est cruciale. Ce niveau supplémentaire de régulation entre facteurs de transcription permet donc d'assurer une régulation de l'expression des gènes cibles de manière encore plus spécifique. En effet, l'absence d'un des membres du complexe pourrait empêcher le facteur principal de nucléation du complexe d'être retrouvé dans les cellules, même si ce dernier devrait normalement être exprimé.

La perte de contrôle de l'expression de SCL suite à des translocations chromosomiques qui causent son expression dans un compartiment cellulaire erroné est associée avec le développement de leucémies de type T-ALL (Begley et al., 1989a). L'expression de

SCL dans la lignée lymphoïde pourrait donc titrer E2A et HEB et empêcher leur homo- ou hétérodimérisation, perturbant ainsi leur activité de régulateur transcriptionnel (Murre et al., 1989b). Dans ce cas, le mécanisme de stabilisation et de relocalisation au noyau du facteur de transcription SCL par les protéines E, E2A et HEB, est néfaste puisqu'il entraîne une boucle de rétro-action positive de l'effet de SCL, ce qui pourrait mener ultimement à la transformation néoplasique de ces cellules. Il est également possible qu'il n'y ait des leucémies seulement dans le compartiment T où la concentration d'E2A et HEB est très haute, ce qui permet d'exprimer SCL à un niveau élevé, entraînant ainsi un effet leucémogénique.

Ce mécanisme moléculaire de régulation de SCL par E2A ou HEB semble également retrouvé chez la souris. En effet, la délétion d'E2A et de HEB dans le génome des souris entraîne une diminution des niveaux protéiques de SCL dans les cellules du foie fœtal (Figure 5), dont le nombre de progéniteurs et de cellules érythroïdes matures est diminué significativement (Figure 6). La dépendance de la présence des protéines E, E2A et HEB pour réguler la stabilité et la localisation subcellulaire de SCL pourrait expliquer la diminution de précurseurs hématopoïétiques et possiblement la létalité observée au stade embryonnaire. Une anémie sévère causée par une diminution de SCL dans les précurseurs hématopoïétiques empêcherait donc l'embryon de poursuivre son développement.

Afin de caractériser la létalité embryonnaire associée à la délétion génique d'E2A et de HEB, j'ai commencé une étude préliminaire des embryons issus de croisement de souris hétérozygotes pour ces gènes à différents jours de développement embryonnaire. Lors de la dissection des embryons, j'ai pu observer un phénotype n'ayant jamais été décrit jusqu'à ce jour. En effet, les embryons *E2a*^{-/-} présentent un développement anormal de la queue caractérisée par une forme en tire-bouchon (Figure 7). De plus, les souris doublement hétérozygotes pour *E2a* et *Heb* présentent plusieurs torsions au niveau de la queue, ce qui lui donne une forme en tire-bouchon.

Ces phénotypes sont très intéressants à la lumière d'une récente publication démontrant l'expression de SCL dans les os pendant le développement embryonnaire ainsi que chez l'adulte même s'il n'est pas essentiel à la spécification des cellules souches embryonnaires vers la lignée ostéogénique (Pimanda et al., 2006). De plus, je viens tout juste de commencer à étudier les populations de précurseurs hématopoïétiques dans le foie fœtal et dans la moelle osseuse de ces embryons par cytométrie en flux, ce qui permettra d'observer le profil de la différenciation érythroïde et l'anémie de ces embryons.

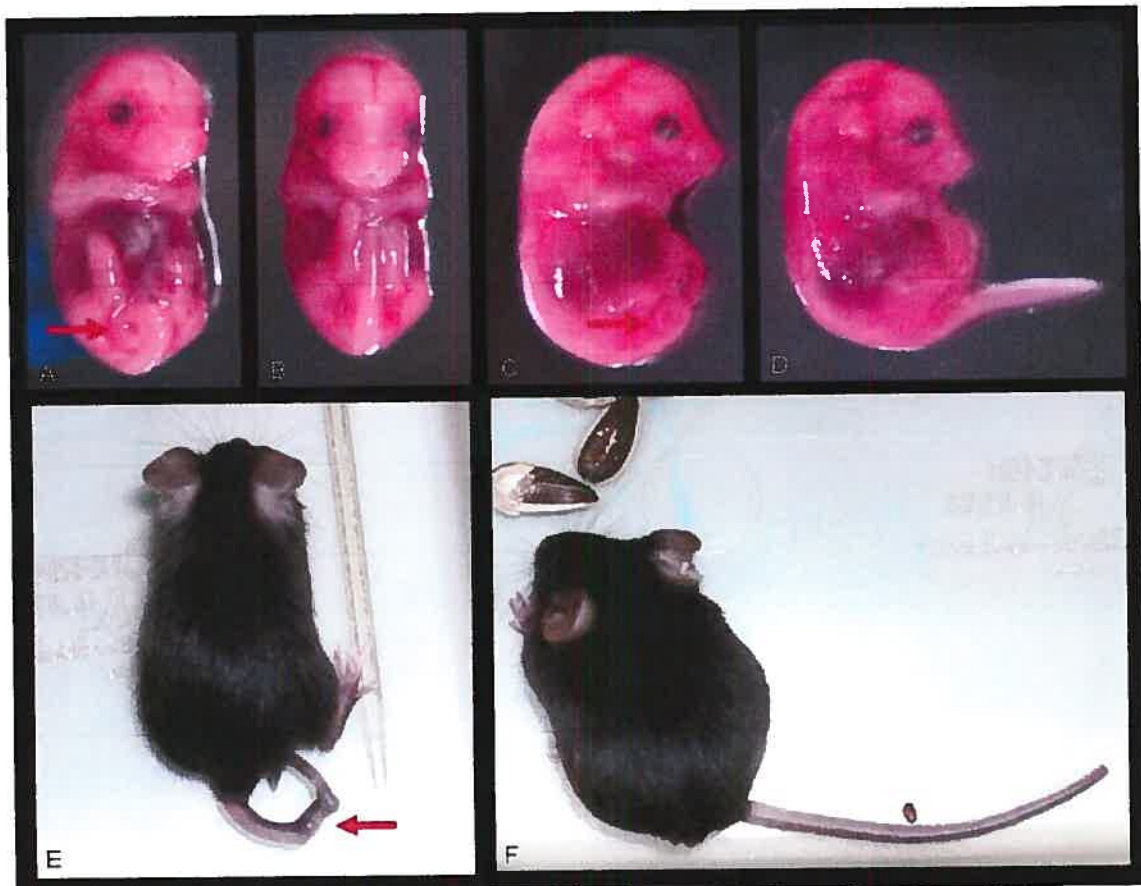


Figure 7 Phénotype anormal de la queue des embryons $E2a^{-/-}$ et les souris $E2a^{+/-}Heb^{+/-}$
 Les embryons E16.5 nuls pour le gène $E2a$ présentent une queue en forme de tire-bouchon (A et C) comparativement aux embryons sauvages (B et D). Les souris doublement hétérozygotes pour les gènes $E2a$ et Heb présentent une queue tordue en plusieurs endroits (E) contrairement aux souris sauvages (F).

À la lumière de mes résultats sur la stabilisation et la localisation de SCL par certaines protéines E, nous pouvons imaginer que la suppression d'E2A dans ces embryons réduirait les niveaux protéiques de SCL, ce qui altérerait la différenciation érythroïde et entraînerait la mort de l'embryon à cause d'une anémie sévère. De plus, cette réduction de SCL engendrerait non seulement un dérèglement de l'expression de ses gènes cibles dans le système hématopoïétique, mais aussi dans la lignée ostéogénique provoquant une perturbation du développement des os de la queue. Il a déjà été montré qu'une surexpression inappropriée de SCL dirigée par les éléments de régulation du gène *Sil* entraîne non seulement une leucémie T-ALL en collaboration avec LMO1 (Breit et al., 1993), mais aussi une perturbation du développement d'autres tissus dérivés du mésoderme. En effet, ces souris présentent une perte anormale des poils ainsi qu'une déformation des vertèbres de la queue (Aplan et al., 1997). La surexpression de SCL pourrait alors empêcher la formation de complexes en titrant des partenaires dans des complexes incomplets ou non fonctionnels, causant un phénotype similaire à la diminution de SCL dans les cellules de la lignée ostéogénique. Il serait donc très intéressant de poursuivre l'étude des embryons dépourvus d'E2A, des souris doublement hétérozygotes pour E2A et HEB, en plus d'étudier l'effet de la délétion conditionnelle de SCL dans la lignée ostéogénique chez la souris. La régulation de SCL est donc cruciale chez la souris, tant pour les lignées hématopoïétiques que pour les lignées ostéogéniques.

CONCLUSION

En cherchant à mieux caractériser les différents mécanismes de régulation du facteur de transcription SCL, j'ai découvert que l'interaction physique entre SCL et les protéines E2A et HEB est non seulement nécessaire à la nucléation du complexe SCL, mais que cela permettait une régulation intrinsèque de la stabilité, de la dégradation et de la distribution spatio-temporelle de SCL. De plus, cette influence des protéines E est également observée *in vivo* dans les cellules hématopoïétiques d'embryons murins où la perte des allèles E2A ou HEB entraîne une diminution des niveaux protéiques de SCL ainsi qu'une diminution du nombre de progéniteurs et de cellules érythroïdes en plus de causer un problème au niveau du développement de la queue de ces embryons. Ces observations m'ont donc permis de révéler un nouveau mécanisme de régulation du facteur de transcription SCL, un régulateur essentiel de l'hématopoïèse et possiblement de l'ostéogénèse.

INDEX ANALYTIQUE

A

Adhésion	16
Affinité.....	19
AGM, Aorto-Gonado-Mésonéphros	9, 31
Analyse cytogénétique	14
Anémie.....	43
Angiogénèse.....	32, 42
Antagonisme	20
Apoptose	11
Arrêt de la différenciation.....	13
Arrêt de la prolifération	80
Auto-renouvellement	3, 5, 21, 80
Axe de division	18

B

bHLH	22, 30, 35, 38
Biosynthese	59
Blastocyste	9, 16
Boîte E	23, 35
Boucle de régulation	19
Boucle de rétro-action.....	93

C

Cancer	14
Caractéristique de l'hématopoïse	32
Cascade de signalisation	27, 81
Caspase	11
Cell fate determination.....	63
Cell proliferation.....	49
Cell survival.....	63
Cellular localization	60
Cellule auto-réactive	11
Cellule fille	18
Cellule NK	7
Cellule souche hématopoïétique	3, 31
Cellules E.S.....	32, 33, 41, 43
Chaos	21
Check-point.....	49
Chimiotactisme	8
Chimiothérapie.....	14
Choix de lignée	iii, 21, 35, 45
Choix irréversible.....	22
Circulation	9
C-KIT.....	27
CLP, Common Lymphoid Progenitor	7
CMP, Common Myeloid Progenitor	7
Coagulation.....	8
Codon d'initiation	30
Colonisation	16
Compartiment cellulaire.....	91
Complexe illégitime.....	13, 42

Complexe majeur d'histocompatibilité.....	8
Complexe SCL.....	24
Complexe transcriptionnel.....	19, 87
Conformation tri-dimensionnelle.....	89
Coopération.....	19
Coordination spatio-temporelle.....	9
Corps apoptotique.....	12
Criblage double-hybride.....	39
Culture en milieu semi-solide.....	6
Cycle cellulaire.....	3, 37
Cytokine.....	8, 15, 21
Cytosquelette.....	27

D

Défense non-spécifique.....	8
Dégradation.....	iii, 45, 88, 96
Délétion génique.....	36, 39, 40, 41, 43
Délétion Génique.....	33
Délétion génique conditionnelle.....	34, 40, 42
Demi-vie.....	88
Destin cellulaire.....	15, 18, 22, 32
Développement embryonnaire.....	93
Développement osseux.....	16
Diapédèse.....	8
Différenciation.....	iii, 3, 7, 15, 20, 21, 22, 30, 34, 45, 80
Différenciation des thymocytaires.....	37
Différenciation érythroïde.....	15, 27, 35
Différenciation terminale.....	7
Differentiation.....	49
Distribution spatio-temporelle.....	iii, 45, 96
Diversité cellulaire.....	21
Division asymétrique.....	18
Division cellulaire.....	18
Division symétrique.....	18
Domaine d'activation.....	36
Domaine de transactivation.....	25
Domaine LIM.....	41
Dominant-négatif.....	38, 42, 86

E

E12.....	35
E2-2.....	39, 48
E2A.....	35, 48
E47.....	35
Élément de régulation.....	36
Élément de régulation en cis.....	28, 81
Embryogénèse.....	9
Enhancer.....	19, 28
Énucléation.....	8
Épissage alternatif.....	35, 38, 39, 81
Épiblaste.....	9
Équilibre.....	20
Érythroblaste.....	31
Érythrocyte.....	8

Érythropoïèse définitive.....	44
Érythropoïèse primitive	41
EST, Express Sequence Tags.....	40
Étude fonctionnelle	5
Étude phylogénétique.....	24
Évènement aléatoire.....	21
Évolution.....	2, 24
Expression ectopique	34
Expression spatio-temporelle.....	19
Expression tissu-spécifique.....	23
Expression ubiquitaire	23
Extrémité amino-terminale	30

F

Facteur de croissance	15
Facteur de transcription.....	19
Facteur intrinsèque.....	19
Facteurs extrinsèques	15
Fertilisation	9
Flexibilité	24
Foie fœtal	10

G

Gamète	9
Gastrulation.....	9
GATA-1	43
GATA-2	43
Gène cible	27
Gène rapporteur LacZ	31
Glycophorine A.....	27
GMP, Granulocyte-Monocyte Progenitor	8
Granulocyte.....	8
Greffe	14

H

Haplo-insuffisance	37
HEB	38, 48
Hémangioblaste	9, 31, 32
Hématopoïèse.....	2, 80
Hématopoïèse définitive	9, 31
Hématopoïèse extra-médullaire	17
Hématopoïèse primitive	9, 31
Hematopoiesis.....	49
Hémoglobine.....	8
Hétérodimérisation.....	20, 22
Hétérogénéité	5
Homéostasie.....	2, 8
Homodimérisation.....	20, 22
Hormone	15
Hypoblaste	9
Hypothèse instructive.....	21
Hypothèse stochastique.....	21
Hypoxie.....	15

I

ICM, Inner Cell Mass	9
Îlot sanguin	9, 31
Immunité humorale	7
Immunité innée	8
Infection virale	8
Intégration rétrovirale	31
Interaction affinité	64
Interaction physique	96
Interaction protéique	19
Isoforme	30, 38, 39, 84

L

LDB-1	40
Létalité	93
Leucémie	13
Leucémogénèse	6, 38
Lignée érythroïde	8
Lignée myéloïde	8
Lignée ostéogénique	95
Lignée vasculaire	9
Lineage outcome	63
LMO2	40
Localisation	18
LT-HSC, Long-Term HSC	5, 34
Lymphocyte B	7
Lymphocyte T	7
Lymphome	14
Lymphopoïèse	13
Lysosome	8

M

Macrophage	8
Marqueur de surface	5
Mass-spectrometry	59
Mastocyte	31
Mécanisme de transport	45
Mécanisme moléculaire	44
Mégacaryocyte	8, 31
Mélanocyte	27
MEP, Megakaryocyte-Erythroid Progenitor	8
Mésoderme	9
Micro-environnement	16, 17
Migration	10, 17
Mitose	3
Modification la chromatine	19
Modification post-traductionnelle	30, 36, 84
Moelle osseuse	10
Monocyte	8
Morula	9
Mutagenèse	25
Mutations	13

N

Neutrophile	8
Niche hématopoïétique	16, 18
Nucléation.....	45

O

Oncogène	13, 28
Ontogénie.....	17
Ostéoblaste.....	16
Ostéoclaste.....	16

P

Pathogène.....	8
Patron d'expression.....	31
Patron d'expression tissus-spécifique	41
Patron d'expression ubiquitaire	36
Patron d'expression ubiquitaire	38
Phagocytose	8
Phosphorylation	30, 36
Piébaldisme.....	27
Plaquette.....	8
Plasmocytes	7
Population hétérogène.....	16
Population KSL.....	5
Potentiel de prolifération.....	13
Précurseur hématopoïétique.....	9, 17
Présentation d'antigène.....	8
Progéniteur hématopoïétique	18
Progéniteur multipotent	7, 31
Programme génétique	15
Prolifération	3, 14, 21
Promoteur.....	19, 28, 81
Protéasome.....	87
Protéine 4.2	27
Protéine d'ancrage à l'ADN.....	25
Protéine E.....	23
Proteomic analyses.....	61

Q

Quiescence.....	3
-----------------	---

R

R.O.S., Reactive Oxygen Species	3
Radiothérapie	14
Reconstitution	5, 16
Recrutement	19, 25
Recrutement à la chromatine.....	25
Régulation transcriptionnelle	22, 24
Répertoire immunologique	11
Réponse immunitaire adaptative.....	7
Réponse immunitaire non spécifique.....	8

Restriction de potentiel	21
Retard de croissance	33
Rétrovirus.....	5

S

Sac vitellin	9
SCL.....	48
SCL, Stem Cell Leukemia	iii, 28
Séquestration.....	86
Short-Term HSC	5
Signal de localisation nucléaire.....	91
Signalisation.....	15
Silencer	28
Spécification	iii, 3, 32, 45
Spécificité	19, 24
Sphérocytose héréditaire.....	28
Stabilité.....	iii, 45, 88, 96
Stability.....	60
ST-HSC, Short-Term HSC	34
Stœchiométrie	20
Structure de la chromatine	36
Structure tridimensionnelle.....	19
Suppresseur de tumeur.....	37
Survie.....	15
Système hiérarchique.....	44
Système nerveux	31
Système vasculaire.....	31

T

T-ALL.....	28
Télomère	3
Thymocyte	7
Thymus	7, 37
Traduction.....	82
Transcription.....	58
Transcription factors	63
Transformation maligne.....	8
Translocation chromosomique.....	13, 14, 24, 28, 42, 80, 92
Transplantation	5, 15
Transport intra-cellulaire.....	90

U

Ubiquitination	88
uORF, upstream Open Reading Frame	30

V

Variabilité	19
Voie endogène	11
Voie exogène	11
Voie lymphoïde.....	7
Voie myéloïde.....	7

BIBLIOGRAPHIE

1. Agulnick,A.D., Taira,M., Breen,J.J., Tanaka,T., Dawid,I.B., and Westphal,H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* 384, 270-272.
2. Akashi,K., Traver,D., Miyamoto,T., and Weissman,I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
3. Aplan,P.D., Begley,C.G., Bertness,V., Nussmeier,M., Ezquerra,A., Coligan,J., and Kirsch,I.R. (1990). The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol. Cell Biol.* 10, 6426-6435.
4. Aplan,P.D., Jones,C.A., Chervinsky,D.S., Zhao,X., Ellsworth,M., Wu,C., McGuire,E.A., and Gross,K.W. (1997). An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J.* 16, 2408-2419.
5. Aplan,P.D., Lombardi,D.P., Reaman,G.H., Sather,H.N., Hammond,G.D., and Kirsch,I.R. (1992a). Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79, 1327-1333.
6. Aplan,P.D., Nakahara,K., Orkin,S.H., and Kirsch,I.R. (1992b). The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J.* 11, 4073-4081.
7. Arai,F., Hirao,A., Ohmura,M., Sato,H., Matsuoka,S., Takubo,K., Ito,K., Koh,G.Y., and Suda,T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-161.
8. Arber,S. and Caroni,P. (1996). Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev.* 10, 289-300.
9. Aronheim,A., Shiran,R., Rosen,A., and Walker,M.D. (1993). The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 8063-8067.
10. Ayer,D.E., Kretzner,L., and Eisenman,R.N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-222.
11. Bach,I., Carriere,C., Ostendorff,H.P., Andersen,B., and Rosenfeld,M.G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* 11, 1370-1380.
12. Bain,G., Engel,I., Robanus Maandag,E.C., te Riele,H.P., Volland,J.R., Sharp,L.L., Chun,J., Huey,B., Pinkel,D., and Murre,C. (1997). E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17, 4782-4791.

13. Bain,G., Maandag,E.C., Izon,D.J., Amsen,D., Kruisbeek,A.M., Weintraub,B.C., Krop,I., Schlissel,M.S., Feeney,A.J., van Roon,M., and . (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79, 885-892.
14. Barndt,R., Dai,M.F., and Zhuang,Y. (1999). A novel role for HEB downstream or parallel to the pre-TCR signaling pathway during alpha beta thymopoiesis. *J. Immunol.* 163, 3331-3343.
15. Barreda,D.R., Hanington,P.C., and Belosevic,M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp Immunol.* 28, 509-554.
16. Barton,L.M., Gottgens,B., and Green,A.R. (1999). The stem cell leukaemia (SCL) gene: a critical regulator of haemopoietic and vascular development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 1193-1207.
17. BECKER,A.J., McCULLOCH,E.A., and TILL,J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197:452-4., 452-454.
18. Begley,C.G., Aplan,P.D., Davey,M.P., Nakahara,K., Tchorz,K., Kurtzberg,J., Hershfield,M.S., Haynes,B.F., Cohen,D.I., Waldmann,T.A., and . (1989a). Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 2031-2035.
19. Begley,C.G., Aplan,P.D., Denning,S.M., Haynes,B.F., Waldmann,T.A., and Kirsch,I.R. (1989b). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 10128-10132.
20. Begley,C.G. and Green,A.R. (1999). The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* 93, 2760-2770.
21. Begley,C.G., Robb,L., Rockman,S., Visvader,J., Bockamp,E.O., Chan,Y.S., and Green,A.R. (1994). Structure of the gene encoding the murine SCL protein. *Gene* 138, 93-99.
22. Begley,C.G., Visvader,J., Green,A.R., Aplan,P.D., Metcalf,D., Kirsch,I.R., and Gough,N.M. (1991). Molecular cloning and chromosomal localization of the murine homolog of the human helix-loop-helix gene SCL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 869-873.
23. Belsham,G.J. and Sonenberg,N. (1996). RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol. Rev.* 60, 499-511.

24. Benezra,R., Davis,R.L., Lockshon,D., Turner,D.L., and Weintraub,H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49-59.
25. Bergqvist,I., Eriksson,M., Saarikettu,J., Eriksson,B., Corneliussen,B., Grundstrom,T., and Holmberg,D. (2000). The basic helix-loop-helix transcription factor E2-2 is involved in T lymphocyte development. *Eur. J. Immunol.* 30, 2857-2863.
26. Billia,F., Barbara,M., McEwen,J., Trevisan,M., and Iscove,N.N. (2001). Resolution of pluripotential intermediates in murine hematopoietic differentiation by global complementary DNA amplification from single cells: confirmation of assignments by expression profiling of cytokine receptor transcripts. *Blood* 97, 2257-2268.
27. Blackwood,E.M. and Eisenman,R.N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217.
28. Bockamp,E.O., Fordham,J.L., Gottgens,B., Murrell,A.M., Sanchez,M.J., and Green,A.R. (1998). Transcriptional regulation of the stem cell leukemia gene by PU.1 and Elf-1. *J. Biol. Chem.* 273, 29032-29042.
29. Bockamp,E.O., McLaughlin,F., Gottgens,B., Murrell,A.M., Elefanty,A.G., and Green,A.R. (1997). Distinct mechanisms direct SCL/tal-1 expression in erythroid cells and CD34 positive primitive myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 272, 8781-8790.
30. Bockamp,E.O., McLaughlin,F., Murrell,A., and Green,A.R. (1994). Transcription factors and the regulation of haemopoiesis: lessons from GATA and SCL proteins. *Bioessays* 16, 481-488.
31. Bockamp,E.O., McLaughlin,F., Murrell,A.M., Gottgens,B., Robb,L., Begley,C.G., and Green,A.R. (1995). Lineage-restricted regulation of the murine SCL/TAL-1 promoter. *Blood* 86, 1502-1514.
32. Brady,G., Billia,F., Knox,J., Hoang,T., Kirsch,I.R., Voura,E.B., Hawley,R.G., Cumming,R., Buchwald,M., and Siminovitch,K. (1995). Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells [published erratum appears in *Curr Biol* 1995 Oct 1;5(10):1201]. *Curr. Biol.* 5, 909-922.
33. Breit,T.M., Mol,E.J., Wolvers-Tettero,I.L., Ludwig,W.D., van Wering,E.R., and van Dongen,J.J. (1993). Site-specific deletions involving the tal-1 and sil genes are restricted to cells of the T cell receptor alpha/beta lineage: T cell receptor delta gene deletion mechanism affects multiple genes. *J. Exp. Med.* 177, 965-977.

34. Bruno,L., Hoffmann,R., McBlane,F., Brown,J., Gupta,R., Joshi,C., Pearson,S., Seidl,T., Heyworth,C., and Enver,T. (2004). Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells in vitro. *Mol. Cell Biol.* *24*, 741-756.
35. Calkhoven,C.F., Muller,C., and Leutz,A. (2000). Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev.* *14*, 1920-1932.
36. Calkhoven,C.F., Muller,C., Martin,R., Krosch,G., Hoang,T., and Leutz,A. (2003). Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. *Genes Dev.* *17*, 959-964.
37. Calligaris,R., Bottardi,S., Cogoi,S., Apezteguia,I., and Santoro,C. (1995). Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 11598-11602.
38. Chaffin,K.E., Beals,C.R., Wilkie,T.M., Forbush,K.A., Simon,M.I., and Perlmutter,R.M. (1990). Dissection of thymocyte signaling pathways by in vivo expression of pertussis toxin ADP-ribosyltransferase. *EMBO J.* *9*, 3821-3829.
39. Chant,J. (1999). Cell polarity in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *15*, 365-391.
40. Chen,C.Z., Li,L., Li,M., and Lodish,H.F. (2003). The Endoglin(positive) Sca-1(Positive) Rhodamine(low) phenotype defines a near-homogeneous population of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Immunity* *19*, 525-533.
41. Chen,H., Ray-Gallet,D., Zhang,P., Hetherington,C.J., Gonzalez,D.A., Zhang,D.E., Moreau-Gachelin,F., and Tenen,D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* *11*, 1549-1560.
42. Cheng,J.T., Cobb,M.H., and Baer,R. (1993a). Phosphorylation of the TAL1 oncoprotein by the extracellular-signal-regulated protein kinase ERK1. *Mol. Cell Biol.* *13*, 801-808.
43. Cheng,J.T., Hsu,H.L., Hwang,L.Y., and Baer,R. (1993b). Products of the TAL1 oncogene: basic helix-loop-helix proteins phosphorylated at serine residues. *Oncogene* *8*, 677-683.
44. Chervinsky,D.S., Zhao,X.F., Lam,D.H., Ellsworth,M., Gross,K.W., and Aplan,P.D. (1999). Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* *19*, 5025-5035.
45. Cheshier,S.H., Morrison,S.J., Liao,X., and Weissman,I.L. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 3120-3125.

46. Choi,K., Kennedy,M., Kazarov,A., Papadimitriou,J.C., and Keller,G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* *125*, 725-732.
47. Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* *162*, 156-159.
48. Chung,Y.S., Zhang,W.J., Arentson,E., Kingsley,P.D., Palis,J., and Choi,K. (2002). Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development* *129*, 5511-5520.
49. Cigan,A.M., Pabich,E.K., and Donahue,T.F. (1988). Mutational analysis of the HIS4 translational initiator region in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *8*, 2964-2975.
50. Cohen,C.M., Dotimas,E., and Korsgren,C. (1993). Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (pallidin). *Semin. Hematol.* *30*, 119-137.
51. Condorelli,G.L., Tocci,A., Botta,R., Facchiano,F., Testa,U., Vitelli,L., Valtieri,M., Croce,C.M., and Peschle,C. (1997). Ectopic TAL-1/SCL expression in phenotypically normal or leukemic myeloid precursors: proliferative and antiapoptotic effects coupled with a differentiation blockade. *Mol. Cell Biol.* *17*, 2954-2969.
52. Corneliussen,B., Thornell,A., Hallberg,B., and Grundstrom,T. (1991b). Helix-loop-helix transcriptional activators bind to a sequence in glucocorticoid response elements of retrovirus enhancers. *J. Virol.* *65*, 6084-6093.
53. Corneliussen,B., Thornell,A., Hallberg,B., and Grundstrom,T. (1991a). Helix-loop-helix transcriptional activators bind to a sequence in glucocorticoid response elements of retrovirus enhancers. *J. Virol.* *65*, 6084-6093.
54. Cory,S. and Adams,J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 647-656.
55. Courtes,C., Lecointe,N., Le Cam,L., Baudoin,F., Sardet,C., and Mathieu-Mahul,D. (2000). Erythroid-specific inhibition of the tal-1 intragenic promoter is due to binding of a repressor to a novel silencer. *J. Biol. Chem.* *275*, 949-958.
56. Crews,S.T. (1998). Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* *12*, 607-620.
57. Cross,M.A., Heyworth,C.M., Murrell,A.M., Bockamp,E.O., Dexter,T.M., and Green,A.R. (1994). Expression of lineage restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line. *Oncogene* *9*, 3013-3016.

58. Curtis,D.J., Hall,M.A., Van Stekelenburg,L.J., Robb,L., Jane,S.M., and Begley,C.G. (2004). SCL is required for normal function of short-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* 103, 3342-3348.
59. Curtis,D.J., Robb,L., Strasser,A., and Begley,C.G. (1997). The CD2-scl transgene alters the phenotype and frequency of T-lymphomas in N-ras transgenic or p53 deficient mice. *Oncogene* 15, 2975-2983.
60. Dawid,I.B., Breen,J.J., and Toyama,R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.* 14, 156-162.
61. Deane,J.E., MacKay,J.P., Kwan,A.H., Sum,E.Y., Visvader,J.E., and Matthews,J.M. (2003). Structural basis for the recognition of ldb1 by the N-terminal LIM domains of LMO2 and LMO4. *EMBO J.* 22, 2224-2233.
62. Deguchi,K., Yagi,H., Inada,M., Yoshizaki,K., Kishimoto,T., and Komori,T. (1999). Excessive extramedullary hematopoiesis in Cbfa1-deficient mice with a congenital lack of bone marrow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 352-359.
63. DeKoter,R.P. and Singh,H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.
64. Delassus,S., Titley,I., and Enver,T. (1999). Functional and molecular analysis of hematopoietic progenitors derived from the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo. *Blood* 94, 1495-1503.
65. Devoy,A., Soane,T., Welchman,R., and Mayer,R.J. (2005). The ubiquitin-proteasome system and cancer. *Essays Biochem.* 41, 187-203.
66. Diakun,G.P., Fairall,L., and Klug,A. (1986). EXAFS study of the zinc-binding sites in the protein transcription factor IIIA. *Nature* 324, 698-699.
67. Dingwall,C. and Laskey,R.A. (1998). Nuclear import: a tale of two sites. *Curr. Biol.* 8, R922-R924.
68. Dong,W.F., Billia,F., Atkins,H.L., Iscove,N.N., and Minden,M.D. (1996). Expression of rhombotin 2 in normal and leukaemic haemopoietic cells. *Br J Haematol* 93, 280-286.
69. Doyle,K., Zhang,Y., Baer,R., and Bina,M. (1994). Distinguishable patterns of protein-DNA interactions involving complexes of basic helix-loop-helix proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 12099-12105.
70. Ducy,P., Zhang,R., Geoffroy,V., Ridall,A.L., and Karsenty,G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.

71. Elefanty,A.G., Begley,C.G., Hartley,L., Papaevangeliou,B., and Robb,L. (1999). SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* 94, 3754-3763.
72. Elefanty,A.G., Begley,C.G., Metcalf,D., Barnett,L., Kontgen,F., and Robb,L. (1998). Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11897-11902.
73. Elefanty,A.G., Robb,L., Birner,R., and Begley,C.G. (1997). Hematopoietic-specific genes are not induced during in vitro differentiation of scl-null embryonic stem cells. *Blood* 90, 1435-1447.
74. Ellis,H.M., Spann,D.R., and Posakony,J.W. (1990). extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* 61, 27-38.
75. Elwood,N.J., Zogos,H., Pereira,D.S., Dick,J.E., and Begley,C.G. (1998). Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood* 91, 3756-3765.
76. Endoh,M., Ogawa,M., Orkin,S., and Nishikawa,S. (2002). SCL/tal-1-dependent process determines a competence to select the definitive hematopoietic lineage prior to endothelial differentiation. *EMBO J.* 21, 6700-6708.
77. Engel,I. and Murre,C. (2001). The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 193-199.
78. Faubert,A., Lessard,J., and Sauvageau,G. (2004). Are genetic determinants of asymmetric stem cell division active in hematopoietic stem cells? *Oncogene* 23, 7247-7255.
79. Feuerstein,R., Wang,X., Song,D., Cooke,N.E., and Liebhaber,S.A. (1994). The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 10655-10659.
80. Filep,J.G., Baron,C., Lachance,S., Perreault,C., and Chan,J.S. (1996). Involvement of nitric oxide in target-cell lysis and DNA fragmentation induced by murine natural killer cells. *Blood* 87, 5136-5143.
81. Fordham,J.L., Gottgens,B., McLaughlin,F., and Green,A.R. (1999). Chromatin structure and transcriptional regulation of the stem cell leukaemia (SCL) gene in mast cells. *Leukemia* 13, 750-759.
82. Fornerod,M., van Baal,S., Valentine,V., Shapiro,D.N., and Grosveld,G. (1997). Chromosomal localization of genes encoding CAN/Nup214-interacting proteins-

- human CRM1 localizes to 2p16, whereas Nup88 localizes to 17p13 and is physically linked to SF2p32. *Genomics* 42, 538-540.
83. Foroni,L., Boehm,T., White,L., Forster,A., Sherrington,P., Liao,X.B., Brannan,C.I., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., and Rabbitts,T.H. (1992). The rhombotin gene family encode related LIM-domain proteins whose differing expression suggests multiple roles in mouse development. *J. Mol. Biol.* 226, 747-761.
 84. Furusawa,C. and Kaneko,K. (2001). Theory of robustness of irreversible differentiation in a stem cell system: chaos hypothesis. *J. Theor. Biol.* 209, 395-416.
 85. Gan,T.I., Rowen,L., Nesbitt,R., Roe,B.A., Wu,H., Hu,P., Yao,Z., Kim,U.J., O'Sickey,T., and Bina,M. (2002). Genomic organization of human TCF12 gene and spliced mRNA variants producing isoforms of transcription factor HTF4. *Cytogenet. Genome Res.* 98, 245-248.
 86. Garrell,J. and Modolell,J. (1990). The *Drosophila* extramacrochaetae locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* 61, 39-48.
 87. Geiger,H., Sick,S., Bonifer,C., and Muller,A.M. (1998). Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts. *Cell* 93, 1055-1065.
 88. Gering,M., Rodaway,A.R., Gottgens,B., Patient,R.K., and Green,A.R. (1998). The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J.* 17, 4029-4045.
 89. Gingras,A.C., Raught,B., and Sonenberg,N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913-963.
 90. Goardon,N., Schuh,A., Hajar,I., Ma,X., Jouault,H., Dzierzak,E., Romeo,P.H., and Maouche-Chretien,L. (2002). Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B- and T-lymphoid differentiation. *Blood* 100, 491-500.
 91. Godfrey,D.I. and Zlotnik,A. (1993). Control points in early T-cell development. *Immunol. Today* 14, 547-553.
 92. Goldfarb,A.N., Goueli,S., Mickelson,D., and Greenberg,J.M. (1992). T-cell acute lymphoblastic leukemia--the associated gene SCL/tal codes for a 42-Kd nuclear phosphoprotein. *Blood* 80, 2858-2866.

93. Goldfarb,A.N. and Lewandowska,K. (1994). Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein via heterodimerization with a nuclear localizing partner. *Exp. Cell Res.* *214*, 481-485.
94. Goldfarb,A.N., Lewandowska,K., and Shoham,M. (1996). Determinants of helix-loop-helix dimerization affinity. Random mutational analysis of SCL/tal. *J. Biol. Chem.* *271*, 2683-2688.
95. Gorlich,D. (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* *17*, 2721-2727.
96. Gottgens,B., Barton,L.M., Gilbert,J.G., Bench,A.J., Sanchez,M.J., Bahn,S., Mistry,S., Grafham,D., McMurray,A., Vaudin,M., Amaya,E., Bentley,D.R., Green,A.R., and Sinclair,A.M. (2000). Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers. *Nat. Biotechnol.* *18*, 181-186.
97. Gottgens,B., Broccardo,C., Sanchez,M.J., Deveaux,S., Murphy,G., Gothert,J.R., Kotsopoulou,E., Kinston,S., Delaney,L., Piltz,S., Barton,L.M., Knezevic,K., Erber,W.N., Begley,C.G., Frampton,J., and Green,A.R. (2004). The scl +18/19 stem cell enhancer is not required for hematopoiesis: identification of a 5' bifunctional hematopoietic-endothelial enhancer bound by Fli-1 and Elf-1. *Mol. Cell Biol.* *24*, 1870-1883.
98. Gottgens,B., McLaughlin,F., Bockamp,E.O., Fordham,J.L., Begley,C.G., Kosmopoulos,K., Elefanty,A.G., and Green,A.R. (1997). Transcription of the SCL gene in erythroid and CD34 positive primitive myeloid cells is controlled by a complex network of lineage-restricted chromatin-dependent and chromatin-independent regulatory elements. *Oncogene* *15*, 2419-2428.
99. Gottgens,B., Nastos,A., Kinston,S., Piltz,S., Delabesse,E.C., Stanley,M., Sanchez,M.J., Ciau-Uitz,A., Patient,R., and Green,A.R. (2002). Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J.* *21*, 3039-3050.
100. Green,A.R., Lints,T., Visvader,J., Harvey,R., and Begley,C.G. (1992). SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain [published erratum appears in *Oncogene* 1992 Jul;7(7):1459]. *Oncogene* *7*, 653-660.
101. Green,A.R., Salvaris,E., and Begley,C.G. (1991). Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. *Oncogene* *6*, 475-479.
102. Hall,M.A., Curtis,D.J., Metcalf,D., Elefanty,A.G., Sourris,K., Robb,L., Gothert,J.R., Jane,S.M., and Begley,C.G. (2003). The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 992-997.

103. Hall,P.A. and Watt,F.M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106, 619-633.
104. Hassan,B.A. and Bellen,H.J. (2000). Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev.* 14, 1852-1865.
105. Hata,K. and Mizuguchi,J. (2004). Genomic organization and characterization of the promoter for the E2A gene. *Gene* 325, 53-61.
106. Hawley,R.G., Lieu,F.H., Fong,A.Z., and Hawley,T.S. (1994). Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther.* 1, 136-138.
107. Henthorn,P.S., Stewart,C.C., Kadesch,T., and Puck,J.M. (1991). The gene encoding human TFE3, a transcription factor that binds the immunoglobulin heavy-chain enhancer, maps to Xp11.22. *Genomics* 11, 374-378.
108. Hentze,M.W. and Kuhn,L.C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 8175-8182.
109. Herblot,S., Aplan,P.D., and Hoang,T. (2002). A gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol. Cell Biol.* 22.
110. Herblot,S., Steff,A.-M., Hugo,P., Aplan,P.D., and Hoang,T. (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation : inhibition of E2A-HEB function and pre-Ta chain expression. *Nat. Immunol.* 1, 138-144.
111. Hershko,A., Heller,H., Elias,S., and Ciechanover,A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258, 8206-8214.
112. Hoang,T. (2004). The origin of hematopoietic cell type diversity. *Oncogene* 23, 7188-7198.
113. 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.
114. Honda,H., Inaba,T., Suzuki,T., Oda,H., Ebihara,Y., Tsuiji,K., Nakahata,T., Ishikawa,T., Yazaki,Y., and Hirai,H. (1999). Expression of E2A-HLF chimeric protein induced T-cell apoptosis, B-cell maturation arrest, and development of acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 93, 2780-2790.
115. Hsu,H.L., Cheng,J.T., Chen,Q., and Baer,R. (1991). Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.* 11, 3037-3042.

116. Hsu,H.L., Huang,L., Tsan,J.T., Funk,W., Wright,W.E., Hu,J.S., Kingston,R.E., and Baer,R. (1994a). Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.* *14*, 1256-1265.
117. Hsu,H.L., Wadman,I., Tsan,J.T., and Baer,R. (1994b). Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 5947-5951.
118. Hu,J.S., Olson,E.N., and Kingston,R.E. (1992). HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. *Mol. Cell Biol.* *12*, 1031-1042.
119. Huang,S., Qiu,Y., Shi,Y., Xu,Z., and Brandt,S.J. (2000). P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *EMBO J.* *19*, 6792-6803.
120. Hwang,L.Y., Siegelman,M., Davis,L., Oppenheimer-Marks,N., and Baer,R. (1993). Expression of the TAL1 proto-oncogene in cultured endothelial cells and blood vessels of the spleen. *Oncogene* *8*, 3043-3046.
121. Igney,F.H. and Krammer,P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 277-288.
122. Iwasaki,H., Mizuno,S., Wells,R.A., Cantor,A.B., Watanabe,S., and Akashi,K. (2003). GATA-1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages. *Immunity.* *19*, 451-462.
123. Jackson,R.J. and Kaminski,A. (1995). Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. *RNA.* *1*, 985-1000.
124. Jaffredo,T., Gautier,R., Eichmann,A., and Dieterlen-Lievre,F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* *125*, 4575-4583.
125. Jaffredo,T., Nottingham,W., Liddiard,K., Bollerot,K., Pouget,C., and de Bruijn,M. (2005). From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp. Hematol.* *33*, 1029-1040.
126. Jan,Y.N. and Jan,L.Y. (1993). HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* *75*, 827-830.
127. Jan,Y.N. and Jan,L.Y. (1998b). Asymmetric cell division. *Nature* *392*, 775-778.
128. Jan,Y.N. and Jan,L.Y. (1998a). Asymmetric cell division. *Nature* *392*, 775-778.
129. Jeronimo,C., Langelier,M.F., Zeghouf,M., Cojocar,M., Bergeron,D., Baali,D., Forget,D., Mnaimneh,S., Davierwala,A.P., Pootoolal,J., Chandy,M., Canadien,V., Beattie,B.K., Richards,D.P., Workman,J.L., Hughes,T.R.,

- Greenblatt,J., and Coulombe,B. (2004). RPAP1, a novel human RNA polymerase II-associated protein affinity purified with recombinant wild-type and mutated polymerase subunits. *Mol. Cell Biol.* *24*, 7043-7058.
130. Juarez,M.A., Su,F., Chun,S., Kiel,M.J., and Lyons,S.E. (2005). Distinct roles for Scl in erythroid specification and maturation in zebrafish. *J. Biol. Chem.*
 131. Jurata,L.W. and Gill,G.N. (1997). Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. *Mol. Cell Biol.* *17*, 5688-5698.
 132. Jurata,L.W., Kenny,D.A., and Gill,G.N. (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 11693-11698.
 133. Kallianpur,A.R., Jordan,J.E., and Brandt,S.J. (1994). The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* *83*, 1200-1208.
 134. Kee,B.L. and Murre,C. (1998). Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J. Exp. Med.* *188*, 699-713.
 135. Kennedy,M., Firpo,M., Choi,K., Wall,C., Robertson,S., Kabrun,N., and Keller,G. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* *386*, 488-493.
 136. Kinder,S.J., Tsang,T.E., Quinlan,G.A., Hadjantonakis,A.K., Nagy,A., and Tam,P.P. (1999). The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development* *126*, 4691-4701.
 137. Klambt,C., Knust,E., Tietze,K., and Campos-Ortega,J.A. (1989). Closely related transcripts encoded by the neurogenic gene complex enhancer of split of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* *8*, 203-210.
 138. Kowenz-Leutz,E. and Leutz,A. (1999). A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol. Cell* *4*, 735-743.
 139. Kozak,M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* *108*, 229-241.
 140. Kroon,E., Thorsteinsdottir,U., Mayotte,N., Nakamura,T., and Sauvageau,G. (2001). NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *Embo Journal* *20*, 350-361.
 141. KrosI,G., He,G., Lefrancois,M., Charron,F., Romeo,P.H., Jolicoeur,P., Kirsch,I.R., Nemer,M., and Hoang,T. (1998). Transcription factor SCL is

- required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* *188*, 439-450.
142. Kubo,H. and Alitalo,K. (2003). The bloody fate of endothelial stem cells. *Genes Dev.* *17*, 322-329.
 143. Lahlil,R., Lecuyer,E., Herblot,S., and Hoang,T. (2003). SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A gene expression. Submitted.
 144. Larson,R.C., Fisch,P., Larson,T.A., Lavenir,I., Langford,T., King,G., and Rabbitts,T.H. (1994). T cell tumours of disparate phenotype in mice transgenic for Rbtn-2. *Oncogene* *9*, 3675-3681.
 145. Larson,R.C., Lavenir,I., Larson,T.A., Baer,R., Warren,A.J., Wadman,I., Nottage,K., and Rabbitts,T.H. (1996). Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J.* *15*, 1021-1027.
 146. Larson,R.C., Osada,H., Larson,T.A., Lavenir,I., and Rabbitts,T.H. (1995). The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. *Oncogene* *11*, 853-862.
 147. Leary,A.G., Ogawa,M., Strauss,L.C., and Civin,C.I. (1984). Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes. *J. Clin. Invest* *74*, 2193-2197.
 148. Lecointe,N., Bernard,O., Naert,K., Joulin,V., Larsen,C.J., Romeo,P.H., and Mathieu-Mahul,D. (1994). GATA-and SP1-binding sites are required for the full activity of the tissue-specific promoter of the tal-1 gene. *Oncogene* *9*, 2623-2632.
 149. Lecuyer, E and Hoang, T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp.Hematol.* 2004.
- Ref Type: In Press
150. 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.
 151. Ledent,V., Paquet,O., and Vervoort,M. (2002). Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol.* *3*, RESEARCH0030.
 152. Lee,B., Thirunavukkarasu,K., Zhou,L., Pastore,L., Baldini,A., Hecht,J., Geoffroy,V., Ducy,P., and Karsenty,G. (1997). Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat. Genet.* *16*, 307-310.

153. Leroy-Viard,K., Vinit,M.A., Lecointe,N., Mathieu-Mahul,D., and Romeo,P.H. (1994). Distinct DNase-I hypersensitive sites are associated with TAL-1 transcription in erythroid and T-cell lines. *Blood* 84, 3819-3827.
154. Lessard,J., Faubert,A., and Sauvageau,G. (2004). Genetic programs regulating HSC specification, maintenance and expansion. *Oncogene* 23, 7199-7209.
155. Liakopoulos,D., Kusch,J., Grava,S., Vogel,J., and Barral,Y. (2003). Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell* 112, 561-574.
156. Lingbeck,J.M., Trausch-Azar,J.S., Ciechanover,A., and Schwartz,A.L. (2005). E12 and E47 modulate cellular localization and proteasome-mediated degradation of MyoD and Id1. *Oncogene* 24, 6376-6384.
157. Look,A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059-1064.
158. Lowsky,R., DeCoteau,J.F., Reitnair,A.H., Ichinohasama,R., Dong,W.F., Xu,Y., Mak,T.W., Kadin,M.E., and Minden,M.D. (1997). Defects of the mismatch repair gene MSH2 are implicated in the development of murine and human lymphoblastic lymphomas and are associated with the aberrant expression of rhombotin-2 (Lmo-2) and Tal-1 (SCL). *Blood* 89, 2276-2282.
159. Magnani,M., Crinelli,R., Bianchi,M., and Antonelli,A. (2000). The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB). *Curr. Drug Targets.* 1, 387-399.
160. Malumbres,M. and Barbacid,M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 222-231.
161. Manaia,A., Lemarchandel,V., Klaine,M., Max-Audit,I., Romeo,P., Dieterlen-Lievre,F., and Godin,I. (2000). Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites. *Development* 127, 643-653.
162. Mann,M. and Jensen,O.N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* 21, 255-261.
163. Martin,D.I. and Orkin,S.H. (1990). Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev.* 4, 1886-1898.
164. Martin,R., Lahlil,R., Damert,A., Miquerol,L., Nagy,A., Keller,G., and Hoang,T. (2004). SCL interacts with VEGF to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development* 131, 693-702.
165. Massari,M.E., Jennings,P.A., and Murre,C. (1996). The AD1 transactivation domain of E2A contains a highly conserved helix which is required for its

- activity in both *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* *16*, 121-129.
166. Massari, M.E. and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell Biol.* *20*, 429-440.
 167. Mauro, M.J. and Druker, B.J. (2001). STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. *Oncologist.* *6*, 233-238.
 168. McCormack, M.P., Forster, A., Drynan, L., Pannell, R., and Rabbitts, T.H. (2003). The LMO2 T-cell oncogene is activated via chromosomal translocations or retroviral insertion during gene therapy but has no mandatory role in normal T-cell development. *Mol. Cell Biol.* *23*, 9003-9013.
 169. Mead, P.E., Kelley, C.M., Hahn, P.S., Piedad, O., and Zon, L.I. (1998). SCL specifies hematopoietic mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* *125*, 2611-2620.
 170. Medline. A service of the U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health (<http://medlineplus.gov/>). 2005.
 171. Medvinsky, A.L., Samoylina, N.L., Muller, A.M., and Dzierzak, E.A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* *364*, 64-67.
 172. 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.
 173. Mikkola, H.K., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T.M., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2003). Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* *421*, 547-551.
 174. Minegishi, N., Ohta, J., Yamagiwa, H., Suzuki, N., Kawauchi, S., Zhou, Y., Takahashi, S., Hayashi, N., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood* *93*, 4196-4207.
 175. Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11:35-71.*, 35-71.
 176. Morrison, S.J. and Weissman, I.L. (1994). The Long-Term Repopulating Subset of Hematopoietic Stem-Cells Is Deterministic and Isolatable by Phenotype. *Immunity* *1*, 661-673.
 177. Murre, C. (2000). Intertwining proteins in thymocyte development and cancer. *Nat. Immunol.* *1*, 97-98.

178. Murre,C., McCaw,P.S., and Baltimore,D. (1989a). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.
179. Murre,C., McCaw,P.S., Vaessin,H., Caudy,M., Jan,L.Y., Jan,Y.N., Cabrera,C.V., Buskin,J.N., Hauschka,S.D., Lassar,A.B., and . (1989b). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
180. Nakielny,S. and Dreyfuss,G. (1999). Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99, 677-690.
181. Neale,G.A., Rehg,J.E., and Goorha,R.M. (1995). Ectopic expression of rhombotin-2 causes selective expansion of CD4-CD8- lymphocytes in the thymus and T-cell tumors in transgenic mice. *Blood* 86, 3060-3071.
182. Nelson,C., Shen,L.P., Meister,A., Fodor,E., and Rutter,W.J. (1990). Pan - A Transcriptional Regulator That Binds Chymotrypsin, Insulin, and Ap-4 Enhancer Motifs. *Genes & Development* 4, 1035-1043.
183. Nicolas Goardon, Julie Alexandra Lambert, Patrick Rodriguez, Philippe Nissaire, Sabine Herblot, Pierre Thibault, Dominique Dumenil, John Strouboulis, Paul-Henri Romeo, and Trang Hoang. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. 2006. *The EMBO Journal*.
184. Nishikawa,S.I., Nishikawa,S., Hirashima,M., Matsuyoshi,N., and Kodama,H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125, 1747-1757.
185. O'Connor-Giles,K.M. and Skeath,J.B. (2003). Numb inhibits membrane localization of Sanpodo, a four-pass transmembrane protein, to promote asymmetric divisions in *Drosophila*. *Dev. Cell* 5, 231-243.
186. O'Neil,J., Billa,M., Oikemus,S., and Kelliher,M. (2001). The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. *Oncogene* 20, 3897-3905.
187. Ohneda,K. and Yamamoto,M. (2002). Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol.* 108, 237-245.
188. Ono,Y., Fukuhara,N., and Yoshie,O. (1997). Transcriptional activity of TAL1 in T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) requires RBTN1 or -2 and induces TALLA1, a highly specific tumor marker of T-ALL. *J. Biol. Chem.* 272, 4576-4581.

189. Orkin,S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* *1*, 57-64.
190. Orkin,S.H. and Zon,L.I. (2002). Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat. Immunol.* *3*, 323-328.
191. Osada,H., Grutz,G., Axelson,H., Forster,A., and Rabbitts,T.H. (1995). Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 9585-9589.
192. Palamarchuk,A., Efanov,A., Maximov,V., Aqeilan,R.I., Croce,C.M., and Pekarsky,Y. (2005). Akt phosphorylates Tal1 oncoprotein and inhibits its repressor activity. *Cancer Res.* *65*, 4515-4519.
193. Palis,J., Robertson,S., Kennedy,M., Wall,C., and Keller,G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* *126*, 5073-5084.
194. Passegue,E., Jamieson,C.H., Ailles,L.E., and Weissman,I.L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100 Suppl 1:11842-9*, 11842-11849.
195. Pedersen,T.A., Kowenz-Leutz,E., Leutz,A., and Nerlov,C. (2001). Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev.* *15*, 3208-3216.
196. Pelletier,J. and Sonenberg,N. (1985). Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell* *40*, 515-526.
197. Perry,C. and Soreq,H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis. Fine tuning of combinatorial multi-domain elements. *Eur. J. Biochem.* *269*, 3607-3618.
198. Pevny,L., Lin,C.S., D'Agati,V., Simon,M.C., Orkin,S.H., and Costantini,F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* *121*, 163-172.
199. Pevny,L., Simon,M.C., Robertson,E., Klein,W.H., Tsai,S.F., D'Agati,V., Orkin,S.H., and Costantini,F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* *349*, 257-260.
200. Pimanda,J.E., Silberstein,L., Dominici,M., Dekel,B., Bowen,M., Oldham,S., Kallianpur,A., Brandt,S.J., Tannahill,D., Gottgens,B., and Green,A.R. (2006). Transcriptional Link between Blood and Bone: the Stem Cell Leukemia Gene

- and Its +19 Stem Cell Enhancer Are Active in Bone Cells. *Mol. Cell Biol.* 26, 2615-2625.
201. Porcher,C., Liao,E.C., Fujiwara,Y., Zon,L.I., and Orkin,S.H. (1999). Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* 126, 4603-4615.
 202. Porcher,C., Swat,W., Rockwell,K., Fujiwara,Y., Alt,F.W., and Orkin,S.H. (1996). The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47-57.
 203. Potten,C.S. and Loeffler,M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-1020.
 204. Poulin,G., Turgeon,B., and Drouin,J. (1997). NeuroD1/beta 2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Molecular and Cellular Biology* 17, 6673-6682.
 205. Prasad,K.S. and Brandt,S.J. (1997). Target-dependent effect of phosphorylation on the DNA binding activity of the TAL1/SCL oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 272, 11457-11462.
 206. Prasad,K.S., Jordan,J.E., Koury,M.J., Bondurant,M.C., and Brandt,S.J. (1995a). Erythropoietin stimulates transcription of the TAL1/SCL gene and phosphorylation of its protein products. *J. Biol. Chem.* 270, 11603-11611.
 207. Prasad,K.S., Jordan,J.E., Koury,M.J., Bondurant,M.C., and Brandt,S.J. (1995b). Erythropoietin stimulates transcription of the TAL1/SCL gene and phosphorylation of its protein products. *J. Biol. Chem.* 270, 11603-11611.
 208. Pscherer,A., Dorflinger,U., Kirfel,J., Gawlas,K., Ruschoff,J., Buettner,R., and Schule,R. (1996). The helix-loop-helix transcription factor SEF-2 regulates the activity of a novel initiator element in the promoter of the human somatostatin receptor II gene. *EMBO J.* 15, 6680-6690.
 209. Pugh,B.F. (2000). Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* 255, 1-14.
 210. Pulford,K., Lecointe,N., Leroy-Viard,K., Jones,M., Mathieu-Mahul,D., and Mason,D.Y. (1995). Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood* 85, 675-684.
 211. Qiu,Y., Sharma,A., and Stein,R. (1998). p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol. Cell Biol.* 18, 2957-2964.

212. Quong,M.W., Massari,M.E., Zwart,R., and Murre,C. (1993). A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* *13*, 792-800.
213. Quong,M.W., Romanow,W.J., and Murre,C. (2002). E protein function in lymphocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* *20*:301-22., 301-322.
214. Rabbitts,T.H. (1998). LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev.* *12*, 2651-2657.
215. Rekhtman,N., Radparvar,F., Evans,T., and Skoultchi,A.I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev.* *13*, 1398-1411.
216. Reya,T., Morrison,S.J., Clarke,M.F., and Weissman,I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105-111.
217. Rigaut,G., Shevchenko,A., Rutz,B., Wilm,M., Mann,M., and Seraphin,B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* *17*, 1030-1032.
218. Risau,W. and Flamme,I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*:73-91., 73-91.
219. Rivera,R. and Murre,C. (2001). The regulation and function of the Id proteins in lymphocyte development. *Oncogene* *20*, 8308-8316.
220. Robb,L., Elwood,N.J., Elefanty,A.G., Kontgen,F., Li,R., Barnett,L.D., and Begley,C.G. (1996). The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* *15*, 4123-4129.
221. Robb,L., Lyons,I., Li,R., Hartley,L., Kontgen,F., Harvey,R.P., Metcalf,D., and Begley,C.G. (1995). Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 7075-7079.
222. Rodan,G.A. and Martin,T.J. (1981). Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif. Tissue Int.* *33*, 349-351.
223. Roodman,G.D. (2004). Mechanisms of bone metastasis. *N. Engl. J. Med.* *350*, 1655-1664.
224. Royer-Pokora,B., Loos,U., and Ludwig,W.D. (1991). TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene* *6*, 1887-1893.

225. Rushlow,C.A., Hogan,A., Pinchin,S.M., Howe,K.M., Lardelli,M., and Ish-Horowicz,D. (1989). The Drosophila hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to N-myc. *EMBO J.* 8, 3095-3103.
226. Russell,E.S. (1979). Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv. Genet.* 20, 357-459.
227. Sanchez,M., Gottgens,B., Sinclair,A.M., Stanley,M., Begley,C.G., Hunter,S., and Green,A.R. (1999). An SCL 3' enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors. *Development* 126, 3891-3904.
228. Sanchez,M.J., Holmes,A., Miles,C., and Dzierzak,E. (1996). Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity.* 5, 513-525.
229. Santolini,E., Puri,C., Salcini,A.E., Gagliani,M.C., Pelicci,P.G., Tacchetti,C., and Di Fiore,P.P. (2000). Numb is an endocytic protein. *J. Cell Biol.* 151, 1345-1352.
230. Sawada,S. and Littman,D.R. (1993). A Heterodimer of Heb and An E12-Related Protein Interacts with the Cd4 Enhancer and Regulates Its Activity in T-Cell Lines. *Molecular and Cellular Biology* 13, 5620-5628.
231. Sawyers,C.L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 340, 1330-1340.
232. Schlissel,M., Voronova,A., and Baltimore,D. (1991). Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germ-line immunoglobulin heavy-chain gene transcription and rearrangement in a pre-T-cell line. *Genes Dev.* 5, 1367-1376.
233. Schmeichel,K.L. and Beckerle,M.C. (1994). The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* 79, 211-219.
234. Segal,M. and Bloom,K. (2001). Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol.* 11, 160-166.
235. Semina,E.V., Altherr,M.R., and Murray,J.C. (1998). Cloning and chromosomal localization of two novel human genes encoding LIM-domain binding factors CLIM1 and CLIM2/LDB1/NLI. *Mamm. Genome* 9, 921-924.
236. Shalaby,F., Ho,J., Stanford,W.L., Fischer,K.D., Schuh,A.C., Schwartz,L., Bernstein,A., and Rossant,J. (1997). A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89, 981-990.
237. Shalaby,F., Rossant,J., Yamaguchi,T.P., Gertsenstein,M., Wu,X.F., Breitman,M.L., and Schuh,A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.

238. Shivdasani,R.A., Fujiwara,Y., McDevitt,M.A., and Orkin,S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* *16*, 3965-3973.
239. Shivdasani,R.A., Mayer,E.L., and Orkin,S.H. (1995a). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* *373*, 432-434.
240. Shivdasani,R.A. and Orkin,S.H. (1996). The transcriptional control of hematopoiesis [see comments]. *Blood* *87*, 4025-4039.
241. Shivdasani,R.A., Rosenblatt,M.F., Zucker-Franklin,D., Jackson,C.W., Hunt,P., Saris,C.J., and Orkin,S.H. (1995b). Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* *81*, 695-704.
242. Sigvardsson,M., O'Riordan,M., and Grosschedl,R. (1997). EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity* *7*, 25-36.
243. Silver,L. and Palis,J. (1997). Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood* *89*, 1154-1164.
244. Simon,M.C., Pevny,L., Wiles,M.V., Keller,G., Costantini,F., and Orkin,S.H. (1992). Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* *1*, 92-98.
245. Sinclair,A.M., Gottgens,B., Barton,L.M., Stanley,M.L., Pardanaud,L., Klaine,M., Gering,M., Bahn,S., Sanchez,M., Bench,A.J., Fordham,J.L., Bockamp,E., and Green,A.R. (1999). Distinct 5' SCL enhancers direct transcription to developing brain, spinal cord, and endothelium: neural expression is mediated by GATA factor binding sites. *Dev. Biol.* *209*, 128-142.
246. Sloan,S.R., Shen,C.P., McCarrick-Walmsley,R., and Kadesch,T. (1996). Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity. *Mol. Cell Biol.* *16*, 6900-6908.
247. Spradling,A., Drummond-Barbosa,D., and Kai,T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* *414*, 98-104.
248. Stade,K., Ford,C.S., Guthrie,C., and Weis,K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* *90*, 1041-1050.
249. Suda,T., Arai,F., and Hirao,A. (2005). Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol.* *26*, 426-433.

250. Sum,E.Y., Peng,B., Yu,X., Chen,J., Byrne,J., Lindeman,G.J., and Visvader,J.E. (2002). The LIM domain protein LMO4 interacts with the cofactor CtIP and the tumor suppressor BRCA1 and inhibits BRCA1 activity. *J. Biol. Chem.* 277, 7849-7856.
251. Sun,X.H. (1994). Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. *Cell* 79, 893-900.
252. Sun,X.H. and Baltimore,D. (1991). An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* 64, 459-470.
253. Taichman,R.S. (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 105, 2631-2639.
254. Takagi,Y., Masuda,C.A., Chang,W.H., Komori,H., Wang,D., Hunter,T., Joazeiro,C.A., and Kornberg,R.D. (2005). Ubiquitin ligase activity of TFIID and the transcriptional response to DNA damage. *Mol. Cell* 18, 237-243.
255. Talora,C., Cialfi,S., Oliviero,C., Palermo,R., Pascucci,M., Frati,L., Vacca,A., Gulino,A., and Screpanti,I. (2005). Cross-talk among Notch3, pre-TCR and Tal-1 in T-cell development and leukemogenesis. *Blood*.
256. Tang,T., Arbiser,J.L., and Brandt,S.J. (2002). Phosphorylation by mitogen-activated protein kinase mediates the hypoxia-induced turnover of the TAL1/SCL transcription factor in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 18365-18372.
257. Tang,T., Prasad,K.S., Koury,M.J., and Brandt,S.J. (1999). Mitogen-activated protein kinase mediates erythropoietin-induced phosphorylation of the TAL1/SCL transcription factor in murine proerythroblasts. *Biochem. J.* 343 Pt 3:615-20., 615-620.
258. Tanigawa,T., Nicola,N., McArthur,G.A., Strasser,A., and Begley,C.G. (1995). Differential regulation of macrophage differentiation in response to leukemia inhibitory factor/oncostatin-M/interleukin-6: the effect of enforced expression of the SCL transcription factor. *Blood* 85, 379-390.
259. TILL,J.E. and McCULLOCH,E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14:213-22., 213-222.
260. Trask,B., Christensen,M., Fertitta,A., Bergmann,A., Ashworth,L., Branscomb,E., Carrano,A., and van den,E.G. (1992). Fluorescence in situ hybridization mapping of human chromosome 19: mapping and verification of cosmid contigs formed by random restriction enzyme fingerprinting. *Genomics* 14, 162-167.

261. Tremblay,M., Herblot,S., Lecuyer,E., and Hoang,T. (2003). Regulation of pTalpha Gene Expression by a Dosage of E2A, HEB, and SCL. *J. Biol. Chem.* *278*, 12680-12687.
262. Tsai,F.Y., Keller,G., Kuo,F.C., Weiss,M., Chen,J., Rosenblatt,M., Alt,F.W., and Orkin,S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* *371*, 221-226.
263. Tsai,F.Y. and Orkin,S.H. (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* *89*, 3636-3643.
264. Valge-Archer,V., Forster,A., and Rabbitts,T.H. (1998). The LMO1 AND LDB1 proteins interact in human T cell acute leukaemia with the chromosomal translocation t(11;14)(p15;q11). *Oncogene* *17*, 3199-3202.
265. Valtieri,M., Tocci,A., Gabbianelli,M., Luchetti,L., Masella,B., Vitelli,L., Botta,R., Testa,U., Condorelli,G.L., and Peschle,C. (1998). Enforced TAL-1 expression stimulates primitive, erythroid and megakaryocytic progenitors but blocks the granulopoietic differentiation program. *Cancer Res.* *58*, 562-569.
266. Vervoort,M. and Ledent,V. (2001). The evolution of the neural basic Helix-Loop-Helix proteins. *ScientificWorldJournal.* *1*, 396-426.
267. Visvader,J., Begley,C.G., and Adams,J.M. (1991). Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene* *6*, 187-194.
268. Visvader,J.E., Elefanty,A.G., Strasser,A., and Adams,J.M. (1992). GATA-1 but not SCL induces megakaryocytic differentiation in an early myeloid line. *EMBO J.* *11*, 4557-4564.
269. Visvader,J.E., Mao,X., Fujiwara,Y., Hahm,K., and Orkin,S.H. (1997). The LIM-domain binding protein Ldb1 and its partner LMO2 act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 13707-13712.
270. von Boehmer,H., Aifantis,I., Feinberg,J., Lechner,O., Saint-Ruf,C., Walter,U., Buer,J., and Azogui,O. (1999). Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 135-142.
271. Vyas,P., McDevitt,M.A., Cantor,A.B., Katz,S.G., Fujiwara,Y., and Orkin,S.H. (1999). Different sequence requirements for expression in erythroid and megakaryocytic cells within a regulatory element upstream of the GATA-1 gene. *Development* *126*, 2799-2811.
272. Wadman,I.A., Hsu,H.L., Cobb,M.H., and Baer,R. (1994). The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene* *9*, 3713-3716.

273. Wadman, I.A., Osada, H., Grutz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157.
274. Warren, A.J., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Smith, A.J., and Rabbitts, T.H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein *rbtn2* is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57.
275. Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244.
276. Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., and . (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251, 761-766.
277. Weis, K. (1998). Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* 23, 185-189.
278. Weiss, M.J., Keller, G., and Orkin, S.H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* 8, 1184-1197.
279. Weiss, M.J. and Orkin, S.H. (1995). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9623-9627.
280. Welchman, R.L., Gordon, C., and Mayer, R.J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 599-609.
281. Wong, P.M., Chung, S.W., Chui, D.H., and Eaves, C.J. (1986). Properties of the earliest clonogenic hemopoietic precursors to appear in the developing murine yolk sac. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 3851-3854.
282. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67.
283. Xu, Z., Huang, S., Chang, L.S., Agulnick, A.D., and Brandt, S.J. (2003). Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol. Cell Biol.* 23, 7585-7599.
284. Yamada, Y., Pannell, R., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (2000). The oncogenic LIM-only transcription factor Lmo2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 320-324.

285. Yamada, Y., Warren, A.J., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R., and Rabbitts, T.H. (1998). The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3890-3895.
286. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yanokura, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., and Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3597-3602.
287. Zervos, A.S., Gyuris, J., and Brent, R. (1994). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 79, following.
288. Zhang, J., Kalkum, M., Yamamura, S., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2004). E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science* 305, 1286-1289.
289. Zhang, Y., Babin, J., Feldhaus, A.L., Singh, H., Sharp, P.A., and Bina, M. (1991). HTF4: a new human helix-loop-helix protein. *Nucleic Acids Res.* 19, 4555.
290. Zhang, Y. and Bina, M. (1992). The nucleotide sequence of the human transcription factor HTF4a cDNA. *DNA Seq.* 2, 397-403.
291. Zhang, Y., Flejter, W.L., Barcroft, C.L., Riviere, M., Szpirer, J., Szpirer, C., and Bina, M. (1995). Localization of the human HTF4 transcription factors 4 gene (TCF12) to chromosome 15q21. *Cytogenet. Cell Genet.* 68, 235-238.
292. Zhao, G.Q., Zhao, Q., Zhou, X., Mattei, M.G., and de Crombrughe, B. (1993b). TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol. Cell Biol.* 13, 4505-4512.
293. Zhao, G.Q., Zhao, Q., Zhou, X., Mattei, M.G., and de Crombrughe, B. (1993a). TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol. Cell Biol.* 13, 4505-4512.
294. Zhao, X.F. and Aplan, P.D. (1999). The hematopoietic transcription factor SCL binds the p44 subunit of TFIID. *J. Biol. Chem.* 274, 1388-1393.
295. Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., and Sorrentino, B.P. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 7, 1028-1034.
296. Zhuang, Y., Barndt, R.J., Pan, L., Kelley, R., and Dai, M. (1998). Functional replacement of the mouse E2A gene with a human HEB cDNA. *Mol. Cell Biol.* 18, 3340-3349.

297. Zhuang, Y., Cheng, P., and Weintraub, H. (1996). B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol. Cell Biol.* *16*, 2898-2905.
298. Zhuang, Y., Kim, C.G., Bartelmez, S., Cheng, P., Groudine, M., and Weintraub, H. (1992). Helix-loop-helix transcription factors E12 and E47 are not essential for skeletal or cardiac myogenesis, erythropoiesis, chondrogenesis, or neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 12132-12136.
299. Zhuang, Y., Soriano, P., and Weintraub, H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* *79*, 875-884.
300. Zon, L.I. (1995). Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* *86*, 2876-2891.

ANNEXES

ANNEXE 1

Contribution des auteurs :

SIGNATURE ET DÉCLARATION DE L'ÉTUDIANTE:

Étudiante : Marianne Desrosiers, DESM24588005
F.E.S. Programme de biologie moléculaire

Manuscrit : DECIPHERING A NOVEL ROLE OF E2A AND HEB ON THE
HEMATOPOIETIC TRANSCRIPTION FACTOR SCL

Auteurs : Marianne Desrosiers, Eric Lécuyer, Sabine Herblot, Mathieu
Tremblay, Julie Lambert, Pierre Thibault and Trang Hoang

La très grande majorité des expériences et la rédaction du manuscrit présenté dans le chapitre 2 ont été effectuées par Marianne Desrosiers, l'auteur de ce mémoire. Les figures 1C et 4 ont été exécutées par Éric Lécuyer, les figures 6A et 6B par Sabine Herblot et la figure 1D par Julie Lambert. Le manuscrit sera soumis bientôt à un éditeur.

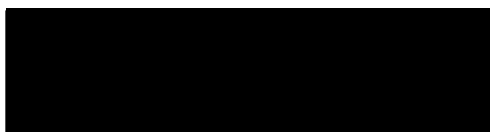


Nov 27th 2005

Marianne Desrosiers - Date

SIGNATURE ET DÉCLARATION DES COAUTEURS:

À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous sommes d'accord pour que Marianne Desrosiers incorpore cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre 'Nouveau rôle de E2A et HEB dans la régulation du facteur de transcription hématopoïétique SCL'.



Eric Lécuyer - Date



Mathieu Tremblay - Date



Sabine Herblot - Date



Julie Lambert - Date

ANNEXE 2

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure I.

Journal: Nature 414, 105-111 (1 November 2001)
 Auteurs: Tannishtha Reya, Sean J. Morrison, Michael F. Clarke and Irving L. Weissman
 Titre: Stem cells, cancer, and cancer stem cells
 Matériel utilisé: Adaptation de la Figure 1

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
 TERMS AND CONDITIONS

Nov 16, 2005

This is a License Agreement between Marianne Desrosiers ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

License Number	1350801216565
Type of Use	Thesis/Dissertation
Licensed content title	Stem cells, cancer, and cancer stem cells
Licensed content author	Tannishtha Reya, Sean J. Morrison, Michael F. Clarke and Irving L. Weissman
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
License date	Nov 16, 2005
Requestor type	Student
Portion used	Figures
Number of figures	1
Total	\$0.00

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with

permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run).

NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. **Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:**

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of up to a whole article do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:
Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

ANNEXE 3

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure II.

Journal: Oncogene, 20 September 2004, Volume 22, Number 43, Pages 7199-7209
Auteurs: Julie Lessard, Amelie Faubert and Guy Sauvageau
Titre: Genetic programs regulating HSC specification, maintenance and expansion
Matériel utilisé: Adaptation de la Figure 1

Dear Ms Desrosiers,

Thank you for your request to use: Figure 1 from Oncogene, Volume 22, Number 43, Pages 7199-7209 (2004)

In: Your thesis

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission given for material in print is also automatically granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
3. Permission granted for a first edition is also granted for second and subsequent editions and for editions in other languages.
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of up to a whole article do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

With best regards,

Jo Webber

Permissions Manager
Academic Journals Division

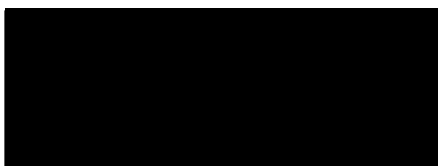
Nature Publishing Group
4 Crinan Street
London N1 9XW
UK
tel: +44 (0)20 7843 4893
fax: +44 (0)20 7843 4839

ANNEXE 4

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure IV

Les photographies d'embryons utilisés dans le schéma à la Figure IV ont été prises par Richard Martin, dans le cadre de son projet de doctorat au laboratoire.

Je suis d'accord pour que Marianne Desrosiers utilise ce matériel pour faire un schéma dans la revue de littérature de son mémoire de maîtrise qui a pour titre 'Nouveau rôle de E2A et HEB dans la régulation du facteur de transcription hématopoïétique SCL'.



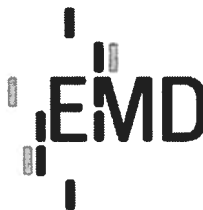
2 décembre 2005

Richard Martin – Date

ANNEXE 5

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure V.

Matériel utilisé: Schéma provenant du site internet:
<http://www.merckbiosciences.co.uk/SharedImages/cnuk/Apoptosis-signalling-web.jpg>



November 21, 2005

Dear Ms. Desrosiers,

EMD Biosciences-Calbiochem hereby grants permission to reproduce the apoptosis signaling graphic from our web site in your thesis provided the phrase, "Reproduced with permission of EMD Biosciences-Calbiochem", accompanies the graphic.

Sincerely,



Corrine Fetherston
Senior Director Global Marketing Communications

EMD Biosciences, Inc.
441 Charmany Drive
Madison, WI 53719

Phone 608-238-6110
Fax 608-238-1388

www.emdbiosciences.com

ANNEXE 6

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure VI.


Greetings Marianne,

The images you requested can be used in your thesis, as long as they are not being used for profit or being distributed in any way.

Thank you,

Marcus McDaniel

Marcus McDaniel
A.D.A.M., Inc.
800-755-2326 x5142
770-541-5142


www.adam.com

ANNEXE 7

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure VII.

Journal: Nature
 Auteurs: Allan Spradling, Daniela Drummond-Barbosa and Toshie Kai
 Titre: Stem cells find their niche
 Matériel utilisé: Adaptation de la Figure 1

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
 TERMS AND CONDITIONS

Nov 16, 2005

This is a License Agreement between Marianne Desrosiers ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

License Number	1350831508770
Type of Use	Thesis/Dissertation
Licensed content title	Stem cells find their niche
Licensed content author	Allan Spradling, Daniela Drummond-Barbosa and Toshie Kai
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
License date	Nov 16, 2005
Requestor type	Student
Portion used	Figures
Number of figures	1
Total	\$0.00

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run).

NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME],
advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL
ACRONYM].XXXXX)

6. **Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:**

**Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)**

7. Translations of up to a whole article do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]
(reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

ANNEXE 8

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure VII.

Journal: Cornea. 2005 Nov;24(8 Suppl 1):S12-7.
 Auteurs: Suda T, Arai F, Shimmura S
 Titre: Regulation of stem cells in the niche.
 Matériel utilisé: Adaptation de la Figure 1



November 29, 2005

Marianne Desrosiers
 5-7225 Cartier St.
 Montreal, Qc
 H2E 2J3
 Canada

VIA EMAIL TO: [REDACTED] November 29, 2005

FEE: NONE

RE: Suda T, Arai F, Shimmura S "Regulation of stem cells in the niche".
 Cornea. 2005 Nov;24(8 Suppl 1):S12-7 Figure 1

USE: Thesis

CONDITION OF AGREEMENT

Permission is granted upon the return of this signed agreement to Lippincott Williams & Wilkins (LWW).
 Please sign and date this form and return to:

Lippincott Williams & Wilkins
 David O'Brien, Worldwide Copyright Management
 351 W Camden Street, 4 North
 Baltimore, MD 21201
 USA

Permission is granted and is subject to the following conditions:

- 1) A credit line will be prominently placed and include the journal article author and article title, journal title, volume number, issue number, and the inclusive pages.
- 2) The requestor warrants that the material shall not be used in any manner, which may be derogatory to the title, content, or authors of the material or to LWW.
- 3) Permission is granted for one time use only as specified in your correspondence. Rights herein do not apply to future reproductions, editions, revisions, or other derivative works.
- 4) Permission granted is non-exclusive, and is valid throughout the world in the French language.
- 5) LWW cannot supply the requestor with the original artwork or a "clean copy".
- 6) Permission is valid if the borrowed material is original to a LWW imprint (Lippincott-Raven Publishers, Williams & Wilkins, Lea & Febiger, Harwal, Igaku-Shoin, Rapid Science, Little Brown & Company, Harper & Row Medical, American Journal of Nursing Co., and Urban & Schwarzenberg-English language.)

Requestor accepts [REDACTED] Date: Nov 29th 2005

ANNEXE 9

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure VIII.

Journal: Experimental Hematology, 32(1): 11-24
Auteurs: Lecuyer E, Hoang T.
Titre: SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia.
Matériel utilisé: Adaptation de la Figure 2A



Date: 21 November 2005
Our ref: FCR/DesrosiersUniversityOfMontrealRS11-05

Dear Ms. Desrosiers:

PUBLICATION DETAILS: Figure 2A from EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, 32(1): 11-24
© 2004 the International Society for Experimental Hematology

As per your letter dated November 16, 2005, we hereby grant you permission to reprint the aforementioned material at no charge **in your thesis** subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.

2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

“Reprinted from Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from the International Society for Experimental Hematology.”

3. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.

4. This permission is granted for non-exclusive world **French** rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.

5. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely,
Richard F. Schneider for Elsevier

ANNEXE 10

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure VIII.

Journal: Nature Reviews Immunology 1, 193-199 (2001)
Auteurs: Isaac Engel & Cornelis Murre
Titre: The function of E- and Id proteins in lymphocyte development
Matériel utilisé: Adaptation de la Figure 1 A)

Dear Ms Desrosiers,

Nature Reviews, hereby grants permission for the reproduction/ translation of Figure 1 from Nature Reviews immunology, Vol 1, No. 3, pp 193-199, (2001), providing that the authors agree and the following credit line is used:

Reproduced with permission from Nature Reviews Immunology (reference citation) copyright (year) Macmillan Magazines Ltd.

The word Nature Reviews must be hyperlinked to the Nature Reviews homepage at www.nature.com/reviews


This permission is granted for one time only. Any other usage will need further permission.

Yours sincerely,

Elliann

Elliann Fairbairn
Editorial Assistant
The Macmillan Building
4 Crinan Street
London
N1 9XW

Tel: 0207 843 3671
Fax: 0207 843 3629



ANNEXE 11

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure IX.

Journal: Blood, Vol. 93 No. 9 (May 1), 1999: pp. 2760-2770
 Auteurs: C. Glenn Begley et Anthony R. Green
 Titre: The SCL Gene: From Case Report to Critical Hematopoietic Regulator
 Matériel utilisé: Adaptation de la Figure 1 A)

blood

JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY

American Society of Hematology, Rights and Permissions,
 1900 M Street, NW, Suite 200, Washington, DC 20036
 Phone: (202) 292-6013, Email: bloodpermissions@hematology.org

Permissions Request Form – *Blood* Journal

Instructions:

Please refer to our Rights and Permissions Guidelines at <http://www.bloodjournal.org/misc/rights.html> before completing this form, then complete Part A only and email to the address noted above. We will return a signed copy of this form to you after your request has been reviewed.

PART A

From: Name: Marizana Desrosiers Date: December 15th

Address: [REDACTED]

Phone: [REDACTED] Fax: [REDACTED]

Title of Article: The SCL Gene: From Case Report to Critical Hematopoietic Regulator

Lead Author: C. Glenn Begley and Anthony R. Green

Year, Volume, Inclusive Page Numbers: 1999 93 9: pp. 2760-2770

Type of Request: Reproduction (complete Section 1) Photocopy (complete Section 2)

Section 1 – Reproduction Rights

Material to be reproduced (please be specific)

Figure(s) Figure 1 A) A modified version, with the original data

It will be used for my thesis, written in French

Table (s) _____

Quote(s): _____

Text Page(s) _____

Other _____

Material will be used as published in *Blood* or
 Material will be adapted as outlined on attached page.

Material will be included in the following new publication:

Title of publication: NOUVEAU RÔLE DE E2A ET HEB DANS LA RÉGULATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HÉMATOPOIÉTIQUE SCL

Type of publication (check one): Journal Book CD-ROM
 Newsletter Other (specify): THESIS

Author/Editor: Marianne Desrosiers, student from the University of Montreal

Publisher: N/A

Expected date of publication: December 2005

Section 2 – Photocopy Rights

Number of photocopies you wish to make: _____

Intended use: _____

PART B

ASH grants permission to reproduce photocopy the material as noted above with the following conditions

- 1) A full citation of the *Blood* article must be included with the reproduced/photocopied material (see sample below).
- 2) Photocopied material may *not* be bound with product advertising or other marketing materials. Photocopied material may be bound with other organizations' published materials as long as no product advertising or other marketing materials are included.

Sample Citation:

From: Clift RA, Martin P, Fisher L, Buckner CD, Thomas ED. Allogenic marrow transplantation for CML in phase-risk factors for survival. *Blood* 1987;70:104-112. Copyright American Society of Hematology. used with permission.

Fee: \$ NA

Request No. 202

Approved by

Renee Hogan
ASH Representative

12/21/2005
Date

ANNEXE 12

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure X.

Journal: Genes Dev. 2003 Apr 15;17(8):959-64
 Auteurs: Calkhoven CF, Muller C, Martin R, Krosi G, Pietsch H,
 Hoang T, Leutz A.
 Titre: Translational control of SCL-isoform expression in
 hematopoietic lineage choice
 Matériel utilisé: Adaptation de la Figure 5

Genes Development

From: Desrosiers Marianne [REDACTED]
 Sent: Friday, January 06, 2006 11:15 AM
 To: Genes & Development
 Subject: Permission - Thesis written in french - Canada

To whom it may concern,

I request a special permission to use a part of the Figure 5 of the following article for the litterature review of my thesis written in french.

Journal: Genes Dev. 2003 Apr 15;17(8):959-64
 Authors: Calkhoven CF, Muller C, Martin R, Krosi G, Pietsch H, Hoang
 T, Leutz A.
 Title: Translational control of SCL-isoform expression in
 hematopoietic lineage choice
 Material used: Figure 5

I would appreciate an answer about the authorisation by email if possible as soon as possible.

Thank you for your time and consideration.

Marianne Desrosiers

Student of the Molecular Departement Program
 University of Montreal, Canada
 [REDACTED]

Permission granted by the copyright owner,
 contingent upon the consent of the original
 author provided complete credit is given to
 the [REDACTED]

By [REDACTED]

COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS

ANNEXE 13

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure XI.

Journal: Nature 373, 432 - 434 (02 February 1995);
 Auteurs: Ramesh A. Shivdasani, Erica L. Mayer & Stuart H. Orkin
 Titre: Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL
 Matériel utilisé: Adaptation de la Figure 1

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 26, 2006

This is a License Agreement between Marianne Desrosiers ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

License Number	1396621425103
License date	Jan 26, 2006
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature
Licensed content title	Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL
Licensed content author	Ramesh A. Shivdasani, Erica L. Mayer & Stuart H. Orkin
Volume number	373
Issue number	6513
Pages	432 - 434
Year of publication	1995
Portion used	Figures
Number of figures	0
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis/Dissertation
Total	\$0.00

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).

4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.

5. The credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of up to a whole article do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

ANNEXE 14

Autorisation d'utilisation de matériel pour la Figure 6.

Journal: Blood. 2002 Oct 1;100(7):2430-40
 Auteurs: Lecuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, Martin R, Begley CG,
 Porcher C, Orkin SH, Hoang T.
 Titre: The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic
 cells through functional interaction with Sp1.
 Matériel utilisé: Adaptation de la Figure 5B

blood

JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY

American Society of Hematology, Rights and Permissions,
 1900 M Street, NW, Suite 200, Washington, DC 20036
 Phone: (202) 192-6013; Email: bloodpermissions@hematology.org

Permissions Request Form – Blood Journal

Instructions:

Please refer to our Rights and Permissions Guidelines at <http://www.bloodjournal.org/misc/rights.shtml> before completing this form, then complete Part A only and email to the address noted above. We will return a signed copy of this form to you after your request has been reviewed.

PART A

From: Name: Desrosiers, Marianne Date: November 23th, 2005

Address: [REDACTED]

Phone: [REDACTED] Fax: N.A

Title of Article: The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1

Lead Author: Eric Lécuyer, Sabine Herblot, Marianne Saint-Denis, Richard Martin, C. Glenn Begley, Catherine Porcher, Stuart H. Orkin, and Trang Hoang

Year, Volume, Inclusive Page Numbers: 2002, Vol. 100 No. 7, pp. 2430-2440

Type of Request: Republication (complete Section 1) Photocopy (complete Section 2)

Section 1 – Republication Rights

Material to be reproduced (please be specific):

Figure(s): 5 B) A modified version, with the original data. It will be used for my thesis, written in French. The author is a member of my lab.

Table (s): _____

Quote(s): _____

Text Page(s): _____

Other: _____

Material will be used as published in *Blood* or

Material will be adapted as outlined on attached page.

Material will be included in the following new publication:

Title of publication: NOUVEAU RÔLE DE E2A ET HEB DANS LA RÉGULATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HEMATOPOIÉTIQUE SCL

Type of publication (check one): Journal Book CD-ROM
 Newsletter Other (specify): THESIS

Author/Editor: Mananne Desrosiers, student from the University of Montreal

Publisher: N/A

Expected date of publication: December 2005

Section 2 – Photocopy Rights

Number of photocopies you wish to make: _____

Intended use: _____

PART B

ASH grants permission to reproduce/photocopy the material as noted above with the following conditions:

- 1) A full citation of the *Blood* article must be included with the reproduced/photocopied material (see sample below).
- 2) Photocopied material may *not* be bound with product advertising or other marketing materials. Photocopied material may be bound with other organizations' published materials as long as no product advertising or other marketing materials are included.

Sample Citation:

From: Clift RA, Martin P, Fisher L, Buckner CD, Thomas ED. Allogenic marrow transplantation for CML in phase-risk factors for survival. *Blood* 1987;70:104-112. Copyright American Society of Hematology, used with permission.

Fee: \$ NA

Request No. 186

Approved by:

Renee Hogan
ASH Representative

12/6/2005
Date

