

Université de Montréal

**Caractérisation du rôle de SCL dans la mégacaryopoïèse et
la thrombopoïèse chez les souris transgéniques**

Par Josepha-Clara Sedzro

Programme de biochimie
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M.Sc.)
en Biochimie

Décembre, 2017

© Josepha-Clara Sedzro, 2017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation du rôle de SCL dans la mégacaryopoïèse et la
thrombopoïèse chez les souris transgéniques**

Présenté par Josepha-Clara Sedzro

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Stephen Michnick, président-rapporteur

Dre. Marie Trudel, directeur de recherche

Dr. Éric Milot, membre du jury

Résumé

SCL est un facteur de transcription qui appartient à la famille bHLH. Dans le système hématopoïétique, SCL est exprimé dans les globules rouges, les mégacaryocytes, les plaquettes et les mastocytes. Chez la souris, la déplétion de SCL cause une absence totale d'érythropoïèse primitive qui mène à une mortalité au jour embryonnaire 9.5. SCL existe principalement sous une forme courte et une forme longue. La forme longue de SCL est très étudiée tandis que la forme courte est très peu caractérisée. Dans le but de comprendre la fonction des 2 isoformes de SCL dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse, le laboratoire a produit des lignées de souris transgéniques sur-exprimant chacune des formes de SCL sous le contrôle des éléments régulateurs du facteur de transcription GATA-1. On observe une augmentation de ~40% des mégacaryocytes dans les souris sur-exprimant la forme longue de SCL et un doublement du nombre de plaquettes en comparaison aux souris non transgéniques. Au contraire, une sur-expression de la forme courte de SCL cause une diminution de ~50% du nombre de mégacaryocytes. Cependant, la suite de la différenciation des mégacaryocytes en plaquettes est inchangée. De plus, les 2 formes de SCL semblent moduler 2 voies de signalisations (c-Mpl/TPO et c-Kit/SCF) impliquées dans la mégacaryopoïèse. Ces données suggèrent une modulation du programme de différenciation des mégacaryocytes par SCL. La caractérisation des fonctions moléculaires et cellulaires des 2 formes de SCL *in vivo* permettra d'élucider leurs différentes fonctions. De plus, ces études pourraient mener à l'identification de cibles thérapeutiques pour les désordres de la coagulation.

Mots-clés : SCL, GATA-1, facteur de transcription, cellules hématopoïétiques, mégacaryocytes, plaquettes, voies de signalisation

Abstract

SCL is a transcription factor member of the bHLH family. SCL is expressed in red blood cells, megakaryocytes, platelets and mast cells. SCL deficient mice die at embryonic day 9.5 due to complete absence of primitive erythropoiesis. Two main isoforms of SCL have been identified, a long isoform and a short isoform. SCL's long isoform is well characterized but little is known about SCL's short isoform. To understand both isoform's function in megakaryopoiesis and thrombopoiesis, the laboratory designed transgenic mice overexpressing each isoform under GATA-1 transcription factor regulatory elements. Mice overexpressing SCL's long isoform produce ~40% more megakaryocytes and twice as much platelets than non-transgenic mice. At the opposite, mice overexpressing SCL's short isoform produce ~50% less megakaryocytes but thrombopoiesis is not affected. Moreover, both isoforms seem to modulate 2 signaling pathways (c-Mpl/TPO and c-Kit/SCF) involve in megakaryopoiesis. Therefore, these results suggest that megakaryocytes differentiation program is modulated by SCL. Molecular and cellular characterization of both isoform's function *in vivo* can help elucidate their different functions. Moreover, these studies could lead to the identification of therapeutic targets in coagulation disorders.

Keywords: SCL, GATA-1, transcription factor, hematopoietic cells, megakaryocytes, platelets, signaling pathway

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures et des tableaux	vii
Liste des sigles et des abréviations	ix
Dédicace	xiii
Remerciements	xiv
Chapitre 1: Introduction	15
1.1 L'hématopoïèse.....	15
1.1.1. L'érythroïèse.....	17
1.1.1.1. L'érythroïèse primitive.....	17
1.1.1.2. L'érythroïèse définitive	18
1.1.2. La mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse.....	18
1.1.2.1. La mégacaryopoïèse.....	19
1.1.2.2. La thrombopoïèse.....	19
1.1.3. Les mécanismes de différenciation des lignées hématopoïétiques.....	20
1.1.3.1. Les facteurs de transcription	20
1.1.3.2. Les cytokines et voies de signalisation	20
1.2. Les facteurs de transcription dans la mégacaryopoïèse et l'érythroïèse	21
1.2.1. GATA-1	21
1.2.1.1. Structure du locus et expression de GATA-1	21
1.2.1.2. Structure protéique de GATA-1.....	22
1.2.1.3. Régulation du locus de GATA-1	22
1.2.1.4. Fonctions de GATA-1 dans l'érythroïèse.....	23
1.2.1.5. Fonctions de GATA-1 dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse	24
1.2.2. SCL	24
1.2.2.1. Structure du locus et expression de SCL	25

1.2.2.2. Structure protéique de SCL.....	26
1.2.2.2.1. Domaine bHLH.....	26
1.2.2.2.2. Domaine prolines/alanines.....	27
1.2.2.3. Régulation du locus de SCL	27
1.2.2.3.1. Structure chromatinienne	27
1.2.2.3.2. Éléments cis régulateur.....	28
1.2.2.3.3. Éléments trans régulateur.....	28
1.2.2.4. Fonctions de SCL.....	29
1.2.2.4.1. Hétérodimérisation de SCL.....	29
1.2.2.4.2. Fonctions de SCL dans l'érythropoïèse.....	31
1.2.2.4.3. Fonctions de SCL dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse	32
1.2.3. E2A, LMO2 et LDB1	33
1.3. Les voies de signalisation dans la mégacaryopoïèse	35
1.3.1. La voie de signalisation c-Mpl/TPO.....	35
1.3.1.1. Structure, expression et régulation de c-Mpl.....	35
1.3.1.2. C-Mpl et TPO	35
1.3.1.3. Fonctions.....	37
1.3.2. La voie de signalisation c-Kit/SCF.....	39
1.3.2.1. Structure, expression et régulation de c-Kit.....	39
1.3.2.2. C-Kit et SCF	40
1.3.2.3. Fonctions.....	42
1.4. Hypothèses et objectifs de recherche.....	44
Chapitre 2: Matériels et méthodes	45
2.1. Géotypage.....	45
2.1.1. Extraction de l'ADN.....	45
2.1.2. PCR.....	46
2.2. Analyses transcriptionnelles.....	46
2.2.1. Récupération des cellules de la moelle osseuse et déplétion des globules rouges..	46
2.2.2. Extraction de l'ARN.....	47
2.2.3. RT-qPCR	48

2.3. Analyses cytologiques	50
2.3.1. Détermination du nombre de mégacaryocytes, de plaquettes et du temps de saignement	50
2.3.2. Culture de la moelle osseuse sur méthyl cellulose.....	50
2.3.3. Coloration à l'iodure de propidium	51
Chapitre 3: Résultats	52
3.1. Les transcrits des transgènes SCL_L (type B) et SCL_C (type A) sont exprimés dans les cellules hématopoïétiques des souris transgéniques	53
3.2. Les transcrits de SCL_L et SCL_C sont exprimés différemment dans les cellules hématopoïétiques des souris transgéniques	55
3.3. L'expression de SCL_L et SCL_C module la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse chez les souris transgéniques	57
3.3.1. Compte des mégacaryocytes, des plaquettes et du temps de saignement.....	57
3.3.2. Ploïdie des cellules de la moelle osseuse.....	59
3.3.3. Culture de la moelle osseuse.....	61
3.4. L'expression de SCL_L et SCL_C régule les voies de signalisation c-Mpl/TPO et c-Kit/SCF chez les souris transgéniques	63
3.4.1. Analyses cytologiques des souris transgéniques SCL _L et SCL _C croisées avec les souris c-Mpl ^{-/-}	64
3.4.2. Analyses cytologiques des souris transgéniques SCL _L et SCL _C croisées avec les souris c-Kit ^{W41/W41}	66
3.5. L'expression de SCL_L et SCL_C module les niveaux des transcrits de c-Mpl et c-Kit dans les mégacaryocytes transgéniques	68
Chapitre 4: Discussion.....	71
4.1. Les transcrits de SCL_L et SCL_C sont exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques.....	71
4.2. Les fonctions cellulaires de SCL.....	72
4.2.1. Modulation du potentiel prolifératif des cellules souches hématopoïétiques	72
4.2.2. Modulation de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse	74

4.3. Les fonctions moléculaires de SCL: modulation des voies de signalisation c-Mpl/TPO et c-Kit/SCF.....	75
4.3.1. La voie de signalisation c-Mpl/TPO.....	75
4.3.2. La voie de signalisation c-Kit/SCF.....	77
Conclusion	78
Bibliographie	79
Annexe 1: Résultats supplémentaires.....	i
Annexe 2: Permissions d'utilisation des figures (Licences).....	iv
Annexe 3: Autres contributions scientifiques.....	v

Liste des figures et des tableaux

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1 : Schéma du système hématopoïétique

Figure 2 : Représentation schématique du gène de *Scl* et des transcrits long et court chez la souris

Figure 3 : Représentation schématique du complexe protéique formé par SCL, E2A, GATA-1, LMO-2 et LDB-1

Figure 4 : Schéma de la voie de signalisation c-Mpl/TPO

Figure 5 : Schéma de la voie de signalisation c-Kit/SCF

Chapitre 3 : Résultats

Figure 6 : Structure et expression de SCL_L et SCL_C (Tg) chez les souris transgéniques

Figure 7 : Comparaison de l'expression de SCL_L et SCL_C (Tg) entre les cellules totales de la moelle osseuse et les cellules TER119-

Figure 8 : Mesure de la mégacaryopoïèse, la thrombopoïèse et du temps de saignement chez les souris transgéniques SCL_L et SCL_C

Figure 9 : Profil de polyploïdisation des cellules de la moelle osseuse

Figure 10 : Mesure de la formation des progéniteurs hématopoïétiques par des cultures de la moelle osseuse sur un milieu de méthyl cellulose.

Figure 11 et 12 : Mesure de la mégacaryopoïèse, la thrombopoïèse et du temps de saignement chez les souris transgéniques SCL_L et SCL_C croisées avec les souris c-Mpl^{-/-} et c-Kit^{W41/W41}

Figure 13 : Quantification de l'expression des transcrits de c-Mpl, c-Kit et Gata-1 chez les souris transgéniques

Chapitre 4 : Discussion

Figure 14 : Schéma représentatif des 2 modèles de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques

Figure 15 : Tableau résumant la présence ou non de SCL et ses partenaires au niveau des séquences régulatrices de *c-Mpl* et *c-Kit*.

Annexe 1 : Résultats supplémentaires

Figure 16 : Courbes standards et de fusions des oligos utilisés pour c-Mpl, c-Kit et Gata-1

Liste des sigles et des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AP-1 : Protéine activatrice 1

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BasoE : Érythroblaste basophile

BFU-E : Bourgeons formants des unités érythroïdes

bHLH : Domaine basique hélice-boucle-hélice

CD : Cluster de différenciation

c-DNA : Acide désoxyribonucléique complémentaire

C/EBP : Protéine liant l'*enhancer* CCAAT

CFU-Ba : Colonies formants des unités basophiles

CFU-E : Colonies formants des unités érythroïdes

CFU-Eo : Colonies formants des unités éosinophiles

CFU-G : Colonies formants des unités granulocytaires

CFU-GEMM : Colonies formants des unités granulocytaires, érythroïdes monocytaires et mégacaryocytaires

CFU-GM : Colonies formants des unités granulocytaires et monocytaires

CFU-M : Colonies formants des unités monocytaires

CFU-MK : Colonies formants des unités mégacaryocytaires

CBP : Protéine se liant au CRE (éléments de réponse de l'AMPC)

c-Kit : Protéine tyrosine kinase

c-Mpl : Virus de la leucémie myéloproliférative

c-MYB : Protéine myéloblastose

CpG : Cytosine phosphate guanine

C-ZF : Domaine à doigt de zinc en C terminal

DEPC : Pyrocarbonate d'éthyle

dNTP : Désoxynucléotide

DTT : Dithiothréitol

E2A : Facteurs de liaison activateur de type immunoglobuline E12/E47

EDTA : Éthylène diamine tétra acétique
EKLF : Facteur de transcription de la famille érythroïde Krueppel
ELF1 : Facteur de transcription E74 de la famille ETS
EPO : Érythropoïétine
EPO-R : Récepteur de l'érythropoïétine
ERK : Kinases régulées par les signaux extracellulaires
EryP-CFC : Précurseur érythroïde primitif-colonie dérivé des cellules érythroïdes primitives
ES : Cellules souches embryonnaires
ETS : Transformation spécifique E26
ETV-6 : Facteur de transcription ETS Variant 6
FLI-1 : Facteur de transcription leucémique intégration 1
FOG1 : Facteur associé à GATA-1
GATA-1 : Facteur de transcription liant les motifs GATA
GFI1B : Facteur de croissance indépendant 1B
GM-CSF : Facteur de croissance stimulant les colonies granulocyte-macrophage
GP1B β : Glycoprotéine 1b β
GP9 : Glycoprotéine 9
HEB : Facteur de transcription se liant aux boîtes E
hESCs : Cellules souches embryonnaires humaines
Hox β 3 : Protéine avec une boîte homéotique β 3
HSI : Région hypersensible I
HSC : Cellules souches hématopoïétiques
Ig : Immunoglobuline
IL-3 : Interleukine 3
ITGA2B : Sous unité alpha 2b de l'intégrine
JAK : Janus kinase
LDB-1 : Protéine de liaison aux domaines LIM 1
LCR : Région de contrôle du locus
LMO-1/-2 : Protéine à domaine LIM -1/-2
MACS : Tri cellulaire magnétique

MAPK : Protéines kinases activées par des mitogènes
MAZ : Protéines à doigts de zinc associés à Myc
MEL : Cellules murines érythroleucémique
MEP : Progéniteur érythroïde et mégacaryocytaire
miR : Micro ARN
MK(s) : Mégacaryocyte(s)
M-MLV : Transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney
M.O. : Moelle osseuse
NFE-2 : Facteur nucléaire érythroïde 2
Lymphocyte NK : Lymphocyte tueur naturel
N-ZF : Domaine à doigt de zinc en N terminal
ORF : Phase ouverte de lecture
OrthE : Érythroblaste orthochromatique
PBS : Tampon phosphate salin
PCR : Amplification en chaîne par polymérase
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PLK(s) : Plaquette(s)
PolyE : Érythroblaste polychromatophile
ProE : Proérythroblaste
PU.1 : Facteur de transcription se liant aux domaines riches en purine
qPCR : Amplification en chaîne par polymérase quantitative
RPM : Rotation par minute
RT : Transcription inverse
RUNX-1 : Facteur de transcription de la famille des domaines Runt 1
SP-1 : Protéine de spécificité 1
SCF : Facteur de croissance des cellules souches
SCL : Leucémie des cellules souches
SDS : Dodécylsulfate de sodium
SRC : Protéine kinase sarcome
STAT : Voie de signalisation activatrice et transductrice de la transcription
TAL-1 : Leucémie aiguë des cellules T

TF-1 : Facteur de transcription 1

TGF- α : Facteur de croissance transformant α

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α

TPO : Thrombopoïétine

UTR : Région non traduite

ZBTB16 : Protéine à doigts de zinc et contenant un domaine BTB 16

Dédicace

*À ma maman qui s'est toujours sacrifiée pour m'offrir le meilleur des cadeaux,
celui de l'éducation.*

« Je peux tout par Celui qui me fortifie. »

Philippiens 4:13

*« Or la foi,
c'est la ferme assurance des choses qu'on espère,
la démonstration de celles qu'on ne voit pas. »*

Hébreux 11:1

Remerciements

Avant toute chose, je remercie ma directrice de recherche Dre. Trudel Marie pour l'opportunité qu'elle m'a donnée de faire ma maîtrise dans son laboratoire. Je la remercie pour l'aide qu'elle m'a apportée mais aussi de m'avoir toujours encouragée à me dépasser. Ses conseils m'ont non seulement permis de progresser scientifiquement mais j'ai aussi appris à toujours donner le meilleur de moi-même dans tout ce que j'entreprends.

Je remercie spécialement Jennifer Lake avec qui j'ai commencé et achève ma maîtrise dans le laboratoire. Merci pour son soutien et ses encouragements pendant ces 2 dernières années. Je remercie également tous les stagiaires, techniciens et étudiants du laboratoire pour leur aide et plus particulièrement Canel Kassa, Cai Zhang, Camila Parrot, Almira Kurbegovic, Silivina Garabisca, Noushine Sadeghi et Aïcha Sow pour leur soutien et leurs conseils.

Je remercie spécialement Dominique Davidson, Elena Priceputu, Peiman Shooshtarizadeh et Hugues Beauchemin, pour l'aide et les précieux conseils qu'ils m'ont apportés.

Merci aux membres des plateformes de biologie moléculaire et de cytométrie en flux et membres de l'IRCM qui m'ont apporté de l'aide durant mes recherches.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon mémoire.

Enfin, je remercie ma famille. Merci à ma maman Rose pour son soutien et sa patience. Merci à mes deux chers amis, Adimegnon Johnson et Cayetana Vazquez de Castro pour leur soutien.

Chapitre 1 : Introduction

Dans ce chapitre, je décrirais d'une part l'hématopoïèse et plus particulièrement l'érythroïèse et la mégacaryopoïèse. D'autre part, nous discuterons de certains facteurs de transcription communs à ces deux voies de différenciation et des voies de signalisations majeures impliquées dans la mégacaryopoïèse.

1.1. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse assure la différenciation et le renouvellement des cellules sanguines. Parmi ces cellules, on distingue la lignée myéloïde composée des globules rouges, des mégacaryocytes, des plaquettes (PLKs), des mastocytes et des granulocytes de la lignée lymphoïde composée des lymphocytes T, B et NK. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les cellules non différenciées qui sont à l'origine de la production de ces cellules matures. Les modèles classiques suggèrent qu'au cours de l'hématopoïèse, une cellule souche hématopoïétique peut s'engager dans une de ces voies de différenciation pour former une cellule mature d'une lignée cellulaire donnée. Cette maturation implique la formation de précurseurs et de progéniteurs communs à plusieurs lignées. Dans le cas des mégacaryocytes et des érythrocytes, ils possèdent un progéniteur commun (MEP : progéniteur érythroïde et mégacaryocytaire) qui va s'engager dans une de ces 2 voies en fonction des facteurs de transcription activés et des signaux reçus (figure 1) (1).

La différenciation de chaque lignée hématopoïétique implique donc d'une part l'action de facteurs de transcription formant des complexes pour réguler des gènes cibles et d'autre part l'activation de plusieurs voies de signalisation. Je discuterais principalement de ces mécanismes dans le cas de l'érythroïèse et de la mégacaryopoïèse chez la souris.

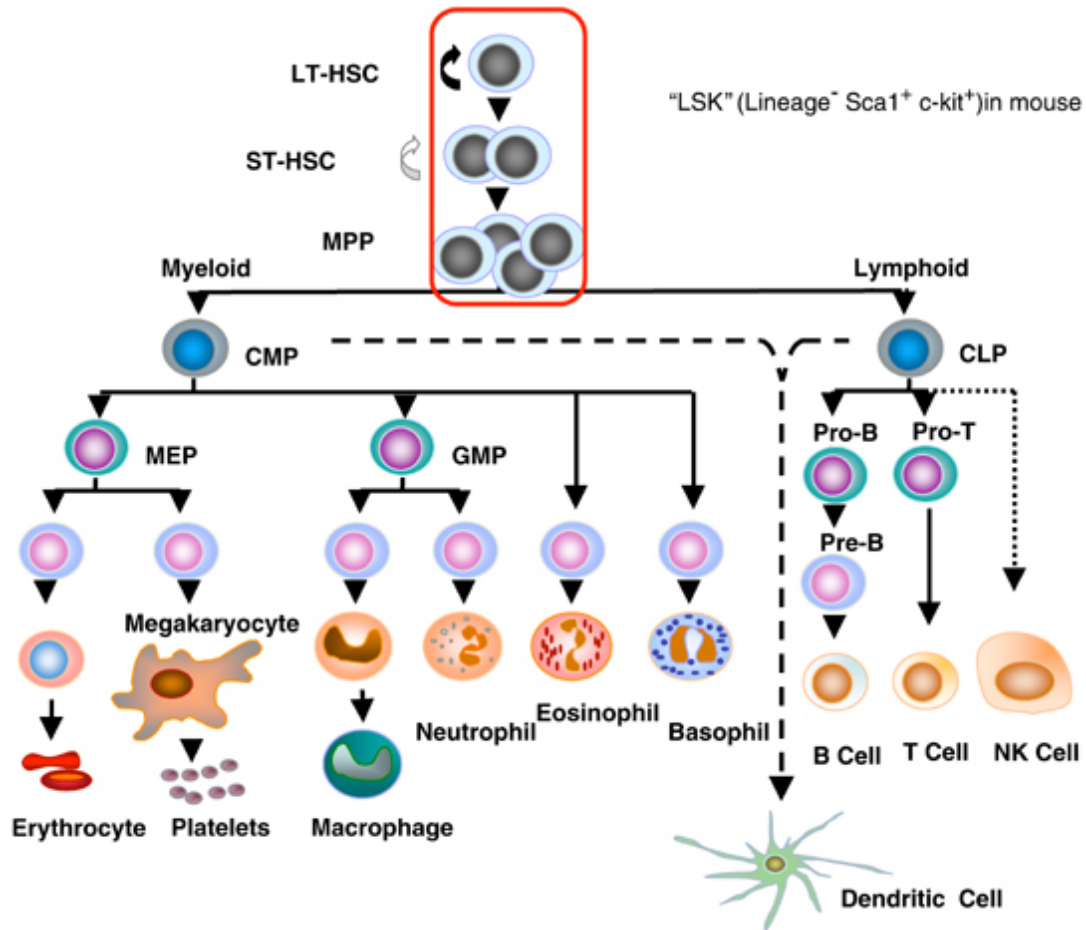


Figure 1 : Schéma du système hématopoïétique (Jonas Larsson et al., Molecular Medicine and Gene Therapy, 2005, (2). Avec la permission de l'éditeur)

Légende de la figure 1 : Schéma représentatif de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques sont les cellules dérivées du mésoderme embryonnaire à l'origine de toutes les cellules sanguines. L'activation/inhibition de différents programmes transcriptionnels engage les cellules souches hématopoïétiques dans la voie myéloïde ou lymphoïde. Les cellules passent par plusieurs étapes de différenciation avant de devenir des cellules matures (globules rouges, mégacaryocytes/plaquettes, mastocytes, granulocytes, macrophages, lymphocytes T, B et NK).

1.1.1. L'érythropoïèse

Les érythrocytes communément appelés globules rouges représentent la majorité des cellules dans le sang. Ces cellules sont formées dès la naissance pendant l'embryogénèse (érythropoïèse primitive) et pendant toute la vie adulte (érythropoïèse définitive). Dans ces 2 mécanismes, la différenciation des cellules suit un modèle similaire. Les progéniteurs érythroïdes (EryP-CFC dans l'érythropoïèse primitive ou BFU-E et CFU-E dans l'érythropoïèse définitive) sont les premières cellules formées suite à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Ces progéniteurs vont par la suite produire des précurseurs érythroblastes (ProE, BasoE, PolyE, OrthoE). Enfin les précurseurs deviennent des cellules matures après l'énucléation dans l'érythropoïèse définitive (3).

1.1.1.1. L'érythropoïèse primitive

Chez la souris, 3 vagues de cellules hématopoïétiques ont été caractérisées. Au jour embryonnaire 7.5 (E7.5), les cellules du mésoderme du sac vitellin se différencient en progéniteurs érythroïdes primitifs (Ery-CFC). L'apparition de ces cellules constitue la première vague de cellules hématopoïétiques. À cette étape de la différenciation, les cellules se multiplient fortement et s'associent à des cellules endothéliales pour former des îlots sanguins (3-5). Au jour E8.25, les cellules atteignent le stade de proérythroblastes primitifs et rejoignent la circulation sanguine (6, 7) pour y achever leur maturation. Certaines évidences suggèrent qu'une partie de la population d'érythrocytes primitifs circulant génère certains érythrocytes définitifs. Des macrophages primitifs sont aussi produits dans le sac vitellin à ce stade du développement (8).

1.1.1.2. L'érythropoïèse définitive

La seconde vague de cellules hématopoïétiques est caractérisée par la migration de progéniteurs érythro-myéloïdes (BFU-E et CFU-E : bourgeons et colonies formants des unités érythroïdes) vers le foie fœtal au jour E11 et initie le début de l'érythropoïèse définitive (9, 10). Au jour E13, l'expansion cellulaire continue et s'amplifie jusqu'aux jours E14.5-15.5 (11-15). Dans le foie fœtal, la maturation des précurseurs érythroïdes nécessite l'intervention de macrophage. En effet, les précurseurs s'assemblent avec ces cellules dans des « îles érythroblastiques » (16, 17).

La dernière vague de cellules hématopoïétique constitue en la migration progressive des cellules souches hématopoïétiques vers le thymus, la rate et finalement la moelle osseuse qui devient le site principal de l'hématopoïèse chez l'adulte. En effet à la naissance, c'est principalement la moelle osseuse qui assure la production des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques. Dans la moelle osseuse comme dans le foie fœtal, les précurseurs érythroïdes se différencient en association avec des macrophages. En effet, les précurseurs érythroïdes expulsent leur noyau pour achever leur maturation. La fonction des macrophages est donc d'assurer la phagocytose de ces noyaux (16, 17). Ainsi, l'énucléation caractérise la fin de la différenciation des érythrocytes définitifs (18-20).

1.1.2. La mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse

La mégacaryopoïèse est le processus permettant la production de mégacaryocytes (MKs) à partir de cellules souches hématopoïétiques. La fonction des MKs est de produire des plaquettes. Ainsi une fois matures, les MKs libèrent des plaquettes ; c'est la thrombopoïèse. Les plaquettes sont les cellules sanguines impliquées dans les processus de coagulation.

1.1.2.1. La mégacaryopoïèse

Les MKs sont des cellules dérivées de la lignée myéloïde. Ces cellules possèdent plusieurs noyaux et sont présentes dans la moelle osseuse, le foie et le sang périphérique. (21). La mégacaryopoïèse commence dans le sac vitellin puis se déroule dans le foie fœtal et enfin dans la moelle osseuse. Les premiers précurseurs mégacaryocytaires formés sont les BFU-MK et les CFU-MK (bourgeons et colonies formants des unités mégacaryocytaires) (2). Ces précurseurs vont subir plusieurs modifications et produire tous les éléments nécessaires à la libération des plaquettes. En effet, au cours de leur maturation, ces précurseurs vont subir une forte expansion de leur cytoplasme, de leur système de membrane, des granules, de leurs organelles et produire de fortes quantités de ribosomes pour atteindre une taille d'environ 100 μm (22, 23). De plus, ces cellules passent par plusieurs étapes d'endomitoses qui correspondent à des cycles de réplifications cellulaires sans cytokinèses (24). Ces mécanismes donnent naissance à une cellule polyploïde qui peut avoir de 2N à 128N d'ADN par MK dépendamment du nombre de divisions sans cytokinèse survenues (25, 26). Les mégacaryocytes vont aussi produire des protéines telles que la fibronectine et le facteur de von Willebrand (27).

1.1.2.2. La thrombopoïèse

Pour libérer des plaquettes, les MKs se « désassemblent ». En effet, cette transition commence par une désorganisation des centrosomes et des microtubules des MKs. Ensuite, l'extension de leur système membranaire (par la formation de filopodes) mène à la formation de pseudopodes constitués d'organelles ; Ces structures caractéristiques sont les pro plaquettes, les précurseurs des plaquettes. Les pros plaquettes sont des chaînes de plaquettes assemblées pouvant atteindre jusqu'à 500 μm (28). Ainsi, des mouvements de rétractions des pros plaquettes permettent la libération des plaquettes (29). On estime qu'au terme de la thrombopoïèse, un mégacaryocyte transforme tout son cytoplasme pour produire de 1000 à 3000 plaquettes (30).

1.1.3. Les mécanismes de différenciation des lignées hématopoïétiques

1.1.3.1. Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription GATA-1, -2 et -3 sont impliqués dans l'hématopoïèse. *GATA-1* est parmi les gènes les plus importants dans l'érythropoïèse mais il est aussi connu pour son rôle majeur dans la mégacaryopoïèse. FOG-1 s'associe avec GATA-1 et joue un rôle de co-activateur au niveau des gènes de globine (31). D'autres facteurs de transcription tel que SCL, EKLF, IKAROS, LMO-2, CBP et PU.1 ont un rôle majeur dans l'érythropoïèse (32).

La mégacaryopoïèse est également grandement contrôlé par GATA-1/FOG-1, SCL ainsi que GFI1B, NFE-2, FLI-1, RUNX-1 et ETV-6 (33). Tel que mentionné dans la partie 1.1., les lignées érythroïdes et mégacaryocytaires partagent un progéniteurs commun (MEP) et pourrait donc expliquer que plusieurs de ces facteurs de transcription sont exprimés dans les 2 lignées. Cependant, le potentiel de régulation d'un facteur de transcription dans chacune des lignées est variable et met en évidence l'implication d'autres facteurs différenciellement exprimé entre les lignées ainsi que l'activation de différentes voies de signalisation.

1.1.3.2. Les cytokines et voies de signalisation

Les mécanismes de régulation impliquant les voies de signalisation passent par la production d'une cytokine qui lie un récepteur et entraîne l'activation de différents effecteurs.

La cytokine la plus importante dans la différenciation des érythrocytes est l'érythropoïétine (EPO). La liaison de l'EPO à son récepteur EPO-R entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation tel que la voie MAPK (Protéines kinases activées par des mitogènes), PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) et STAT (Voie de signalisation activatrice et transductrice de la transcription) impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que dans l'inhibition de l'apoptose. SCF (Facteur de croissance des cellules souches) est une autre cytokine majeure impliquée dans l'érythropoïèse et se lie à son récepteur c-Kit (Protéine tyrosine kinase) pour activer différentes voies de signalisation.

D'autres cytokines telle que la thrombopoïétine (TPO), GM-CSF (Facteur de croissance stimulant les colonies granulocytes-macrophages) et les interleukines 3, 6, 8, 9 et 11 sont impliquées dans l'érythropoïèse mais n'ont pas un rôle aussi critique que l'EPO et SCF (20).

La TPO et SCF jouent un rôle majeur dans la mégacaryopoïèse en se liant à leur récepteur respectif c-Mpl (Virus de la leucémie myéloproliférative) et c-Kit. Ils activent différentes voies de signalisation tel que les voies PI3K, MAPK et ERK-1/ERK-2 (Kinases régulées par les signaux extracellulaires). Cependant d'autres voies de signalisations telles que la voie Notch, la voie des kinases de la famille SRC (Protéine kinases sarcome) et la voie des intégrines sont impliquées dans la mégacaryopoïèse (34).

1.2. Les facteurs de transcription dans la mégacaryopoïèse et l'érythropoïèse

1.2.1. GATA-1

1.2.1.1. Structure du locus et expression de GATA-1

GATA-1 (aussi nommé GF-1 ou NFE-1) est un facteur de transcription à doigts de zinc connu pour être le « master » régulateur de l'érythropoïèse. La famille GATA est composé de 6 membres. Les trois premiers membres sont plutôt impliqués dans l'hématopoïèse et les trois derniers dans les mécanismes reliés à l'endoderme. Chez l'homme et la souris, le gène codant GATA-1 est localisé sur le chromosome X et est composé de deux promoteurs et de 5 exons codants (35).

Dans le système hématopoïétique, GATA-1 est prédominant dans les mégacaryocytes, les érythrocytes, les mastocytes et les éosinophiles (36-38). En dehors du système hématopoïétique, l'expression de GATA-1 est retrouvée dans les testicules (39). GATA-2 est plutôt retrouvé dans les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs primaires (40, 41). Pendant la différenciation des cellules souches hématopoïétique, l'expression

de GATA-1 augmente progressivement et va inhiber celle de GATA-2. C'est la commutation des facteurs GATA. GATA-2 est donc absent dans les cellules matures sauf dans les mégacaryocytes et les mastocytes où GATA-1 et -2 sont co-exprimés (42).

1.2.1.2. Structure protéique de GATA-1

GATA-1 existe sous deux isoformes. Une forme longue et une forme tronquée. La forme longue est principalement composée de 4 domaines fonctionnels dont deux domaines de transactivation en N terminal et de deux domaines à doigt de zinc identifiés N-ZF et C-ZF (domaine à doigt de zinc en N terminal et en C terminal). Le domaine C-ZF est indispensable pour la liaison à l'ADN (43, 44) tandis que seul, le domaine N-ZF est insuffisant pour cette liaison. Cependant, ce domaine (N-ZF) est requis pour stabiliser la liaison à l'ADN du domaine C-ZF ainsi que pour l'interaction avec FOG-1 (Facteur associé à GATA-1) (45, 46). La forme courte de GATA-1 dispose des mêmes domaines que la forme longue sans les domaines de transactivation.

1.2.1.3. Régulation du locus de *GATA-1*

Deux promoteurs ont été identifiés au locus du gène *GATA-1*. Le promoteur IT est responsable de l'expression dans les testicules et le promoteur IE régule l'expression dans les cellules hématopoïétiques. Trois sites hypersensibles à la DNase associés au promoteur IE ont été localisés entre les deux promoteurs. En particulier, le site HSI conservé chez l'homme et la souris est indispensable pour l'expression de GATA-1 dans les mégacaryocytes (47) et contrôle une forte expression de GATA-1 dans les érythrocytes (48).

La région HSI contient des motifs de liaison pour différents facteurs de transcription telle qu'une région riche en GC conservée chez l'homme et la souris qui contiennent potentiellement des sites de liaison pour les protéines de la famille ETS (48).

Aussi, un motif GATA suivi d'une boîte E a été localisé au niveau de la région HSI et représente un site de liaison pour un complexe multi-protéique composé de l'isoforme long et court de Scl, Lmo-2, E47 et Ldb-1 dans les cellules murines érythroleucémiques MEL (48, 49) et les cellules

de la lignée T (50). De plus, des expériences de transactivation ont démontrés que lorsque tous les facteurs du complexe sont présents, on observe une activation du promoteur de 2.5 fois dans les cellules érythroïdes *in vivo*. Ces résultats suggèrent que les formes longue et courte de SCL en coopération avec un complexe protéique sont capable de lier et d'activer l'expression du promoteur IE de *GATA-1* et permettre son expression dans les lignées hématopoïétiques.

1.2.1.4. Fonctions de GATA-1 dans l'érythropoïèse

Le facteur de transcription GATA-1 est particulièrement connu pour son rôle dans l'érythropoïèse. En effet, la perte de fonction totale de Gata-1 chez la souris entraîne une mortalité entre les jours E10.5 et E11.5. Ces embryons qui n'ont aucun vaisseau sanguin, présentent une anémie sévère et la faible fraction d'érythrocytes formés est arrêté au stade proérythroblaste avec une fragmentation nucléaire (51). De plus, la culture des cellules Gata-1⁻ dérivées du sac vitellin de ces embryons ne forment pas de colonies érythroïdes morphologiquement identifiables mais plutôt de larges colonies pâles (51). Enfin, les cellules ES Gata-1⁻ introduites dans des blastocystes hôtes de type sauvage contribuent à la formation des leucocytes et des tissus non hématopoïétiques mais pas à la formation des érythrocytes matures (52). Ces résultats suggèrent que l'absence de Gata-1 inhibe la différenciation des précurseurs érythroïdes (au-delà du stade proérythroblaste) ainsi que leur maturation *in vivo* et *ex vivo*. Dans les érythroblastes, GATA-1 régule également des gènes cibles comme les cyclines impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire (53, 54). Aussi, des études ont montrés que GATA-1 favorise la survie des précurseurs érythroïdes en activant la signalisation du récepteur de l'érythropoïétine EPO-R (55).

1.2.1.5. Fonctions de GATA-1 dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse

GATA-1 est également critique dans la différenciation des mégacaryocytes et des plaquettes. D'une part, des études réalisées chez la souris ont montrés que l'absence de Gata-1 causait une hyper prolifération mégacaryocytaire (47, 52, 56, 57). En effet, les MKs déficients pour Gata-1 dérivés de foies fœtaux prélevés au jour embryonnaire E12.5 mis en culture ont une croissance 15 fois supérieure aux MKs contrôles. Cette croissance s'étend sur ~30 jours alors que les MKs contrôles cessent leur croissance au 15^e jour (56).

D'autre part, l'absence de GATA-1 cause des défauts dans la biogénèse des plaquettes. En effet, le nombre de plaquettes dérivés des mégacaryocytes est diminué de façon significative. Aussi, les plaquettes sont plus larges et ne contiennent presque pas de granules (56, 57). L'analyse *ex vivo* montre que les plaquettes ont une forme sphérique et présentent un excès de réticulum endoplasmique rugueux et de ribosomes ainsi qu'une hétérogénéité dans la distribution des organelles (56). GATA-1 est donc requis pour la maturation du cytoplasme des mégacaryocytes et pour leur différenciation terminale en plaquettes.

1.2.2. SCL

SCL (Leucémie des cellules souches), aussi connu sous le nom de TAL-1 (Leucémie aiguë des cellules T) est un facteur de transcription. Il a d'abord été identifié pour son implication dans les leucémies lymphoblastiques aiguës puis pour son rôle dans l'hématopoïèse que je décrirais plus particulièrement.

1.2.2.1. Structure du locus et expression de SCL

Le gène de *SCL* est conservé entre plusieurs vertébrés comme l'homme et la souris. L'analyse du gène de *SCL* chez ces deux espèces démontre de nombreuses homologies mais aussi quelques divergences. Chez l'homme, le gène de *SCL* s'étend sur ~16 kb et comporte 8

exons (Ia, Ib, IIb, IIa, III, IV, V et VI) sur le chromosome 1 (58). Chez la souris, le gène possède 7 exons (identiques aux exons humain sans l'exon IIa) (figure 2) étendus sur ~20kb au niveau du chromosome 4 (59). Chez l'homme comme chez la souris, la région 5' du gène (exons I, II et III) est une région riche en îlots CpG et propice à la régulation mais assez similaire entre les deux espèces. Les exons Ia et Ib constituent deux promoteurs utilisés de façon tissu spécifique. De part et d'autre de cette région, 5 sites hypersensibles à la DNase ont été identifiés dans les deux espèces (60). En amont de l'exon Ia, des sites de liaison pour GATA-1 ont été identifiés ainsi qu'une boîte TATA. La région 3' de *SCL* (exons IV, V et VI) comporte la séquence codante et présente 88% d'homologie entre les deux espèces comparés (61). La phase ouverte de lecture (ORF) débute à l'exon IV mais il existe d'autres codons potentiels d'initiation de la transcription dans la région codante. Enfin, dans les deux espèces, le domaine bHLH (Domaine basique hélice-boucle-hélice) est localisé dans l'exon VI (figure 2).

Chez l'homme, peu d'informations sont connues sur l'expression de *SCL* pendant le développement embryonnaire à cause de limitations éthiques. Cependant, l'expression de *SCL* a été détectée dans plusieurs tissus adultes humains comme le foie et la moelle osseuse.

Chez la souris, *Scl* est d'abord exprimé pendant le développement embryonnaire au jour E7.5 dans les cellules mésodermiques du sac vitellin puis dans les érythrocytes primitifs et les cellules endothéliales formants les îlots sanguins (62-64). Dans les souris adultes, *Scl* est également exprimé dans le foie et la moelle osseuse et plus particulièrement dans les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺, les érythrocytes, les mégacaryocytes et les mastocytes. L'expression de *Scl* est retrouvée à plus faible niveau dans les cellules myéloïdes peu différenciées et certaines cellules B (65-68). Dans la rate, *Scl* est exprimé dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (69).

Dans les poumons, le rein et certaines régions du cerveau, *Scl* est notamment retrouvé dans les macrophages et dans certaines cellules endothéliales du rein (62, 68, 70, 71).

1.2.2.2. Structure protéique de SCL

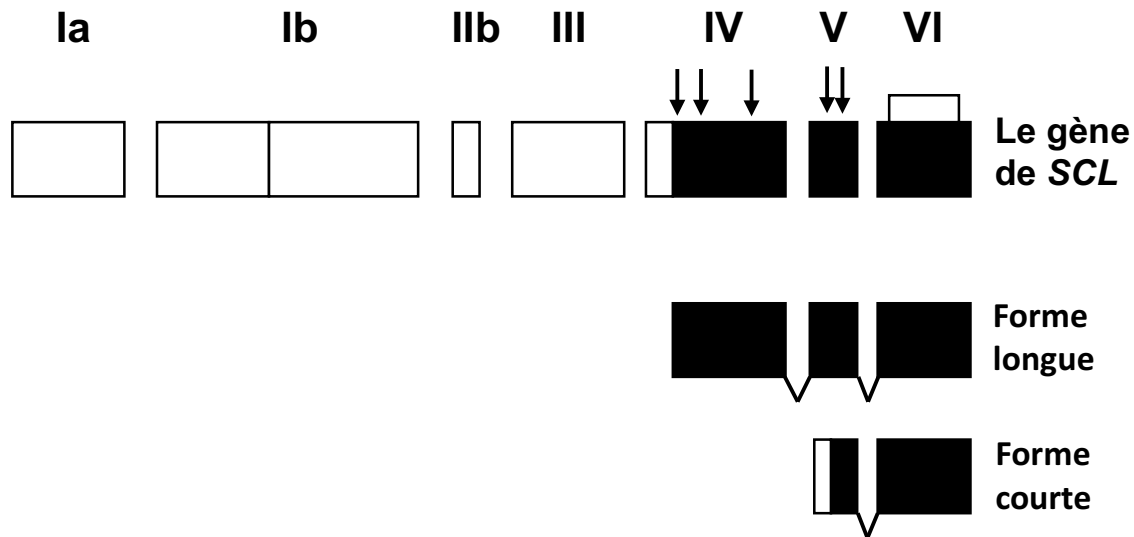


Figure 2 : Représentation schématique du gène de *Sc1* et des transcrits long et court chez la souris (Adapté de Begley et al., *Gene*, 1994, (59). Avec la permission de l'éditeur)

Légende de la figure 2 : La forme longue de Scl est composée des exons 4, 5 et 6 et la forme courte est composée d'une partie de l'exon 5 et de l'exon 6. Tous les isoformes de Scl possèdent le domaine bHLH (représenté au-dessus de l'exon 6 par une boîte blanche). Les exons codants la protéine sont représentés par des boîtes noires.

1.2.2.2.1. Domaine bHLH

Un domaine bHLH (basique hélice-boucle-hélice), présent chez de nombreux facteurs de transcription (72) a été identifié en C terminal de SCL (58, 59). Ce domaine peut être divisé en une partie basique et une partie HLH. La partie HLH est formée de deux hélices α connectées par une boucle.

Cette conformation permet l'hétérodimérisation de SCL avec des protéines membres de la famille bHLH de classe I telles que les protéines E2A (E12 et E47). Le domaine basique permet la liaison de l'hétérodimère à l'ADN au niveau de séquences appelées boîte E (50, 73, 74).

Le domaine bHLH étant localisé en C terminal de SCL, il est présent chez les deux isoformes et permet théoriquement à la forme longue comme à la forme courte d'hétérodimériser avec les mêmes protéines et de lier les mêmes séquences génomiques pour les réguler.

1.2.2.2.2. Domaine prolines/alanines

En N terminal de l'isoforme long de SCL (type B), on retrouve un domaine riche en prolines et en alanines ainsi que plusieurs sérines phosphorylés importantes pour l'activité de transactivation de SCL (75, 76). La mutation de la sérine en position 122 cause une diminution du potentiel de transactivation de SCL qui révèle que, bien que les deux isoformes de SCL pourraient lier les mêmes régions génomiques, leur potentiel d'activation de ces régions est déterminé par la présence d'autres éléments en N terminal que la forme tronquée de SCL ne possède pas.

1.2.2.3. Régulation du locus de SCL

1.2.2.3.1. Structure chromatinienne

Les processus permettant l'expression ciblée de SCL sont peu décrits mais il est établi que les promoteurs Ia et Ib au niveau du gène de *SCL* ainsi que les facteurs de transcription régulant ce gène jouent un rôle déterminant dans le profil d'expression cellulaire de SCL. L'expression ou non de SCL dans ces différentes lignées cellulaires est déterminée par l'activité ou non des deux promoteurs de *SCL*. Cette activité dépend d'abord de la structure de la chromatine et ensuite des facteurs de transcription se liant au promoteur pour le réguler. En effet, des études de structure chromatinienne montrent que le promoteur de *Scl* est hypo méthylé dans les cellules MEL (77) et les mastocytes (78).

On détecte aussi la présence de sites hypersensibles à la DNase I en amont des deux promoteurs (60). Généralement, dans ces régions, la chromatine est dite « ouverte » ce qui facilite l'interaction entre les facteurs de transcription et l'ADN. À l'opposé, la structure méthylée et l'absence de sites hypersensibles à la DNase I au niveau de ce promoteur dans les cellules T et

les fibroblastes montre que le promoteur de *Scl* tend à être inactif dans ces cellules (77). Ainsi, la structure « ouverte » de la chromatine dans les érythrocytes favorise l'accès au promoteur de *SCL* pour les facteurs de transcription régulant son expression.

1.2.2.3.2. Éléments cis régulateurs

Plusieurs éléments cis permettant la régulation cellulaire de *SCL* ont été identifiés. En effet, plusieurs *enhancers* conservés chez l'homme et la souris ont été identifiés au niveau du locus de *SCL* (79, 80). En 5' du locus, des *enhancers* dirigent l'expression de *Scl* dans différentes régions du cerveau et dans l'endothélium (81). En 3' les *enhancers* identifiés permettent l'expression de *Scl* dans les cellules sanguines et endothéliales ainsi que dans les progéniteurs hématopoïétiques (70) où des sites de liaison pour GATA-2, FLI-1 et ELF-1 ont été identifiés *in vivo* (82).

1.2.2.3.3. Éléments trans régulateurs

D'autres éléments régulateurs comme les facteurs de transcription ont été identifiés au niveau des deux promoteurs de *SCL*. Au niveau du promoteur Ia, il existe des sites de liaison pour AP-1, SP-1 et plusieurs motifs GATA (77, 78, 83). Dans les cellules MEL et les mastocytes, plusieurs complexes protéiques ont été identifiés au niveau de ces motifs et la mutation de ces sites de liaison abolit la liaison des complexes (77, 78). En particulier, la mutation du site -37 GATA entraîne une baisse significative de l'activation du promoteur Ia de *SCL* ce qui montre le rôle critique de ce site de liaison et de la régulation de *SCL* par les protéines de la famille GATA (77).

Le promoteur Ib de *SCL* comporte des sites de liaison pour les protéines de la famille MAZ, ETS, et C/EBP. Dans les cellules MEL, plusieurs complexes ont aussi été identifiés sur ces sites de liaison et il a été démontré que ces sites étaient nécessaires pour l'activité du promoteur de *Scl* puisque des mutations au niveau de ces motifs de liaison empêchaient son activité (77). Dans les mastocytes, les protéines de la famille ETS telles que PU.1 et ELF-1

peuvent se lier à leur site de liaison au niveau du promoteur Ib et le transactiver. SP-1 peut aussi se lier au promoteur Ib au travers des sites de liaisons MAZ, très similaires dans la séquence aux sites de liaison pour SP-1 (78).

Ainsi, la structure de la chromatine, les *enhancers* et les facteurs de transcription régulent tous ensemble l'expression de *SCL*. De plus l'utilisation alternative du promoteur Ia ou Ib permet la formation de différents variant transcriptionnels de *SCL*. Ensuite, l'épissage alternatif de ces transcrits permet la formation de différents isoformes de *SCL*.

1.2.2.4. Fonctions de SCL

1.2.2.4.1. Hétérodimérisation de SCL

SCL est retrouvé dans plusieurs complexes protéiques au niveau de gènes cibles. En effet, dans les cellules K562, le dimère *SCL/E2A* a été identifié dans un complexe multi-protéique composé de *GATA-1*, *LMO-2* ET *LDB-1* au niveau du LCR du gène de la β -globine humaine (84) (figure 3). Dans les cellules MEL, il a été montré que ce même complexe avait des capacités de transactivation plus élevés quand tous les membres du complexe étaient présents (49). De plus, un autre complexe composé de *SCL*, *GATA-1*, *GATA-2*, *RUNX-1* et *FLI-1* a été identifié dans les mégacaryocytes humains au niveau des régions régulatrices des gènes *RUNX-1*, *SCL*, *ITGA2B*, *GP9* et *GPIBB* (85). L'ensemble de ces résultats suggère que l'action de *SCL* dans l'hématopoïèse se fait en synergie avec d'autre facteurs de transcription par la formation de complexes transcriptionnels.

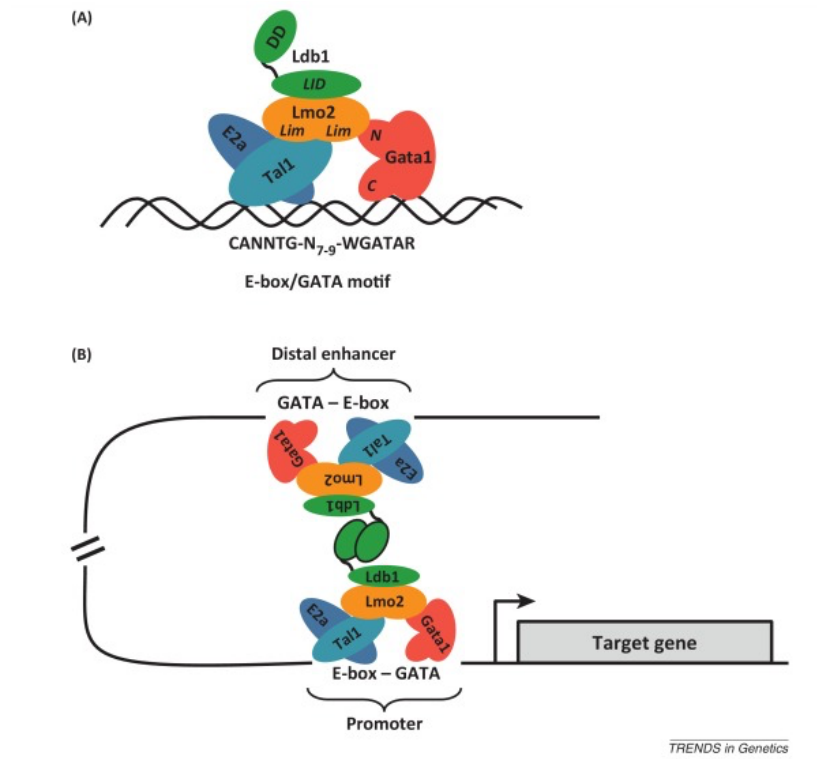


Figure 3 : Représentation schématique du complexe protéique formé par SCL, E2A, GATA-1, LMO-2 et LDB-1 (Love et al., Cell Press, 2013 (86). Avec la permission de l'éditeur)

Légende de la figure 3 : (A) SCL hétérodimérise avec les protéines E2A. Le dimère reconnaît et se lie aux boîtes E de l'ADN. LMO-2 interagit avec LDB-1 et GATA-1 qui lui-même lit l'ADN. Ce complexe se forme au niveau des régions promotrices comportant une boîte E suivie d'un motif GATA. (B) Les capacités d'homodimérisation de LDB-1 suggère la formation de boucles par l'ADN et ainsi pourrait favoriser l'interaction avec d'autres éléments régulateurs tel que des régions activatrices. (Distal enhancer : activateur distal ; promoter : promoteur ; target gene : gène cible)

1.2.2.4.2. Fonctions de SCL dans l'érythropoïèse primitive et définitive

Chez l'homme, le rôle de SCL dans l'érythropoïèse primitive a pu être étudié dans les cellules K562, une lignée cellulaire humaine de type érythro-leucémique avec des caractéristiques embryo-fœtal et dans les cellules souches embryonnaires humaines (hESCs). Le gain de fonction de SCL dans les hESCs favorise la formation des MEPs (87) et des progéniteurs hémato-endothéliaux (88) et accélère la différenciation des globules rouges (88). La perte de fonction partielle de SCL par l'utilisation d'un anti sens dans les cellules K562 ralentit la croissance des cellules, diminue leur capacité d'auto-renouvellement et affecte la taille des colonies cellulaires formées. SCL semble donc impliqué dans la prolifération et la régulation des érythrocytes (89).

Chez la souris, les embryons $Scl^{-/-}$ meurent au jour E9.5. La forte anémie observée chez ces embryons suggère une absence totale d'érythropoïèse primitive dans le sac vitellin (90-92). Pourtant au jour E8.5, soit 1 jour après le début de l'érythropoïèse primitive, on observe toujours des embryons $Scl^{-/-}$ dans des proportions normales mais dès les jours E9.5-10 on en observe plus aucun. Aux jours E9.5-10, les embryons $Scl^{-/-}$ sont anormalement petits, anémiques et leur sac péri-cardiaque est dilaté comparés aux contrôles $Scl^{+/+}$. Les analyses histologiques indiquent que les globules rouges embryonnaires sont absents du sac vitellin et du placenta. On observe aussi une absence de transcrits des gènes impliqués dans l'hématopoïèse (*Gata-1*, *c-Myb* et *Pu.1*), des transcrits correspondant aux chaînes de globines embryonnaires (ϵ et ζ) et aussi un niveau basal de *Rbtn2*. De plus, les progéniteurs hématopoïétiques provenant de sacs vitellins des embryons $Scl^{-/-}$ mis en culture ne produisent pas de colonies érythroïdes primitives contrairement aux progéniteurs des embryons $Scl^{+/-}$ ou $Scl^{+/+}$ qui produisent plusieurs colonies érythroïdes, myéloïdes et mixtes. L'action de SCL semble déterminante aux stades précoces de l'érythropoïèse primitive. En particulier, SCL est important pour la formation des érythrocytes primitifs à partir du mésoderme dans l'embryon (91, 92).

Les fonctions de Scl dans l'érythropoïèse définitive ont pu être mis en évidence par l'analyse de la contribution de cellules souches embryonnaires (ES) $Scl^{-/-}$ ou $Scl^{+/-}$ à la différenciation de plusieurs tissus chez des blastocystes hôtes. Les cellules ES $Scl^{-/-}$ ont la capacité de participer à la formation de plusieurs tissus non hématopoïétiques (cerveau, cœur, reins, muscles) lorsqu'elles sont injectées dans des blastocystes de souris hôtes de type sauvage. Cependant, ces cellules ne participent pas à la formation des tissus hématopoïétiques (comme la rate ou la moelle osseuse) (90, 93) alors que les cellules ES $Scl^{+/-}$ ont ce potentiel. Au niveau protéique, des expériences de ChIP (Immuno-précipitation de la chromatine) dans les cellules MEL montrent que Scl est enrichi au niveau de certaines régions du LCR du gène de β -globine (94, 95). SCL est donc requis dans l'érythropoïèse définitive et dans la formation des tissus hématopoïétiques définitifs.

1.2.2.4.3. Fonctions de SCL dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse

Chez l'homme, l'expression ectopique de SCL stimule la différenciation des précurseurs mégacaryocytaires, des MKs matures et des plaquettes *ex vivo*. De plus, l'expression de facteurs transcriptionnels (FLI-1, GATA-1, NF-E2), de marqueurs cellulaires (CD41 et CD61) et des gènes (*c-MPL*, *RUNX-1*, *FLI-1*, *HOX β 3*, *ZBTB16*) impliqués dans la mégacaryopoïèse, la thrombopoïèse et l'agrégation des plaquettes est favorisée (96). Ces données suggèrent que SCL module (directement ou indirectement) l'expression de gènes impliqués dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse chez l'homme (85).

Chez la souris, la sur-expression de l'isoforme long de Scl dans les cellules souches hématopoïétiques favorise leur différenciation dans la voie CFU-MK (97). À l'opposé, son absence dans les cellules ES $Scl^{-/-}$ cultivées en présence de différents facteurs de croissance hématopoïétiques inhibe la formation de colonies hématopoïétiques incluant des MKs (90). Scl est donc requis pour la différenciation des mégacaryocytes *ex vivo*.

Une caractérisation plus poussée montre que Scl est aussi nécessaire aux étapes tardives de la maturation mégacaryocytaire lors des remaniements membranaires impliqués dans la biogénèse des plaquettes. En effet, les souris adultes déficientes pour Scl ont 50% moins de plaquettes dans la circulation comparés aux contrôles (98, 99). Ce défaut n'est pas causé par une déficience de production des mégacaryocytes dans la moelle osseuse (98, 99). Cependant, les mégacaryocytes sont deux fois plus larges que les contrôles (98) et présentent une augmentation du réticulum endoplasmique rugueux ainsi qu'une absence presque totale des granules présents dans les plaquettes. Ces défauts cytoplasmiques des mégacaryocytes ont une répercussion sur la biogénèse des plaquettes qui sont plus larges et hétérogènes que les plaquettes des souris sauvages. En effet, les thrombocytes n'exprimant pas Scl ont une forme sphérique au lieu de leur forme normalement allongée et discoïdale. Leur temps de $\frac{1}{2}$ vie est néanmoins conservé ainsi que leur capacité d'agrégation mais cela n'empêche pas une augmentation du temps de saignement. Chez la souris, l'absence de Scl prévient donc la maturation terminale des mégacaryocytes et leur fonction de pourvoir correctement à la biogénèse des plaquettes (99).

1.2.3. E2A, LMO2 et LDB1

Il existe de nombreux autres facteurs de transcription impliqués dans la mégacaryopoïèse et l'érythropoïèse. Cependant, je favoriserais dans cette partie l'implication des facteurs E2A, LMO-2 et LDB-1 qui sont associés à SCL et GATA-1 dans un complexe multi-protéique.

Le gène *E2A* encode 2 protéines de la famille bHLH de classe I, E12 et E47 produites suite à l'utilisation alternative d'un exon (72). Ces protéines très similaires possèdent toutes les deux 2 domaines d'activation en N terminal et un domaine bHLH en C terminal. E12 et E47 sont capables d'hétérodimériser avec d'autres protéines bHLH (de classe II) telle que SCL (comme mentionné dans la partie 1.2.2.2.1). Les protéines E2A ont d'abord été identifiées pour leur fonction activatrices dans les cellules B mais sont aussi exprimées dans plusieurs cellules du système hématopoïétique, du système nerveux central, de la rate, des poumons, du pancréas et du muscle squelettique en développement.

Les souris déficientes pour E2A développent principalement des tumeurs des lymphocytes T mais présentent aussi une réduction du nombre de cellules souches hématopoïétiques, des pré CFU-E, des pré GM, des MkPs, et des MEPs (100).

LMO-2 est un proto-oncogène de la famille des protéines à domaine LIM. LMO-2 possède 2 domaines LIM chacun composé de 2 motifs à doigts de zinc. Néanmoins (tel que mentionné dans la section 1.2.2.4.1), LMO-2 ne se lie pas directement à l'ADN mais est retrouvé dans un complexe protéique en association avec E47, SCL, LDB-1 et GATA-1 (49). LMO-2 est exprimé dans le foie fœtal, la rate, l'endothélium vasculaire, les cellules souches hématopoïétiques c-Kit⁺, les érythrocytes, les cellules B et à plus faible niveau aux stades précoces de la lymphopoïèse (101, 102). La perte de fonction de LMO-2 chez la souris cause une létalité au jour E10.5 et une absence totale d'érythropoïèse dans le sac vitellin (103). La perte de fonction de LMO-2 ou de GATA-1 entraîne dans les 2 cas une mortalité au jour E10.5 suggérant que ces facteurs ont un rôle critique au même stade du développement et renforce les évidences de coopération entre ces 2 facteurs par la formation de complexes protéiques. LMO-2 a également un rôle majeur dans l'érythropoïèse définitive (104) et dans l'angiogenèse (105).

LDB-1 est un cofacteur associé aux protéines à domaine LIM. LDB-1 possède un domaine d'homodimérisation en N terminal et un domaine d'interaction avec les protéines à domaine LIM (LID) en C terminal (106). Ce dernier domaine permet l'interaction de LMO-2 et LDB-1 qui joue un rôle de protéine adaptatrice entre LMO-2 et les autres facteurs du complexe SCL (figure 3). L'absence de LDB-1 chez la souris est létale entre les jours E9.5 et E10 et les embryons mutants présentent notamment des défauts dans la formation des îlots sanguins du sac vitellin suggérant un rôle de LDB-1 dans l'érythropoïèse primitive (107).

1.3. Les voies de signalisation dans la mégacaryopoïèse

Tel qu'indiqué dans la partie 1.1.3.2, il existe plusieurs voies de signalisation impliquée dans la différenciation des mégacaryocytes. Dans cette partie, je détaillerais principalement les voies de signalisation activées par c-Mpl/TPO et c-Kit/SCF.

1.3.1. La voie de signalisation c-Mpl/TPO

1.3.1.1. Structure, expression et régulation de c-Mpl

C-Mpl (ou CD110) est un récepteur membranaire de la famille des récepteurs de cytokine de type 1. Le gène de *c-Mpl* présente beaucoup d'homologies entre l'homme et la souris. Le gène contient 12 exons distribués sur ~17 kb chez l'homme (108) et ~15 kb chez la souris (109). La forme longue de c-Mpl est composée d'un domaine transmembranaire, d'un domaine extracellulaire lui-même composé de deux domaines récepteurs de cytokines et d'un domaine cytoplasmique responsable de la transduction du signal (110).

C-Mpl est exprimé sur les cellules hématopoïétiques CD34⁺, les mégacaryocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales (111).

La régulation de l'expression de *c-Mpl* est assurée par différents facteurs de transcription. Chez l'homme, GATA-1 et FLI-1 occupent et activent le promoteur de *c-MPL* dans les mégacaryocytes *in vitro* (112). Dans les mégacaryocytes murins, Gata-1, Scl et Ldb-1 ont été retrouvé au niveau du promoteur de *c-Mpl* (113).

1.3.1.2. C-mpl et TPO

Le récepteur c-Mpl est exprimé de façon inactive à la surface des cellules. La thrombopoïétine (TPO) est la cytokine qui se lie à c-Mpl et permet son activation.

Chez l'homme, le gène codant la TPO est composé de 6 exons étendus sur ~6 kb sur le chromosome 3 (114).

Chez l'homme et la souris, la TPO est principalement composée de deux domaines. Le domaine N terminal est une région de 152 acides aminés dans les deux espèces qui présente une forte homologie au gène de l'érythropoïétine. Le domaine C terminal est une région riche en résidus sérines, prolines et thréonines et contient 7 sites de glycosylation potentiels. Ces deux domaines sont reliés par une jonction contenant une paire de résidus arginines représentant peut-être un site de clivage protéolytique (114, 115). Chez l'homme et la souris, le site prédominant de production de la TPO est le foie. La TPO est aussi produite par les reins chez l'homme. La liaison de la TPO à son récepteur c-Mpl entraîne son homodimérisation à la surface cellulaire. Cette dimérisation va permettre l'activation de différentes voies de signalisation comme la voie des tyrosines kinase Janus (JAK) et la voie des kinases STAT (figure 4) (116).

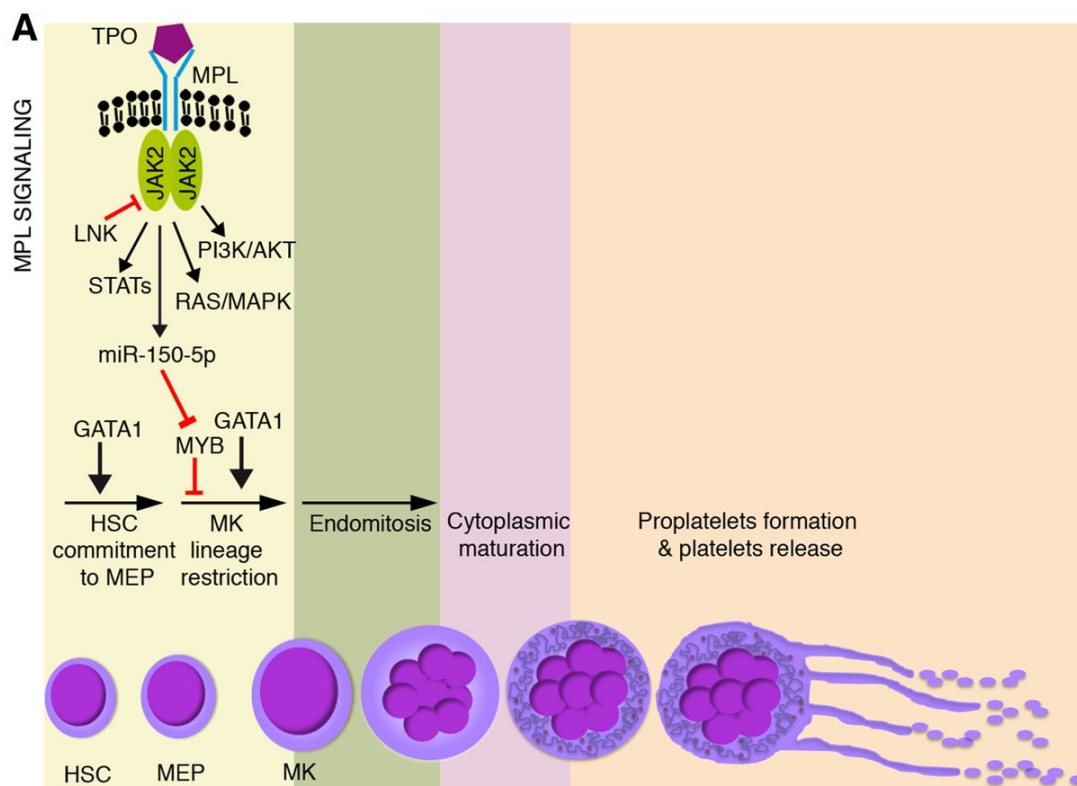


Figure 4 : Schéma de la voie de signalisation c-Mpl/TPO (Elisa Bianchi et al., Blood, 2016, (117). Avec la permission de l'éditeur)

Légende de la figure 4 : Schéma de la voie de signalisation c-Mpl/TPO. La voie de signalisation c-Mpl/TPO est activée lorsque la TPO se lie à son récepteur c-Mpl. Cette liaison permet la dimérisation de c-Mpl et induit l'autophosphorylation de la kinase Janus 2 (JAK2). JAK2 phosphoryle de nombreux substrats en aval et permet l'activation de différentes voies de signalisation. L'effet ultime de l'activation de toutes ces voies est de promouvoir la différenciation des plaquettes. La thrombopoïétine agit donc au niveau des progéniteurs hématopoïétiques pour favoriser la différenciation des mégacaryocytes mais n'est pas requis pour la phase terminale de production des plaquettes.

1.3.1.3. Fonctions

Les signalisations activées par le récepteur c-Mpl et son ligand sont principalement connues pour être impliquées dans les étapes précoces et tardives de la mégacaryopoïèse. Cependant, la voie c-Mpl/TPO ne semble pas impliquée dans la thrombopoïèse. Les souris c-Mpl^{-/-} survivent jusqu'à l'âge adulte et se développent normalement. Ces souris présentent néanmoins un défaut dans la lignée mégacaryocytaire. En effet, les animaux déficients pour c-Mpl ou la TPO ont une diminution du nombre de mégacaryocytes et de plaquettes (jusqu'à 85%) dans la moelle osseuse et la rate ainsi qu'une diminution du nombre de progéniteurs CFU-MKs. Les autres paramètres hématologiques restent cependant inchangés suggérant que l'absence de c-Mpl cause une déplétion spécifique de la lignée mégacaryocytaire (118, 119). Afin de déterminer si les défauts observés chez les adultes c-Mpl^{-/-} proviennent d'un défaut de différenciation des progéniteurs, des expériences *ex vivo* ont été réalisées. Les cellules c-Mpl^{-/-} dérivées de la moelle osseuse cultivées en présence de TPO, IL-3 et SCF produisent 6 fois moins de colonies au potentiel mégacaryocytaire par rapport aux cellules c-Mpl^{+/+}. De plus, les cellules déficientes pour c-Mpl donnent moins de mégacaryocytes larges et polyploïdes avec un cytoplasme abondant (118). Ces résultats confirment le rôle de SCL dans la différenciation et la maturation des mégacaryocytes.

Pour compléter les études de perte de fonction d'une part, et dans le but d'identifier des facteurs thérapeutiques pour les cas de thrombopénies d'autre part, des expériences d'administration de TPO exogène ont été réalisées. Chez la souris, l'injection intra-péritonéale de Tpo murine entraîne une augmentation de 4 fois le nombre de plaquettes en circulation en 7 jours (115, 120). Aussi, des études *in vitro* sur des cultures de cellules souches dérivées de foies fœtaux murins en présence ou non de Tpo et autres cytokines montrent le rôle critique de la signalisation induite par la Tpo dans la différenciation des mégacaryocytes. En effet, les cultures contenant la Tpo seule ou avec d'autres cytokines (Il-3, Scf) produisent des mégacaryocytes ainsi que d'autres cellules myéloïdes. Cependant, on observe aucun mégacaryocyte dans les cultures contenant uniquement Il-3 et Scf (121). L'administration de la TPO humaine ou d'un recombinant stimule la mégacaryopoïèse de progéniteurs murins (121) et humains (115) en culture liquide ainsi que leur croissance, leur ploïdie et l'expression de marqueurs de surface spécifiques à la voie mégacaryocytaire (121).

Malgré le rôle spécifique de c-Mpl dans les mégacaryocytes, c-Mpl semble également avoir un rôle dans d'autres lignées cellulaires et particulièrement dans les érythrocytes. En effet, les cellules de la moelle osseuse de souris c-Mpl^{-/-} cultivées en présence de Tpo ont une diminution du nombre total de progéniteurs (de 44% à 38%) et en particulier une baisse de 50% des érythrocytes-CFC pures. De plus, des analyses clonogéniques sur des cellules cultivées de la rate montrent une baisse du nombre d'érythrocytes pures et mixtes d'environ 6 fois (118). L'ensemble de ces résultats suggèrent que c-Mpl est principalement nécessaire pour la production de progéniteurs mégacaryocytaires et la maturation des mégacaryocytes. Cependant, c-Mpl n'est pas impliqué dans la production et la libération des plaquettes puisque les plaquettes des souris c-Mpl^{-/-} sont morphologiquement normaux et fonctionnelles.

1.3.2. La voie de signalisation c-Kit/SCF

1.3.2.1. Structure, expression et régulation de c-Kit

C-Kit (ou CD117) est un récepteur membranaire. Chez la souris, c-Kit est codé par le locus *W* aussi connu sous le nom de « white spotting locus » à cause de nombreuses mutations associées à la mélanogenèse identifiées dans cette région (122).

Chez l'homme et la souris, cette région possède 21 exons étendus sur ~80 kb d'ADN (123-125).

Dans les deux espèces, l'expression de c-Kit est retrouvée dans plusieurs cellules hématopoïétiques. C-Kit est fortement exprimé sur les mastocytes (126-128) et en plus faible quantité sur les plaquettes activées, les mégacaryocytes, 70% des cellules CD34⁺, les lignées cellulaires érythroleucémiques ainsi qu'une fraction des cellules mononucléaires avec des marqueurs spécifiques à la lignée lymphoïde (129). Dans les tissus non hématopoïétiques, c-Kit est exprimé dans les mélanocytes, le cerveau embryonnaire (128, 130), les testicules (131), les cellules endothéliales vasculaires, les astrocytes et les tubules rénaux (132, 133).

Le profil d'expression de c-Kit est assuré par une fine régulation contrôlée à différents niveaux. La régulation génique est assurée par différents facteurs comme Sp-1, Ets, c-Myb, Gata-1, Scl et Ap-2. En effet, des sites de liaison pour ces facteurs de transcription ont été localisés au niveau du locus *W* et suggère qu'ils sont impliqués dans la régulation de l'expression de c-Kit. En particulier, des expériences mettent en évidence une régulation du gène de *c-Kit* par les formes longue et courte de SCL. D'une part, une diminution de l'expression protéique de l'isoforme long de SCL (type B) dans la lignée cellulaire hématopoïétique TF-1 par l'expression d'un anti-sens ou d'un dominant négatif de SCL entraîne une baisse de l'expression de c-KIT sans affecter l'expression d'autres marqueurs cellulaires. À l'inverse, la transfection de SCL dans ces cellules restitue les niveaux transcriptionnels et protéiques de c-KIT (134). D'autre part, la capacité de transactivation de SCL sur le promoteur de *c-KIT* a été testé *in vitro*.

Ces expériences montrent d'une part que le promoteur de *c-KIT* est activé par des quantités croissantes de SCL et d'autre part que le promoteur de *c-KIT* est occupé et activé par un complexe nécessitant SCL et tous ses partenaires (SP-1, E47, GATA-1, LMO-2, LDB-1) (135).

Les études sur les formes courtes de SCL montrent que l'expression ectopique d'un isoforme tronquée de la partie de transactivation de SCL dans les lignées B permet l'expression de c-Kit (qui n'est normalement pas exprimé dans les cellules B) (135). De plus, ce même isoforme est également capable de transactiver le promoteur de *c-Kit in vitro* tout comme l'isoforme long (135). Ces études montrent donc que les isoformes longs et courts de SCL sont capables de moduler le promoteur de *c-Kit* en favorisant son activation.

Au niveau transcriptionnel et protéique, c-Kit est régulé par des micros ARN et des cytokines. En effet, les micros ARN miR-221 et miR-222 ont été identifiés pour réguler l'expression de c-kit dans les cellules hématopoïétiques. De plus, plusieurs cytokines comme GM-CSF, IL-1, IL-4, TGF- β , TNF- α et l'interféron- γ répriment l'expression des ARNm de c-Kit ou des récepteurs c-Kit déjà localisé à la membrane en influençant leur stabilité ou en diminuant leurs niveaux d'expression (136-141).

1.3.2.2. C-Kit et SCF

Chez l'homme il existe 4 isoformes protéiques de c-Kit et deux chez la souris. Tous les isoformes possèdent principalement trois régions : une région extra cellulaire composé de 5 domaines de type Ig (immunoglobuline), une région à activité phospho transférase en intra cellulaire, et une région transmembranaire hydrophobe reliant les deux régions intra et extra cellulaire. C-Kit est donc un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase.

Comme tout récepteur, son activité nécessite la liaison d'un ligand. SCF (aussi nommé facteur c-Kit) est un homodimère présent sous forme soluble et membranaire et est capable de lier c-Kit. SCF est codé par le gène *Sl* composé de 9 exons (142) et localisé sur le chromosome 12 chez l'homme et 10 chez la souris (143). Son expression est retrouvée dans les cellules stromales, les fibroblastes, les cellules endothéliales et à faible niveau dans la circulation sanguine (142, 144, 145).

Dans les lignées cellulaires exprimant le récepteur et son ligand, SCF peut se lier à c-Kit. La présence de SCF favorise l'interaction entre deux monomères c-Kit par l'intermédiaire de leur domaine Ig extra cellulaire. S'en suit alors une homodimérisation et une auto phosphorylation de différents domaines intra cellulaire du récepteur. Ces régions vont alors exercer leur activité tyrosine kinase sur différents effecteurs cellulaires et activer leurs voies de signalisation. La stimulation de c-Kit par SCF est connu pour activer la voie de signalisation PI3K, la voie de la famille des kinases SRC, la voie des MAP kinases et les voies phospholipases C et D. L'activation de ces voies est associée à la prolifération, la survie et la mélanogénèse cellulaire ce qui suggère un rôle de c-Kit dans ces mécanismes (figure 5).

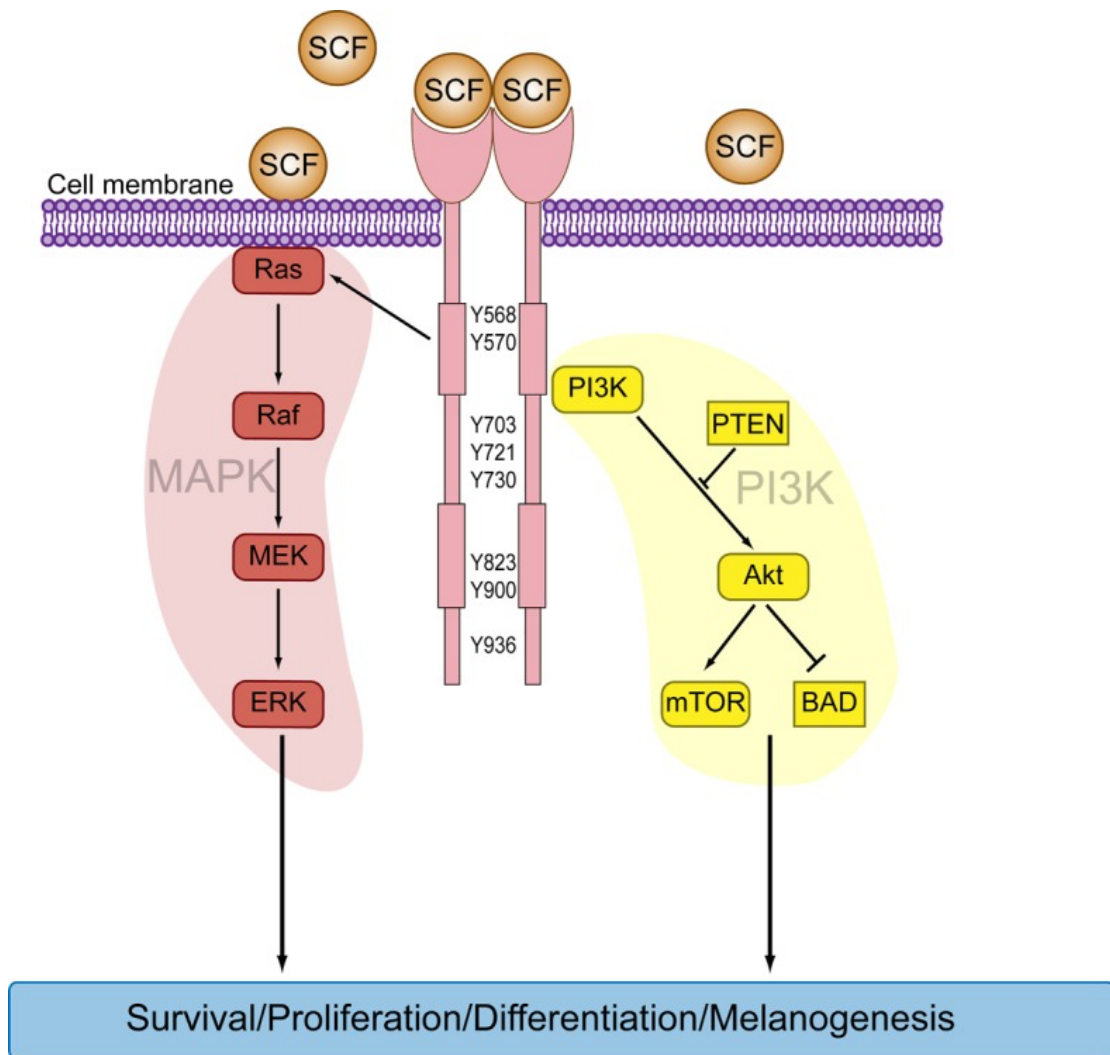


Figure 5 : Schéma de la voie de signalisation c-Kit/SCF (Matteo S. Carlino et al., Oncoscience, 2014, (146). Source en accès libre)

Légende de la figure 5 : Schéma de la voie de signalisation c-Kit/SCF. La liaison de SCF à son récepteur c-Kit est connue pour activer différentes voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération, la différenciation cellulaire et la mélanogenèse. (Cell membrane : membrane cellulaire ; survival : survie ; differentiation : différenciation ; melanogenesis : mélanogenèse)

1.3.2.3. Fonctions

Chez la souris, plusieurs mutations ont été identifiées au locus *W* (W^{37} , W^{39} , W^{41} , W^{42} , W^{44} , W^{49} , W^{55} , W^V , W^W). Ces mutations affectent principalement la pigmentation, la fertilité et la différenciation cellulaire. Les mutants homozygotes sont généralement stériles mais parfois fertiles et présentent une anémie microcytaire causant souvent une mortalité embryonnaire ou néo-natale. Aussi, le nombre d'érythrocytes est significativement réduit et les globules rouges restants sont macrocytaires. De plus, il a été montré que l'interaction c-Kit/SCF était nécessaire pour la survie des cellules érythrocytes primitifs (147) ce qui prouve un rôle de c-Kit aux étapes précoces de l'érythropoïèse primitive. c-Kit est également nécessaire aux étapes plus tardives de l'hématopoïèse puisqu'on observe une réduction des mégacaryocytes, des neutrophiles et des mastocytes dans la moelle osseuse des mutants *W*. Enfin, l'absence de c-Kit inhibe les capacités de migration des cellules germinales et cause la stérilité dans certains mutants. Contrairement aux érythrocytes primitifs, les cellules germinales se forment normalement au niveau du sac vitellin mais c'est leur migration vers les bordures germinales qui est retardée et cause des tumeurs ovariennes chez les souris (148). Les hétérozygotes sont fertiles, et ont souvent un pelage dépigmenté.

Parmi les homozygotes et les hétérozygotes, on distingue encore deux classes de mutants. Certains sont affectés au niveau de l'expression de c-Kit et d'autres mutants sont affectés au niveau de la structure du domaine kinase de c-Kit. Par exemple, le mutant c-

Kit^{W41/W41} au pelage blanc/gris est viable à l'état homozygote et présente une expression normal de c-Kit mais son activité kinase est réduite (149).

1.4. Objectifs et hypothèses de recherche

Objectifs

SCL est une protéine à domaine bHLH et est connu pour son implication dans l'hématopoïèse. Deux isoformes de SCL sont principalement identifiés. Une forme longue composée d'un domaine de transactivation en N terminal et d'un domaine bHLH en C terminal (type B) et une forme courte contenant uniquement le domaine bHLH (type A). Dans le but de caractériser les fonctions moléculaires et cellulaires des deux isoformes de SCL dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse mais aussi pour identifier les cibles moléculaires et les voies de signalisation ciblées par ces isoformes, le laboratoire a conçu des lignées de souris transgéniques sur-exprimant chacune des 2 formes.

Hypothèses

SCL module la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse ainsi que l'expression de facteurs de transcription impliqués dans ces mécanismes.

SCL est impliqué dans l'activation/inhibition de voies de signalisation reliées à la mégacaryopoïèse et à la thrombopoïèse.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Dans le but d'élucider le rôle des 2 isoformes de SCL, le laboratoire a conçu des modèles murins de sur-expression de SCL. En effet, des souris transgéniques exprimant l'ADN complémentaire (ADNc) humain de la forme longue (SCL_L) ou courte (SCL_C) de SCL sous le contrôle des éléments régulateurs de *Gata-1* (*Enhancer* murin : -856 à -655 et fragment du promoteur IE murin : -312 à -31) ont été établis. Le promoteur IE dirige l'expression de *Gata-1* dans les mêmes lignées hématopoïétiques que SCL. Ainsi, l'utilisation de ce promoteur permet d'avoir un modèle unique de souris transgéniques sur-exprimant SCL selon son profil normal d'expression en évitant toutefois une autorégulation (négative) de SCL sur son transgène.

2.1. Génotypage

2.1.1. Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir d'un morceau de queue murin afin de déterminer le génotype des souris transgéniques utilisées. Dans un premier temps, ~0.5 cm de queue est digéré dans un eppendorf de 1.5 ml contenant 13.1 µl de pronase à 20 mg/ml dans 450 µl d'un tampon de digestion (Tris pH 8.0, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 10%). L'ensemble des tubes à digérer est enveloppé dans de l'aluminium et placé sur une plateforme berçante à 55°C. La digestion nécessite entre 5 et 12 heures. Une fois la digestion complète, une première centrifugation (12000 rpm, 5 min) est réalisée pour culoter et se débarrasser des poils de la queue présents dans l'échantillon de digestion. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube auquel est ajouté 450 µl d'éthanol 100% et 60 µl de sodium acétate (3 M pH 6.9) et l'ADN est précipité en agitant vigoureusement les tubes. Une seconde centrifugation (15000 rpm, 5 min) est réalisée.

Le surnageant est retiré et le culot d'ADN est lavé avec 200 µl d'éthanol 70%. Les tubes sont de nouveau centrifugés, le surnageant est retiré et l'ADN est séché à l'air libre ou bien sous la hotte chimique pendant ~20 minutes. L'ADN est resuspendu dans 100µl de tampon Tris-EDTA (EDTA 1 mM, Tris pH 8.0 10 mM). Pour faciliter la resuspension de l'ADN dans le TE, une incubation de 5 à 10 min à 55°C peut être réalisée.

2.1.2. PCR

Le géotype des souris transgéniques (SCL_L et SCL_C) est analysé par PCR avec les oligonucléotides (oligos) suivant : 5' GTT CTT AGG CTG CTG GGA TG 3' (sens SCL humain exon 3 : oligo 1) et 5' TCA TTC GTC TGT TTC CCA TTC 3' (anti-sens β-globine intron 2 : oligo 2). Le mélange de réaction utilisé comprend 0.7 µl de Taq (4U/µl), 1 µl de dNTPs (2.5 mM), 0.5 µl de chacun des oligos 1 et 2 (20 µM) et 2 µl d'un tampon (KCL 500 mM, Tris Ph 8.5 100 mM, MgCl₂ 10 mM) dans un volume total de 19 µl et est préparé pour le nombre de souris à génotyper. 1 µl d'ADN est ajouté au mélange de réaction et le programme de PCR utilisé est le suivant : 95°C 5', (94°C 25'', 61°C 25'', 72°C 25'') x27, 72°C 10', 14°C. Les produits de la PCR sont analysés sur un gel d'agarose 1%. La bande attendue est à 349 paire de base (bp).

2.2. Analyses transcriptionnelles

2.2.1. Récupération de la moelle osseuse et déplétion des globules rouges

La moelle osseuse est récupérée à partir des os des tibias, fémurs, humérus et radius avec 4 ml de PBS (NaCl 137 mM, KCL 2.7 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, FBS 2%) et une aiguille de 21G^{1/2}. Les cellules sont centrifugées et resuspendues dans 400 µl de PBS dans un tube de verre borosilicate 12x75mm.

Environ 10^8 cellules sont marquées avec 5 μg d'anticorps TER119 (couplé à la biotine, biolegend) pour 15 minutes à 4°C dans le noir. Des billes magnétiques couplées à la streptavidine (MojortSort, biolegend, cat. 480015) sont ajoutées aux cellules pour une incubation de 15 minutes. Le volume total est ajusté à 2.5 ml avec du PBS. Les globules rouges (TER119+) sont retirés par une approche « MACS » (Tri cellulaire magnétique) en plaçant le tube de verre borosilicate dans un aimant magnétique (aimant *EasySep*, stem cell, Cat. 18000). Une incubation de ~ 5 minutes dans l'aimant est nécessaire pour « capter » les cellules TER119+ sur les parois du tube. Après les 5 minutes, le tube est conservé dans l'aimant et les cellules TER119- sont récupérées par inversion du tube de verre borosilicate dans un nouveau tube. L'extraction de l'ARN des cellules TER119- est immédiatement réalisée.

2.2.2. Extraction de l'ARN

L'ARN total des cellules de la moelle osseuse (M.O.) ou des cellules déplétées des cellules TER119+ (TER119-) est extrait au thiocyanate de guanidinium (GuSCN). Des tubes stériles de polypropylène de 4.4 ml (Fisher, 11 x 60 mm, cat 03955) sont incubés sous agitation pendant $\sim 3\text{h}$ dans 0.025% d'eau traitée au diethyl pyrocarbonate (DEPC) et seront utilisés pour culoter les ARN par la suite. Les cellules (M.O. ou TER119-) sont d'abord culotées dans des tubes de 13 ml (1000 rpm, 3 min) et 3 ml d'une solution fraîche de GuSCN (GuSCN 4 M, Sarcosyl 30%, citrate de sodium 25 mM pH 7.5, β -mercaptoéthanol 0.1 M) est ajouté. Une seringue de 3 ml munie d'une aiguille de 22G $\frac{1}{2}$ est utilisée pour lyser les cellules par des mouvements vigoureux d'aspiration de la seringue. Les cellules lysées sont conservées sur glace. Après l'étape de lyse, les tubes stériles de polypropylène de 4.4 ml traités au DEPC sont retirés de l'eau et séchés. 3 ml d'une solution de chlorure de sodium CsCl (CsCl 5.7 M, NaOAc pH 5.0 0.025 M, EDTA 0.01 M) est délicatement déposé pour former un coussin au fond des tubes. Les tubes sont placés dans les « tubes oscillants » adaptés au rotor SW 60 Ti (Beckman) et sont centrifugés à 36 000 rpm, $\sim 16\text{h}$ dans une ultra centrifugeuse. L'ARN est ainsi culoté au fond des tubes et le surnageant est délicatement retiré à l'aide d'une pipette pasteur.

Le culot d'ARN est resuspendu avec 0.5 ml d'une solution de guanidium hydrochloride (Gu HCl 7.5 M, sodium citrate pH 7.5 0.025 M) par des mouvements d'agitation et transféré dans un eppendorf de 1.5 ml. Les tubes (de 13 ml) sont rincés avec 0.2 ml de la solution de Gu HCl et ajouté à l'eppendorf. 17.5 µl d'acide acétique 1 M et 360 µl d'éthanol 100% sont ajoutés à l'ARN. L'ARN est précipité à -20°C pour au moins 3 à 4 heures. L'ARN est ensuite culoté avec une étape de centrifugation (12 000 rpm) de 45 minutes à 4°C suivi d'une étape de lavage avec 0.5 ml d'éthanol 100%. Une 2^e étape de centrifugation d'environ 1 minute est réalisée et, après avoir retiré le surnageant, le culot est séché et resuspendu dans ~100 µl d'eau traitée au DEPC (0.025%). Une 3^e centrifugation de 5 min est réalisée et le surnageant est récupéré dans un tube stérile. 2 autres étapes de resuspension dans l'eau traitée au DEPC (0.025%) suivi d'une centrifugation sont réalisés et l'ARN est récupéré en regroupant les surnageants dans un tube stérile. 0.1 volume d'acétate de potassium (KoAc 2 M) et 2 volumes d'éthanol 100% sont ajoutés à l'ARN et une incubation d'au moins 3 à 4 heures est réalisée à -20°C. L'ARN est centrifugé (12 000 rpm) 15 minutes à 4°C et lavé avec 0.5 ml d'éthanol 95%. L'ARN est de nouveau centrifugé (12 000 rpm) puis séché et resuspendu dans ~30 µl d'eau traité au DEPC. Les valeurs des ratios 260/280 (contaminations en protéines) et 260/230 (contaminations chimiques) sont mesurés au nano-drop et doivent toujours être supérieures ou égal à 1.80 et 1.60 respectivement. Une électrophorèse sur un gel d'agarose 0.8-1.6% contenant 4.25 µl de formaldéhyde 37% et 4.25ml de MOPS 10X (MOPS 0.2 M, EDTA 10 mM pH 7.0, NaOAc 50 mM) permet de vérifier l'intégrité de l'ARN.

2.2.3. RT-qPCR

1-2 µg d'ARN est traité à la deoxyribonuclease I (1U/µl) dans un mélange contenant 1 µl d'un tampon de réaction 10X (Tris 200 mM pH 8.4, MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM) et 0.1 µl d'inhibiteur de RNase (40U/µl) dans un volume total de 6 µl d'eau DEPC (0.025%). La réaction s'effectue à 37°C pendant 15 min. L'activité de l'enzyme est ensuite inhibée avec 1 µl d'EDTA (25 mM, pH 8.0) à 65°C pendant 15 min. Entre 0.25 µg et 1 µg d'ARN traité à la DNase est utilisé dans une réaction de transcription inverse (RT).

Une première étape permettant l'hybridation des oligos à l'ARN est réalisée avec 500 ng d'une amorce aléatoire Pd(N)₆ à 65°C pendant 5 minutes. La réaction de transcription inverse est réalisée dans un mélange contenant 4 µl d'un tampon de réaction 5X, 1 µl de dNTP (2.5 mM), 2 µl de DTT (0.1 M), 0.1 µl d'inhibiteur de RNase (40U/µl) et 1 µl de transcriptase inverse M-MLV (200U/µl). Le mélange est ajouté à l'ARN et incubé à 37°C, 15 minutes puis à 65°C, 15 minutes. Les cDNA sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

L'expression des formes longue et courte de SCL humain (transgène) dans les cellules de la moelle osseuse est analysée par qPCR avec les oligos suivant : 5' GTG AGA ATT GGG CGG CTC T 3' (sens SCL humain 3' UTR) et 5' TGG ACA GCA AGA AAG CGA GC 3' (anti-sens β-globine humaine exon 3). L'expression des transcrits de c-Mpl, c-Kit et Gata-1 murin est aussi analysée par qPCR avec les oligos suivant : c-Mpl: 5' CTT TGG AAC CCG GTA TGT GT 3' (sens exon 3) et 5' GGA TCT GAA GTT CCC CTG GT 3' (anti-sens exon 4); c-Kit: 5' AGA GAG GCC CTA ATG TCG GA 3' (sens exon 13) et 5' CTG TAA TGA CCA GGG TGG GC 3' (anti-sens exon 14); Gata-1: 5' AGG CAC CCA ATG CAC TAA CT 3' (sens exon 4) et 5' TTC CTC GTC TGG ATT CCA TC 3' (anti-sens exon 5); Les échantillons sont normalisés avec le produit du gène *S16* ribosomal en utilisant les oligos suivant: 5' AGG AGC GAT TTG CTG GTG TGG 3' (sens S16 exon 3) et 5' GCT ACC AGG GCC TTT GAG ATG 3' (anti-sens S16 exon 4). Les réactions sont réalisées en triplicatas dans un mélange de SYBR Select Master (life technologies) et les analyses sont réalisées avec le logiciel Quant Studio.

2.3. Analyses cytologiques

2.3.1. Détermination du nombre de mégacaryocytes, de plaquettes et du temps de saignement

Pour compter les mégacaryocytes, ~60 000 cellules de la moelle osseuse sont utilisées pour une centrifugation cytopspin (400 rpm, 5 min) et colorés au Wright. Après coloration, le nombre de mégacaryocytes (noyau polyploïde : violet foncé, cytoplasme : violet pâle) est déterminé au microscope.

Pour les plaquettes, le sang périphérique est prélevé à partir de la queue ou de la joue des souris et est resuspendu dans une solution de PBS 1%. Les plaquettes sont comptées sur un hématimètre.

Le temps de saignement est évalué en comptant le temps nécessaire à la coagulation de biopsies de queues de souris mis dans une solution de saline (0.85% NaCl).

2.3.2. Culture de la moelle osseuse sur méthyl cellulose

La moelle osseuse est récupérée à l'aide d'une aiguille 21G ½ dans 3 ml de milieu IMDM FBS 10%, supplémenté d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline). Les cellules sont centrifugées à 4°C, 5 minutes, à 1200 rpm. Le culot est resuspendu dans 3 ml de la solution utilisée précédemment. Les cellules sont de nouveau centrifugées 5 minutes à 1200 rpm à 15°C et resuspendues dans 3 ml de milieu IMDM FBS 5% sans antibiotiques. Les cellules sont comptées et 10^5 cellules sont resuspendues par tube.

Les cellules sont ensuite mises en culture sur méthyl cellulose selon le protocole suivant. Le milieu de méthyl cellulose est composé de milieu IMDM supplémenté de streptomycine et de pénicilline, méthyl cellulose 1%, FCS 10%, BSA déionisé (14mg/ml), transferrine humaine saturée en fer (190 µg/µl), WEHI-3 5%, érythropoïétine humaine (1U/µl) et α -monothioglycérol (2 µl dans 500 µl IMDM). La solution est mélangée délicatement et un temps d'attente de 10 à 15 minutes permet de retirer les bulles d'air.

Environ 10^5 cellules sont ajoutées au milieu de méthyl cellulose et un temps d'attente de 5 à 10 minutes permet de faire disparaître les bulles d'air. 1 ml du mélange est ajouté sur un pétri (*corning*) stérile en polystyrène de 35x10 mm. À l'aide d'une seringue de 1cc les bulles d'air sont retirées et la solution est étalée en penchant le pétri. Le pétri contenant les cellules est placé dans un plus grand pétri avec un 2^e pétri contenant de l'eau auto-clavée. Les cellules sont incubées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂. Les CFU-E sont comptées après 2 jours ; les BFU-E, CFU-M et CFU-GM au bout de 7 jours ; et les CFU-GEMM après 9 à 11 jours. Des répliquas ou des triplicatas sont réalisés pour chaque échantillon.

2.3.3. Coloration à l'iodure de propidium

La moelle osseuse d'un fémur est récupérée à l'aide d'une aiguille de 21G^{1/2} dans 3 ml d'une solution de RPMI FBS 10%. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1000 rpm puis resuspendues dans 1 ml de PBS FBS 2%. Entre 1-2 millions de cellules sont incubées pendant 1h30 minutes dans le noir à 4°C dans 1 ml d'un tampon contenant 0.1% de citrate de sodium, 0.3% de NP-40 et 0.05 mg/ml d'iodure de propidium dans une solution de PBS. L'acquisition de 10^6 cellules est réalisée au cytomètre.

Chapitre 3 : Résultats

Contributions aux résultats

J'ai contribué aux résultats présentés dans les figures 6, 7, 9 et 13. Les résultats des figures 8, 10 à 12 proviennent de la contribution d'auteurs différents.

3.1. Les transcrits des transgènes SCL_L (type B) et SCL_C (type A) sont exprimés dans les cellules hématopoïétiques des souris transgéniques

Le laboratoire dispose de 3 lignées ayant intégrées la forme longue de l'ADNc de SCL (humain) et 4 lignées ayant intégrées la forme courte (figure 6A). Les lignées exprimant la forme longue humaine de SCL sont SCL_{L1}, SCL_{L2} et SCL_{L3} (ou L1, L2 et L3) et les lignées exprimant la forme courte humaine de SCL sont SCL_{C4}, SCL_{C5}, SCL_{C6} et SCL_{C7} (ou C4, C5, C6 et C7).

Au niveau génomique, des analyses de buvardage de type Southern (données non présentées) ont été réalisées pour vérifier l'intégration des transgènes dans le génome murin d'une part et d'autre part pour estimer le nombre de copies de transgènes intégrés. Ces résultats suggèrent que la lignée L1 a intégré ~1 copie du transgène, L2 en a ~4 et L3 a ~10 copies. C4 et C5 ont ~4 copies du transgène, C6 a ~8 et C7 en a ~10 copies.

Au niveau transcriptionnel, Scl est normalement exprimé dans les mêmes lignées hématopoïétiques que Gata-1 soit dans les mégacaryocytes, les plaquettes, les érythrocytes et les mastocytes. Afin de confirmer l'expression des transgènes dans les cellules hématopoïétiques, l'expression des transcrits long et court de SCL a été quantifiée à partir des cellules totales de la moelle osseuse (M.O.). L'expression de SCL_L est à un niveau relatif d'environ 1.5 dans L1, ~40 dans L2 et ~1500 dans L3 (figure 6B). L'expression de SCL_C est à un niveau relatif d'environ 0.4 dans C4, ~0.9 dans C5, ~1.4 dans C6 et ~3.1 dans C7.

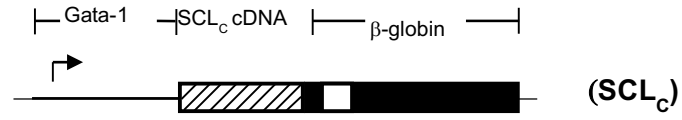
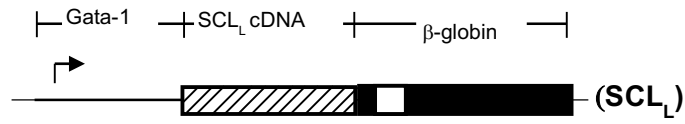
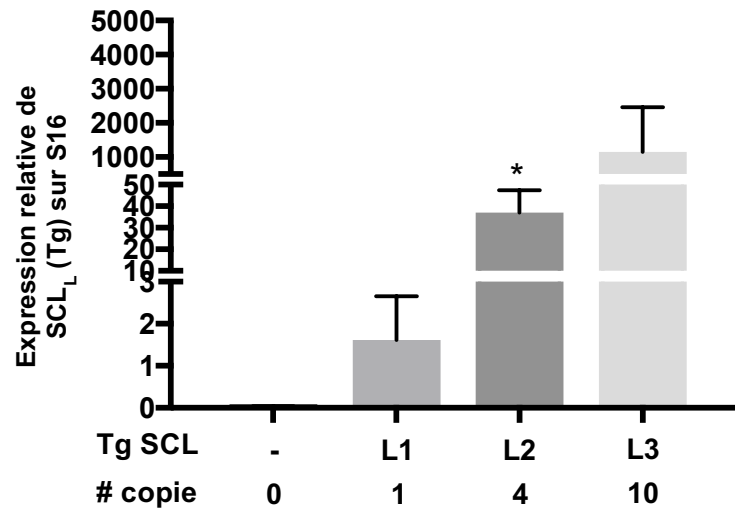
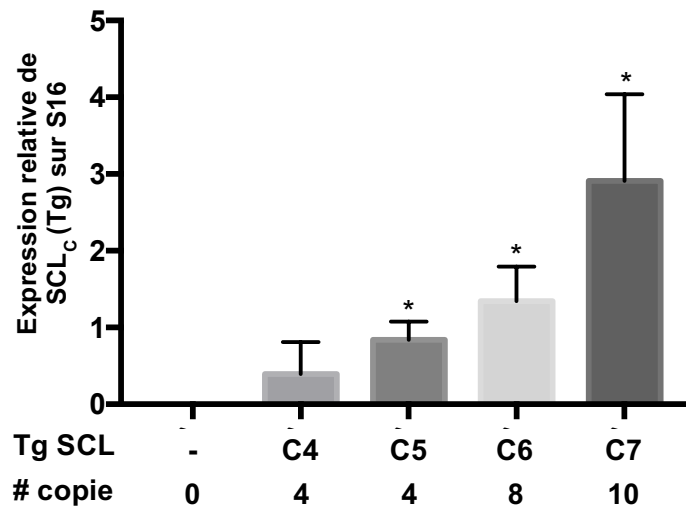
A**B****C**

Figure 6 : Structure et expression de SCL_L et SCL_C (Tg) chez les souris transgéniques

Légende de la figure 6 : (A) Représentation schématique des constructions de SCL_L et SCL_C (Tg) avec le promoteur et l'*enhancer* murin de *Gata-1* (1.087 kb : ligne noire) suivi de l'ADNc humain de SCL_L ou SCL_C (1.4 et 0.8 kb respectivement : carrés hachurés) et le fragment de β -globine humaine (1.684 kb: carré noir/blanc). Expression de SCL_L (B) et SCL_C (C) dans la moelle osseuse des souris transgéniques (n supérieur ou égal à 4 ; * : p < 0.05). La moelle osseuse des souris adultes (8-13 mois) a été récupérée et l'ARN provenant de l'ensemble des cellules hématopoïétiques a été extrait. Les niveaux d'expression des transgènes SCL_L et SCL_C a été quantifié par RT-qPCR et comparé aux souris avec la plus faible expression de chaque transgène (SCL_{L1} et SCL_{C4} respectivement). Le niveau d'expression est normalisé par rapport au gène de référence S16, qui est une sous-unité ribosomale dont l'expression est constante dans les cellules hématopoïétiques.

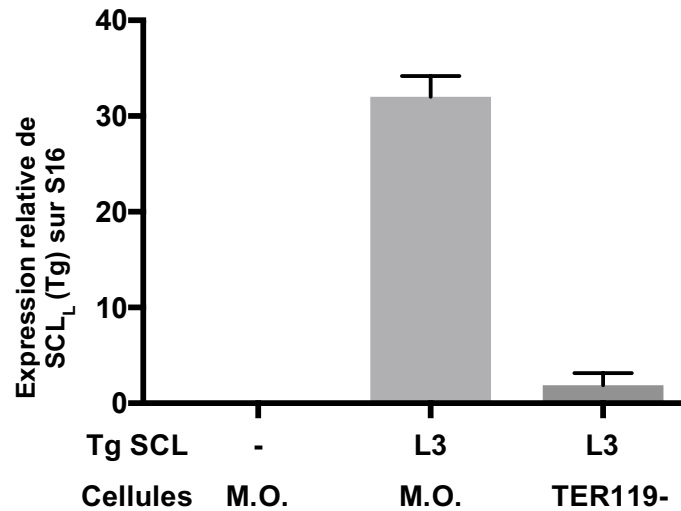
3.2. Les transcrits de SCL_L et SCL_C sont exprimés différemment dans les cellules hématopoïétiques des souris transgéniques

On détecte une expression des transgènes SCL_L et SCL_C dans la moelle osseuse totale des souris transgéniques (figures 6B et 6C respectivement). Cependant, pour obtenir une meilleure représentation de l'expression des transgènes dans la lignée mégacaryocytaire, les globules rouges ont été déplétés. L'analyse de l'expression des transgènes SCL_L et SCL_C dans les cellules de la moelle osseuse déplétées des globules rouges révèle une expression différente des transgènes entre les différentes lignées cellulaires.

Dans la lignée L3, l'expression de SCL_L dans les cellules de la M.O. est à un niveau relatif de ~32. Lorsqu'on déplete les globules rouges, ce niveau d'expression diminue de ~17 fois et passe à un niveau relatif de ~1.85 (figure 7A). Les globules rouges sont responsables de ~94.2% de l'expression (correspond à un niveau relatif de $\sim 30.15 = 32 - 1.85$).

De même dans la lignée C7, le niveau d'expression du transgène (SCL_C) passe de ~ 2472.2 dans la M.O. total à 455.9 dans les cellules TER119-. On observe une diminution de ~ 5 fois l'expression du transgène (figure 7B). Les globules rouges sont ici responsables de $\sim 81.6\%$ de l'expression de SCL_C (correspond à un niveau relatif de $\sim 2016.7 = 2472.6 - 455.9$).

A



B

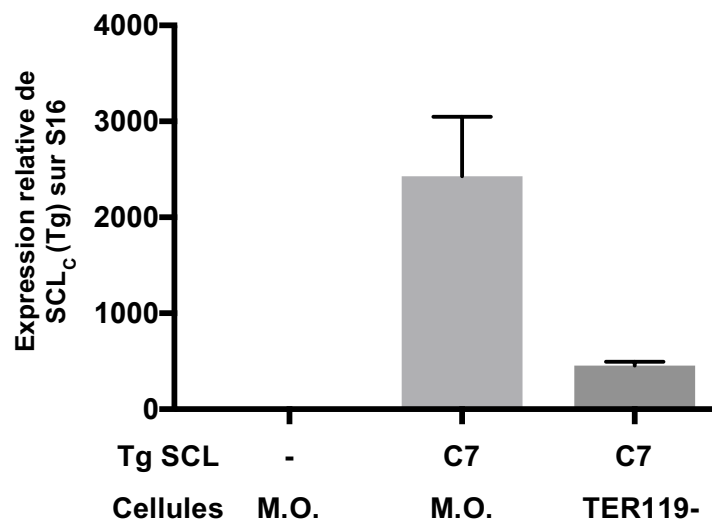


Figure 7 : Comparaison de l'expression de SCL_L et SCL_C (Tg) entre les cellules totales de la moelle osseuse et les cellules TER119-

Légende de la figure 7 : Expression de SCL_L (A) et SCL_C (B) dans les cellules totales de la M.O. et dans les cellules TER119- des souris transgéniques (n égale à 2). Les niveaux d'expression des transgènes SCL_L et SCL_C dans les cellules totales de la M.O. et dans des cellules de la M.O. déplétées des globules rouges (TER119-) a été quantifié par RT-qPCR.

3.3. L'expression de SCL_L et SCL_C module la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse chez les souris transgéniques

3.3.1. Compte des mégacaryocytes, des plaquettes et du temps de saignement

Dans le but d'élucider le rôle des 2 isoformes de SCL dans la différenciation des mégacaryocytes et des plaquettes et sur les capacités de coagulation des souris transgéniques, le compte des mégacaryocytes et des plaquettes a été réalisé et le temps de saignement a été évalué.

Les lignées (SCL_L) L1, L2 et L3 expriment significativement plus de mégacaryocytes dans la moelle osseuse que les souris sauvages. Le niveau basal de ~18 mégacaryocytes (pour 10⁶ cellules) est augmenté de ~1.3 fois (23 MKs), ~1.7 fois (30 MKs) et ~1.4 fois (25 MKs) dans les lignées transgéniques L1, L2 et L3 respectivement (figure 8A). Le niveau de plaquettes en circulation est également augmenté de ~2 fois, ~1.5 fois et ~2.5 fois dans les lignées L1, L2 et L3 respectivement (figure 8B). Enfin, le temps de saignement est diminué de ~45 secondes dans les 3 lignées (figure 8C). La sur-expression de l'isoforme long de SCL favorise donc la formation des mégacaryocytes et des plaquettes et permet une diminution du temps de saignement chez les souris transgéniques SCL_L adultes.

À l'opposé, les lignées (SCL_C) C4, C5, C6 et C7 expriment moins de mégacaryocytes que les contrôles. En effet, on observe une baisse ~50% du nombre de mégacaryocytes dans C6 et C7 et de plus de 50% dans C4 et C5 comparés aux souris sauvages (figure 8A). Le nombre de plaquettes (figure 8B) et le temps de saignement (figure 8C) dans ces souris transgéniques reste cependant inchangé. La sur-expression de la forme courte de SCL inhibe la formation des mégacaryocytes. Malgré cela, les 50% de mégacaryocytes restants dans ces souris parviennent quand même à produire un nombre physiologique de plaquettes fonctionnels. La sur-expression de l'isoforme tronquée de SCL (lignées C4 à C7) diminue le nombre de mégacaryocytes chez les souris transgéniques adultes. Cependant le niveau des autres paramètres analysés est relativement normal chez ces souris.

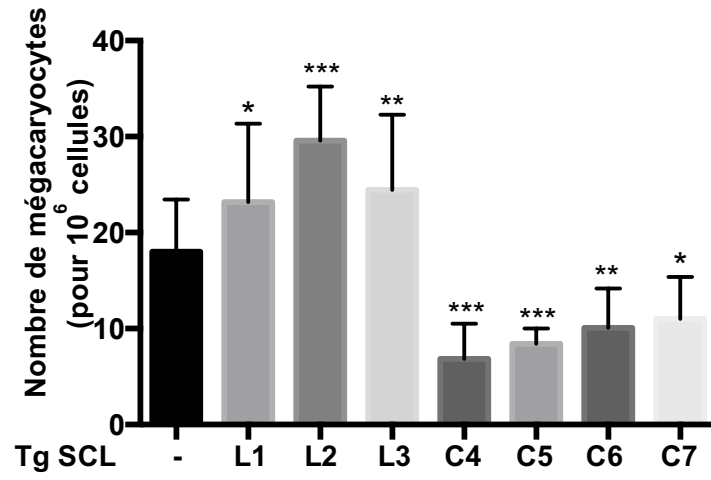
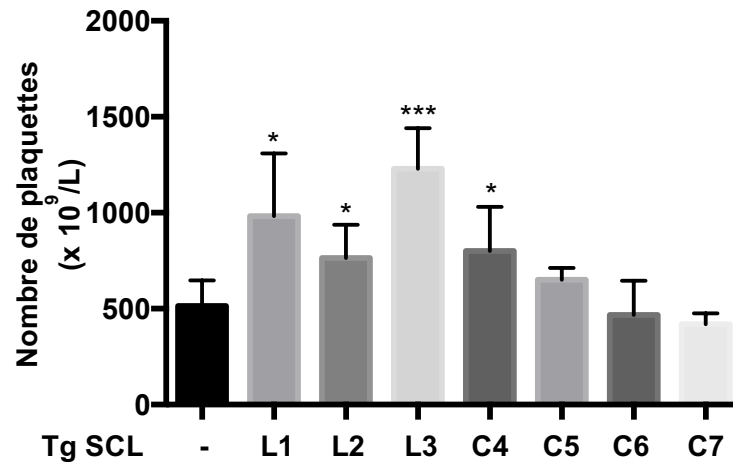
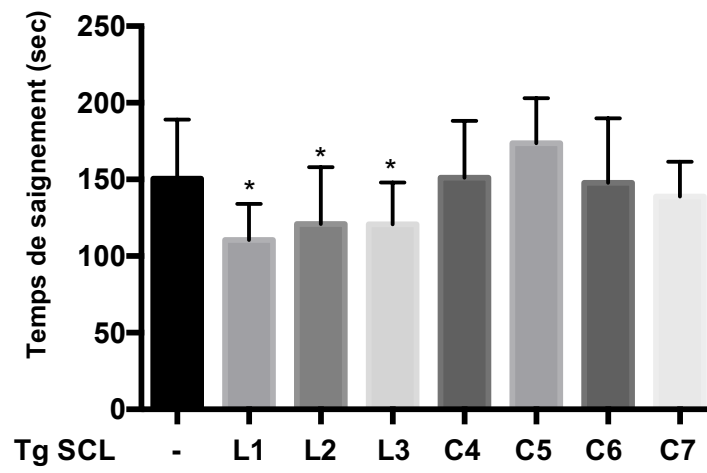
A**B****C**

Figure 8 : Mesure de la mégacaryopoïèse, la thrombopoïèse et du temps de saignement chez les souris transgéniques SCL_L et SCL_C

Légende de la figure 8 : (A) & (B) La moelle osseuse et le sang périphérique de souris transgéniques adultes (6-8 mois) ont été prélevés et les cellules des lignées mégacaryocytaires et plaquettaires ont été comptées respectivement. (C) Le temps de saignement a été évalué à partir du sang périphérique des souris transgéniques adultes. (N supérieur ou égal à 4 pour chaque lignée ; *: p < 0.05; **: p < 0.001 ; ***: p < 0.0001).

3.3.2. Ploïdie des cellules de la moelle osseuse

Pour mieux comprendre les mécanismes impliquant SCL dans la dérégulation du nombre de mégacaryocytes chez les souris transgéniques, la ploïdie des cellules de la moelle osseuse a été investiguée. Les populations 2N et 4N représentent un mélange de l'ensemble des cellules de la moelle osseuse. Cependant, les cellules 8N à 64N et plus (64N+) peuvent être assimilées à la population de mégacaryocytes. L'analyse du profil de polyploïdisation montre que dans les 2 lignées transgéniques SCL_{L1} et SCL_{C6}, il y a une modification de la proportion des cellules 8N, 32N (uniquement pour SCL_{C6}) et 64N+ comparé aux souris sauvages. En effet, chez les souris sauvages C57BL/6J, il y a 51.5% de cellules 8N, 20.6% de 16N, 10.5% de 32N et 17.4% de 64N+ (figure 9B). Dans la lignée SCL_{L1}, il y a 57.5% de 8N, 20.4% de 16N, 9.4% de 32N et 12.7% de 64N+ (figure 9B). Dans la lignée SCL_{C6}, il y a 58.9% de 8N, 20.3% de 16N, 9.1% de 32N et 11.6% de 64N+ (figure 9B). Cependant, la lignée SCL_{L1} exprime seulement 1 copie du transgène contre 4 et 10 copies pour les lignées SCL_{L2} et SCL_{L3} (respectivement) chez qui on n'observe pas de variation du profil de polyploïdisation. De même, SCL_{C6} exprime 8 copies du transgène contre 10 copies dans la lignée SCL_{C7} chez qui il n'y a pas non plus de variation du profil de polyploïdisation. Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de modifications du profil de polyploïdisation dans les lignées transgéniques SCL_L et SCL_C comparé aux souris sauvages.

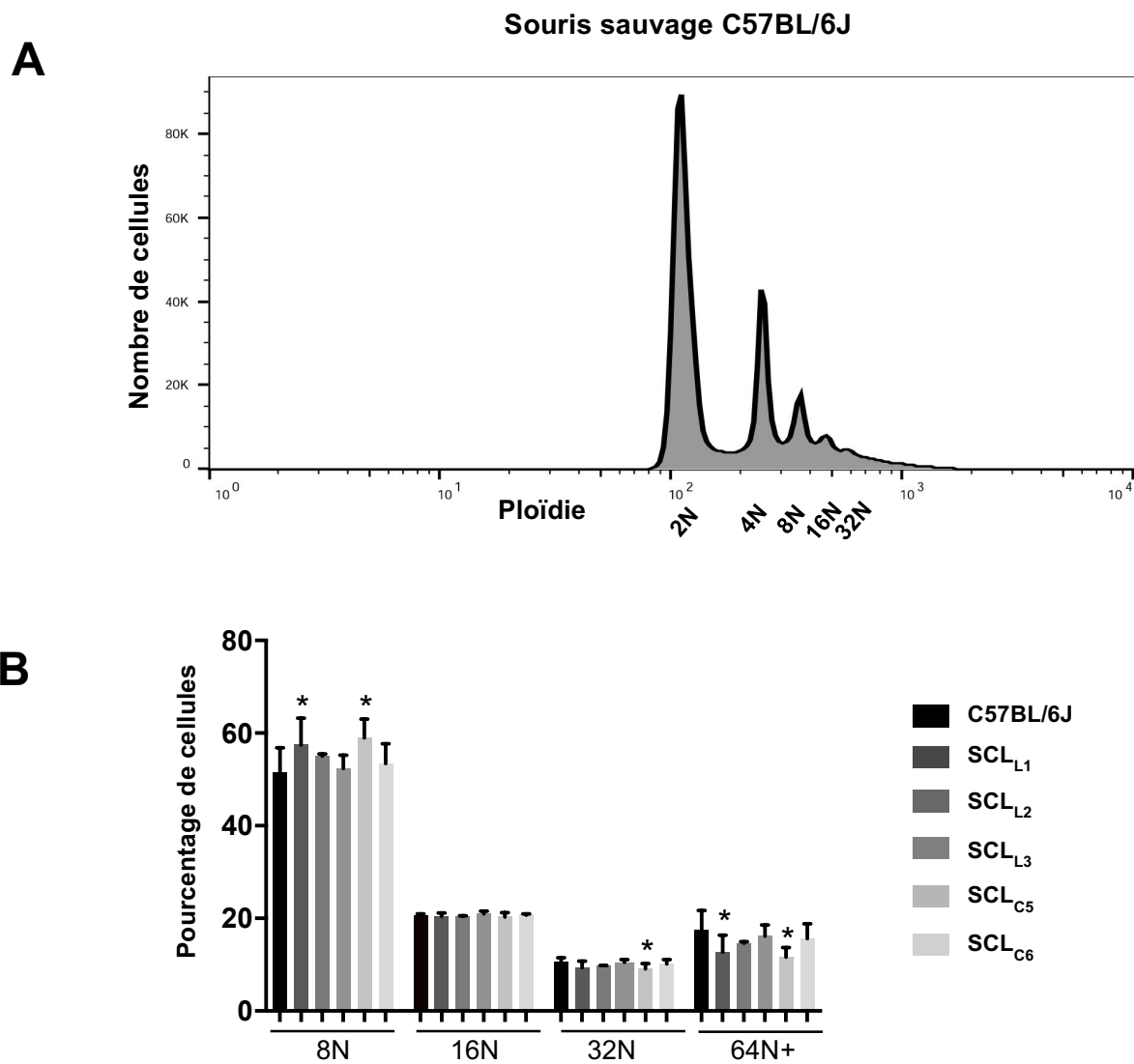


Figure 9 : Profil de polyploïdisation des cellules de la moelle osseuse

Légende de la figure 9 : (A) Histogramme représentant le profil de polyploïdisation des cellules de la M.O. chez une souris sauvage C57BL/6J par une coloration à l'iodure de propidium (P.I.) suivie d'une analyse de cytométrie en flux. (B) Graphique résumant le pourcentage de cellules 8N, 16N, 32N et 64N+ dans chaque lignée analysée (N supérieur ou égal à 4 pour chaque lignée ; *: $p < 0.05$).

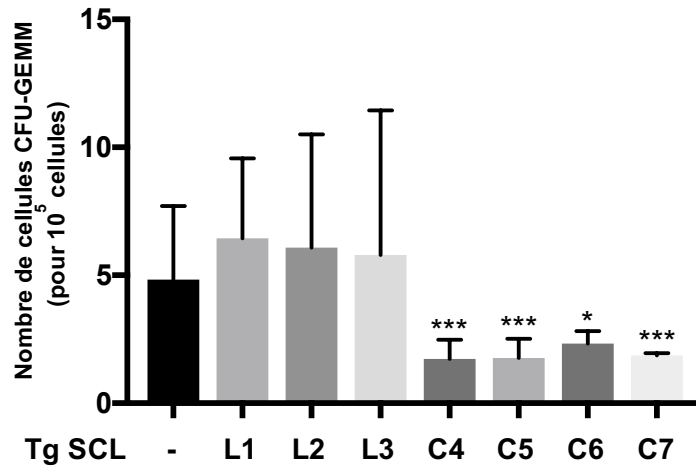
3.3.3. Culture de la moelle osseuse

La formation des précurseurs hématopoïétiques a été évaluée afin de déterminer d'une part si la sur-expression de SCL affecte la différenciation des précurseurs et d'autre part pour élucider à quel niveau de la différenciation hématopoïétique surviennent les dérégulations observées au niveau du nombre de cellules matures (mégacaryocytes et plaquettes). Les colonies CFU-GEMM sont les précurseurs myélo-érythroïdes les plus précoces. Ces derniers sont à l'origine des colonies BFU-E (donne CFU-E), CFU-GM (donne CFU-M et CFU-G), CFU-Meg, CFU-Eo et CFU-Ba. L'ensemble de ces cellules sont les précurseurs des cellules matures de la moelle osseuse.

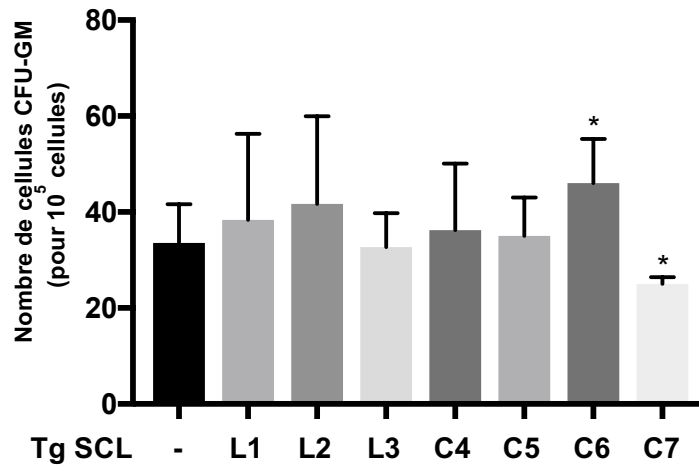
Les lignées (SCL_L) L1, L2 et L3 ont une augmentation (non significative) du nombre de colonies CFU-GEMM (figure 10A). Les niveaux des autres précurseurs dérivés des CFU-GEMM ne varient pas non plus de façon significative dans les lignées SCL_L (excepté une diminution des CFU-E dans la lignée L1) (figure 10C).

Les lignées (SCL_C) C4 à C7 ont une diminution de plus de 50% du nombre de colonies CFU-GEMM (figure 10A). Cependant, malgré cette baisse des colonies CFU-GEMM, le nombre de colonies CFU-M (données non présentées), BFU-E (données non présentées) et CFU-E ne varie pas significativement entre les lignées SCL_C et les contrôles. Le nombre de colonies CFU-GM augmente dans la lignée C6 mais diminue pour C7 (figure 10B).

A



B



C

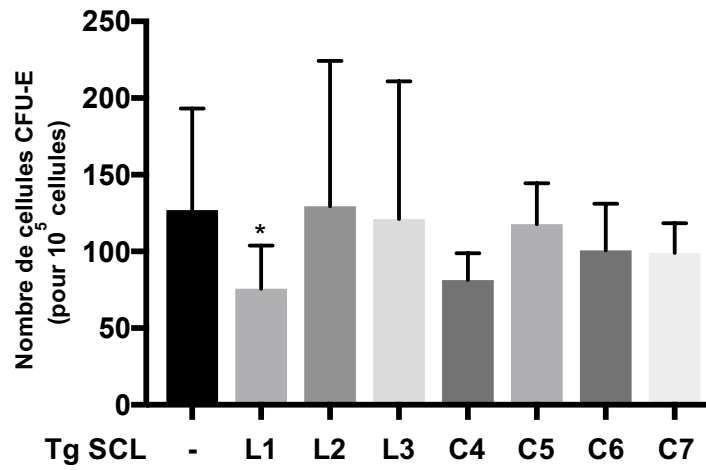


Figure 10 : Mesure de la formation des progéniteurs hématopoïétiques par des cultures de la moelle osseuse sur un milieu de méthyl cellulose.

Légende de la figure 10 : Le nombre de cellules CFU-GEMM (A), CFU-GM (B) et CFU-E (C) a été évalué dans les lignées transgéniques SCL_L et SCL_C et comparé aux souris non transgéniques C57BL/6J (n supérieur ou égal à 4 pour chaque lignée ; *: p < 0.05; ***: p < 0.0001).

3.4. L'expression de SCL_L et SCL_C module les voies de signalisation c-Mpl/TPO et c-Kit/SCF chez les souris transgéniques

Dans le but d'identifier les voies de signalisation qui régulent SCL ou bien régulées par SCL, l'investigation de 2 voies de signalisation de cytokines (c-Mpl/TPO et c-Kit/SCF) impliquées dans la différenciation des mégacaryocytes et des plaquettes a été entreprise. Pour cela, on réalise des tests de complémentation par des croisements entre les lignées c-Mpl^{-/-} et les lignées L1 à L3 et C4 à C7 (mêmes croisements avec les lignées c-Kit^{W41/W41}). Des analyses cytologiques *in vivo* de ces souris permettra de déterminer l'ordre d'action des différents facteurs étudiés (SCL, c-Mpl/TPO, c-Kit/SCF) dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse.

3.4.1. Analyses cytologiques des souris transgéniques SCL_L et SCL_C croisées avec les souris c-Mpl^{-/-}

La sur-expression de la forme longue de SCL (SCL_L) favorise la mégacaryopoïèse tandis que la sur-expression de la forme courte (SCL_C) inhibe cette production. Or, la voie de signalisation principalement impliquée dans la formation des mégacaryocytes est celle de c-Mpl/TPO. En effet, de nombreuses évidences de la littérature montrent qu'une déficience de c-Mpl cause une profonde déplétion dans les lignées mégacaryocytaires et plaquettaires.

Les souris c-Mpl^{-/-} ont un niveau résiduel de ~12.5% de mégacaryocytes, ~15% de plaquettes et un temps de saignement quasiment doublé comparés aux souris sauvages (figure 11).

Les souris c-Mpl^{-/-} sur-exprimant la forme longue de SCL (L2 et L3) n'ont pas de variation du nombre de mégacaryocytes ni de plaquettes (figure 11A et 11B). Cependant, le temps de saignement dans ces souris est quasiment doublé en comparaison aux souris c-Mpl^{-/-} (figure 11C).

Les souris c-Mpl^{-/-} sur-exprimant la forme courte de SCL (C4, C5 et C7) produisent 50% moins de mégacaryocytes que les souris c-Mpl^{-/-} (figure 11A) mais leur niveau de plaquettes est similaire à celui des souris c-Mpl^{-/-} (figure 11B). Par contre, leur temps de saignement est doublé (figure 11C).

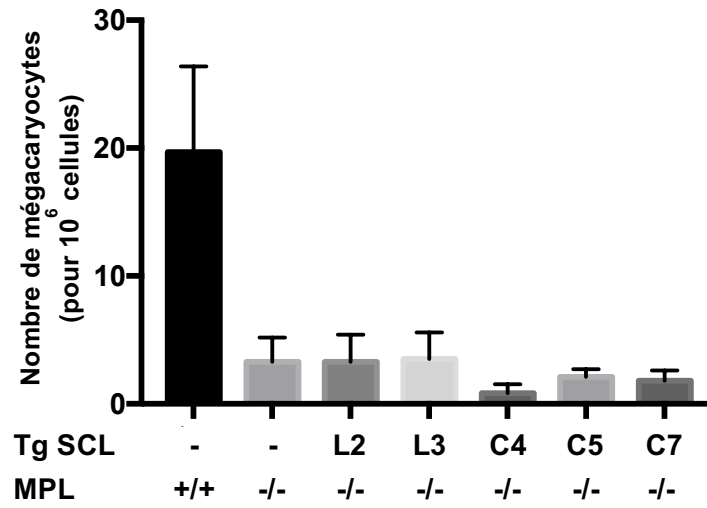
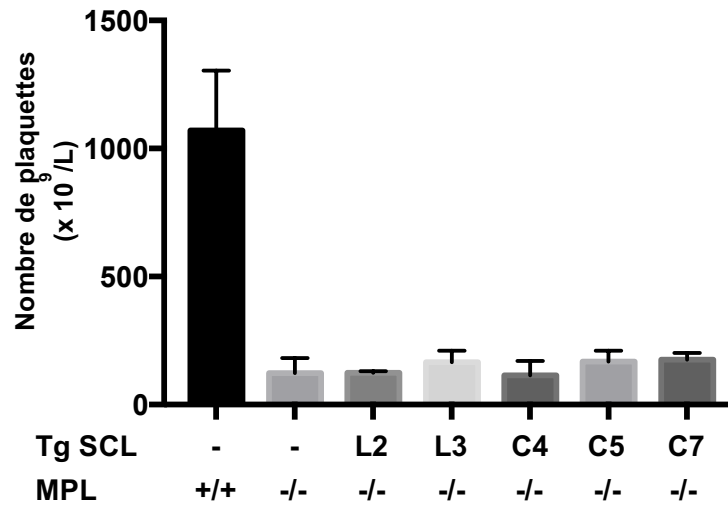
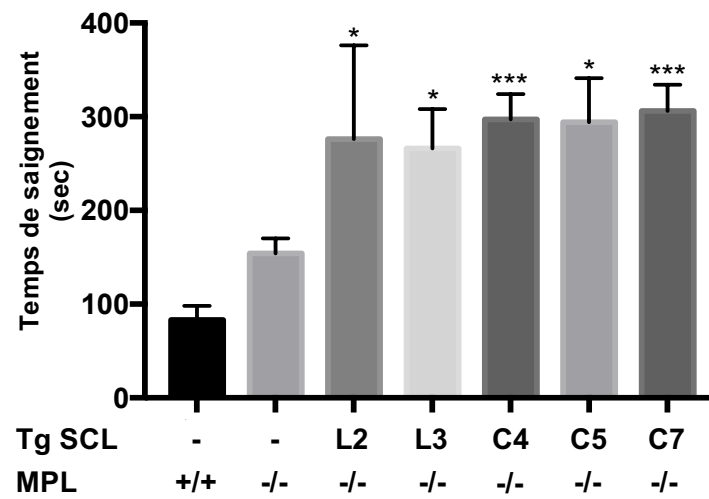
A**B****C**

Figure 11 : Mesure de la mégacaryopoïèse, la thrombopoïèse et le temps de saignement chez les souris transgéniques SCL_L et SCL_C croisées avec les souris c-Mpl^{-/-}

Légende de la figure 11 : Les souris c-Mpl^{-/-} exprimant les transgènes SCL_L et SCL_C ont été obtenues par des croisements binaires et le nombre de mégacaryocytes (A), le nombre de plaquettes (B) et le temps de saignement (C) de ces souris ont été évalués (n supérieur ou égal à 4 pour chaque lignée ; *: p < 0.05; ***: p < 0.0001).

3.4.2. Analyses cytologiques des souris transgéniques SCL_L et SCL_C croisées avec les souris c-Kit^{W41/W41}

La voie de signalisation c-Kit/SCF a aussi été investiguée pour son implication dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse. Les souris c-Kit^{W41/W41} produisent un mutant fonctionnel de la protéine c-Kit mais dont l'activité kinase est réduite. Ces souris produisent ~37.5% de mégacaryocytes, mais ont un niveau de plaquettes et un temps de saignement comparable aux lignées sauvages.

Les lignées c-Kit^{W41/W41} sur-exprimant la forme longue de SCL (L2 et L3) produisent autant de mégacaryocytes que les souris c-Kit^{W41/W41} (figure 12A). La production de plaquettes dans ces souris est diminuée et cette baisse est significative dans la lignée c-Kit^{W41/W41}SCL_{L2} (figure 12B). Le temps de saignement est par conséquent augmenté dans les souris c-Kit^{W41/W41}SCL_L et cette augmentation est significative dans la lignée c-Kit^{W41/W41}SCL_{L2} (figure 12C).

La production de mégacaryocytes des souris c-Kit^{W41/W41} sur-exprimant la forme courte de SCL est inchangé en comparaison aux souris c-Kit^{W41/W41}. Cependant, le niveau de plaquettes est diminué dans ces souris et cette diminution est significative dans la lignée c-Kit^{W41/W41}SCL_{C4}. Étonnamment, le temps de saignement de ces souris est similaire au temps de saignement des souris c-Kit^{W41/W41} ou significativement plus bas dans la lignée c-Kit^{W41/W41}SCL_{C4}.

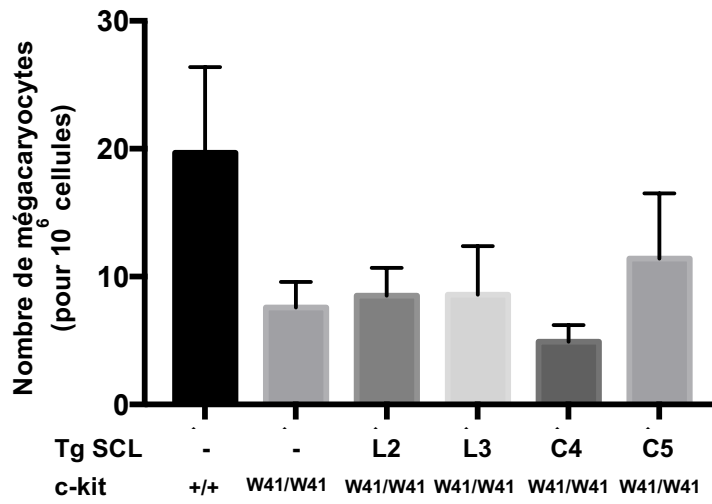
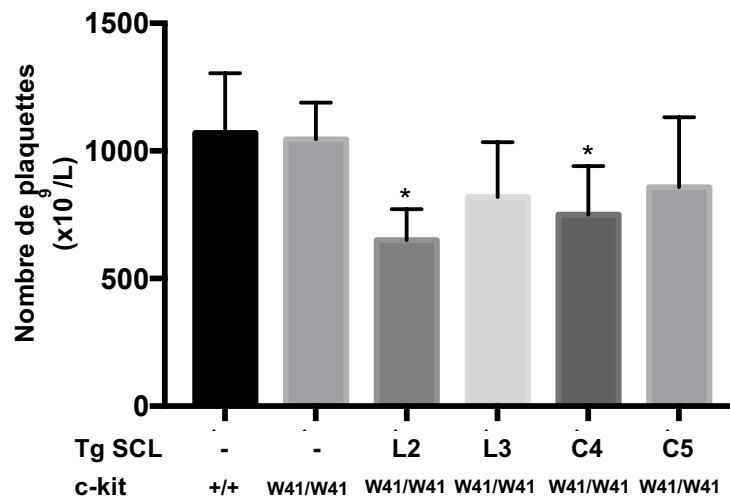
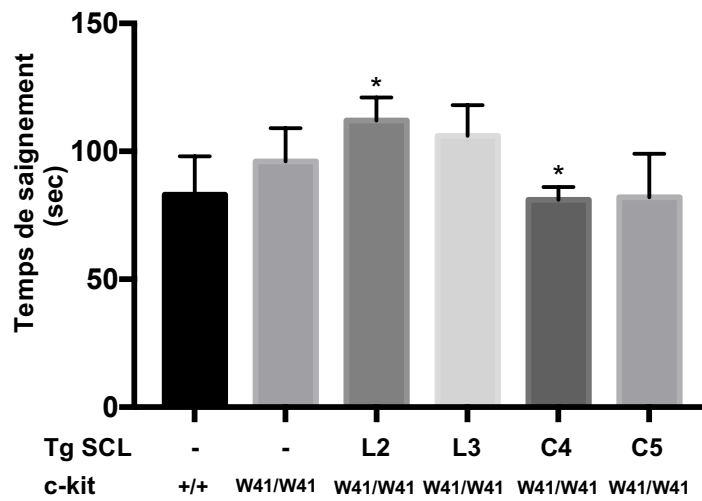
A**B****C**

Figure 12 : Mesure de la mégacaryopoïèse, la thrombopoïèse et le temps de saignement chez les souris transgéniques SCL_L et SCL_C croisées avec les souris c-Kit^{W41/W41}

Légende de la figure 12 : Les souris c-Kit^{W41/W41} exprimant les transgènes SCL_L et SCL_C ont été obtenues par des croisements binaires et le nombre de mégacaryocytes (A), le nombre de plaquettes (B) et le temps de saignement (C) de ces souris ont été évalués. (N supérieur ou égal à 4 pour chaque lignée ; *: p < 0.05)

3.5. L'expression de SCL_L et SCL_C module l'expression des transcrits de c-Mpl et c-Kit dans les mégacaryocytes transgéniques

Dans le but de mieux comprendre à quel niveau SCL_L et SCL_C régule les voies de signalisation c-Mpl/TPO et c-Kit/SCF, l'expression des transcrits endogènes murins de c-Mpl et c-Kit a été quantifiée à partir des cellules de la moelle osseuse déplétées des globules rouges. L'expression du facteur de transcription Gata-1 est également analysée.

L'expression de c-Mpl est réduite de presque la moitié dans la lignée transgénique SCL_{L1} mais ne varie pas de façon significative dans les autres lignées (figure 13A).

L'expression de c-Kit et de Gata-1 n'est pas significativement différente entre les souris transgéniques et les sauvages (figures 13B et 13C respectivement). Néanmoins, on peut observer une tendance à la baisse de l'expression de c-Kit dans les lignées L1, L2, L3 et C6.

L'ensemble de ces résultats suggère que la forme longue de SCL module c-Mpl et c-Kit et que la forme courte de SCL module c-Kit.

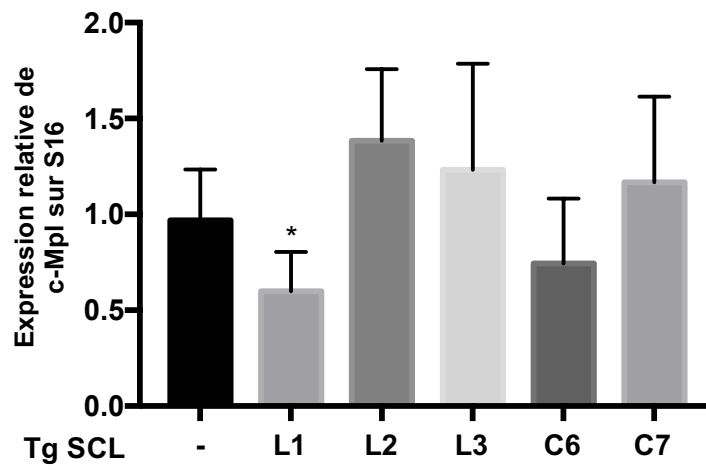
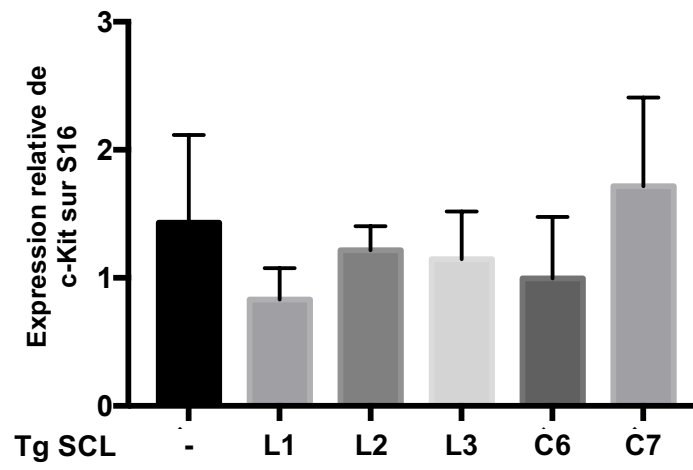
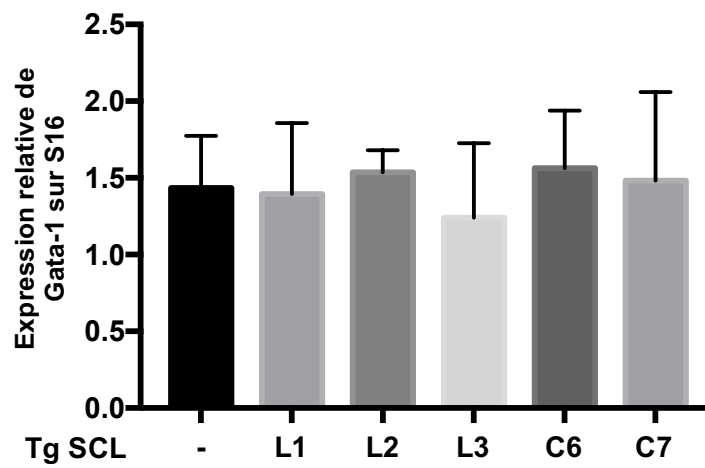
A**B****C**

Figure 13 : Quantification de l'expression des transcrits de c-Mpl, c-Kit et Gata-1 chez les souris transgéniques

Légende de la figure 13 : Les cellules totales de la moelle osseuse des souris transgéniques (SCL_L et SCL_C) et non transgéniques ont été récupérées et les globules rouges ont été déplétés avec l'anticorps TER119 par une approche MACS. L'ARN des cellules TER119- a été extrait et une RT-qPCR a été réalisée pour quantifier les niveaux d'expression de c-Mpl (**A**), c-Kit (**B**) et Gata-1 (**C**) (n supérieur ou égal à 4 pour chaque lignée ; *: p < 0.05).

Chapitre 4 : Discussion

4.1. Les transcrits de SCL_L et SCL_C sont exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques

L'analyse de l'expression des transgènes (SCL_L et SCL_C) dans les cellules hématopoïétiques indique que les niveaux d'expression des transgènes (long ou court) sont d'autant plus élevés que le nombre de copies de transgène intégrés dans le génome murin l'est (figure 6B et 6C). Ces résultats suggèrent que dans chacune des lignées, l'expression des transgènes est cumulative et permet d'obtenir un modèle unique de souris transgéniques présentant une « palette » de différents niveaux de sur-expression de chaque isoforme de SCL et ainsi permettre de caractériser les fonctions de SCL.

De plus, la comparaison de l'expression des transcrits de SCL_L et SCL_C entre l'ensemble des cellules de la moelle osseuse et les cellules de la moelle osseuse déplétées des globules rouges (TER119-) indique une expression différentielle des transgènes entre les différentes cellules hématopoïétiques (figure 7). Ainsi, ces résultats suggèrent que les transcrits SCL_L et SCL_C (contrôlés par les éléments régulateurs de Gata-1) sont beaucoup plus exprimés dans les globules rouges que dans les autres lignées hématopoïétiques. En effet, ces résultats vont de pair avec certaines données de la littérature suggérant une plus forte expression des transcrits de GATA-1 dans la lignée érythroïde K562 que dans la lignée mégacaryocytaire MEG 01 (37).

4.2. Les fonctions cellulaires de SCL

4.2.1. Modulation du potentiel prolifératif des cellules souches hématopoïétiques

L'hématopoïèse est un processus complexe assurant chaque jour la différenciation et le renouvellement des cellules sanguines. Les modèles conventionnels suggèrent qu'une cellule souche hématopoïétique a la capacité de se différencier en toutes les lignées cellulaires du sang (150) (figure 14). Ces propriétés ont principalement été établies en évaluant la capacité des cellules souches hématopoïétiques à former des colonies de multiples lignées cellulaires (CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-M, BFU-E, CFU-E et CFU-MK) sur un milieu semi solide. Cependant, des modèles récents remettent en cause ce dogme (151-154) et suggèrent qu'une cellule souche hématopoïétique peut déjà être engagée dans une voie de différenciation par un processus d'amorçage de la différenciation (figure 14). En plus de la capacité de donner toutes les cellules sanguines, les CSH ont des capacités de prolifération fortes et peuvent s'auto-renouveler ce qui maintient le pool de CSH.

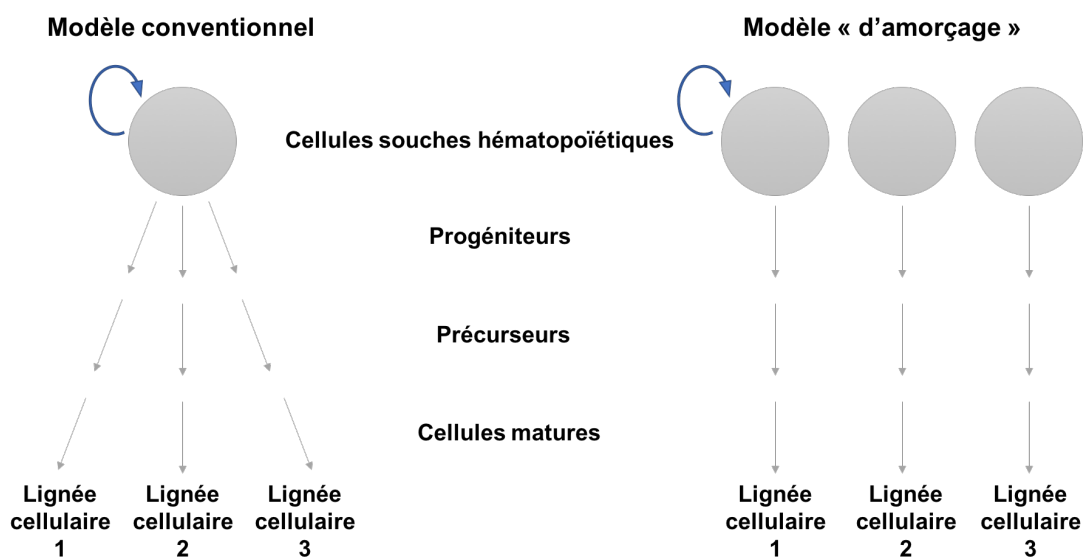


Figure 14 : Schéma représentatif des 2 modèles de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques

Légende de la figure 14 : Le modèle conventionnel de l'hématopoïèse est comparable à une pyramide dans laquelle les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se trouvent au sommet et desquels toutes les cellules sanguines du sang peuvent dériver. Le modèle « d'amorçage » suggère un engagement dans la différenciation déjà au stade de cellule souche hématopoïétique. La capacité d'autorenouveauement des CSH est représentée par une flèche bleue.

Le nombre de cellules CFU-GEMM tend à augmenter (non significatif) dans les souris SCL_L (figure 10). Ces résultats suggèrent que SCL_L favorise les capacités de prolifération des CFU-GEMM. Au niveau moléculaire, la sur-expression de SCL_L pourrait amplifier son action au niveau du promoteur de gènes impliqués dans l'expansion et le renouvellement des CSH tels que *c-Kit* (144) et *c-Mpl* (155).

À l'opposé, la sur-expression de SCL_C diminue le nombre de CFU-GEMM et suggère qu'au niveau moléculaire, SCL_C a une action de répression sur le promoteur des gènes impliqués dans la prolifération des CSH.

	SCL (long et court)	GATA-1	Ldb-1	LMO-2
Promoteur <i>c-Mpl</i>	+	++	+	Pas de données
Région -114 kb <i>c-Kit</i>	++	+++	+++	+++
Promoteur <i>c-Kit</i>	-	-	-	-

Figure 15 : Tableau résumant la présence ou non de SCL et ses partenaires au niveau des séquences régulatrices de *c-Mpl* et *c-Kit*.

Légende de la figure 15 : Les régions régulatrices de *c-Mpl* et *c-Kit* sont ciblées par SCL (l'anticorps utilisé pour détecter SCL reconnaît le domaine C-terminal de la protéine qui est commun aux 2 isoformes étudiés) et ses partenaires GATA-1, Ldb-1 et LMO-2 (113). Le tableau ci-dessus représente par des signes « + » ou « - » la présence (plus ou moins forte) ou l'absence des protéines SCL, GATA-1, Ldb-1 et LMO-2 au niveau du promoteur de *c-Mpl* et de *c-Kit*. La région -114 kb de *c-Kit* pourrait être une zone de régulation potentielle puisque tous les membres du complexe SCL s'y accumulent.

Ainsi, dans nos modèles transgéniques (SCL_L et SCL_C), la présence de SCL au niveau des séquences régulatrices de *c-Mpl* et *c-Kit* serait augmentée. En supposant que le niveau protéique des autres partenaires de SCL n'est pas limitant, la formation du complexe SCL serait aussi augmentée au niveau de ces régions ce qui pourrait moduler la transcription des récepteurs membranaires c-Mpl et c-Kit tel que suggéré par les figures 13A et 13B.

De plus, la légère augmentation du nombre de CFU-GEMM dans les souris SCL_L « profite » uniquement à la lignée mégacaryocytaire (figure 8A). Ces données vont donc en faveur du 2^e modèle de différenciation des cellules souches hématopoïétiques suggérant un amorçage d'un programme de différenciation favorisant la prolifération des CSH « destinées » à donner des mégacaryocytes. En effet, en considérant que le pool de CSH donnant des MKs est déjà prédéterminé et qu'en plus, l'expression de SCL_L favorise la prolifération de ces colonies, on peut expliquer l'augmentation du nombre de cellules dans la lignée des mégacaryocytes mais pas dans les autres lignées cellulaires (figure 14). De plus, l'évaluation des paramètres hématologiques (données non présentées) ne montre pas de variation conséquente du nombre de cellules matures dans les autres lignées hématopoïétiques (érythrocytes, lymphocytes...). Ce résultat va aussi en faveur du 2^e modèle et suggère que « l'excès » de CFU-GEMM se différencie uniquement en MKs; sinon, on obtiendrait une augmentation dans plusieurs lignées cellulaires dérivants des CFU-GEMM.

De façon similaire, pour les lignées SCL_C, la diminution des colonies CFU-GEMM (figure 10A) affecte uniquement les mégacaryocytes en réduisant leur nombre (figure 8A) et suggère un modèle d'amorçage de la différenciation (figure 14).

Au niveau moléculaire, les mécanismes menant au processus d'amorçage impliquent différents acteurs. Des données de la littérature suggèrent que des modifications épigénétiques de la chromatine sont à l'origine du processus d'amorçage. Ensuite, les facteurs de transcription dans des complexes protéiques assurent l'expression de gènes spécifiques et permettent l'engagement dans une voie de différenciation. Les signaux extérieurs (cytokines...) reçus par une cellule en différenciation ont aussi un rôle important dans la différenciation des cellules. En effet, au stade où les cellules sont encore multipotentes, elles expriment plusieurs récepteurs de cytokines spécifiques à différentes lignées cellulaires. C'est donc les cytokines environnantes qui vont influencer la différenciation (156, 157). Cette étude confirme le rôle critique des facteurs de transcription dans la différenciation des CSH et suggère en particulier que SCL aurait un rôle dans l'amorçage de la différenciation vers la lignée des mégacaryocytes.

4.2.2. Modulation de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse

Ainsi, la sur-expression de 2 isoformes de SCL présentant des différences dans leur domaine N terminal démontre d'une régulation différentielle de la mégacaryopoïèse par ces 2 formes de SCL. Alors que la sur-expression de l'isoforme long de SCL favorise la formation des mégacaryocytes, la sur-expression de l'isoforme tronqué du domaine de transactivation en N terminal l'inhibe. Les 2 isoformes de SCL ont donc un rôle opposé dans la formation des mégacaryocytes.

Comme attendu, la suite de la différenciation des mégacaryocytes en plaquettes (thrombopoïèse) est augmentée dans les lignées exprimant la forme longue de SCL (type B) et leur temps de saignement est diminué.

Quant aux souris exprimant la forme courte de SCL (type A), elles ont un niveau normal de plaquettes et un temps de saignement normal alors qu'on aurait pu s'attendre à une diminution de la thrombopoïèse. La compensation au niveau du nombre de plaquettes laisse penser que les mégacaryocytes des souris SCL_C passent par un processus de régulation qui leur permet de produire plus de plaquettes. En effet, chaque mégacaryocyte donne entre 1000 et 3000 plaquettes; et plus la ploïdie d'un mégacaryocyte est élevée, plus il donnera de plaquettes. En suggérant que dans les souris SCL_C , chaque mégacaryocyte se différencie en un nombre plus élevé de plaquettes, on peut expliquer les niveaux normaux de plaquettes dans ces souris malgré une diminution du nombre de mégacaryocytes. Ainsi, une augmentation dans le nombre de mégacaryocytes de ploïdie $32N$ et/ou $64N+$ pourrait expliquer la régulation du nombre de plaquettes dans les souris SCL_C . Cependant, l'analyse du profil de polyploïdisation des mégacaryocytes dans chacune des lignées transgéniques ne suggère pas d'augmentation du nombre de MKs à forte ploïdie. Ainsi, la régulation du nombre de plaquettes dans les souris transgéniques SCL_C se fait grâce à un autre mécanisme.

4.3. Les fonctions moléculaires de SCL : modulation des voies de signalisation c-Mpl/TPO et c-Kit/SCF

Dans cette partie, la discussion sera axée sur 2 cibles moléculaires potentielles de SCL : c-Mpl et c-Kit. Nous essayerons de comprendre l'action de SCL_L et SCL_C (activation ou répression) sur ces cibles et d'établir l'ordre d'action de ces facteurs.

4.3.1. La voie de signalisation c-Mpl/TPO

Comme discuté dans l'introduction (partie 1.3.1.3), la voie de signalisation c-Mpl/TPO est responsable de la production de ~85% des mégacaryocytes de la moelle osseuse. L'investigation de cette voie de signalisation apparaît donc comme critique pour cette étude étant donné les phénotypes observés dans la lignée mégacaryocytaire (figure 8A) et la présence de SCL au niveau du promoteur de *c-Mpl* (figure 15).

Au niveau moléculaire, si la quantité des récepteurs c-Mpl par cellule (progéniteurs ou mégacaryocytes) est modulée dans les lignées transgéniques (augmentée dans les souris SCL_L ou diminuée dans les souris SCL_C), alors *c-Mpl* pourrait être une cible de SCL. Par contre, si la quantité de récepteurs c-Mpl/cellule ne varie pas dans les souris transgéniques, alors, soit c-Mpl régule *SCL* et donc ils appartiennent à la même voie de signalisation ou soit c-Mpl et SCL sont indépendants. Dans le cas où c-Mpl régule *SCL*, en évaluant la formation des mégacaryocytes/plaquettes dans les souris SCL x c-Mpl^{-/-} (SCL_L x c-Mpl^{-/-} et SCL_C x c-Mpl^{-/-}), on s'attendrait à une restauration du phénotype observé dans les souris c-Mpl^{-/-}. Par contre, si c'est SCL qui régule *c-Mpl*, on n'attend aucun changement dans le phénotype observé dans les souris c-Mpl^{-/-}.

Dans nos croisements SCL x *c-Mpl*^{-/-}, on n'observe pas de restauration du nombre de mégacaryocytes/plaquettes (figure 11A et 11B). Ces résultats suggèrent donc que SCL régule *c-Mpl*. De plus, les analyses transcriptionnelles (figure 13A) montrent que la sur-expression de SCL_L tend à augmenter le niveau d'expression de *c-Mpl* dans les lignées SCL_{L2} et SCL_{L3} (qui expriment le plus grand nombre de copies du transgène) et suggère donc que SCL_L régule *c-Mpl*. L'expression de *c-Mpl* ne varie pas dans la lignée SCL_{C7} mais tend à la baisse dans SCL_{C6}. Ainsi, si SCL module le niveau d'expression des récepteurs *c-Mpl* à la membrane cellulaire (augmenté dans SCL_L et diminué dans SCL_C), on peut suggérer que ceci favorise l'activation ou l'inhibition de la voie de signalisation *c-Mpl*/TPO et de cette manière l'activation ou l'inhibition de la mégacaryopoïèse.

De plus, l'analyse du promoteur de *c-Mpl* dans les mégacaryocytes des souris transgéniques (SCL_L et SCL_C) permettrait d'évaluer la présence de SCL au niveau de ce promoteur et de confirmer que SCL régule *c-Mpl* dans nos lignées transgéniques. Aussi, la quantification des niveaux d'expression des formes endogènes longues et courtes de SCL dans les souris *c-Mpl*^{-/-} permettrait aussi de discuter sur la régulation de *c-Mpl* par SCL.

4.3.2. La voie de signalisation *c-Kit*/SCF

La voie de signalisation *c-Kit*/SCF a aussi été analysée pour son implication dans la différenciation des mégacaryocytes/plaquettes. De plus, l'investigation de cette voie de signalisation semble critique dans cette étude puisque les lignées *c-Kit*^{W^v/W^v} (mutant du domaine kinase de *c-Kit*) (158) et SCL_C ont toutes les 2 une baisse du nombre de mégacaryocytes mais une régulation au niveau de la production des plaquettes (figure 8A et 8B).

Au niveau moléculaire, si le nombre de récepteurs *c-Kit*/cellule est modulé dans nos lignées transgéniques (SCL_L et SCL_C), alors SCL régule *c-Kit*. À l'opposé, si le nombre de récepteurs *c-Kit*/cellule ne change pas, alors soit *SCL* est une cible de *c-Kit* soit *SCL* est indépendant de *c-Kit*. Dans le cas où *SCL* est une cible de *c-Kit*, dans les souris SCL x *c-Kit*^{W⁴¹/W⁴¹} (SCL_L x *c-Kit*^{W⁴¹/W⁴¹} et SCL_C x *c-Kit*^{W⁴¹/W⁴¹}), on s'attend à une restauration du nombre de mégacaryocytes/plaquettes.

Les résultats des croisements SCL x c-Kit^{W41/W41} montrent que le nombre de mégacaryocytes ne varie pas mais le nombre de plaquettes tend à la baisse en comparaison aux souris c-Kit^{W41/W41} (figure 12A et 12B). Ainsi, la sur-expression de SCL ne modifie pas significativement le niveau de mégacaryocytes/plaquettes dans les lignées transgéniques et va en faveur d'un modèle où SCL régule *c-Kit*. De plus, l'expression de c-Kit tend à la baisse dans les souris SCL_{L1}, SCL_{L2}, SCL_{L3} et SCL_{C6} et suggère également que SCL régule *c-Kit*. Pourtant, ces résultats sont en opposition avec des données de la littérature suggérant que l'absence de SCL ne modifie pas le niveau d'expression de c-Kit (159).

Il serait donc judicieux d'investiguer la présence de SCL au promoteur de *c-Kit* dans les mégacaryocytes des souris transgéniques (SCL_L et SCL_C) ainsi que l'expression des formes endogènes longues et courtes de SCL dans les souris c-Kit^{W41/W41} pour compléter cette étude et confirmer si SCL régule directement *c-Kit* ou non.

L'ensemble des résultats des tests de complémentation suggèrent donc que l'expression de SCL_L et SCL_C régule *c-Mpl* (figure 11) et donc par extension les voies de signalisation associées. Pour expliquer l'augmentation de la mégacaryopoïèse dans les lignées SCL_L (figure 8A), on pourrait suggérer un modèle dans lequel SCL_L favoriserait la production des récepteurs c-Mpl (figure 13A) ce qui aurait pour conséquence d'amplifier l'activation de cette voie de signalisation qui a un rôle majeur dans la formation des MKs. À l'inverse, l'expression de SCL_C réprimerait la formation des récepteurs c-Mpl (figure 13A) ce qui inhiberait l'activation de la voie de signalisation c-Mpl/TPO et donc la formation des mégacaryocytes chez les souris transgéniques SCL_C (figure 8A). De plus, on peut penser que la régulation de *c-Mpl* par SCL commence déjà dans les progéniteurs (lorsque les cellules commencent à exprimer SCL_L et SCL_C) ce qui va favoriser (dans les lignées SCL_L) ou réprimer (dans les lignées SCL_C) la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules progénitrices (figure 10A). Ainsi, on peut comprendre comment le reste de la mégacaryopoïèse est affectée par la modulation du nombre de cellules progénitrices initiales.

La voie de signalisation c-Kit/SCF semble également modulée par SCL_L et SCL_C (figures 12); mais les résultats présentés ne permettent pas de distinguer si SCL_L et SCL_C activent ou répriment cette voie.

Bien que les voies de signalisation c-Mpl/TPO et c-Kit/SCF sont 2 voies majeures dans la formation des mégacaryocytes, d'autres cytokines telles que les interleukines 1, 3, 6 et 11 et les voies de signalisation Notch (160) et Wnt (161) sont impliqués dans la modulation de la mégacaryopoïèse et leur investigation permettrait de comprendre l'ensemble des voies de signalisation régulées par SCL_L et SCL_C.

Conclusion

Ces études ont permis de mettre en évidence que la forme longue de SCL régule positivement la formation des mégacaryocytes en modulant la prolifération des progéniteurs *in vivo*. À l'opposé, la forme courte de SCL exerce une action négative sur la mégacaryopoïèse en modulant également les CSH. Pour se faire, chaque isoforme semble moduler différentes voies de signalisation.

En particulier, l'analyse de la voie de signalisation c-Mpl/TPO suggère que la forme longue de SCL (SCL_L) agit en amont de c-Mpl en favorisant sa transcription. La forme courte de SCL (SCL_C) agirait aussi en amont de c-Mpl mais cette fois-ci en inhibant la transcription de c-Mpl. La variation du nombre de récepteurs c-Mpl sur la membrane des progéniteurs (augmentation pour SCL_L et diminution pour SCL_C) entraînerait une activation plus ou moins forte de la voie de signalisation c-Mpl/TPO et affecterait la différenciation des progéniteurs en mégacaryocytes. Il serait donc intéressant d'évaluer le niveau d'expression membranaire de c-Mpl dans les lignées SCL_L et SCL_C pour confirmer que les niveaux protéiques de ce récepteur concordent avec les variations transcriptionnelles.

L'analyse de la voie de signalisation c-Kit/SCF suggère que les 2 formes de SCL régulent *c-Kit*. Cependant, l'action de SCL_L et SCL_C sur *c-Kit* n'est pas définie, bien que les niveaux transcriptionnels de c-Kit tendent à la baisse dans les lignées SCL_{L1}, SCL_{L2}, SCL_{L3} et SCL_{C6} suggérant une inhibition de SCL_L et SCL_C sur l'expression de *c-Kit*. Aussi, la régulation du nombre de plaquettes dans les souris SCL_C semble impliquer une baisse de l'expression de c-Kit et concorderait avec les analyses transcriptionnelles dans la lignée SCL_{C6}. Comme pour c-Mpl, l'analyse du niveau protéique de c-Kit à la membrane cellulaire permettrait de compléter cette étude.

Ainsi, ces études montrent que les 2 formes de SCL modulent différemment la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse par l'intermédiaire des voies de signalisation c-Mpl/TPO et c-Kit/SCF. L'investigation d'autres voies de signalisations, de cytokines (Il-3, Il-6) et facteurs

de transcription (Fli-1, Nfe-2, Gfi1b) impliqués dans la différenciation des mégacaryocytes, permettrait de déterminer l'ensemble des cibles des 2 formes de SCL et d'établir le réseau de régulation de la mégacaryopoïèse contrôlé par les 2 formes de SCL étudiées

Bibliographie

1. Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, et al. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood*. 1996;88(4):1284-96.
2. Briddell RA, Brandt JE, Straneva JE, Srouf EF, Hoffman R. Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood*. 1989;74(1):145-51.
3. Palis J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol*. 2014;5:3.
4. Haar JL, Ackerman GA. A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *The Anatomical record*. 1971;170(2):199-223.
5. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
6. Ferkowicz MJ, Yoder MC. Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Experimental hematology*. 2005;33(9):1041-7.
7. McGrath KE, Koniski AD, Malik J, Palis J. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood*. 2003;101(5):1669-76.
8. Travnickova J, Tran Chau V, Julien E, Mateos-Langerak J, Gonzalez C, Lelievre E, et al. Primitive macrophages control HSPC mobilization and definitive haematopoiesis. *Nat Commun*. 2015;6:6227.
9. Johnson GR, Moore MA. Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature*. 1975;258(5537):726-8.
10. Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development (Cambridge, England)*. 1999;126(22):5073-84.
11. Bethlenfalvay NC, Block M. Fetal erythropoiesis. Maturation in megaloblastic (yolk sac) erythropoiesis in the C 57 B1-6J mouse. *Acta haematologica*. 1970;44(4):240-5.
12. De la Chapelle A, Fantoni A, Marks PA. Differentiation of mammalian somatic cells: DNA and hemoglobin synthesis in fetal mouse yolk sac erythroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1969;63(3):812-9.
13. Sangiorgi F, Woods CM, Lazarides E. Vimentin downregulation is an inherent feature of murine erythropoiesis and occurs independently of lineage. *Development (Cambridge, England)*. 1990;110(1):85-96.
14. Kurata H, Mancini GC, Alespeiti G, Migliaccio AR, Migliaccio G. Stem cell factor induces proliferation and differentiation of fetal progenitor cells in the mouse. *Br J Haematol*. 1998;101(4):676-87.
15. Rich IN, Kubanek B. Erythroid colony formation (CFUe) in fetal liver and adult bone marrow and spleen from the mouse. *Blut*. 1976;33(3):171-80.
16. Bessis M, Mize C, Prenant M. Erythropoiesis: comparison of in vivo and in vitro amplification. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):155-74.
17. Mohandas N, Prenant M. Three-dimensional model of bone marrow. *Blood*. 1978;51(4):633-43.
18. Fraser ST, Isern J, Baron MH. Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression. *Blood*. 2007;109(1):343-52.

19. Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood*. 2004;104(1):19-25.
20. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(4):a011601.
21. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81(11):2844-53.
22. Long MW, Williams N, Ebbe S. Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor. *Blood*. 1982;59(3):569-75.
23. Gerrard JM, White JG, Rao GH, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am J Pathol*. 1976;83(2):283-98.
24. Nagata Y, Muro Y, Todokoro K. Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *The Journal of cell biology*. 1997;139(2):449-57.
25. Odell TT, Jr., Jackson CW, Friday TJ. Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy. *Blood*. 1970;35(6):775-82.
26. Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *Journal of cellular physiology*. 2002;190(1):7-20.
27. Heijnen HF, Debili N, Vainchenker W, Breton-Gorius J, Geuze HJ, Sixma JJ. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood*. 1998;91(7):2313-25.
28. Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *The Journal of cell biology*. 2010;191(4):861-74.
29. Italiano JE, Jr., Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *The Journal of cell biology*. 1999;147(6):1299-312.
30. Kaufman RM, Airo R, Pollack S, Crosby WH. Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung. *Blood*. 1965;26(6):720-31.
31. Welch JJ, Watts JA, Vakoc CR, Yao Y, Wang H, Hardison RC, et al. Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood*. 2004;104(10):3136-47.
32. Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*. 2002;21(21):3368-76.
33. Pang L, Weiss MJ, Poncz M. Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3332-8.
34. Yu M, Cantor AB. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis: an update on cytokines and lineage surface markers. *Methods Mol Biol*. 2012;788:291-303.
35. Shimizu R, Yamamoto M. Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(1):129-36.
36. Martin DI, Zon LI, Mutter G, Orkin SH. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*. 1990;344(6265):444-7.
37. Romeo PH, Prandini MH, Joulin V, Mignotte V, Prenant M, Vainchenker W, et al. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature*. 1990;344(6265):447-9.

38. Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*. 1989;339(6224):446-51.
39. Tsai SF, Strauss E, Orkin SH. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev*. 1991;5(6):919-31.
40. Nagai T, Harigae H, Ishihara H, Motohashi H, Minegishi N, Tsuchiya S, et al. Transcription factor GATA-2 is expressed in erythroid, early myeloid, and CD34+ human leukemia-derived cell lines. *Blood*. 1994;84(4):1074-84.
41. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 1994;371(6494):221-6.
42. Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(15):8811-6.
43. Trainor CD, Ghirlando R, Simpson MA. GATA zinc finger interactions modulate DNA binding and transactivation. *J Biol Chem*. 2000;275(36):28157-66.
44. Trainor CD, Omichinski JG, Vandergon TL, Gronenborn AM, Clore GM, Felsenfeld G. A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. *Mol Cell Biol*. 1996;16(5):2238-47.
45. Crossley M, Merika M, Orkin SH. Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Mol Cell Biol*. 1995;15(5):2448-56.
46. Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*. 1997;90(1):109-19.
47. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *The EMBO journal*. 1997;16(13):3965-73.
48. Vyas P, McDevitt MA, Cantor AB, Katz SG, Fujiwara Y, Orkin SH. Different sequence requirements for expression in erythroid and megakaryocytic cells within a regulatory element upstream of the GATA-1 gene. *Development (Cambridge, England)*. 1999;126(12):2799-811.
49. Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, et al. 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. *The EMBO journal*. 1997;16(11):3145-57.
50. Hsu HL, Huang L, Tsan JT, Funk W, Wright WE, Hu JS, et al. Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol*. 1994;14(2):1256-65.
51. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(22):12355-8.
52. Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*. 1991;349(6306):257-60.

53. Rylski M, Welch JJ, Chen YY, Letting DL, Diehl JA, Chodosh LA, et al. GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(14):5031-42.
54. Whyatt DJ, Karis A, Harkes IC, Verkerk A, Gillemans N, Elefanty AG, et al. The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes Funct.* 1997;1(1):11-24.
55. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood.* 1999;94(1):87-96.
56. Vyas P, Ault K, Jackson CW, Orkin SH, Shivdasani RA. Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood.* 1999;93(9):2867-75.
57. Orkin SH, Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA. Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. *Stem Cells.* 1998;16 Suppl 2:79-83.
58. Aplan PD, Begley CG, Bertness V, Nussmeier M, Ezquerra A, Coligan J, et al. The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol Cell Biol.* 1990;10(12):6426-35.
59. Begley CG, Robb L, Rockman S, Visvader J, Bockamp EO, Chan YS, et al. Structure of the gene encoding the murine SCL protein. *Gene.* 1994;138(1-2):93-9.
60. Leroy-Viard K, Vinit MA, Lecointe N, Mathieu-Mahul D, Romeo PH. Distinct DNase-I hypersensitive sites are associated with TAL-1 transcription in erythroid and T-cell lines. *Blood.* 1994;84(11):3819-27.
61. Begley CG, Visvader J, Green AR, Aplan PD, Metcalf D, Kirsch IR, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the murine homolog of the human helix-loop-helix gene SCL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991;88(3):869-73.
62. Elefanty AG, Begley CG, Hartley L, Papaevangelidou B, Robb L. SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood.* 1999;94(11):3754-63.
63. Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ. The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood.* 1994;83(5):1200-8.
64. Visvader JE, Fujiwara Y, Orkin SH. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev.* 1998;12(4):473-9.
65. Mouthon MA, Bernard O, Mitjavila MT, Romeo PH, Vainchenker W, Mathieu-Mahul D. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood.* 1993;81(3):647-55.
66. Begley CG, Aplan PD, Davey MP, Nakahara K, Tchorz K, Kurtzberg J, et al. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989;86(6):2031-5.
67. Green AR, Salvaris E, Begley CG. Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. *Oncogene.* 1991;6(3):475-9.
68. Pulford K, Lecointe N, Leroy-Viard K, Jones M, Mathieu-Mahul D, Mason DY. Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood.* 1995;85(3):675-84.
69. Hwang LY, Siegelman M, Davis L, Oppenheimer-Marks N, Baer R. Expression of the TAL1 proto-oncogene in cultured endothelial cells and blood vessels of the spleen. *Oncogene.* 1993;8(11):3043-6.

70. Sanchez M, Gottgens B, Sinclair AM, Stanley M, Begley CG, Hunter S, et al. An SCL 3' enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors. *Development (Cambridge, England)*. 1999;126(17):3891-904.
71. van Eekelen JA, Bradley CK, Gothert JR, Robb L, Elefanty AG, Begley CG, et al. Expression pattern of the stem cell leukaemia gene in the CNS of the embryonic and adult mouse. *Neuroscience*. 2003;122(2):421-36.
72. Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME, et al. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 1994;1218(2):129-35.
73. Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*. 1989;56(5):777-83.
74. Davis RL, Weintraub H. Acquisition of myogenic specificity by replacement of three amino acid residues from MyoD into E12. *Science*. 1992;256(5059):1027-30.
75. Cheng JT, Hsu HL, Hwang LY, Baer R. Products of the TAL1 oncogene: basic helix-loop-helix proteins phosphorylated at serine residues. *Oncogene*. 1993;8(3):677-83.
76. Goldfarb AN, Goueli S, Mickelson D, Greenberg JM. T-cell acute lymphoblastic leukemia--the associated gene SCL/tal codes for a 42-Kd nuclear phosphoprotein. *Blood*. 1992;80(11):2858-66.
77. Bockamp EO, McLaughlin F, Murrell AM, Gottgens B, Robb L, Begley CG, et al. Lineage-restricted regulation of the murine SCL/TAL-1 promoter. *Blood*. 1995;86(4):1502-14.
78. Bockamp EO, Fordham JL, Gottgens B, Murrell AM, Sanchez MJ, Green AR. Transcriptional regulation of the stem cell leukemia gene by PU.1 and Elf-1. *J Biol Chem*. 1998;273(44):29032-42.
79. Gottgens B, Barton LM, Gilbert JG, Bench AJ, Sanchez MJ, Bahn S, et al. Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers. *Nat Biotechnol*. 2000;18(2):181-6.
80. Sanchez MJ, Bockamp EO, Miller J, Gambardella L, Green AR. Selective rescue of early haematopoietic progenitors in Scl(-/-) mice by expressing Scl under the control of a stem cell enhancer. *Development (Cambridge, England)*. 2001;128(23):4815-27.
81. Sinclair AM, Gottgens B, Barton LM, Stanley ML, Pardanaud L, Klaine M, et al. Distinct 5' SCL enhancers direct transcription to developing brain, spinal cord, and endothelium: neural expression is mediated by GATA factor binding sites. *Dev Biol*. 1999;209(1):128-42.
82. Gottgens B, Nastos A, Kinston S, Piltz S, Delabesse EC, Stanley M, et al. Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *The EMBO journal*. 2002;21(12):3039-50.
83. Aplan PD, Nakahara K, Orkin SH, Kirsch IR. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *The EMBO journal*. 1992;11(11):4073-81.
84. Song SH, Hou C, Dean A. A positive role for NLI/Ldb1 in long-range beta-globin locus control region function. *Mol Cell*. 2007;28(5):810-22.
85. Tijssen MR, Cvejic A, Joshi A, Hannah RL, Ferreira R, Forrai A, et al. Genome-wide analysis of simultaneous GATA1/2, RUNX1, FLI1, and SCL binding in megakaryocytes identifies hematopoietic regulators. *Dev Cell*. 2011;20(5):597-609.
86. Love PE, Warzecha C, Li L. Ldb1 complexes: the new master regulators of erythroid gene transcription. *Trends Genet*. 2014;30(1):1-9.
87. Yung S, Ledran M, Moreno-Gimeno I, Conesa A, Montaner D, Dopazo J, et al. Large-scale transcriptional profiling and functional assays reveal important roles for Rho-GTPase

signalling and SCL during haematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Human molecular genetics*. 2011;20(24):4932-46.

88. Real PJ, Ligeró G, Ayllón V, Ramos-Mejía V, Bueno C, Gutiérrez-Aranda I, et al. SCL/TAL1 regulates hematopoietic specification from human embryonic stem cells. *Mol Ther*. 2012;20(7):1443-53.

89. Green AR, DeLuca E, Begley CG. Antisense SCL suppresses self-renewal and enhances spontaneous erythroid differentiation of the human leukaemic cell line K562. *The EMBO journal*. 1991;10(13):4153-8.

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

91. Robb L, Lyons I, Li R, Hartley L, Kontgen F, Harvey RP, et al. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(15):7075-9.

92. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature*. 1995;373(6513):432-4.

93. Robb L, Elwood NJ, Elefanty AG, Kontgen F, Li R, Barnett LD, et al. The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *The EMBO journal*. 1996;15(16):4123-9.

94. Brand M, Ranish JA, Kummer NT, Hamilton J, Igarashi K, Francastel C, et al. Dynamic changes in transcription factor complexes during erythroid differentiation revealed by quantitative proteomics. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11(1):73-80.

95. Song SH, Kim A, Ragoczy T, Bender MA, Groudine M, Dean A. Multiple functions of Ldb1 required for beta-globin activation during erythroid differentiation. *Blood*. 2010;116(13):2356-64.

96. Toscano MG, Navarro-Montero O, Ayllón V, Ramos-Mejía V, Guerrero-Carreno X, Bueno C, et al. SCL/TAL1-mediated transcriptional network enhances megakaryocytic specification of human embryonic stem cells. *Mol Ther*. 2015;23(1):158-70.

97. Valtieri M, Tocci A, Gabbianelli M, Luchetti L, Masella B, Vitelli L, et al. Enforced TAL-1 expression stimulates primitive, erythroid and megakaryocytic progenitors but blocks the granulopoietic differentiation program. *Cancer Res*. 1998;58(3):562-9.

98. Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, Elefanty AG, Sourris K, Robb L, et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(3):992-7.

99. McCormack MP, Hall MA, Schoenwaelder SM, Zhao Q, Ellis S, Prentice JA, et al. A critical role for the transcription factor Scl in platelet production during stress thrombopoiesis. *Blood*. 2006;108(7):2248-56.

100. Semerad CL, Mercer EM, Inlay MA, Weissman IL, Murre C. E2A proteins maintain the hematopoietic stem cell pool and promote the maturation of myelolymphoid and myeloerythroid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(6):1930-5.

101. Herblot S, Steff AM, Hugo P, Aplan PD, Hoang T. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol*. 2000;1(2):138-44.

102. Feroni L, Boehm T, White L, Forster A, Sherrington P, Liao XB, et al. The rhombotin gene family encode related LIM-domain proteins whose differing expression suggests multiple roles in mouse development. *J Mol Biol.* 1992;226(3):747-61.
103. Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ, Rabbitts TH. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein *rbtn2* is essential for erythroid development. *Cell.* 1994;78(1):45-57.
104. Yamada Y, Warren AJ, Dobson C, Forster A, Pannell R, Rabbitts TH. The T cell leukemia LIM protein *Lmo2* is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95(7):3890-5.
105. Yamada Y, Pannell R, Forster A, Rabbitts TH. The oncogenic LIM-only transcription factor *Lmo2* regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000;97(1):320-4.
106. Matthews JM, Visvader JE. LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. *EMBO Rep.* 2003;4(12):1132-7.
107. Mukhopadhyay M, Teufel A, Yamashita T, Agulnick AD, Chen L, Downs KM, et al. Functional ablation of the mouse *Ldb1* gene results in severe patterning defects during gastrulation. *Development (Cambridge, England).* 2003;130(3):495-505.
108. Mignotte V, Vigon I, Boucher de Crevecoeur E, Romeo PH, Lemarchandel V, Chretien S. Structure and transcription of the human *c-mpl* gene (MPL). *Genomics.* 1994;20(1):5-12.
109. Alexander WS, Dunn AR. Structure and transcription of the genomic locus encoding murine *c-Mpl*, a receptor for thrombopoietin. *Oncogene.* 1995;10(4):795-803.
110. Vigon I, Florindo C, Fichelson S, Guenet JL, Mattei MG, Souyri M, et al. Characterization of the murine *Mpl* proto-oncogene, a member of the hematopoietic cytokine receptor family: molecular cloning, chromosomal location and evidence for a function in cell growth. *Oncogene.* 1993;8(10):2607-15.
111. Souyri M, Vigon I, Penciolelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell.* 1990;63(6):1137-47.
112. Jackers P, Szalai G, Moussa O, Watson DK. Ets-dependent regulation of target gene expression during megakaryopoiesis. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52183-90.
113. Tripic T, Deng W, Cheng Y, Zhang Y, Vakoc CR, Gregory GD, et al. SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes. *Blood.* 2009;113(10):2191-201.
114. Foster DC, Sprecher CA, Grant FJ, Kramer JM, Kuijper JL, Holly RD, et al. Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994;91(26):13023-7.
115. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the *c-Mpl* ligand thrombopoietin. *Nature.* 1994;369(6481):568-71.
116. Drachman JG, Sabath DF, Fox NE, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood.* 1997;89(2):483-92.
117. Bianchi E, Norfo R, Pennucci V, Zini R, Manfredini R. Genomic landscape of megakaryopoiesis and platelet function defects. *Blood.* 2016;127(10):1249-59.

118. Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood*. 1996;87(6):2162-70.
119. de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, Ryan A, Dowd M, Eaton DL, et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med*. 1996;183(2):651-6.
120. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*. 1994;369(6481):533-8.
121. Zeigler FC, de Sauvage F, Widmer HR, Keller GA, Donahue C, Schreiber RD, et al. In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 1994;84(12):4045-52.
122. Lev S, Blechman JM, Givol D, Yarden Y. Steel factor and c-kit protooncogene: genetic lessons in signal transduction. *Crit Rev Oncog*. 1994;5(2-3):141-68.
123. Andre C, Martin E, Cornu F, Hu WX, Wang XP, Galibert F. Genomic organization of the human c-kit gene: evolution of the receptor tyrosine kinase subclass III. *Oncogene*. 1992;7(4):685-91.
124. Giebel LB, Strunk KM, Holmes SA, Spritz RA. Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene*. 1992;7(11):2207-17.
125. Yasuda H, Galli SJ, Geissler EN. Cloning and functional analysis of the mouse c-kit promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;191(3):893-901.
126. Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature*. 1988;335(6185):88-9.
127. Mayrhofer G, Gadd SJ, Spargo LD, Ashman LK. Specificity of a mouse monoclonal antibody raised against acute myeloid leukaemia cells for mast cells in human mucosal and connective tissues. *Immunol Cell Biol*. 1987;65 (Pt 3):241-50.
128. Nocka K, Majumder S, Chabot B, Ray P, Cervone M, Bernstein A, et al. Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev*. 1989;3(6):816-26.
129. Andre C, d'Auriol L, Lacombe C, Gisselbrecht S, Galibert F. c-kit mRNA expression in human and murine hematopoietic cell lines. *Oncogene*. 1989;4(8):1047-9.
130. Keshet E, Lyman SD, Williams DE, Anderson DM, Jenkins NA, Copeland NG, et al. Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *The EMBO journal*. 1991;10(9):2425-35.
131. Majumder S, Brown K, Qiu FH, Besmer P. c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Mol Cell Biol*. 1988;8(11):4896-903.
132. Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, Saad A, Cote R, Cordon-Cardo C. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 1994;42(11):1417-25.
133. Natali PG, Nicotra MR, Sures I, Santoro E, Bigotti A, Ullrich A. Expression of c-kit receptor in normal and transformed human nonlymphoid tissues. *Cancer Res*. 1992;52(22):6139-43.

134. Krosil G, He G, Lefrancois M, Charron F, Romeo PH, Jolicoeur P, et al. Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J Exp Med*. 1998;188(3):439-50.
135. Lecuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, Martin R, Begley CG, Porcher C, et al. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood*. 2002;100(7):2430-40.
136. Jacobsen FW, Veiby OP, Stokke T, Jacobsen SE. TNF-alpha bidirectionally modulates the viability of primitive murine hematopoietic progenitor cells in vitro. *J Immunol*. 1996;157(3):1193-9.
137. Keller JR, Jacobsen SE, Dubois CM, Hestdal K, Ruscetti FW. Transforming growth factor-beta: a bidirectional regulator of hematopoietic cell growth. *Int J Cell Cloning*. 1992;10(1):2-11.
138. Konig A, Corbacioglu S, Ballmaier M, Welte K. Downregulation of c-kit expression in human endothelial cells by inflammatory stimuli. *Blood*. 1997;90(1):148-55.
139. Sillaber C, Strobl H, Bevec D, Ashman LK, Butterfield JH, Lechner K, et al. IL-4 regulates c-kit proto-oncogene product expression in human mast and myeloid progenitor cells. *J Immunol*. 1991;147(12):4224-8.
140. Taniguchi S, Dai CH, Price JO, Krantz SB. Interferon gamma downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells. *Blood*. 1997;90(6):2244-52.
141. Welham MJ, Schrader JW. Modulation of c-kit mRNA and protein by hemopoietic growth factors. *Mol Cell Biol*. 1991;11(5):2901-4.
142. Ropers HH, Craig IW. Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 12 and 13. *Cytogenet Cell Genet*. 1989;51(1-4):259-79.
143. Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*. 1990;63(1):203-11.
144. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*. 1997;90(4):1345-64.
145. Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*. 1998;91(4):1101-34.
146. Carlino MS, Todd JR, Rizos H. Resistance to c-Kit inhibitors in melanoma: insights for future therapies. *Oncoscience*. 2014;1(6):423-6.
147. Li CL, Johnson GR. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood*. 1994;84(2):408-14.
148. Mintz B, Russell ES. Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J Exp Zool*. 1957;134(2):207-37.
149. Dubreuil P, Rottapel R, Reith AD, Forrester L, Bernstein A. The mouse W/c-kit locus. A mammalian gene that controls the development of three distinct cell lineages. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;599:58-65.
150. Brown G, Hughes PJ, Michell RH, Rolink AG, Ceredig R. The sequential determination model of hematopoiesis. *Trends Immunol*. 2007;28(10):442-8.
151. Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, et al. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*. 2013;154(5):1112-26.
152. Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*. 2016;351(6269):aab2116.

153. Velten L, Haas SF, Raffel S, Blaszkiewicz S, Islam S, Hennig BP, et al. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol.* 2017;19(4):271-81.
154. Nimmo RA, May GE, Enver T. Primed and ready: understanding lineage commitment through single cell analysis. *Trends Cell Biol.* 2015;25(8):459-67.
155. Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95(3):1195-200.
156. Kontaraki J, Chen HH, Riggs A, Bonifer C. Chromatin fine structure profiles for a developmentally regulated gene: reorganization of the lysozyme locus before trans-activator binding and gene expression. *Genes Dev.* 2000;14(16):2106-22.
157. Bottardi S, Bourgoin V, Pierre-Charles N, Milot E. Onset and inheritance of abnormal epigenetic regulation in hematopoietic cells. *Human molecular genetics.* 2005;14(4):493-502.
158. Ebbe S, Phalen E, Stohlman F, Jr. Abnormalities of megakaryocytes in W-WV mice. *Blood.* 1973;42(6):857-64.
159. Elefanty AG, Robb L, Birner R, Begley CG. Hematopoietic-specific genes are not induced during *in vitro* differentiation of scl-null embryonic stem cells. *Blood.* 1997;90(4):1435-47.
160. Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Sakano S, et al. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2000;192(9):1365-72.
161. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.* 2003;423(6938):409-14.

Annexe 1 : Résultats supplémentaires

Détermination de l'efficacité et de la spécificité des oligos utilisés pour c-Mpl, c-Kit et Gata-1

L'efficacité des oligos utilisés pour c-Mpl, c-Kit et Gata-1 a été déterminée à partir des courbes standards obtenues suite à une analyse qPCR (figure 15). L'efficacité est de ~105% pour c-Mpl, ~116% pour c-Kit et ~105% pour Gata-1. Une efficacité de ~100% est optimale et est équivalente à un doublement des produits à chaque cycle de qPCR. Cette analyse permet d'affirmer que les différences observées entre les lignées ne sont pas causées par une efficacité différentielle des oligos.

Les courbes de fusion de c-Mpl, c-Kit et Gata-1 permettent de déterminer la spécificité des oligos et montrent un seul pic pour chaque couple d'oligos. Ces données indiquent qu'il n'y a qu'un seul produit d'amplification pour chaque couple d'amorces. Ainsi, ce résultat permet d'affirmer que seuls les transcrits ciblés par les oligos sont amplifiés. Cela suggère qu'il n'y a pas d'autres amplifications qui pourraient fausser les niveaux d'amplification du transcrit réellement ciblé.

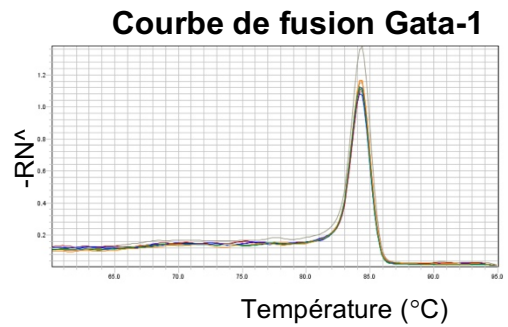
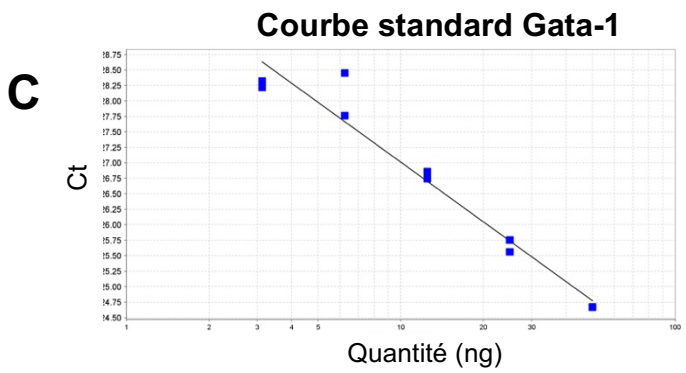
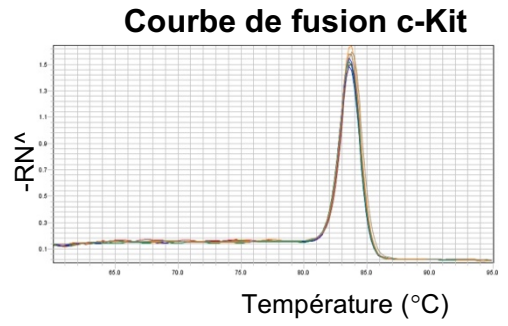
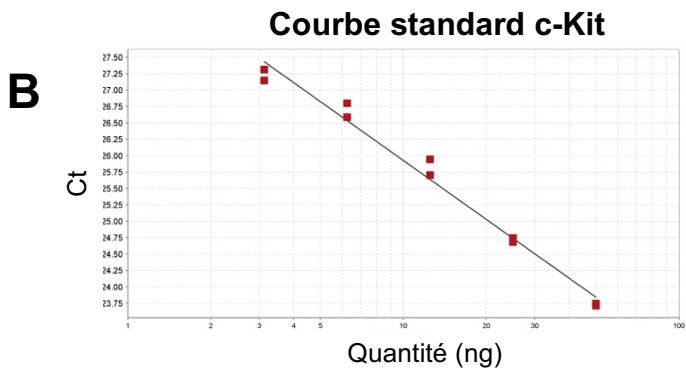
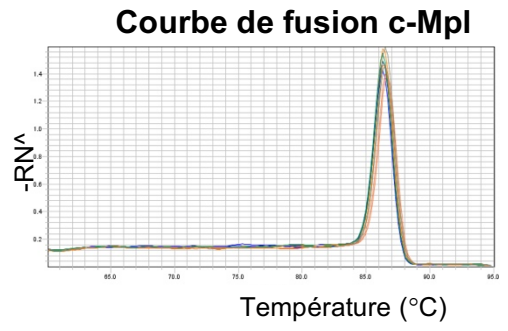
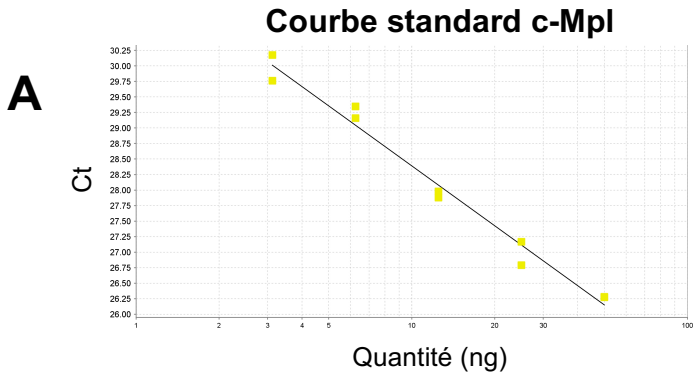


Figure 16 : Courbes standards et de fusions des oligos utilisés pour c-Mpl, c-Kit et Gata-1

Légende de la figure 16 : Une qPCR est réalisée pour déterminer l'efficacité des oligos utilisés pour c-Mpl (**A**), c-Kit (**B**) et Gata-1 (**C**). Un mélange contenant une quantité équimolaire de tous les échantillons de cDNA analysés est préparé et 5 dilutions en série sont faites (50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6.25 ng et 3.125 ng). L'efficacité de chaque oligo est calculé à partir des courbes standards et les valeurs sont données par le logiciel Quant Studio. L'efficacité est de ~105% pour c-Mpl, ~116% pour c-Kit et ~105% pour Gata-1.

Annexe 2 : Permissions d'utilisation des figures (Licences)

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1 : Schéma du système hématopoïétique ; Licence n° 4217160358924

Figure 2 : Représentation schématique du gène de Scl et des transcrits long et court chez la souris ; Licence n° 4242060537575

Figure 3 : Représentation schématique du complexe protéique formé par SCL, E2A, GATA-1, LMO-2 et LDB-1 ; Licence n° 4246010732756

Figure 4 : Schéma de la voie de signalisation c-mpl/TPO ; Licence n° 4242060281016

Annexe 3 : Autres contributions scientifiques

En plus de mon projet de recherche principal, j'ai eu l'opportunité de contribuer à 2 autres projets qui ont aboutis à 2 publications ; une revue de méthodes d'analyses des paramètres érythroïdes chez la souris et un article en collaboration sur l'anémie falciforme.

Approaches for Analysis of Erythroid Cell Parameters and Hemoglobinopathies in Mouse Models. In Joyce A. Lloyd, *Methods Molecular Biology*, Vol. 1698, (Eds): Erythropoiesis, 978-1-4939-7427-6, 394200_1_En, (6), 2017 (Marie Trudel, Josepha-Clara Sedzro)

Genome-wide association study of erythrocyte density in sickle cell disease patients, *Blood Cells Molecules and Diseases*, 2017 (Yann Ilboudo et *al.*)

