

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Caractérisation du facteur hématopoïétique  
spécifique  
MNDA (Myeloid nuclear differentiation Antigen)**

par  
Natacha Pierre-Charles

Programme de Biologie Moléculaire  
Faculté des études supérieures

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

Décembre, 2007

©, Natacha Pierre-Charles, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation du facteur hématopoïétique spécifique  
MNDA (Myeloid Nuclear Differentiation Antigen)**

présenté par :  
**Natacha Pierre-Charles**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr Abdellah Belmaaza**  
président-rapporteur

**Dr Eric Milot**  
directeur de recherche

**Dr David Silversides**  
membre du jury

## Résumé

L'inhibition du cycle cellulaire par les interférons (INFs) est possible grâce aux gènes dont ils activent la transcription. Parmi ceux-ci, nous retrouvons «*myeloid nuclear differentiation antigen*» (MNDA), membre de la famille des «*hematopoietic interferon inducible nuclear protein with 200 amino acid repeat*» (HIN-200). Peu de choses sont connues sur MNDA. Nous savons que des études cliniques montrent son expression anormale dans des cas de syndrome de myélodysplasie (SMD) et de leucémie myéloïde aigue (AML). Dans notre étude, nous avons tenté de caractériser MNDA, par sa localisation et la nature de ses associations protéiques, afin d'en connaître plus sur sa fonction. Nos résultats montrent une localisation au noyau, au nucléole et possiblement au centrosome. Par ailleurs, MNDA co-immunoprécipite avec «*Elongation Factor 1 alpha*» (EF1 $\alpha$ ), tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . La vue d'ensemble de nos données suggère une influence de MNDA sur le cycle cellulaire. Cette influence pourrait s'exercer de multiples façons.

**Mots clés :** INF, HIN-200, SMD, AML, centrosome, cycle cellulaire, tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , EF1 $\alpha$ .

## **Abstract**

The cell cycle inhibition by interferons (INF) is possible through the activation of genes that responded to them. One of those genes is the myeloid nuclear differentiation antigen (MNDA), a member of the hematopoietic interferon inducible nuclear protein with 200 amino acid repeat (HIN-200). Little is known about MNDA. Clinical studies have shown abnormal expression of MNDA in myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML). In our study we characterize MNDA by cellular localisation and the nature of its protein interactions, in order to learn more about its function. Our results suggest localisation of MNDA at the nucleus and nucleolus, and possibly at the centrosome. Furthermore, MNDA co-immunoprecipitated with the Elongation Factor 1 alpha (EF1 $\alpha$ ) and with tubulin  $\alpha$  and  $\beta$ . Taking globally, our results suggest that MNDA could influence the cell cycle in multiple ways.

**Key words:** INF, HIN-200, MDS, AML, centrosome, cell cycle, EF1 $\alpha$ , tubulin  $\alpha$  and  $\beta$ .

## Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Table des matières.....	V
Liste des tableaux.....	VII
Liste des figures.....	VIII
Liste des sigles et des abréviations.....	IX
Remerciements.....	XII
1. Introduction.....	1
1.1 Les quatre subdivisions du système hématopoïétique adulte.....	2
1.1.1 L'hématopoïèse adulte.....	2
1.1.2 La subdivision des cellules souches hématopoïétiques.....	2
1.1.3 La subdivision des progéniteurs hématopoïétiques.....	3
1.1.4 La subdivision des précurseurs hématopoïétiques (myéloïdes).....	3
1.1.5 La subdivision des cellules sanguines différenciées.....	3
1.2 La régulation du système hématopoïétique.....	4
1.2.1 La régulation du système hématopoïétique par des facteurs extrinsèques.....	4
1.2.2 La régulation du système hématopoïétique par des facteurs intrinsèques.....	4
1.3 Désordres sanguins.....	5
1.3.1 Le syndrome de myélodysplasie (MDS).....	6
1.3.2 La leucémie myéloïde aiguë (AML).....	7
1.4 La lignée cellulaire HL-60.....	7
1.5 La régulation du cycle cellulaire.....	8
1.6 La famille des <i>hematopoietic interferon-inducible nuclear protein with 200-amino acid repeat</i> (HIN-200).....	9
1.6.1 Le domaine HIN de la famille HIN-200.....	10
1.6.2 Le domaine DAPIN de la famille HIN-200.....	11
1.6.3 Localisation de la famille HIN-200.....	11
1.6.4 Implication possible des HIN-200 dans le cycle cellulaire.....	12
1.7 La protéine MNDA.....	13
1.7.1 La protéine Nucléoline interagit avec MNDA.....	14
1.7.2 La protéine NPM interagit avec MNDA.....	15
1.7.3 La protéine YY1 interagit avec MNDA.....	17
1.8 Connaissances sur MNDA dans les désordres sanguins.....	17
1.9 Hypothèse.....	18
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	20
2.1 Extraction d'ARN.....	21
2.2 RT.....	21

2.3 PCR et clonage.....	21
2.4 Cultures cellulaires et transfections .....	22
2.4.1 Cellules COS-7 .....	22
2.4.2 Cellules HL-60 .....	22
2.4.3 Isolation de monocytes humains .....	23
2.4.4 Isolation de neutrophiles humains.....	23
2.5 Microscopie.....	23
2.5.1 Immunofluorescence indirecte sur les cellules HL-60.....	23
2.5.2 Immunofluorescence indirecte sur les monocytes primaires .....	24
2.5.3 Coloration « <i>Neutral red</i> ».....	24
2.6 Cytométrie en flux.....	24
2.6.1 Tri cellulaire .....	24
2.6.2 Cycle cellulaire.....	25
2.7 Co-Immunoprécipitation.....	25
2.8 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide .....	26
2.9 Coloration à l'argent .....	26
2.10 Coloration Sypro .....	26
2.11 Western blot .....	26
3. RÉSULTATS .....	28
3.1 Localisation de MNDA .....	29
3.1.1 Immunofluorescence de MNDA sur la lignée cellulaire HL-60.....	29
3.1.2 Immunofluorescence de MNDA et de la tubuline gamma sur les monocytes primaires humains .....	31
3.1.3 Immunofluorescence de MNDA sur les neutrophiles primaires humains	36
3.1.4 Localisation de MNDA dans les HL-60 selon le cycle cellulaire.....	37
3.1.5 Localisation de MNDA dans les cellules HL-60 en G <sub>2</sub> /M.....	38
3.2 Co-immunoprécipitation avec la protéine MNDA.....	39
3.3 Surexpression de MNDA et cycle cellulaire.....	43
4. Discussion .....	46
4.1 MNDA a une localisation nucléaire et nucléolaire .....	47
4.2 Localisation de MNDA au centrosome.....	49
4.3 Localisation nucléaire de MNDA dans les cellules différenciées .....	51
4.4 MNDA et sa localisation durant le cycle cellulaire .....	52
4.5 Co-Immunoprécipitation.....	53
4.5.1. MNDA immunoprécipité avec tubuline $\alpha$ 6, tubuline $\beta$ 5 et la Ran GTPase : des protéines associées aux microtubules, action sur le cycle cellulaire .....	54
4.5.2 MNDA immunoprécipité avec NPM, action sur le cycle cellulaire .....	54
4.5.3 MNDA immunoprécipité avec EF1 $\alpha$ : action sur le cycle cellulaire .....	55
4.6. Surexpression de MNDA modifie le cycle cellulaire .....	56
4.7 Conclusions.....	56
Références.....	58

## Liste des tableaux

Tableau I : Classification FAB des syndromes de myélodysplasie .....	6
Tableau II : Leucémies myéloïdes aiguës .....	7
Tableau III : Liste des amorces utilisées .....	22
Tableau IV : Résultats de l'analyse de spectrométrie de masse.....	42

## Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse définitive.....	2
Figure 2 : Les domaines des protéines HIN-200.....	10
Figure 3 : Localisation cellulaire de MNDA par la technique d'immunofluorescence	30
Figure 4 : Image de déconvolution indiquant la colocalisation cellulaire de MNDA et NPM par la technique d'immunofluorescence dans les cellules HL-60 ....	31
Figure 5 : Représentation schématique de la technique de séparation par gradient au Ficoll .....	32
Figure 6 : Coloration au <i>Neutral Red</i> .....	33
Figure 7 : Détection de MNDA par la technique d'immunofluorescence dans les monocytes primaires isolés avec la technique de gradient au Ficoll .....	34
Figure 8 : Analyse du cycle cellulaire des cellules monocytaires primaires humaines	35
Figure 9 : Image d'immunofluorescence de la double détection de MNDA et de la tubuline gamma sur les monocytes primaires .....	36
Figure 10 : Immunofluorescence de MNDA dans les neutrophiles primaires humains. .....	37
Figure 11 : Localisation de MNDA selon le cycle cellulaire des HL-60.....	38
Figure 12 : Immunofluorescence suite au traitement à la colcémide sur les cellules HL-60 .....	39
Figure 13 : Coloration à l'argent du gel des immunoprécipitations fait avec les protéines des cellules HL-60.....	40
Figure 14 : Coloration au Sypro du gel de l'immunoprécipité à l'aide de l'anticorps MNDA. Les trois puits contiennent le même immunoprécipité. ....	41
Figure 15 : Western blot sur les immunoprécipités .....	43
Figure 16 : Vecteurs d'expression contenant MNDA.....	44
Figure 17 : Marquage du cycle cellulaire.....	45

## Liste des sigles et des abréviations

a.a. :	Acide aminé
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AGP :	« <i>Alpha-1 acid glycoprotein</i> »
ALL :	Leucémie lymphocytaire aiguë
AML :	Leucémie myéloïde aiguë
APL :	Leucémie promyélocytique aiguë
ARF :	« <i>Alternative reading frame</i> »
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
AR :	Anémie réfractaire
AREB :	Anémie réfractaire avec excès de blastes
AREB-t :	Anémie réfractaire avec excès de blastes en cours de transformation
ARSR :	Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne
°C :	Celsius
CARD :	« <i>Caspase-activating recruitment</i> »
CDK :	« <i>Cyclin-dependent kinase</i> »
CFU :	« <i>Colony Forming Unit</i> »
CLL :	Leucémie lymphocytaire chronique
CML :	Leucémie myéloïde chronique
CMML :	Leucémie myélomonocytaire chronique
CO <sub>2</sub> :	Dioxyde de carbone
DD :	« <i>Death domain</i> »
DED :	« <i>Death-effector domain</i> »
DIVA :	« <i>Digitalized Vantage</i> »
DMEM :	« <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> »
DMSO :	Diméthyle sulfoxyde
EF1 $\alpha$ :	« <i>Elongation factor 1 alpha</i> »
FAB :	Franco-américano-britannique
FADD :	« <i>Fas-associated death domain protein</i> »
FBS :	Sérum de fœtus bovin
G418 :	Généticine

G-CSF :	« <i>Granulocyte colony stimulating factor</i> »
HIN-200 :	« <i>Hematopoietic interferon-inducible nuclear protein with 200-amino acid repeat</i> »
INF :	Interférons
IRF-1 :	« <i>Interferon Regulatory Factor 1</i> »
ISRE :	« <i>Interferon-Stimulated Response Element</i> »
M :	Mitose
M-CSF :	« <i>Macrophage colony stimulating factor</i> »
MDS :	Syndrome de myélodysplasie
min :	Minute(s)
ml :	Millilitre(s)
MLF1 :	« <i>Myeloid leukemia factor 1</i> » humain
MNDA :	« <i>Myeloid nuclear differentiation Antigen</i> »
mm :	Millimètre(s)
NPM (B23) :	Nucléophosmine
N-terminal :	Amino-terminal
PBS :	« <i>Phosphate-buffered saline</i> »
PCR :	« <i>Polymerase chain reaction</i> »
Ph1 :	Chromosome de Philadelphie
PI :	Iodure de propidium
PMSF :	Phénylméthanesulphonyl fluoride
Rb :	Rétinoblastome
RT-PCR :	Réaction de transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE :	« <i>Sulfate dodecyl sodium polyacrylamide gel electrophoresis</i> »
sec :	Seconde(s)
SLN :	Signal de localisation nucléaire
SMD :	Syndrome de myélodysplasie
SLE :	« <i>Systemic lupus erythematosus</i> »
TBS:	« <i>Tris-buffered saline</i> »
Thr :	Thréonine
TNF :	« <i>Tumor-necrosis factor</i> »
TPA :	Phorbol d'acétate <i>tétramyristique</i>

U :	Unité(s)
VD3 :	Vitamine D3
$\mu$ F :	MicroFaraday
$\mu$ g :	Microgramme(s)
$\mu$ l :	Microlitre(s)

## **Remerciements**

J'aimerais tout d'abord remercier Dr Eric Milot, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné ce sujet de recherche et pour son excellent tutorat. Je tiens particulièrement à remercier Dr Stefania Botardi pour son assistance dans toutes les sphères. Merci à tous les membres du laboratoire, présents et antérieurs. Merci à Nathalie Henley et Sophie Ouellet pour les tris cellulaires.

Je tiens à remercier mon mari, Jose Isaac, mes parents, Paulonne et Guillaume Pierre-Charles, pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de mes études.

Pour terminer, un gigantesque remerciement à El Shadaïl d'avoir rendu le tout possible.

# **1. Introduction**

## 1.1 Les quatre subdivisions du système hématopoïétique adulte

### 1.1.1 L'hématopoïèse adulte

Les cellules matures sanguines accomplissent des fonctions spécifiques. De plus, elles ne peuvent pas s'auto-renouveler et elles ont une durée de vie déterminée. Les cellules hématopoïétiques immatures de la moëlle osseuse, capables de prolifération et de maturation, pourvoient au renouvellement. L'hématopoïèse est un ensemble de mécanismes aboutissant à la production soutenue et contrôlée des cellules sanguines afin d'assurer l'équilibre du tissu hématopoïétique. Il existe une cellule souche commune aux cellules myéloïdes et lymphoïdes, par contre nous ne discuterons que de l'hématopoïèse myéloïde. Le système hématopoïétique peut être divisé en quatre compartiments fonctionnels (voir la figure 1).

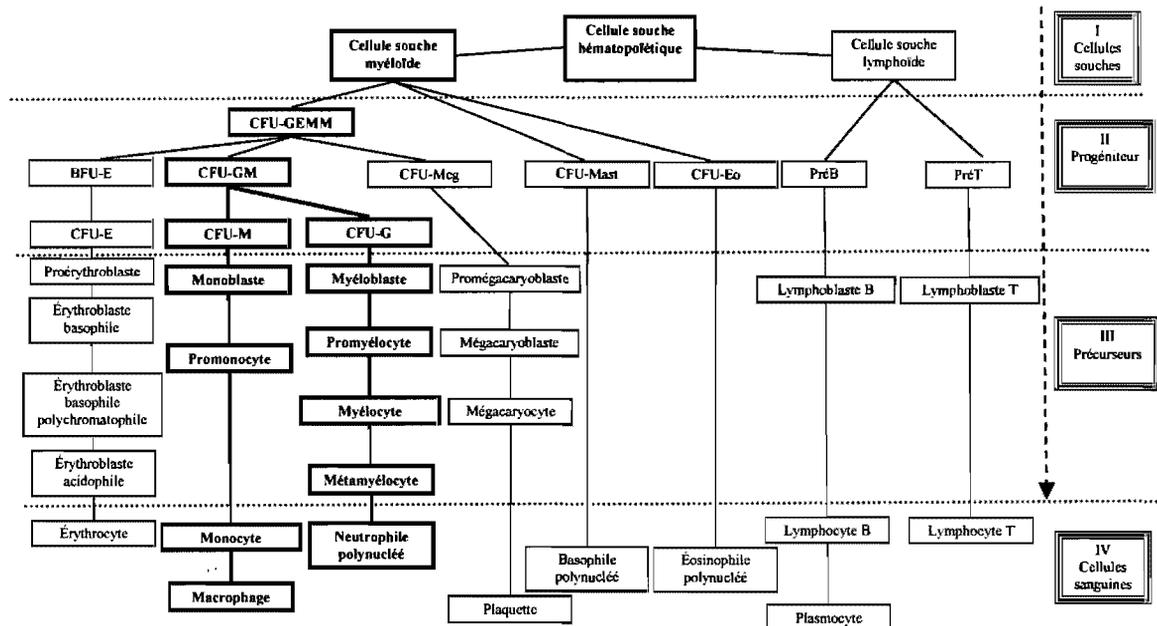


Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse définitive. I = La subdivision des cellules souches hématopoïétiques, II = La subdivision des progéniteurs hématopoïétiques, III = La subdivision des précurseurs hématopoïétiques, IV = La subdivision des cellules sanguines différenciées (adapté de Charpentier A. 1996. *Sang et cellules sanguines*. Nathan, Paris.).

### 1.1.2 La subdivision des cellules souches hématopoïétiques

La première subdivision est composée des cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules souches hématopoïétiques sont caractérisées par une capacité d'auto-génération. Leur

deuxième caractéristique est leur potentiel à se différencier en divers types de progéniteurs hématopoïétiques, qui à leur tour, donnent les différentes lignées cellulaires pour former l'ensemble des cellules sanguines matures (Orkin and Zon, 2002). Ces cellules souches sont localisées essentiellement dans la moëlle.

### **1.1.3 La subdivision des progéniteurs hématopoïétiques**

La deuxième subdivision comprend les progéniteurs hématopoïétiques. Ces progéniteurs dérivent des cellules souches qui entament la différenciation. Morphologiquement, ils sont difficilement identifiables. Ils sont mis en évidence par leur capacité clonogénique. En fait, la mise en culture *in vitro* des progéniteurs accompagnée de l'ajout d'inducteurs, leur permet de donner naissance à des colonies de cellules matures. Selon la taille et le type de colonie qu'ils produisent dans un temps de culture variable, on remarque schématiquement des progéniteurs précoces pluripotents, qui sont à l'origine des cellules de toutes les lignées myéloïdes, et des progéniteurs tardifs unipotents, qui produisent des colonies composées d'un seul type de cellule myéloïde. Ces colonies sont appelées CFU «*Colony Forming Unit*» et permettent d'établir les différentes sous populations produites par les progéniteurs.

### **1.1.4 La subdivision des précurseurs hématopoïétiques (myéloïdes)**

Les précurseurs myéloïdes ont une capacité de prolifération réduite et n'accomplissent que trois ou quatre divisions au cours desquelles ils produisent les cellules fonctionnelles. À l'inverse des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs hématopoïétiques, ils sont cytologiquement reconnaissables grâce à des caractéristiques nucléaires et cytoplasmiques spécifiques des différentes lignées hématopoïétiques. De plus, ils expriment des antigènes de surface spécifiques (Lund-Johansen and Terstappen, 1993); (Terstappen *et al.*, 1993).

### **1.1.5 La subdivision des cellules sanguines différenciées**

Après maturation des précurseurs, les cellules différenciées fonctionnelles se déplacent vers la circulation sanguine et les tissus. À ce stade, elles ne prolifèrent pas et leur durée de vie est restreinte. Par exemple, la durée de vie moyenne des érythrocytes est de 120 jours, celle des plaquettes est de 7 jours et celle des neutrophiles ne franchit pas les 24 heures. Environ

$10^{12}$  cellules sont produites chaque jour, néanmoins ce nombre peut s'accroître en fonction des exigences de l'organisme.

## **1.2 La régulation du système hématopoïétique**

Les cellules sanguines différenciées (tels que les monocytes et les neutrophiles polynuclées) ont une durée de vie limitée. Ces cellules meurent d'épuisement métabolique ou d'agression et sont donc renouvelées continuellement. La régulation de la différenciation et de la maturation hématopoïétiques, à partir des étapes les plus précoces jusqu'à la différenciation terminale, dépendent essentiellement des signaux extracellulaires (facteurs de croissance hématopoïétiques) ayant des récepteurs membranaires. Elle est aussi due aux signaux intracellulaires qui affectent la transcription des gènes à l'aide de facteurs de transcriptions spécifiques (Klinken, 1999).

### **1.2.1 La régulation du système hématopoïétique par des facteurs extrinsèques**

Quand on parle de facteurs extrinsèques qui régulent l'hématopoïèse, on fait référence aux cytokines hématopoïétiques telles que M-CSF «*Macrophage - Colony Stimulating Factor*» qui agissent sur les progéniteurs tardifs. Ces facteurs sont des molécules protéiques ou glycoprotéines solubles médiateurs dans la communication inter-cellulaire. Ils sont primordiales à la survie, la différenciation et la prolifération des progéniteurs. Également, ces facteurs contribuent à l'équilibre du système hématopoïétique. Ces cytokines peuvent agir en combinaison sur une ou plusieurs étapes de différenciation des progéniteurs. Il semble que les cytokines permettent la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches mais qu'elles ne soient pas responsables de la décision individuelle d'une cellule de promouvoir l'auto-renouvellement ou différenciation. Ce choix est probablement dirigé par des facteurs de transcription. Lorsque les cytokines se fixent à leurs récepteurs, des voies de signalisation sont enclenchées pour moduler l'expression de gènes qui vont soit promouvoir la prolifération ou la différenciation. Les deux grands types de récepteurs possèdent ou non une activité tyrosine kinase intrinsèque.

### **1.2.2 La régulation du système hématopoïétique par des facteurs intrinsèques**

La régulation intrinsèque implique une signalisation intracellulaire qui influence la transcription de gènes par des facteurs de transcription spécifiques. De façon générale, c'est la proportion présente d'un ou des facteur(s) qui promouvoit la voie de différenciation ou

celle de la prolifération. Par exemple, si les facteurs de transcription PU.1 et GATA-1 sont fortement exprimés dans la cellule souche, cela incitera la différenciation en progéniteur myéloïde commun (Scott *et al.*, 1994). Par la suite, l'expression prédominante de PU.1 enclenche la différenciation du progéniteur myéloïde commun vers le progéniteur granulomonocytaire.

### 1.3 Désordres sanguins

L'hématopoïèse d'un organisme sain fabrique des millions de nouvelles cellules sanguines par jour. Il est primordial que l'organisme régule bien chacune des étapes du processus afin de produire le nombre adéquat de chacun des types cellulaires. Autrement, cela peut donner lieu à des maladies sanguines. Certaines maladies du sang, tel que le syndrome de myélodysplasie et la leucémie, ont une incidence importante dans la population. La leucémie est un cancer des cellules de la moëlle osseuse (Bowen, 2005). Il existe différents types de leucémies : les leucémies aiguës ou leucémies chroniques. Les leucémies aiguës peuvent être myéloïdes (AML) ou lymphocytaires (ALL). Il en est de même pour les chroniques : leucémies chroniques myéloïdes (CML) ou leucémies chroniques lymphocytaires (CLL). Généralement, les leucémies apparaissent après des anomalies chromosomiques (translocations, inversions, délétions ou mutations affectant des gènes régulateurs de l'hématopoïèse) (Pihan *et al.*, 1998).

Un des exemples de translocation qui peuvent amener à une leucémie est la translocation qui engendre le chromosome de Philadelphie. Dans 90% des cas de CML, on retrouve le chromosome de Philadelphie (Ph1). Ce chromosome est le produit d'une translocation réciproque entre le bras long du chromosome 9 et celui du chromosome 22. Il en résulte le gène de fusion BCR-ABL (Ben-Neriah *et al.*, 1986); (Munker *et al.*, 2000);(Rowley, 1973). Il existe trois phases cliniques pour la CML (Raskin, 1996). La première est la phase chronique initiale qui est déterminée par une augmentation du nombre de leucocytes matures dans le sang et dans la moëlle osseuse comparativement à un sujet sain. La deuxième est la phase accélérée qui se définit par un fort accroissement de la population des blastes. La troisième est la phase blastique où il y a une vive expansion du nombre de blastes myéloïdes et lymphoïdes (Calabretta and Perrotti, 2004). Les anomalies génétiques accroissent lors de l'évolution de la maladie vers la phase blastique (Mitelman, 1993); (Di Bacco *et al.*, 2000).

### 1.3.1 Le syndrome de myélodysplasie (MDS)

Les myélodysplasies (MDS) sont composées d'un groupe hétérogène de désordres clonaux des cellules souches et/ou progénitrices hématopoïétiques. Le syndrome de myélodysplasie se transforme fréquemment en AML. Les MDS se rencontrent plus souvent chez les personnes âgées, mais les jeunes adultes et les enfants peuvent aussi en développer (Munker *et al.*, 2000); (Hirai, 2002). Cinq sous-types de MDS ont été identifiés d'après la classification franco-américano-britannique (FAB), (tableau I) (Bennett *et al.*, 1982); (Mehta and Hoffbrand, 2003).

Tableau I : Classification FAB des syndromes de myélodysplasie

Sous-types	Blastes	
	Sang périphérique	Moëlle osseuse
RA (Anémie réfractaire)	<1%	<5%
RARS (RA avec sidéroblastes en couronne)	<1%	<5% et sidéroblastes en couronne >15%
RAEB (RA avec excès de blastes)	<5%	5-20%
RAEB-t (RAEB en cours de transformation)	>5-30%	21-30%
CMML (Leucémie myélo-monocytaire chronique)	<5%	<20%

Le pourcentage de blastes dans la moëlle osseuse procure un indice pronostique de AML. Les patients classés RA et RARS possèdent une faible probabilité de voir leur MDS évoluer en AML car le pourcentage de blastes dans leur moëlle est moindre que celui des patients RAEB, CMML et les RAEB (Mehta and Hoffbrand, 2003) (Tableau 1). Chaque type de MDS a des signes cliniques qui peuvent être différents. Un des signes cliniques qui caractérisent les MDS est une hématopoïèse inefficace emmenant une cytopénie dans le sang. Cette cytopénie se traduit en une réduction massive de un ou plusieurs types cellulaires sanguins matures (érythrocytes, leucocytes et plaquettes). Cette réduction peut même donner lieu à une disparition du type cellulaire dans le sang périphérique. À l'inverse, la moëlle devient surchargée de cellules. Quoiqu'elle soit le siège d'une prolifération cellulaire importante, on y observe aussi une augmentation de cellules

apoptotiques (Munker *et al.*, 2000); (Mehta and Hoffbrand, 2003); (Greenberg, 1998). Plus une cellule souche possède de dommage à l'ADN, plus cette dernière est exposée à un MDS. C'est pourquoi des translocations, mutations, délétions ou aneuploïdies sont régulièrement rencontrées chez les patients atteints d'un MDS. La pathogenèse du syndrome de myélodysplasie est inconnue et ceux qui tentent de caractériser ce syndrome concluent que l'apoptose ou la sensibilité à induire la programmation de la mort cellulaire contribue à la cytopénie (Parker and Mufti, 2004).

### 1.3.2 La leucémie myéloïde aiguë (AML)

Les MDS se transforment en leucémie myéloïde aiguë (AML) quand les blastes de la moëlle osseuse dépassent le seuil de 30%. L'incidence de cette maladie est plus grande chez les personnes âgées (60-70 ans) que les enfants et les jeunes adultes (Munker *et al.*, 2000). Parmi toutes les leucémies connues, AML représente 36% et peut atteindre 75% des leucémies aiguës («*American Cancer Society, Statistiques 2004*», <http://www.cancer.org/>). AML a aussi différents sous-types (Tableau II) (Bennett *et al.*, 1982); (Munker *et al.*, 2000); (Mehta and Hoffbrand, 2003).

Tableau II : Leucémies myéloïdes aiguës

Sous-type	Caractéristiques
M0	Non différenciée
M1	Myéloïde, faible différenciation, >90% de blastes
M2	Myéloïde avec différenciation, 30-90% de blastes
M3	Promyélocytaire, avec granularité intense variante : avec microgranules atypiques
M4	Myélomonocytaire, avec myéloblastes et monoblastes leucémiques variante : M4Eo, présence d'éosinophiles
M5	Monocytaire, avec monoblastes
M6	Érythroleucémie, avec >50% de cellules mononucléaires érythroïdes et >30% de myéloblastes parmi les cellules non érythroïdes
M7	Mégacaryoblastique

### 1.4 La lignée cellulaire HL-60

Les études sur la biologie des leucémies humaines ont permis de grandes avancées dans la compréhension de cette maladie. Ces mêmes études ont aussi permis de développer des

modèles cellulaires *in vitro*. Parmi ceux-ci, on peut compter la lignée cellulaire humaine HL-60. Les HL-60 ont été isolées à partir du sang périphérique d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde aigue (Gallagher *et al.*, 1979). Phénotypiquement, les cellules HL-60 ressemblent à des blastes («ATCC Cell Biology Collection» [www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Il est suggéré que ces cellules néoplasiques proviendraient de progéniteurs tardifs de monocytes et de neutrophiles (Harris and Ralph, 1985). Cette lignée cellulaire peut facilement être maintenue en culture sans se différencier (Harris and Ralph, 1985). En effet, leur mise en culture ne dépasse pas le stade de promyélocytes et de myéloblastes (Gallagher *et al.*, 1979). Cependant, il est possible de forcer la différenciation des HL-60 soit dans la voie des monocytes ou des neutrophiles à l'aide d'inducteurs: le diméthyle sulfoxyde (DMSO), phorbol d'acétate tétraméristique (TPA), la vitamine D3 (VD3), l'acide rétinoïque (RA) qui favoriseraient une voie plutôt qu'une autre (Breitman *et al.*, 1980); (Harris and Ralph, 1985).

### 1.5 La régulation du cycle cellulaire

Il y a quatre phases qui composent le cycle cellulaire : la phase G<sub>1</sub>, la phase S, la phase G<sub>2</sub> et la phase M (mitose). Une cellule peut aussi sortir du cycle cellulaire. On dira alors qu'elle est dans son processus de différenciation. Elle peut également être en état de quiescence que l'on appelle aussi la phase G<sub>0</sub> (Deane *et al.*, 2005). Les mécanismes d'enchaînement des phases du cycle cellulaire comprennent plusieurs points de contrôle qui empêchent le passage à la phase suivante avant que toutes les étapes de la phase précédente ne soient complétées (Sherr and Roberts, 1999). Chaque point de contrôle est surveillé par des protéines régulatrices. Parmi ces dernières, on retrouve la famille des kinases sérine-thréonine dépendantes des cyclines (CDK) et les inhibiteurs des CDK. Il y a aussi la protéine de rétinoblastome (Rb), p53 et le facteur de transcription E2F (Deane *et al.*, 2005). C'est l'activation des CDK qui autorise la transition d'une phase à l'autre. Cette activation se fait lorsque les CDK se lient à une protéine cycline et qu'elle subit aussi une phosphorylation (Sherr and Roberts, 1999). Dès le début du cycle, la cellule doit décider si elle favorise la prolifération en poursuivant sa progression vers les autres phases du cycle pour aboutir à la division cellulaire, ou si elle quitte le cycle pour entrer dans un état de quiescence ou de différenciation. C'est l'état de phosphorylation de Rb qui fait pencher la décision de la cellule d'un côté plutôt que l'autre. L'hypophosphorylation de Rb permet son interaction avec les facteurs de transcription de la famille E2F. Ce complexe inhibe la transcription de plusieurs gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire ou des gènes

impliqués dans la réplication de l'ADN (Sherr and Roberts, 1999). C'est l'inverse qui se produit quand la cellule opte pour la division cellulaire. La protéine p53 est aussi en mesure de bloquer le cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub>. p53 peut arrêter le cycle cellulaire en activant la transcription de l'inhibiteur de CDK, p21<sup>Cip1</sup> (Sherr and McCormick, 2002). On conçoit que si les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire ne sont pas bien contrôlés, cela peut entraîner diverses maladies tel que le cancer.

### **1.6 La famille des *hematopoietic interferon-inducible nuclear protein with 200-amino acid repeat* (HIN-200)**

Les interférons (INFs) ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), qui font partie de la famille des cytokines (Gutterman, 1994), ont de multiples activités biologiques, incluant l'inhibition de la croissance cellulaire et la régulation de l'apoptose. Les INF agissent par l'entremise de gènes qui influencent la croissance cellulaire et la régulation de l'apoptose (Asefa *et al.*, 2004).

Parmi les gènes qui peuvent être induits par les INFs, on retrouve la famille des «*hematopoietic interferon-inducible nuclear protein with 200-amino acid repeat*» (HIN-200). Cette famille encode les gènes humains (IFI 16, MNDA (voir section 1.7) et AIM2) et murins (IFI202/p202, IFI203/p203, IFI204/p204, et IFI205/p205/D3). Chacun de ces gènes a ses propriétés propres, son patron d'expression et de régulation (Asefa *et al.*, 2004); (Ding *et al.*, 2004); (Choubey *et al.*, 1989); (Wang *et al.*, 1999); (Johnstone and Trapani, 1999). Le regroupement de gènes HIN-200 humains est localisé sur le chromosome 1 dans la région q21-q23 (Opdenakker *et al.*, 1989). Probablement que ce regroupement origine d'une duplication répétée d'un gène ancestral (Deschamps *et al.*, 2003). Des mutations dans ce locus ont été associées à la tumorigénèse (Asefa *et al.*, 2004) ainsi que des maladies immunologiques telles le lupus érythémateux systémique (SLE) (Choubey and Kotzin, 2002).

### 1.6.1 Le domaine HIN de la famille HIN-200

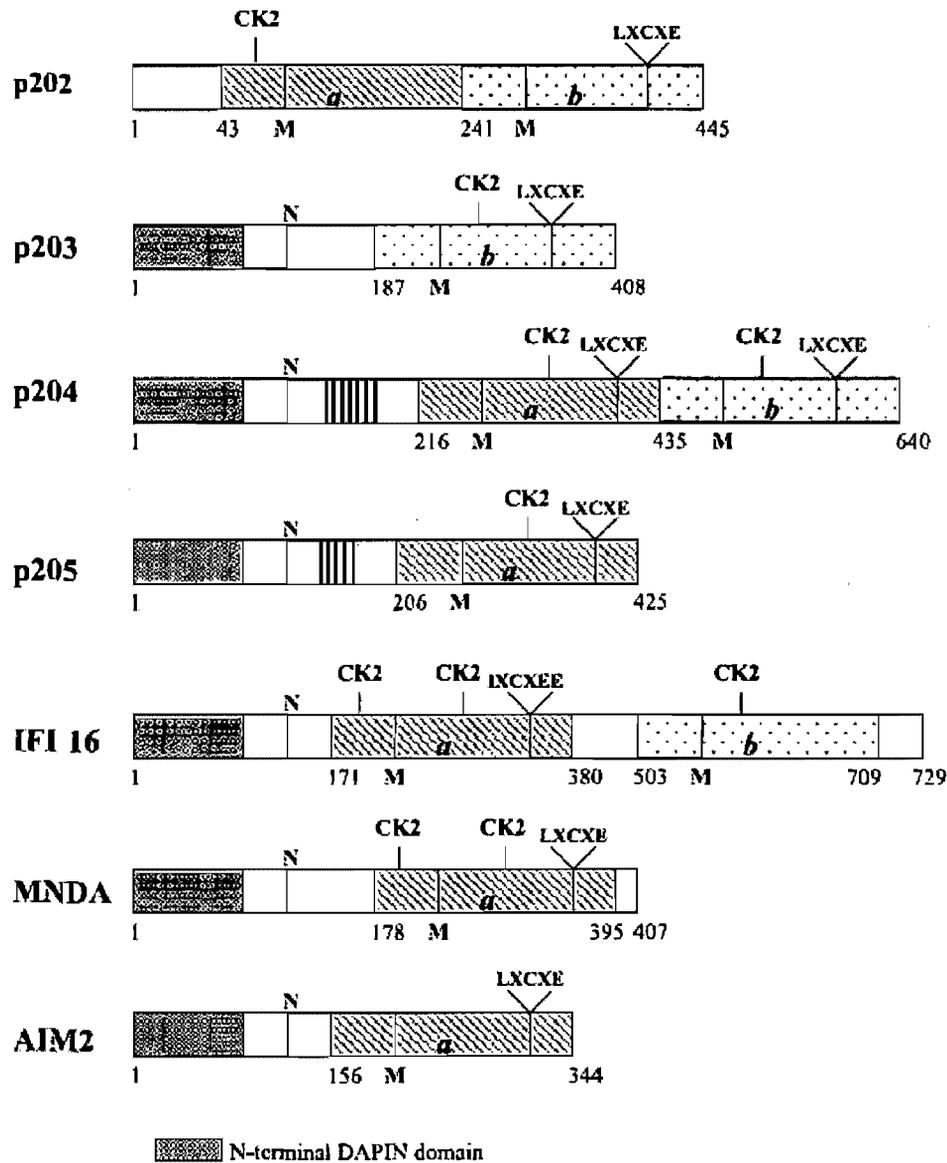


Figure 2 : Les domaines des protéines HIN-200. Les domaines HIN de type a et b ont tous le motif MFHATVAT (M) conservé responsable de la dimérisation et des interactions protéine-protéine. Il y a aussi des sites potentiels de liaisons de Rb (LXCXE) et de phosphorylation par CDK2 (CK2). La séquence de localisation nucléaire (N) et le domaine DAPIN sont aussi conservés (Asefa *et al.*, 2004).

Les membres de la famille HIN-200 sont appelés ainsi à cause d'un domaine contenant une séquence de 200aa (acide aminée) qu'on appellera le domaine HIN. Ce domaine se retrouve toujours près de l'extrémité C-terminale des protéines HIN-200. Les séquences du domaine

HIN peuvent être groupées en deux sous-types A et B très reliés. Les protéines AIM2, MNDA et p205 contiennent seulement un domaine HIN du type A; tandis que IFI16, p202 et p204 possèdent les sous-types A et B. Il y a seulement p203 qui possède un seul domaine HIN de type B. Également, une courte séquence (MFHATVAT), qui se retrouve dans le domaine de 200aa est suffisante pour l'homo-dimérisation et hétéro-dimérisation de ces protéines *in vitro* (Koul *et al.*, 1998).

### 1.6.2 Le domaine DAPIN de la famille HIN-200

Le domaine DAPIN est aussi appelé domaine PAAD, PYD ou PYRIN en référence aux protéines Pyrin/Marenostrin, le produit de la famille «*Mediterranean fever gene*» (Albrecht *et al.*, 2003). Le domaine DAPIN se retrouve fréquemment dans des régulateurs de réponse immune inflammatoire et régulateurs d'apoptose (Inohara and Nunez, 2003); (Tschopp *et al.*, 2003). La fonction et la structure tridimensionnelle du domaine, à six hélices «*bunble*», indiquant que le domaine DAPIN appartient à la famille des «*death domain*» (Hiller *et al.*, 2003). Cette famille inclus les domaines CARD «*caspase-activating recruitment*», DD «*death domain*», et DED «*death-effector domain*» qui participent à des interactions homotypiques domaine-domaine comme DAPIN (Weber and Vincenz, 2001).

L'architecture commune de la famille des protéines HIN-200 consiste en les domaines DAPIN et HIN-[HIN]. À l'opposé du domaine HIN qui est toujours près du C-terminal, le DAPIN se retrouve toujours en N-terminal de la protéine. Il n'y a que la protéine p202 qui fait exception à cette règle car le domaine DAPIN n'est pas présent dans cette protéine (Asefa *et al.*, 2004). Il est à noter que cette même région N-terminale où est localisé le DAPIN domaine a été montrée comme essentielle à l'homo-dimérisation de la protéine MNDA (Staub *et al.*, 2001).

### 1.6.3 Localisation de la famille HIN-200

Tous les membres de la famille HIN-200 n'ont pas été étudiés de façon intensive. Par contre, il apparaît que la majorité ont une localisation nucléaire (Asefa *et al.*, 2004); (Ding *et al.*, 2004). Les protéines p203, p204, IFI16 et MNDA ont une localisation premièrement nucléaire avec une séquence signal consensus pour la localisation nucléaire (Johnstone and Trapani, 1999). Cependant, la protéine p202 a une localisation cytoplasmique mais aussi

nucléaire malgré qu'elle ne possède pas de signal de localisation nucléaire (Choubey and Lengyel, 1993). Le traitement des cellules avec l'INF accentue la localisation de p202 au noyau (Choubey and Lengyel, 1993). En plus d'une localisation nucléaire, p204 et IFI16 se retrouvent aussi au nucléole (Choubey and Lengyel, 1992); (Choubey and Lengyel, 1993); (Dawson and Trapani, 1995). En plus, les protéines IFI16 et MNDA lient l'ADN nucléaire (Gaczynski *et al.*, 1990).

#### 1.6.4 Implication possible des HIN-200 dans le cycle cellulaire

Les HIN-200 ne sont pas connues comme des protéines ayant une activité enzymatique (Asefa *et al.*, 2004); (Ding *et al.*, 2004). Cependant, les protéines HIN-200 pourraient jouer un rôle de «*scaffold*» pour l'assemblage d'un complexe protéique qui impliquerait des facteurs de régulation transcriptionnel (Asefa *et al.*, 2004); (Dawson and Trapani, 1996); (Landolfo *et al.*, 1998); (Johnstone and Trapani, 1999); (Xin *et al.*, 2003). De plus, plusieurs des protéines HIN-200 lient un certain nombre de facteurs de transcription et des régulateurs transcriptionnels, par exemple, le répresseur de tumeur p53, BRCA1 «*Brest cancer susceptibility protein 1*», et les protéines p107, p130 et pRb (Asefa *et al.*, 2004); (Choubey and Kotzin, 2002); (Sherr, 2004).

Les protéines p202, p204 et IFI16 sont les protéines les mieux caractérisées de la famille des HIN-200. L'effet du gène p202 de souris sur la mort cellulaire programmée a été examiné dans un certain nombre de systèmes. Dans certains cas, p202 promouvait la mort cellulaire programmée, tandis que dans d'autres cas p202 l'inhibe (D'Souza *et al.*, 2001); (Yang *et al.*, 1994). Par exemple, la surexpression de p202 dans des cellules du cancer du sein, augmente la capacité d'induire la mort cellulaire programmée par le «*tumor necrosis factor*» (TNF). L'injection de p204 dans des embryons de souris est létale (Lembo *et al.*, 1998). La transfection de p202 et p204 dans les cellules appropriées ralentit la prolifération cellulaire et provoque une accumulation des cellules en phase G<sub>1</sub>/S (Lembo *et al.*, 1995). Il est à noter que IFI16 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la sénescence cellulaire (Asefa *et al.*, 2004); (Xin *et al.*, 2003); (Xin *et al.*, 2004). IFI16 peut promouvoir la mort cellulaire programmée en s'associant avec p53 activé, suite au traitement par des agents génotoxiques (Aglipay *et al.*, 2003).

En accord avec l'action connue des INF, ces protéines participent dans l'inhibition de la progression du cycle cellulaire, la modulation de la différenciation, et la survie cellulaire (Asefa *et al.*, 2004) ; (Choubey and Kotzin, 2002) ; (Dawson and Trapani, 1995).

À cause de leur effet antiprolifératif, certaines des protéines HIN-200 pourraient agir comme des agents thérapeutiques potentiels pour le traitement de cancer (Xin *et al.*, 2004).

### 1.7 La protéine MNDA

Dans cette étude, nous voudrions caractériser le facteur hématopoïétique spécifique MNDA «*Myeloid nuclear differentiation Antigen*». Le gène humain MNDA est localisé dans la région du chromosome 1q21-22. Cette région est à l'intérieur d'un endroit qui est conservé entre l'humain et la souris (Briggs *et al.*, 1994b). La protéine MNDA est constitutivement exprimée dans les lignées cellulaires myéloïdes (Goldberger *et al.*, 1986); (Briggs *et al.*, 1994c). De façon plus précise, elle est détectée dans la lignée monocyttaire (dès le stade de monoblaste) et la lignée des neutrophiles (dès le stade des myéloblastes) (Goldberger *et al.*, 1986); (Briggs *et al.*, 1994a). Tout au long de la différenciation, MNDA continue d'être exprimée et le niveau d'expression augmente graduellement (Briggs *et al.*, 1994b). Son expression est même maintenue dans les neutrophiles et monocytes en circulation (Briggs *et al.*, 1994c). L'expression de MNDA dans la leucémie myéloïde aiguë (AML) maintient son patron d'expression lignée spécifique (Cousar and Briggs, 1990). Les cas d'AML sont nécessairement MNDA positive quand la différenciation myéloïde est évidente, tandis que les leucémies lymphocytaires sont négatives pour l'expression de MNDA (Cousar and Briggs, 1990).

Dans la région N-terminale, entre les aa 67 à 179 de la protéine MNDA, il y a une région hautement basique. Ces hélices  $\alpha$  amphipathiques sont aussi observées en N-terminal de la moitié des protéines *Interferon Regulatory Factor1* (IRF-1). Ce site est impliqué dans la liaison de séquence d'ADN spécifique aux *Interferon-Stimulated Response Element* (ISRE) des gènes pouvant être induits par des interférons (Yu-Lee *et al.*, 1990). Les protéines qui possèdent cette séquence en N-terminale et qui lient la même séquence d'ADN ont été proposées comme faisant partie d'une nouvelle classe de facteur de transcription (Pine *et al.*, 1990). Il est aussi possible que MNDA agisse comme un pré- ou post-inducteur en réponse aux interférons ou/et infection viral comme répresseur ou activateur dans les cellules spécifiques (neutrophiles ou monocytes) (Briggs *et al.*, 1992). Par ailleurs, MNDA contient

5 motifs S(T)PXX (Briggs *et al.*, 1992), indiquant que MNDA pourrait être une protéine régulatrice qui lie l'ADN puisque ces sites permettent une liaison non spécifique à l'ADN (Suzuki, 1989). Cette liaison peut favoriser la proximité de MNDA à l'ADN mais, ce serait par son association à une autre protéine ayant un site de liaison spécifique à l'ADN que MNDA pourrait exercer une action plus sélective. La protéine MNDA possède aussi 11 sites consensus possibles pour la phosphorylation (Briggs *et al.*, 1992). Cela permettrait de réguler son action. Plusieurs protéines nucléaires ayant une expression tissu-spécifique ont une réponse spéciale à un stimulus extérieur (Evans, 1988). Cela pourrait être le cas de la protéine MNDA. En effet, nous savons qu'un élément ISRE se retrouve du côté 5' non-transcrit de l'ARNm de *mnda* et que l'interféron  $\alpha$  augmente son niveau d'ARNm. Il est probable que l'expression lignée cellulaire spécifique ainsi que le stade de différenciation cellulaire spécifique de MNDA soient associés à la réponse des granulocytes/monocytes à l'interféron  $\alpha$ .

#### 1.7.1 La protéine Nucléoline interagit avec MNDA

La protéine MNDA a été immunoprécipitée avec la protéine Nucléoline (Xie *et al.*, 1995). La Nucléoline est connue comme étant impliquée dans la ribogenèse; mais il semble aussi que la Nucléoline ait d'autres fonctions. La Nucléoline possède une activité hélicase (Tuteja *et al.*, 1995). En partenariat avec la protéine NPM, la Nucléoline est capable de se lier à la protéine YY1 et d'influencer la transcription de gènes par cette interaction ou via des interactions subséquentes qui se lieront à des éléments régulateurs de gènes (Lee and Lee, 1994); (Yang *et al.*, 1994); (Inouye and Seto, 1994). La Nucléoline réprime l'expression du gène du foie *alpha-1 acid glycoprotein* (AGP) en se liant à une séquence spécifique de l'élément B (5'-NTGYCCCN-3') (Yang *et al.*, 1994). L'effet de la Nucléoline sur l'élément B est influencé par YY1. (Momoeda *et al.*, 1994). En effet, YY1 peut activer la transcription de «*alpha-1 acid glycoprotein*» (AGP) en interférant avec la fonction répressive de la Nucléoline qui se lie à l'élément B (Lee and Lee, 1994).

La Nucléoline se retrouve à la surface de la cellule, dans le cytoplasme et dans le noyau, mais majoritairement dans le nucléole. Suite à des études sur la phosphorylation de la Nucléoline localisée à la surface cellulaire, il a été suggéré que la Nucléoline soit impliquée dans la communication des signaux extracellulaires au noyau. La Nucléoline lie aussi les protéines apoB- et apoE (ces deux protéines contiennent des lipoprotéines) d'une façon

similaire au récepteur LDL (Semenkovich *et al.*, 1990). Dans la région amphipatique basique du motif de l'hélice  $\alpha$  de MNDA, entre les aa 84-103 et aussi 388-400, on retrouve une similitude avec une séquence consensus de LDL «*receptor binding sequence*» de l'apolipoprotéine B-100 (Hospattankar *et al.*, 1986). La présence de ces motifs suggère la possibilité de relation fonctionnelle non déterminée entre MNDA, la Nucléoline et les lipoprotéines. Car les lipoprotéines sont importantes dans la physiologie de la lignée cellulaire myélomonocytaire et l'importance de l'effet des lipoprotéines dans la fonction des monocytes, dans l'artériosclérose est reconnu (Faruqi and DiCorleto, 1993). L'effet spécifique des lipoprotéines sur la prolifération des macrophages a récemment été documenté (Sakai *et al.*, 1994).

### 1.7.2 La protéine NPM interagit avec MNDA

L'interaction de MNDA avec NPM (Nucléophosmine, B23 ou Numatrine) est bien documentée. Cette interaction n'est pas uniquement due à des interactions électrostatiques, la structure de la protéine pourrait y jouer un rôle (Xie *et al.*, 1997). Le gène humain *npm* est localisé sur le long bras distal du chromosome 5 (Morris *et al.*, 1994). NPM est une phosphoprotéine nucléolaire très conservée liant les ARNs non ribosomiaux (Borer *et al.*, 1989). Les fonctions de NPM semblent être très diversifiées aussi. Une de ses principales fonctions est le transport des ribonucléoprotéines entre le nucléole et le cytoplasme pendant l'assemblage des ribosomes (Olson *et al.*, 1986); (Borer *et al.*, 1989).

La protéine NPM serait également impliquée dans l'initiation de la duplication du centrosome. En phase G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire, NPM se dissocie du centrosome lorsque sa thréonine (199) est phosphorylée par le complexe CDK2/cycline-E, lequel initierait ensuite la duplication du centrosome. NPM se réassocie au centrosome à la phase mitotique au moment de la fission membranaire (Tokuyama *et al.*, 2001); (Okuda, 2002).

Il a également été démontré que NPM interagit avec différentes protéines, tel que le facteur de transcription YY1 (Inouye and Seto, 1994) suggérant une influence directe ou indirecte au niveau de la transcription de gènes (Lee and Lee, 1994). De plus, NPM régule l'activation de la transcription et la stabilité du suppresseur de tumeur p53 (Colombo *et al.*, 2002).

### 1.7.2.1 Les translocations impliquant NPM.

Les chromosomes des cellules blastiques des patients atteints d'une AML montrent des translocations ou des inversions dans près de 80% des cas. Les anomalies chromosomiques se produisent souvent dans des régions codant pour des gènes importants pour la régulation de la transcription. Le gène hybride formé code alors pour une protéine de fusion ayant d'autres fonctions. Les translocations impliquant la protéine NPM sont d'intérêt pour ce mémoire. Il y a 3 translocations du gène *npm* avec d'autres gènes qui sont impliqués dans des leucémies et des lymphomes (Morris *et al.*, 1994); (Yoneda-Kato *et al.*, 1996); (Redner *et al.*, 1996). Deux des translocations impliquent le 5' de *npm* : NPM-ALK t(2 ;5) associé aux «large cell lymphomas» (Morris *et al.*, 1994); (Bischof *et al.*, 1997); NPM-MLF t(3;5) retrouvée dans le syndrome de myélodysplasie, et leucémie myéloïde (Yoneda-Kato *et al.*, 1996). La troisième translocation est t(5;17) associée à la leucémie promyélocytaire aiguë (APL); NPM y est fusionné à RAR $\alpha$ , une version de la translocation plus commune RAR $\alpha$  APL t(15;17) (Redner *et al.*, 1996); (Pandolfi, 1996). La translocation du chromosome 17 et 5, qui donne la protéine NPM-RAR $\alpha$ , est la plus fréquente dans l'AML (Look, 1997). La protéine NPM-MLF1 est localisée dans le noyau et le nucléole des cellules (Yoneda-Kato *et al.*, 1996). Cette localisation est due à la conservation du NLS de NPM dans la translocation. La protéine de fusion NPM-MLF1 induit l'apoptose des cellules K562 et HEL et l'apoptose des cellules NIH 3T3 suite à une privation en sérum (Yoneda-Kato *et al.*, 1999). Par contre, la cinétique de l'apoptose induite par NPM-MLF1 est plus lente comparée à celle obtenue avec d'autre inducteur d'apoptose tel que c-Myc et E2F-1 (Yoneda-Kato *et al.*, 1999). L'étude de différentes délétions de la protéine NPM-MLF1, (Yoneda-Kato *et al.*, 1999) a déterminé qu'il y aurait un domaine important pour l'induction de l'apoptose dans NPM-MLF1 au N-terminale de la région MLF1. Ils ont aussi démontré que le NLS de NPM est important pour provoquer l'apoptose et que la délétion du domaine de dimérisation de NPM viendrait diminuer l'effet apoptotique de NPM-MLF1 (Yoneda-Kato *et al.*, 1999). Cependant, il semble que NPM-MLF1 n'induit pas uniquement l'apoptose des cellules. L'expression de NPM-MLF1 confère également un avantage prolifératif aux cellules. Cet aspect a été démontré en co-surexprimant, dans des NIH 3T3, NPM-MLF1 et la protéine anti-apoptotique Bcl-2, alors que seule la surexpression de Bcl-2 n'affectait pas la prolifération (Yoneda-Kato *et al.*, 1999). Ceci suggère que NPM-MLF1 est impliqué dans au moins deux voies de signalisation différentes. Ces deux voies (ou une des deux) pourraient être impliquées dans l'induction de MDS et la progression, dans certains cas, vers une AML.

Deux des fusions de NPM qui résultent de translocation de chromosome (*i.e.*, NPM-MLF1 et NPM-ALK) affectent des cellules qui expriment MNDA. MNDA lie la protéine intacte NPM ainsi que la protéine fusion de NPM-MLF mais pas la protéine fusion NPM-ALK. La partie conservée de NPM dans la protéine de fusion NPM-MLF contient 58aa de plus que dans la protéine de fusion de NPM-ALK. Un ou des éléments situés dans les derniers 58aa de NPM pourrait être requis pour l'interaction de NPM avec MNDA.

### 1.7.3 La protéine YY1 interagit avec MNDA

La protéine ubiquitaire YY1 lie l'ADN avec son motif doigt de zinc qui est impliqué dans la régulation de plusieurs gènes cellulaires et viraux (Basu *et al.*, 1993); (Bauknecht *et al.*, 1992). YY1 lie d'autres protéines : les facteurs de transcription Sp1 et c-myc, TATA «*binding associated factors*», TAF<sub>II</sub>55, TFIIB et des phosphoprotéines incluant la Nucléoline et NPM (Chiang and Roeder, 1995) ; (Inouye and Seto, 1994) ; (Usheva and Shenk, 1996). La protéine MNDA interagit aussi avec la protéine YY1. Le site de liaison de YY1 se trouve entre les 53-150aa de MNDA. Cette association renforce la liaison de YY1 avec l'ADN (Xie *et al.*, 1998). La région des 53-150aa contient une région étendue amphipatique d'hélice  $\alpha$  et un «*zipper*» de leucine imparfait qui sont rencontrés lors d'interactions protéines-protéines (Briggs *et al.*, 1994c). Cette région de 53-150aa de MNDA n'est pas conservée dans la famille des HIN-200. L'interaction à YY1 pourrait être propre à MNDA (Briggs *et al.*, 1994c). Il est proposé que la liaison de MNDA à YY1 induirait la dissociation de facteurs répressifs X qui sont normalement liés à YY1 (Xie *et al.*, 1998). Ceci est déjà observé entre Rb et Sp1. Il est aussi possible que la liaison de MNDA à YY1 change la conformation de ce dernier pour augmenter sa liaison à l'ADN. MNDA pourrait aussi lier l'ADN de façon non spécifique et influencer la structure de l'ADN de façon à faciliter la liaison de YY1.

### 1.8 Connaissances sur MNDA dans les désordres sanguins

L'analyse du profil d'expression de MNDA démontre une différence dans le niveau de transcrits des progéniteurs hématopoïétique des MDS versus les cellules normales ou les AML (Pradhan *et al.*, 2004); (Hofmann *et al.*, 2002); (Miyazato *et al.*, 2001). Par exemple, dans le rapport de Hofmann *et al.* (Hofmann *et al.*, 2002), le transcrit de MNDA est moindre dans les cas plus à risque de développer une AML comparativement aux cas moins

à risque. Dans une autre analyse de profil de gènes, MNDA est le gène le plus significativement sous-régulé dans les deux cas de MDS familiale et sporadique (Pradhan *et al.*, 2004).

Dans certains cas de néoplasie (ex : leucémie promyélocytaire aigue) MNDA peut être exprimé à un plus haut niveau que dans les cellules normales (Miranda *et al.*, 1999). L'expression de MNDA est élevée dans les néoplasies hématopoïétiques, comme pour le cas des AML-M3 ou l'expression de MNDA est plus forte que dans les promyélocytes ou myéloblastes normaux (Miranda *et al.*, 1999). Les auteurs suggèrent que l'expression anormale de MNDA pourrait être l'élément rendant la croissance cellulaire des cellules de néoplasies hématopoïétiques moindre que les cellules normales (Stelzer *et al.*, 1993). La régulation anormale de MNDA dans les cellules néoplasiques suggère une implication dans le développement de néoplasie myélomonocytaire. Un groupe de recherche a détecté l'expression anormale de MNDA dans 21 cas humains de leucémie aiguë classée selon les critères du groupe FAB (*French-American-British*) (Cousar and Briggs, 1990). Dans les cas FAB catégories M2, M3, M4 et M5, où la maturation myéloïde est faiblement observée, l'expression de MNDA est positive avec des variations dans le pourcentage de cellules positives et de l'intensité de la réponse au marquage (par immunodétection). Parmi les 5 cas de leucémie aiguë myéloblastique sans maturation (FAB M1), 3 étaient négatifs et 2 positifs pour l'expression de MNDA. Suite à l'analyse de 4 cas de leucémie aiguë lymphocytaire, ils ont observé qu'aucune d'entre elles n'était positive pour MNDA. La même chose a été observée lors de l'analyse de 2 cas de leucémie aiguë biphénotypique et 1 cas de leucémie lymphoïde (Cousar and Briggs, 1990). Ces résultats indiquent que l'expression de MNDA corrèle avec la différenciation des granulocytes et des monocytes dans les leucémies myéloïdes aiguës.

### **1.9 Hypothèse**

La protéine MNDA est anormalement régulée dans plusieurs cas de MDS et d'AML. L'expression anormale de MNDA dans les cellules hématopoïétiques induit un dérèglement moléculaire qui favorise l'apparition de ces maladies.

Pour apprendre sur la fonction de MNDA et son influence sur les processus cellulaires lors de l'hématopoïèse, nous avons essayé de caractériser cette protéine. Cette caractérisation est : 1) déterminer sa localisation cellulaire. La localisation cellulaire pourrait indiquer sa

fonction, 2) déterminer si MNDA fait partie d'un complexe protéique. La nature des partenaires composant le complexe serait informatif sur le(s) rôle(s) possible(s) de MNDA.

## **2. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 2.1 Extraction d'ARN

Les extractions d'ARN sont effectuées à l'aide de Trizol (Invitrogen), tel que décrit dans la fiche technique du produit. Afin d'exécuter l'expérience de RT-PCR, l'ARN est extrait de  $5 \times 10^6$  cellules hématopoïétiques humaines. Ces cellules sont obtenues par la procédure d'aphérèse. Brièvement, cette procédure a pour but de mobiliser les cellules progénitrices hématopoïétiques dans les voies sanguines du patient par le traitement à la cytokine G-CSF. L'ARN est resuspendue dans 50  $\mu$ l d' $H_2O_{DEPC}$  et quantifiée par spectrophotométrie.

## 2.2 RT

L'ADN complémentaire total est synthétisé à partir de 2  $\mu$ g d'ARN à l'aide de l'enzyme transcriptase inverse SuperScript RT (Invitrogen) en incubant pendant une heure à 37°C, suivi d'une incubation de 15 min à 70°C pour inactiver l'enzyme.

## 2.3 PCR et clonage

S'en suit d'une série de réactions PCR afin d'avoir l'insert ADNc de MNDA pour le clonage. Les réactions de PCR sont faites à l'aide de l'enzyme *pfu* (Promega) car cette polymérase assure une plus grande fidélité dans la duplication de l'ADN. Une première réaction de PCR est faite avec les amorces MNDAC et MNDAD (voir tableau 3) qui ne donne aucun produit non-spécifique. Les conditions de PCR sont les suivantes : 3 min à 95°C; 31 cycles de 1 min à 95°C, 45 sec à 60°C et 2 min à 72°C; puis une élongation finale de 5 min à 72°C. Une deuxième réaction de PCR est faite à partir du produit de la première réaction avec les amorces internes «*nested*» MNDAE5' et MNDAE3' (voir tableau 3). Ces amorces permettent de modifier l'ADNc de MNDA en ajoutant des sites de restriction *EcoR* I en 5' et en 3', une séquence Kozak (Kozak, 1987) en amont de l'ATG et en enlevant le codon d'arrêt de MNDA. L'ajout des sites *EcoR*I facilite le clonage subséquent, la séquence Kozac sert à augmenter le potentiel de traduction de ARNm. Les conditions de PCR sont les mêmes que décrites précédemment. Les produits de PCR sont visualisés sur gel d'agarose 2% à l'aide de bromure d'éthidium et le transilluminator avec la lumière ultra violet.

Le produit de PCR est digéré par *EcoR* I, puis cloné dans le vecteur pcDNA3.1B/ V5-His (Invitrogen) préalablement digéré par *EcoR* I pour produire le vecteur pcDNA3.1B/MNDA-V5-His. Ce clonage permet de faire un séquençage qui révèle que l'ADNc de MNDA comporte une mutation silencieuse.

Tableau III : Liste des amorces utilisées

Nom donné à l'amorce	Séquence	Caractéristiques
MNDAC	5'-GTGGTACCATGGTGAATGAATACAAG-3'	—
MNDAD	5'-AAGGTACCTCAATTAACATTTCATTGGTC-3'	—
MNDAE5'	5'-TTGAATTCGCCACCATGGTGAATGAATACAAG-3'	Site <i>EcoR</i> I, séquence Kozak
MNDAE3'	5'-GGGAATTCTTAACATTTCATTGGTCCTTCCTTG-3'	Site <i>EcoR</i> I, abolition du codon d'arrêt

## 2.4 Cultures cellulaires et transfections

### 2.4.1 Cellules COS-7

Les cellules COS-7 sont cultivées dans du milieu «*Dulbecco's modified Eagle's medium*» (DMEM) (Gibco), supplémenté avec 10% de sérum de fœtus bovin (FBS) (Sigma) et de la pénicilline (100 U/ml)-streptomycine (100 µg/ml) (Gibco) dans l'incubateur cellulaire à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules sont passées à 70% de confluence tous les 2-3 jours. Les transfections stables des cellules COS-7 sont effectuées par électroporation. On resuspend 2 X 10<sup>6</sup> cellules dans 400 µl de milieu de culture qui sont électroporées avec 20 µg d'ADN dans une cuvette 4mm, à 170 volts et à 950 µF (GenePulser Xcell, Bio-Rad). La sélection des clones stables est effectuée avec 1,1mg/ml de généticine (G418).

### 2.4.2 Cellules HL-60

Les cellules HL-60 sont cultivées dans du milieu RPMI, supplémenté avec 20% de FBS (Sigma) et de la pénicilline (100 U/ml)-streptomycine (100 µg/ml) (Gibco) dans l'incubateur cellulaire à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules sont passées tous les 2-3 jours pour que la concentration ne dépasse pas 1x10<sup>6</sup> cellules/ml.

### **2.4.3 Isolation de monocytes humains**

Une solution de saline avec 3% de Dextran est préparée. Le sang est mélangé dans un volume égal de 3% Dextran saline. S'en suit une incubation de 35min à la température de la pièce. Le surnageant du sang est par la suite aspiré et déposé tranquillement sur le Ficoll contenu dans un tube contenant 5ml de Ficoll-Paque. Suite à la centrifugation de 20min à 1500rpm et la température pièce, la couche de cellules mononucléaires est récoltée. Les cellules sont mises en culture (RPMI, 20%, FBS (Sigma) et pénicilline (100 U/ml)-streptomycine (100 µg/ml) (Gibco) dans l'incubateur cellulaire à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub> pendant une heure. Les cellules qui auront adhéré sont des monocytes.

### **2.4.4 Isolation de neutrophiles humains**

Une solution de saline avec 3% de Dextran est préparée. Le sang est mélangé dans un volume égal de 3% Dextran saline. S'en suit une incubation de 35 minutes à la température de la pièce. Le surnageant du sang est par la suite aspiré et déposé tranquillement sur le Ficoll contenu dans un tube contenant 5ml de Ficoll-Paque. S'en suit une centrifugation de 20 minutes à 1500rpm et à la température pièce. Le surnageant est jeté. Les cellules sont resuspendues dans 2ml 0,2% NaCl pour une incubation de 25 secondes. 2mL 1,6% NaCl, 6mL PBS 1X/ 0,1% BSA / 0,1% glucose sont ensuite rajoutés. S'en suit une centrifugation de 10 minutes à 1300rpm température pièce. Le surnageant est ensuite jeté et les cellules resuspendues dans 1ml de tampon HANK(-)/ 0,1% BSA

## **2.5 Microscopie**

### **2.5.1 Immunofluorescence indirecte sur les cellules HL-60**

Les lames sont préalablement traitées à la poly-L-lysine (Sigma). Les cellules sont déposées sur lames. Les cellules sont fixées 30 minutes dans une solution de formaldéhyde 4% en PBS. Suit deux lavages de 5 minutes, les lames sont bloquées dans 5% de lait en poudre écrémé dans du PBS. Les lames sont ensuite incubées avec la solution d'anticorps primaire : chèvre anti-MNDA (SantaCruz) dilué dans du PBS, 1% BSA et 0,1% triton, pendant 45-60 minutes à la température de la pièce. Après un lavage, les lames sont incubées 45-60 minutes avec l'anticorps secondaire : lapin anti-chèvre IgG-FITC (Sigma)

dilué dans du PBS, 1% BSA et 0,1% Triton. Suite au lavage et à la déshydratation des lames, les noyaux sont colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (Sigma/Vector Laboratories).

### **2.5.2 Immunofluorescence indirecte sur les monocytes primaires**

Les lames sont préalablement traitées à la poly-L-lysine (Sigma). Les cellules sont poussées directement sur lame pendant une heure. Il s'en suit deux lavages de 5 minutes en PBS. Les cellules sont fixées par l'immersion des lames pendant 20 minutes dans une solution de méthanol 100% à -20°C. Ceci est suivi d'une réhydratation dans une solution de PBS-1%BSA et d'une perméabilisation de 30 minutes avec 0,1% de Triton X-100 dans du PBS. Suite à deux lavages de 5 minutes, les lames sont bloquées dans 10% de FBS. Les lames sont ensuite incubées avec la solution d'anticorps primaire : anti-MNDA (SantaCruz) dilué dans du PBS, 1% BSA et 0,1% Triton, pendant 45-60 minutes à la température de la pièce. Après un lavage, les lames sont incubées 45-60 minutes avec l'anticorps secondaire : lapin anti-chèvre IgG-FITC (Sigma) dilué dans du PBS, 1% BSA et 0,1% Triton. Suite au lavage et à la déshydratation des lames, les noyaux sont colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (Sigma/Vector Laboratories).

### **2.5.3 Coloration «Neutral red»**

Le colorant rouge neutre (*Neutral red*, NR) est utilisé comme marqueur afin d'identifier les cellules monocytaires. Nous utilisons 100µl de cellules auxquelles nous ajoutons 100µl de colorant *Neutral red* (Sigma) (0,1% dans 0,85% NaCl), 800µl HBSS contenant du Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> est rajouté. Le tout est ensuite incubé 10 minutes à 37°C. S'en suit l'étalement des cellules sur lames et la visualisation au microscope.

## **2.6 Cytométrie en flux**

### **2.6.1 Tri cellulaire**

Les cellules HL-60 sont récoltées et lavées à deux reprises dans une solution PBS contenant 2%FBS et 0,1% BSA. Par la suite, les cellules sont resuspendues dans la même solution de tampon à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/ml à laquelle est rajouté un volume égal de 5mM de colorant Hoechst. S'en suit une incubation de 15 minutes à 37°C et une analyse à

l'aide d'un trieur munit de l'option DIVA «Digitalized Vantage» (Becton Dickinson) qui permet le tri de cellules selon les phases du cycle cellulaire.

### 2.6.2 Cycle cellulaire

Pour l'analyse du cycle cellulaire,  $3-5 \times 10^5$  cellules sont resuspendues dans 1 ml de 1,1% EDTA-PBS, auquel 3 ml d'éthanol froid sont ajoutés, goutte à goutte en vortexant, pour fixer les cellules. Les échantillons sont ensuite placés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'au jour du marquage. Le jour du marquage, les échantillons sont centrifugés, lavés avec 4 ml de 1,1% EDTA dans du PBS et centrifugés de nouveau. Les culots de cellules sont resuspendus dans 1 ml de solution de Krishan (0,1% citrate de sodium, 0,02 mg/ml RNase A, 0,3% NP-40 et 0,05 mg/ml iodure de propidium (PI)). L'acquisition des données est effectuée au FACScan (Becton Dickinson) avec le logiciel CellQuest (BD Biosciences), puis l'analyse est exécutée avec le logiciel ModFit (Verity Software House).

### 2.7 Co-Immunoprécipitation

Les cellules HL-60 sont d'abord lavées par centrifugation dans du PBS froid. Le culot de cellules HL-60 est lysé 15 minutes à  $4^\circ\text{C}$  sur plaque dansante, dans un tampon RIPA contenant 150 mM de NaCl, 1% NP-40, 0,25% Na-deoxycholate, 50 mM de Tris HCl (pH 7,4), 1mM d'EDTA, des inhibiteurs de protéases (1mM de PMSF,  $1\mu\text{g/ml}$  d'aprotinine,  $1\mu\text{g/ml}$  de leupeptine,  $1\mu\text{g/ml}$  de pepstatine A, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1mM NaF). Après centrifugation à 14 000g, le surnageant est conservé et un dosage des protéines contenues dans ces échantillons est réalisé par la méthode de Bradford (Bio Rad). Pour l'immunoprécipitation, les cellules sont incubées en présence du premier anticorps dans un volume final de  $500\mu\text{l}$  de RIPA contenant  $500\mu\text{g}$  de protéines. Les anticorps primaires qui sont utilisés dans cette étude sont les anticorps chèvre anti-MNDA (Santa Cruz Biotechnology), lapin anti-tubuline $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology), lapin anti-NPM (Santa Cruz Biotechnology), et souris anti-EF1 $\alpha$  (Upstade). De plus,  $5\mu\text{g}$  d'anticorps sont utilisés par réaction de  $500\mu\text{g}$ . Après 16 heures d'incubation à  $4^\circ\text{C}$ , les complexes MNDA-anticorps sont incubés avec  $50\mu\text{l}$  de Protéine G Agarose (Upstade) un autre 16heures. Les complexes immunoprécipités sont ensuite lavés trois fois avec le tampon RIPA. Les immunoprécipités sont solubilisés dans  $60\mu\text{l}$  de tampon Laemmli 2X et portés à ébullition pendant 5 minutes afin de dissocier les billes d'agarose du complexe. Le tout est ensuite centrifugé pour

récolter le surnageant. Le surnageant est déposé sur gel SDS-PAGE 10% avant d'être analysés.

### **2.8 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide**

Les extraits protéiques totaux sont obtenus en resuspendant  $1 \times 10^6$  cellules dans 60  $\mu$ l de solution saline/PMSF (0,9% NaCl, 1mM PMSF), puis les extraits sont soniqués pendant 5 secondes. S'en suit une incubation de 30 minutes sur glace suivi d'une quantification de Bradford. Les extraits protéiques (volume de 30  $\mu$ l) sont ensuite soumis à une séparation sur un gel SDS-polyacrylamide de 10% avec le système Mini Protean II (*Bio-Rad*).

### **2.9 Coloration à l'argent**

Immédiatement après l'électrophorèse, le gel est fixé dans 200mL de 50% méthanol : 10% acide acétique au moins 30 minutes sur plaque dansante. S'en suit 3 lavages de 10 minutes chacun dans 200mL de 15% méthanol sur plaque dansante. Le gel est transféré dans une solution fraîchement préparée de 7,5% glutaraldéhyde pour 15 minutes à 37°C avec agitation modérée. S'en suit 3 combinaisons de lavages (1 combinaison équivaut à un lavage de 15 minutes dans 200mL de méthanol suivi d'un autre de 10 minutes dans 200mL d'eau déionisé). Le gel est ensuite transféré dans une solution 2% d'argent pendant 10 minutes sur plaque dansante. Le gel est en suite lavé dans 200mL d'eau déionisé. Le gel est développé avec 200mL de 0,005% d'acide citrique/0,0185% de formaldéhyde. Une fois les bandes bien révélées, la réaction est arrêtée avec 200mL de solution d'acide acétique à 5%.

### **2.10 Coloration Sypro**

Immédiatement après l'électrophorèse, le gel SDS-Page est placé dans une solution de fixation 10% méthanol/ 7% acide acétique pendant 30 minutes. S'en suit un lavage rapide dans de l'eau. Le gel est alors incubé pendant 2 heures dans une solution de Sypro (*Bio-Rad*) sur une plaque dansante. Les protéines sont détectées avec une lampe ultraviolet.

### **2.11 Western blot**

Suite à la migration sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (*Amersham Biosciences*). La membrane est bloquée avec du lait écrémé (5% dans du TBS). La membrane est ensuite incubée 16 heures à 4°C avec l'anticorps primaire : chèvre anti-MNDA (*Santa Cruz Biotechnology*), dilué dans du lait écrémé (1% dans du TBS) à une concentration de 1 :100. L'anticorps secondaire :

lapin anti-chèvre IgG conjugué à la peroxydase (Sigma), est dilué dans du lait écrémé (1% dans du TBS) à une concentration de 1 :1000 et est incubé pendant 2 heures à la température de la pièce. Après chaque anticorps, la membrane est lavée trois fois 10 minutes dans 0,05% Tween 20 dans du TBS. L'anticorps secondaire est révélé avec une trousse de chemiluminescence (Lumiligh Plus : Roche), puis détecté avec le système d'imagerie LAS-3000 (Fuji Life Science). Les autres anticorps utilisés sont les suivants : lapin anti-NPM (Santa Cruz Biotechnology) à une concentration de 1 :100 et chèvre anti-lapin IgG conjugué à la peroxydase (Sigma); lapin anti-tubuline (Santa Cruz Biotechnology) à une concentration de 1 :100 et chèvre anti-lapin IgG conjugué à la peroxydase (Sigma); souris anti- EF1 $\alpha$  (Upstade) à une concentration de 1 :500 et chèvre anti-souris IgG conjugué à la peroxydase (Sigma); souris anti-CD3 (Chemicon) à une concentration 1 :1000, et chèvre anti-souris IgG conjugué à la peroxydase (Sigma).

### **3. RÉSULTATS**

La fonction de MNDA est inconnue. Afin de jeter une lumière sur le rôle de cette protéine, nous avons déterminé sa localisation et ses partenaires protéiques.

### **3.1 Localisation de MNDA**

#### **3.1.1 Immunofluorescence de MNDA sur la lignée cellulaire HL-60**

Pour déterminer la localisation précise de MNDA, nous avons employé la technique d'immunofluorescence. La lignée cellulaire humaine leucémique HL-60 exprime constitutivement MNDA (Briggs *et al.*, 1994c). Tandis que la lignée cellulaire humaine érythroleucémique K562 ne l'exprime pas (Briggs *et al.*, 1994c). Tel qu'attendu, nous remarquons que MNDA est indétectable dans les cellules K562 (figure 3a), mais présente dans les cellules HL-60 (figure 3b). La déconvolution de l'image obtenue avec les cellules HL-60 cerne mieux la localisation de MNDA (figure 3c). L'agrandissement d'une cellule provenant d'une image de déconvolution permet de confirmer que MNDA a un patron de localisation nucléaire (figure 3d). Néanmoins, nous constatons au niveau du noyau une grande concentration de MNDA localisée dans une excavation, semblable au nucléole, délimitée par de l'hétérochromatine. Cela suggère que le patron de localisation de la protéine MNDA est majoritairement nucléolaire.

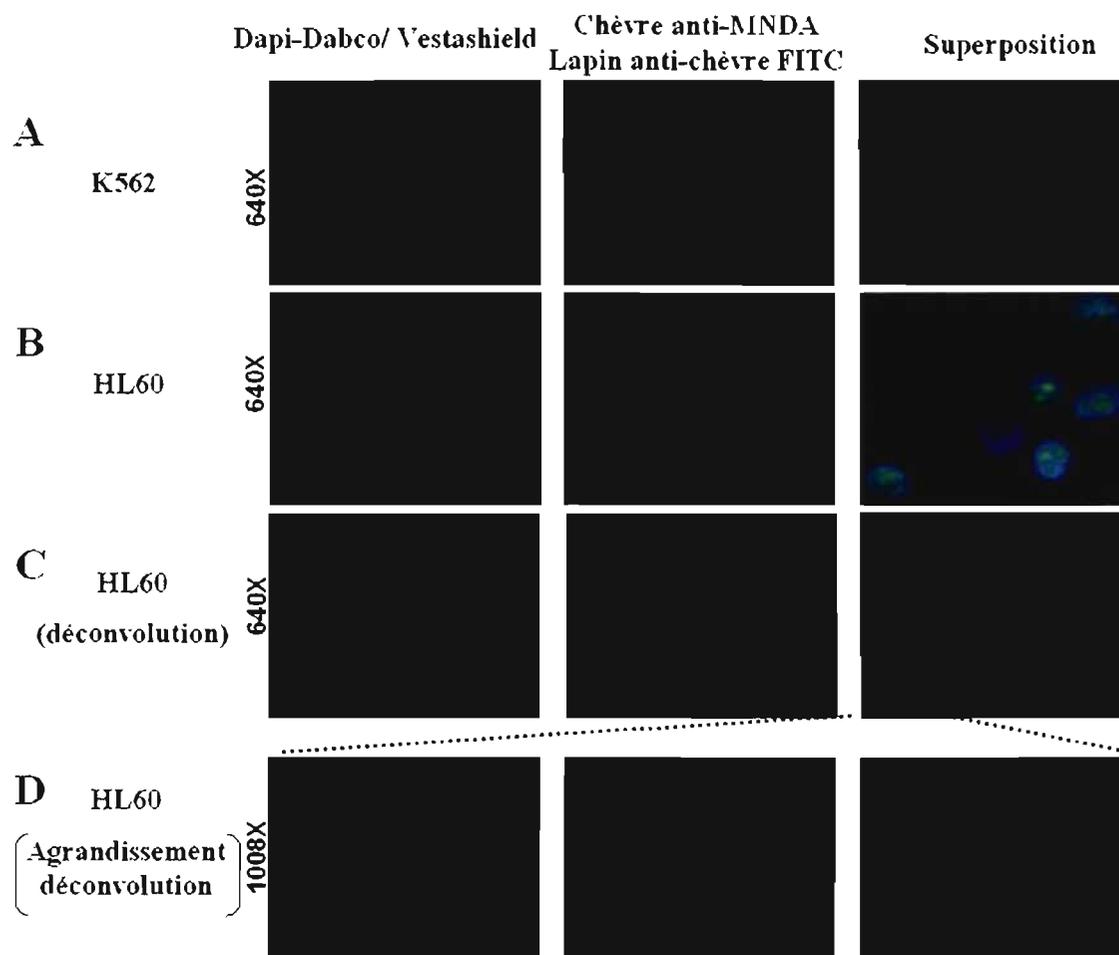


Figure 3 : Localisation cellulaire de MNDA par la technique d'immunofluorescence. (A) Contrôle négatif pour l'expression de MNDA, cellules K562; (B) Cellules exprimant MNDA, cellules HL-60; (C) Image de déconvolution des cellules HL-60; (D) Agrandissement de l'image d'une cellule HL-60 suite à la déconvolution pour mettre en évidence la localisation nucléaire et majoritairement nucléolaire de MNDA. Les noyaux sont colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). Le marquage des cellules est fait avec l'anticorps primaire (chèvre anti-MNDA) et l'anticorps secondaire (lapin anti-chèvre IgG) conjugué au FITC (vert). La superposition des deux marquages est également montrée.

Dans la littérature, il est démontré par immunoprécipitation que la protéine NPM est capable d'interagir avec la protéine MNDA (Xie *et al.*, 1997). NPM est une protéine connue pour sa localisation nucléolaire (Lim and Wang, 2006). Nous avons donc pensé faire une double détection par immunofluorescence de NPM et MNDA. Cette double localisation permet de confirmer d'une part, si la localisation de MNDA est bien nucléolaire et d'autre part de voir où se localise, dans la cellule, l'interaction de MNDA avec NPM. La figure 4a illustre un

exemple de déconvolution de cellules doublement marquées. NPM a une localisation nucléolaire, située majoritairement dans une excavation du noyau qui semble bien indiquer le nucléole. De plus, nous constatons la co-localisation de MNDA et de NPM aux nucléoles. Le double marquage de MNDA et NPM permet de voir à l'occasion la protéine MNDA de façon concentrée près du noyau au niveau du centrosome (figure 4b) (Poole *et al.*, 2005). Selon le cycle cellulaire, NPM est relocalisé au centrosome où il est impliqué dans la régulation de la duplication de celui-ci (Okuda, 2002).

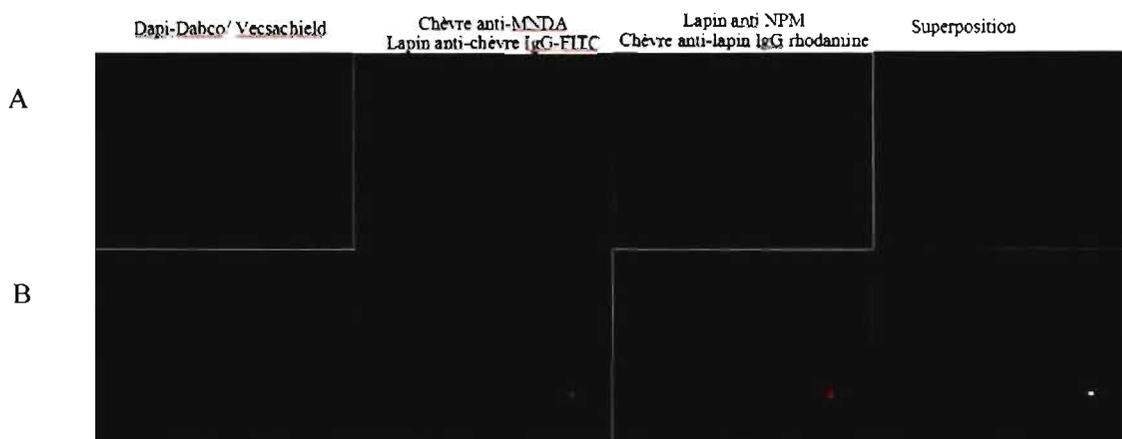


Figure 4 : Image de déconvolution indiquant la colocalisation cellulaire de MNDA et NPM par la technique d'immunofluorescence dans les cellules HL-60. Le marquage des cellules est fait avec l'anticorps primaire chèvre anti-MNDA et l'anticorps secondaire lapin anti-chèvre IgG conjugué au FITC (vert) suivi de l'anticorps lapin anti-NPM et l'anticorps secondaire chèvre anti-lapin IgG conjugué à la rhodamine (rouge). La superposition des trois marquages est également montrée. (A) Co-localisation nucléolaire; (B) Co-localisation possible au centrosome. Les noyaux sont colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu).

### 3.1.2 Immunofluorescence de MNDA et de la tubuline gamma sur les monocytes primaires humains

Afin de confirmer que MNDA se localise au centrosome, nous utilisons comme marqueur la tubuline gamma (Joshi, 1994). La détection de la tubuline gamma par immunofluorescence est évidente avec les cellules adhérentes et non les cellules en suspension tel que les HL-60 (constatation personnelle). Un autre modèle cellulaire est donc utilisé afin de vérifier si MNDA est localisé au centrosome. Puisque MNDA est exprimé dans la lignée monocyttaire,

nous avons utilisé des cellules humaines primaires de monocytes. Ces cellules sont obtenues par une procédure de séparation par gradient de Ficoll (figure 5).

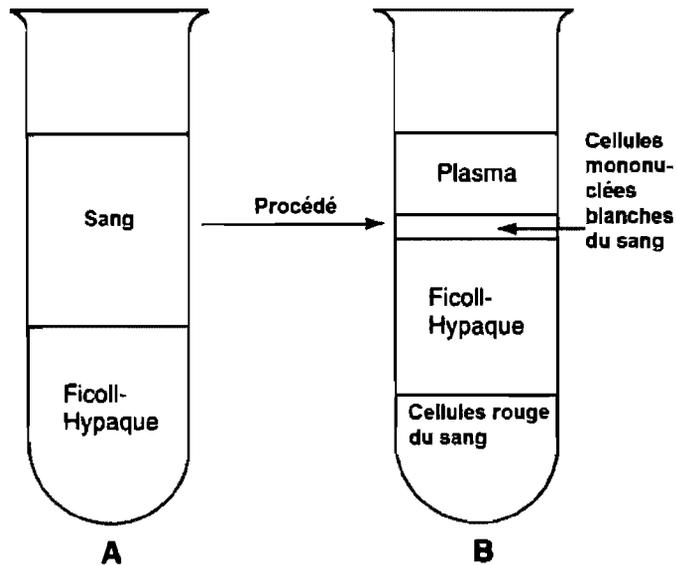


Figure 5 : Représentation schématique de la technique de séparation par gradient au Ficoll. Isolation des cellules mononuclées blanches du sang avec le gradient de Ficoll A, en premier lieu et B, en second.

Nous avons mis en culture les cellules mononuclées blanches du sang qui contient plusieurs types cellulaires tels que des lymphocytes et des monocytes. Après une heure en culture, les monocytes adhèrent à la surface du contenant de culture. Cela permet d'obtenir les monocytes en se débarrassant des autres types cellulaires suite au lavage des cellules adhérentes. Afin de s'assurer que cette technique produit un nombre important de monocytes pour étudier MNDA, nous avons procédé à une coloration au *Neutral red* des cellules adhérentes. Ce colorant est spécifique pour les monocytes (figure 6).

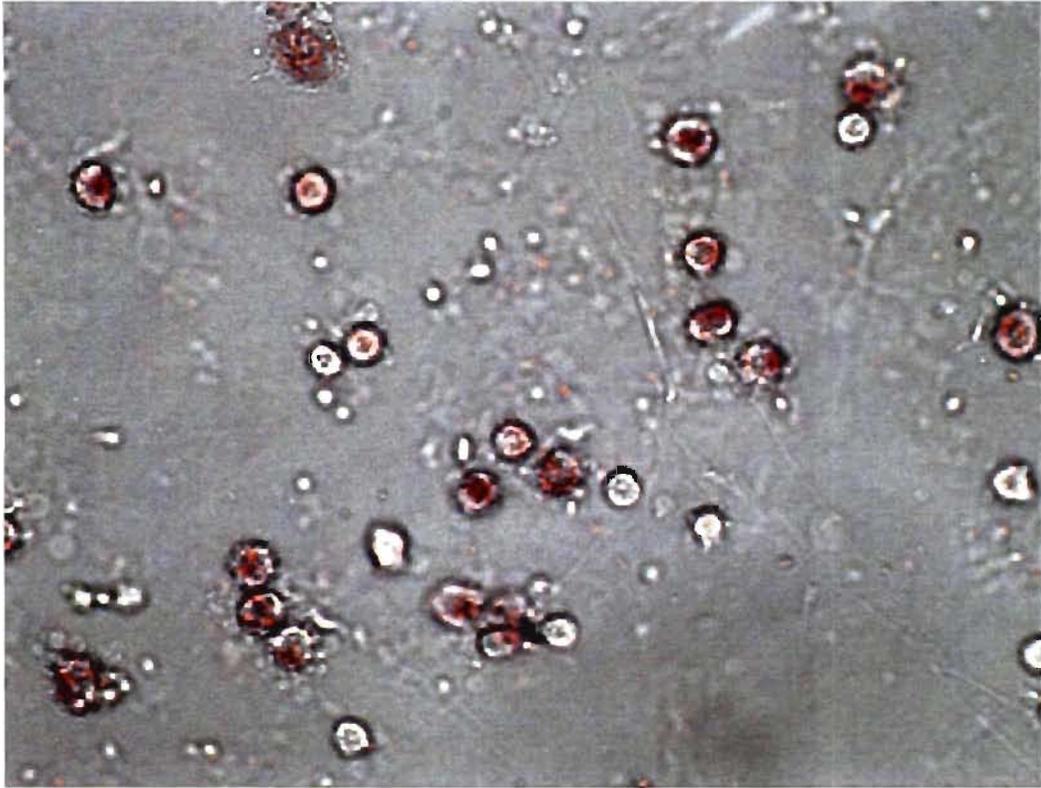


Figure 6 : Coloration au *Neutral Red*. Les cellules ayant adhérées sont color es après la mise en culture de la couche de cellules mononuclées blanches du sang suite à la séparation aux gradients de Ficoll.

---

Le décompte des lames marquées avec le *Neutral Red* montre 80% de cellules positives, indiquant que cette technique permet un fort enrichissement des monocytes.

L'immunofluorescence avec des anticorps MNDA montre 77% des cellules monocytaires possédant MNDA nucléaire. À la figure7 nous pouvons voir un exemple de monocyte primaire humain marqué.

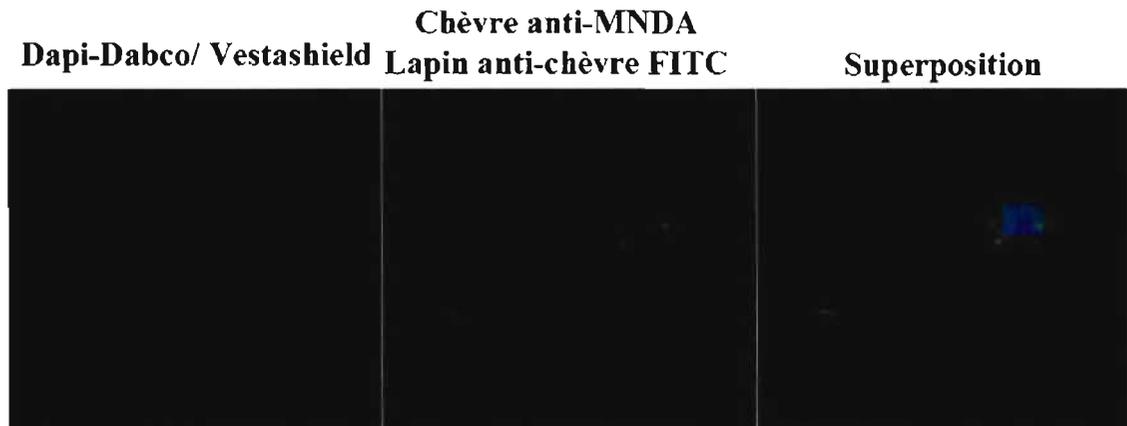


Figure 7 : Détection de MNDA par la technique d'immunofluorescence dans les monocytes primaires isolés avec la technique de gradient au Ficoll. Les noyaux sont colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). Le marquage des cellules est fait avec l'anticorps primaire chèvre anti-MNDA et l'anticorps secondaire lapin anti-chèvre IgG conjugué au FITC (vert). La superposition des deux marquages est également montrée.

---

Une coloration à l'iodure de propidium (PI) a permis de définir le profil du cycle cellulaire des cellules adhérentes (figure 8).

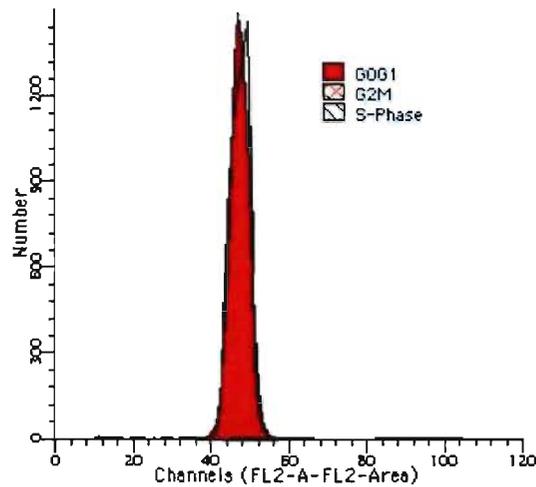


Figure 8 : Analyse du cycle cellulaire des cellules monocytaires primaires humaines. Les cellules ont été fixées à l'éthanol puis, marquées au PI. L'acquisition des données a été effectuée en cytométrie en flux et l'analyse des données a été faite à l'aide du programme «ModFit» qui donne le profil du cycle ainsi que la proportion de cellules dans chacune des phases sous forme de l'aire sous la courbe. Rouge : nombre de cellules en phase  $G_0/G_1$ ; quadrillé rouge : nombre de cellules en phase G2-M; lignée bleue : nombre de cellules en phase S.

---

Cette technique permet de démontrer que 99% de nos cellules sont dans la phase  $G_0/G_1$ . Nous avons ensuite fait le double marquage de MNDA et de la tubuline gamma afin de vérifier la localisation de MNDA au centrosome.

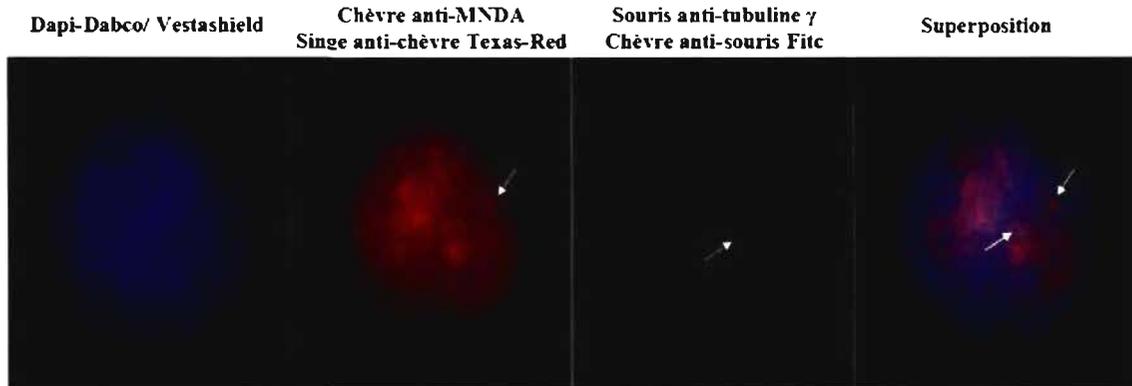


Figure 9 : Image d'immunofluorescence de la double détection de MNDA et de la tubuline gamma sur les monocytes primaires. Les noyaux sont colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). Le marquage des cellules est fait avec l'anticorps primaire chèvre anti-MNDA et l'anticorps secondaire singe anti-chèvre IgG conjugué au Texas-Red (rouge) suivi de l'anticorps souris anti-tubuline gamma et l'anticorps secondaire chèvre anti-souris IgG conjugué au FITC (vert). La superposition des trois marquages est également montrée

Nous voyons peu de cellules monocytaires avec MNDA au niveau du centrosome. Cependant, le marquage à la tubuline gamma, suggère que dans ces cellules, MNDA ne se retrouve pas au centrosome (figure9). Comme ces cellules sont presque uniquement en  $G_0/G_1$ , nous ne pouvons exclure que MNDA se retrouve au centrosome à une autre phase du cycle cellulaire. Ceci est le cas de NPM dont la localisation au centrosome est dépendante du cycle cellulaire (Okuda, 2002).

### 3.1.3 Immunofluorescence de MNDA sur les neutrophiles primaires humains

Le gradient au Ficoll permet également d'isoler des neutrophiles. Sachant que MNDA est exprimée dans la lignée des monocytes et neutrophiles, nous avons décidé de déterminer la localisation de MNDA dans ces derniers. Il est aussi intéressant de voir la localisation de MNDA dans un autre type cellulaire ayant un stade de différenciation final.

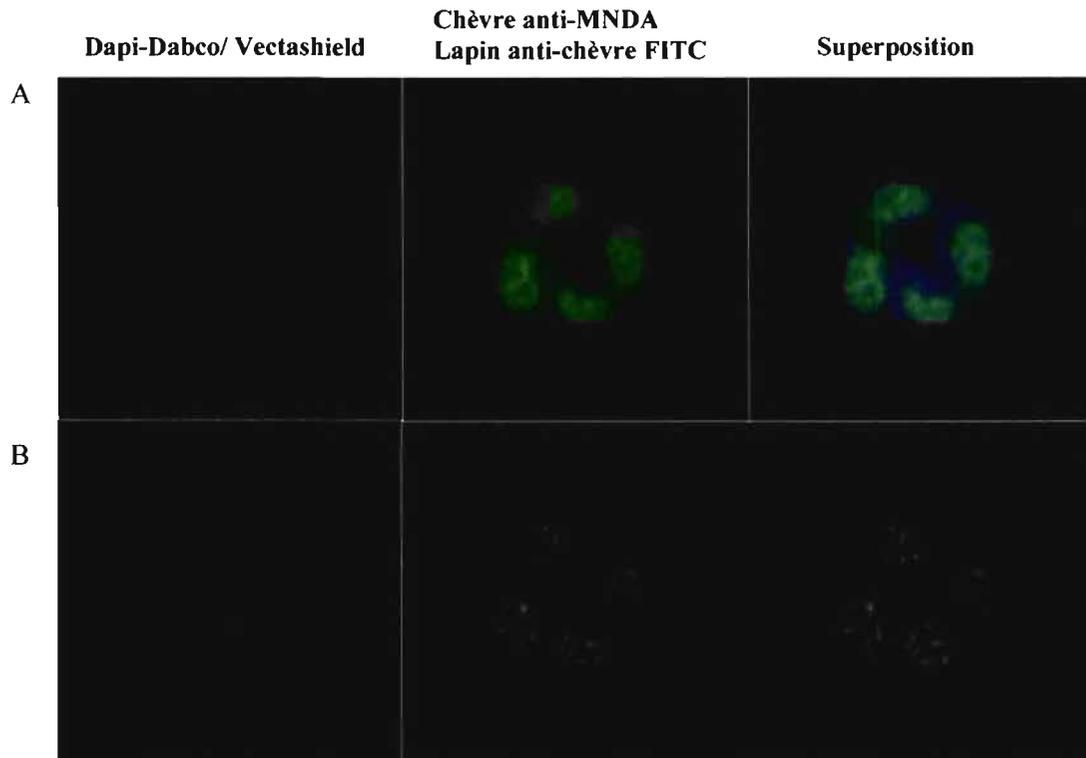


Figure 10 : Immunofluorescence de MNDA dans les neutrophiles primaires humains. (A) Localisation cellulaire de MNDA par la technique d'immunofluorescence dans les neutrophiles primaires. (B) Image de déconvolution des neutrophiles primaires pour mettre en évidence la localisation nucléaire de MNDA. Les noyaux sont colorés au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). Le marquage des cellules est fait avec l'anticorps primaire chèvre anti-MNDA et l'anticorps secondaire lapin anti-chèvre IgG conjugué au FITC (vert). La superposition des deux marquages est également montrée.

Nous pouvons voir que MNDA maintient une localisation nucléaire dans des neutrophiles complètement différenciés. La déconvolution montre que MNDA semble se concentrée dans des régions de l'euchromatine (figure 10).

### 3.1.4 Localisation de MNDA dans les HL-60 selon le cycle cellulaire

MNDA montre différents patrons de localisation cellulaire dans les HL-60. Les résultats obtenus permettent de croire que la localisation cellulaire de MNDA est dépendante du cycle cellulaire (figure 11).

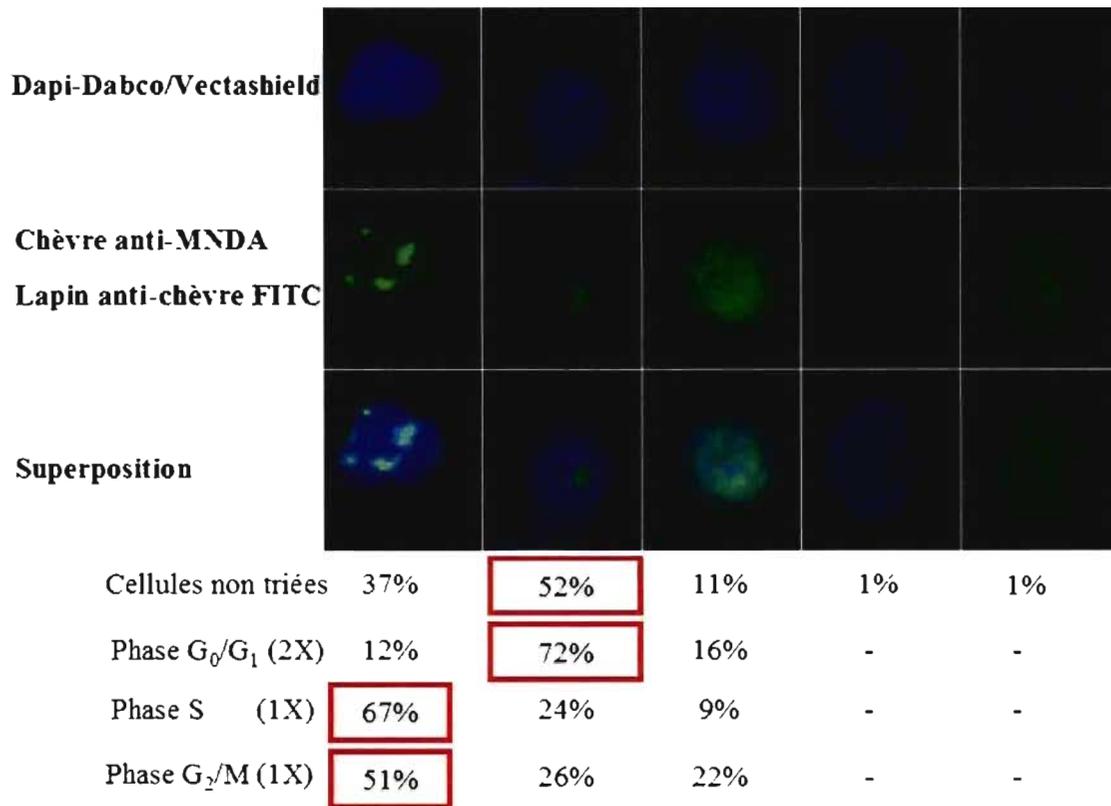


Figure 11 : Localisation de MNDA selon le cycle cellulaire des HL-60. Pourcentages de détection de chaque patron de localisation de MNDA selon la phase du cycle cellulaire. Les pourcentages encadrés en rouge correspondent au patron qui est majoritaire dans la dite phase du cycle cellulaire qui est cité à gauche.

### 3.1.5 Localisation de MNDA dans les cellules HL-60 en G<sub>2</sub>/M.

Mise à part la technique du tri cellulaire qui permet d'isoler les cellules selon la phase du cycle cellulaire, nous pouvons aussi utiliser des drogues pour enrichir la population de cellules dans une phase donnée. Par exemple, la colcémide est une drogue qui bloque les cellules en phase G<sub>2</sub>/M en empêchant la polymérisation des microtubules. Suite au traitement des cellules à la colcémide, nous avons détecté MNDA par immunofluorescence. Étonnamment, on constate que MNDA se retrouve au cytoplasme (figure 12). Ce résultat suggère que l'absence de la polymérisation des microtubules modifie l'organisation nucléaire de MNDA.

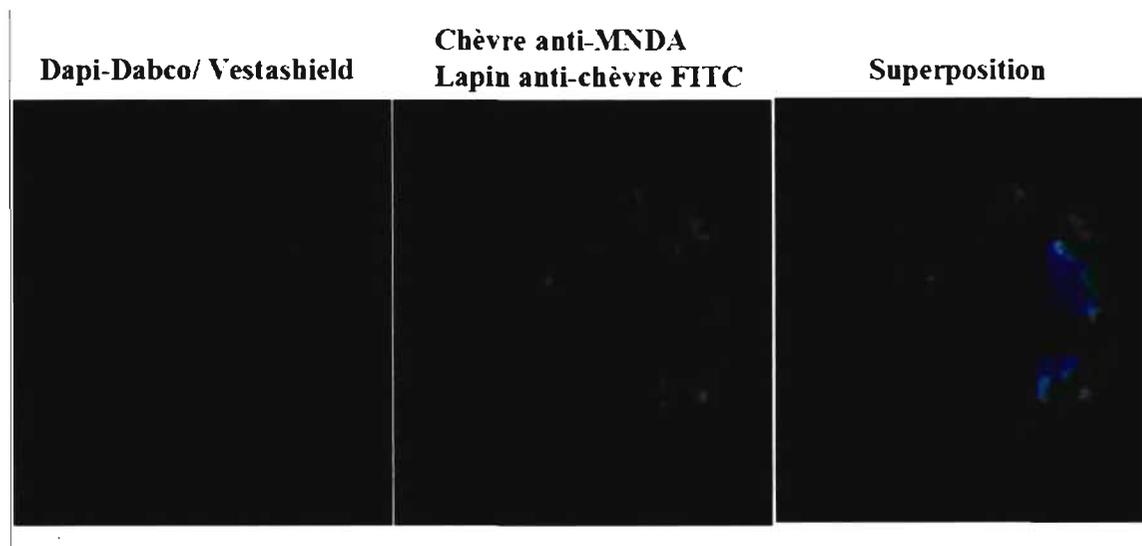


Figure 12 : Immunofluorescence suite au traitement à la colcémide sur les cellules HL-60. Localisation cellulaire de MNDA par la technique d'immunofluorescence dans une cellule HL-60 traitée à la colcémide. L'image de déconvolution indique clairement la localisation cytoplasmique de MNDA. Le noyau est coloré au Dapi-Dabco/Vectashield (bleu). Le marquage des cellules est fait avec l'anticorps primaire chèvre anti-MNDA et l'anticorps secondaire lapin anti-chèvre IgG conjugué au FITC (vert). La superposition des deux marquages est également montrée.

### 3.2 Co-immunoprécipitation avec la protéine MNDA

Pour déterminer si MNDA fait partie d'un complexe protéique, nous avons fait une co-immunoprécipitation. La co-immunoprécipitation est suivie d'un SDS-PAGE et d'une coloration à l'argent. Nous constatons que le patron de migration de l'immunoprécipitation avec l'anticorps dirigé contre MNDA (figure 13a) est différent de l'immunoprécipitation contrôle avec les billes sans l'anticorps (figure 13b). Ce patron suggère que MNDA interagit avec plusieurs protéines.

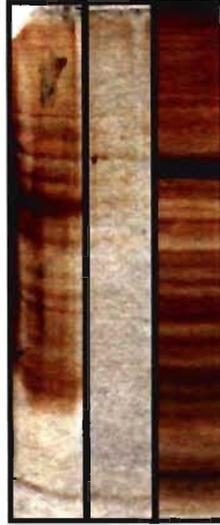


Figure 13 : Coloration à l'argent du gel des immunoprécipitations fait avec les protéines des cellules HL-60. (A) Immunoprécipitation avec l'anticorps dirigé contre MNDA, (B) immunoprécipitation contrôle seulement avec les billes d'Agarose, (C) Le lysat cellulaire des cellules HL-60 qui est utilisé pour faire la co-immunoprécipitation.

---

Nous avons répété la co-immunoprécipitation avec l'anticorps chèvre anti-MNDA, toujours suivi d'une séparation sur gel SDG-PAGE. Cette fois-ci nous avons coloré le gel à l'aide du colorant Sypro (Bio RAD) pour ne pas endommager les protéines. Ainsi, nous avons pu découper les bandes pour une analyse par spectrométrie de masse (figure 14).

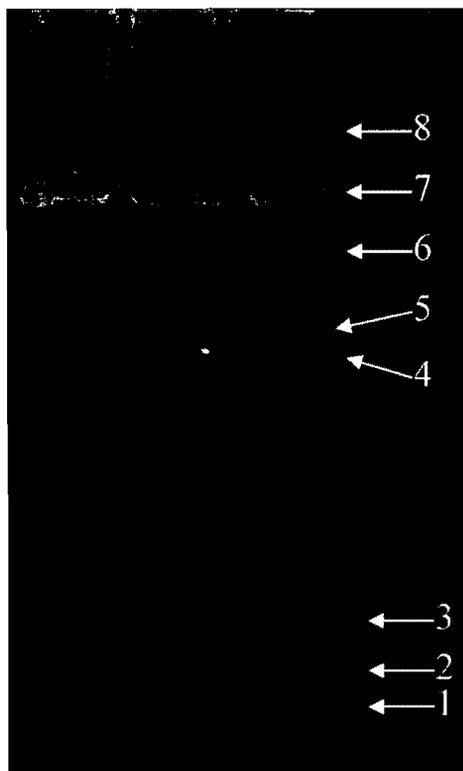


Figure 14 : Coloration au Sypro du gel de l'immunoprécipité à l'aide de l'anticorps MNDA. Les trois puits contiennent le même immunoprécipité. Les numéros identifient les bandes ayant été excisées pour la spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse a révélée plusieurs protéines interagissant avec MNDA (tableau IV). Nous avons décidé de confirmer l'interaction de MNDA avec la tubuline  $\beta$  et *Elongation Facteur 1 alpha* (EF1 $\alpha$ ), étant donné leur implication dans la régulation du cycle cellulaire (Derry *et al.*, 1995). En fait, il est rapporté que la dépolymérisation des microtubules peut influencer le cycle cellulaire, et les tubulines forment les microtubules. De plus, dans le tableau IV, nous retrouvons la tubuline  $\alpha$  et la Ran-GTPase. Nous supposons que la tubuline  $\alpha$  s'associe à la tubuline  $\beta$  pour former un hétérodimère de tubuline, et que la Ran-GTPase servirait à la polymérisation des microtubules à l'aide des hétérodimères; d'où la présence de ces trois protéines dans la co-immunoprécipitation. L'autre élément qui fait pencher le choix sur la tubuline  $\beta$  c'est le résultat d'une localisation cytoplasmique de MNDA suite à une dépolarisation des microtubules avec la drogue colcémide.

Quant à EF1 $\alpha$ , cette protéine est impliquée dans la traduction (Proud, 1994), comme NPM qui interagit avec MNDA (Xie *et al.*, 1997). Il est évident que la traduction est une partie intégrante du mécanisme de croissance et du cycle cellulaire. De plus, EF1 $\alpha$ , est co-immunoprécipité avec MNDA.

Tableau IV : Résultats de l'analyse de spectrométrie de masse

<b>Protéines identifiées</b>
Ran-GTPase
eIF3 p40
Tubuline $\beta$ 5
Tubuline $\alpha$ 6
Protéine ribosomale 60S L7
Elongation factor 1 alpha
Protéine ribosomale S2
Fetal liver RING finger protein.
Chaperonine (Hsp60)

L'interaction de MNDA avec la tubuline  $\beta$  et EF1 $\alpha$  est faite par co-immunoprécipitation inverse et suivit d'une détection par western blot (figure 15). Afin de s'assurer que notre technique est en mesure d'immunoprécipité des complexes, nous avons utilisé comme contrôle positif la protéine NPM qui interagit avec MNDA (Xie *et al.*, 1997); voir section 3.1.1). Les résultats de co-immunoprécipitation inverse, confirment que les interactions de MNDA et la tubuline  $\beta$  et EF1 $\alpha$  sont spécifiques.

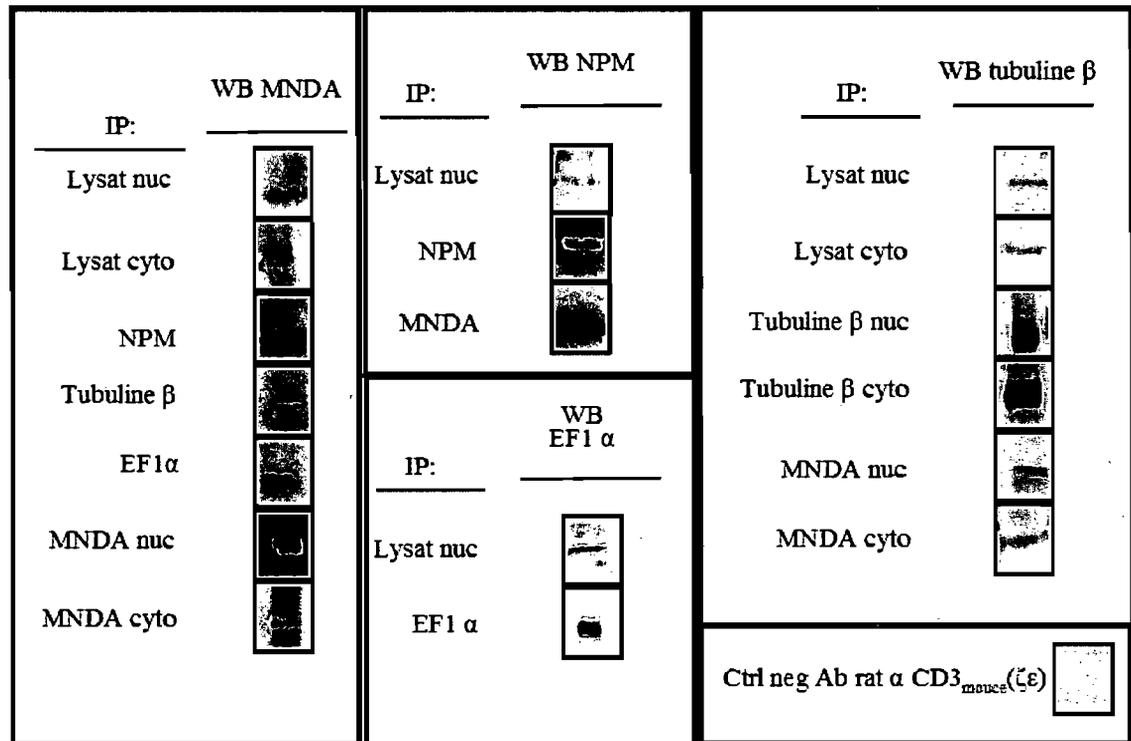


Figure 15 : Western blot sur les immunoprécipités. Les immunoprécipités (IP) faits à l'aide de l'anticorps dirigé contre MNDA sont transférés sur membrane pour détecter la tubuline $\beta$ , NPM et l'EF1 $\alpha$ . Les Westerns blots (WB) sont aussi faits pour détecter MNDA des immunoprécipités inverses.

### 3.3 Surexpression de MNDA et cycle cellulaire

Suite aux résultats d'immunofluorescence et de co-immunoprécipitation qui suggèrent l'implication de MNDA dans la régulation du cycle cellulaire, nous avons déterminé l'effet d'une expression ectopique de MNDA sur le cycle cellulaire. Pour ce faire, nous avons synthétisé l'ADN complémentaire (ADNc) de MNDA en effectuant une réaction de transcription inverse (RT) sur un extrait d'ARN de cellules myéloïdes provenant du procédé d'aphérèse (voir section 2.1). Cette étape de RT est suivie d'une série de réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) afin de cloner l'ADNc de MNDA dans le vecteur d'expression pcDNA3.1B/V5-His (Invitrogen) (voir section 2.2 et 2.3). Suite à des transfections dans les cellules K562 non fructueuses, c'est-à-dire que les cellules avaient la résistance à la néomycine (G418, généticine) mais dans lesquelles nous ne détectons pas MNDA par western blot, nous décidons de sous-cloner MNDA dans le vecteur d'expression pIRESpuro2 (BD Biosciences Clontech) (figure 16).

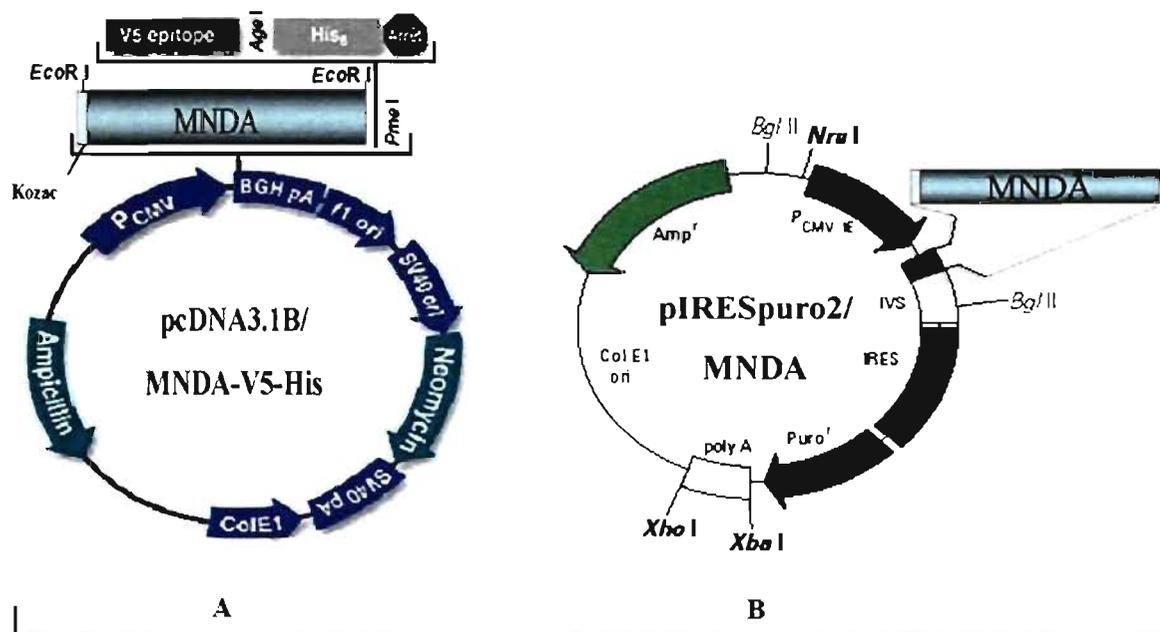


Figure 16 : Vecteurs d'expression contenant MNDA. A) Vecteur pcDNA3.1B/MNDA-V5-His, B) Vecteur pIRESpuro2/MNDA

Ce vecteur est connu pour son fort pouvoir d'expression. La transfection du vecteur pIRESpuro2/MNDA dans les cellules Cos7 a donné plusieurs clones Cos7 résistants à la puromycine. Au tout début de l'expansion des clones, nous avons tenté de les caractériser par coloration PI. Parmi ces clones, l'un d'eux semble avoir une déféctuosité dans son cycle cellulaire (figure 17). Comme plusieurs autres clones résistants à la puromycine, ce clone succombe à la mort cellulaire durant la culture. Cette mortalité est probablement associée à un blocage dans le cycle cellulaire comme on l'observe à la figure 17. La comparaison des cellules contrôles Cos7 avec celles du clone Cos7/pIRESpuro2/MNDA montre une plus grande proportion des cellules de ce dernier en phase  $G_0/G_1$  et une faible proportion en  $G_2$ . Ces résultats préliminaires nous suggèrent que la surexpression de MNDA engendre une modification du cycle cellulaire.

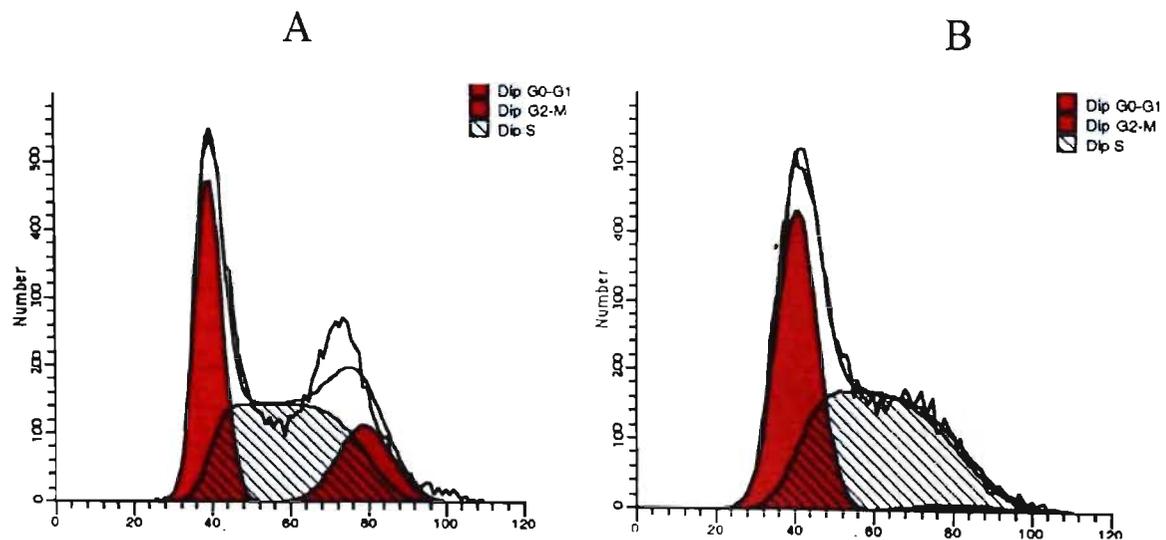


Figure 17 : Marquage du cycle cellulaire. A) Le cycle cellulaire des cellules contrôles Cos7; B) Le cycle cellulaire d'un des clones Cos 7/ pIRESpuro2/MNDA

## **4. Discussion**

Peu de choses sont connues au sujet de la protéine MNDA. Néanmoins, MNDA semble important lors de l'hématopoïèse puisque sa régulation anormale est observée dans certains cas de MDS et d'AML. Pour en savoir davantage sur la fonction de MNDA, nous avons principalement vérifié la localisation cellulaire de MNDA et déterminé ses partenaires d'interaction.

#### **4.1 MNDA a une localisation nucléaire et nucléolaire**

Les résultats d'immunofluorescence avec les cellules HL-60, qui expriment MNDA de manière constitutive, montrent que MNDA est localisé dans le noyau avec une accumulation prononcée possiblement au niveau du nucléole. Ceci suggère que MNDA a une fonction nucléaire et/ou nucléolaire. L'hypothèse du nucléole est suggérée parce que les foci d'accumulation de MNDA semblent être dans des structures délimitées par de l'hétérochromatine. Afin de vérifier si MNDA avait une accumulation préférentielle au nucléole, nous avons utilisé NPM, un marqueur du nucléole. De plus, NPM interagit avec MNDA (Ochs *et al.*, 1983). Nos résultats suggèrent que MNDA et NPM colocalisent au nucléole. NPM est, entre autre, impliquée dans la ribogenèse et dans le transport de protéines entre le nucléole et le reste du noyau. Puisque MNDA colocalise avec NPM au nucléole, il est possible que MNDA ait une fonction semblable à NPM au nucléole. Étant donné que dans la littérature la famille des protéines HIN-200 semble être associée à la régulation du cycle cellulaire, il est possible que MNDA d'une façon directe ou indirecte, agisse sur le mécanisme de traduction. Sachant que la traduction des protéines permet la croissance cellulaire; et que c'est uniquement quand la cellule a atteint un certain niveau de croissance qu'elle peut entamer le processus de mitose, nous proposons que MNDA influence le cycle cellulaire par l'entremise de la traduction. En fait, un des problèmes dans le syndrome de la myélodysplasie (MDS) est que la proportion des blastes est plus importante que celle des cellules différenciées dans le compartiment hématopoïétique. Dans le cas d'une expression anormale de MNDA, nous pouvons supposer que les cellules souches se divisent pour donner lieu aux progéniteurs et que ces progéniteurs ne seraient pas en mesure de continuer de se différencier. L'expression de MNDA commence au stade de monoblaste (Briggs *et al.*, 1994c). Si à ce stade de la différenciation MNDA a une expression anormale, cela pourrait bloquer la traduction. Cela bloquerait la croissance cellulaire et par le fait même, bloquerait le cycle cellulaire. Ainsi, la cascade de division et de différenciation cellulaire, se produisant lors de l'hématopoïèse pour obtenir les cellules

différenciées n'aurait pas lieu. Cela résulterait en un déséquilibre des blastes versus les cellules différenciées chez les patients ayant le MDS.

La localisation de NPM au nucléole pourrait influencer la voie d'activation ARF-p53 (Korgaonkar *et al.*, 2005). Puisque MNDA colocalise avec NPM au nucléole, il est possible que MNDA soit aussi impliquée dans cette voie de régulation du cycle cellulaire. En fait, le locus INK4a/ARF «*alternative reading frame*» contient deux gènes qui se chevauchent du fait d'un épissage alternatif. Les exons 1 $\beta$ , 2 et 3 codent pour l'un des deux gènes soit le gène p14<sup>ARF</sup> (p19<sup>ARF</sup> chez les rongeurs), qui est un gène suppresseur de tumeur qui agit négativement sur l'oncoprotéine Mdm2, impliquée dans la régulation négative de la protéine suppresseur de tumeur p53. La liaison de Mdm2 à p53 dans le noyau engendre la délocalisation du complexe du noyau vers le cytoplasme. Ainsi, p53 n'est plus en mesure d'exercer son activité (Colombo *et al.*, 2002). Également, Mdm2 est capable d'ubiquitiner p53 et la diriger vers le protéasome afin d'être dégradée. Dans des conditions normales, p53 a une demi-vie très courte, et n'est présente qu'en faible quantité. Diverses perturbations (lésion de l'ADN, hypoxie ou surexpression d'oncogènes) augmentent les niveaux cellulaires de p53. Le niveau de p53 augmente après phosphorylation de cette dernière sur la sérine 15 par les kinases ATM et ATR. En effet, la phosphorylation de p53 réduit sa fixation à Mdm2, ce qui diminue son ubiquitinylation (sous le contrôle de Mdm2) et empêche ainsi sa dégradation dans le protéasome (Daujat *et al.*, 2001).

La stabilisation de p53 promouvoit la liaison de cette protéine au promoteur du gène suppresseur de tumeur p21. L'induction de l'expression de p21 (Waf1/Cip) provoque l'arrêt du cycle cellulaire, et celle de gènes impliqués dans l'apoptose. La protéine p21 est l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à divers stress cellulaires. Cette protéine peut entre autre arrêter le cycle en inhibant des complexes cycline E et cycline A: Cdk2 et cycline B: Cdk1. Il est à noter que la protéine p53 induit également l'expression de Mdm2, ce qui produit un effet de rétrocontrôle négatif (*feed-back loop*). Lorsque la protéine p53 est déficiente, l'arrêt en G1 est atténué et les cellules entrent en phase S malgré la présence d'anomalie de l'ADN (Levine, 1997).

La protéine p14<sup>ARF</sup> inactive Mdm2 en induisant sa translocation vers le nucléole. Également, p14<sup>ARF</sup> inhibe l'activité ubiquitine ligase de Mdm2 et augmente l'acétylation (donc la stabilisation) de p53 en bloquant l'effet inhibiteur de Mdm2 sur l'acétylase p300/CBP. La protéine p14<sup>ARF</sup> séquestre Mdm2 au nucléole. Ainsi, Mdm2 n'est plus en

mesure de promouvoir la dégradation de p53, ce dernier peu rester au noyau pour exercer ses fonctions pour, soit bloquer le cycle cellulaire ou enclencher le processus d'apoptose. Récemment dans la littérature, on rapporte que NPM est en mesure de lier p14<sup>ARF</sup> sur le même site de liaison utilisé par Mdm2 (Brady *et al.*, 2004). Cela aurait comme effet de rendre p14<sup>ARF</sup> moins disponible pour se lier à Mdm2. Mdm2 serait alors disponible pour se lier à p53 et promouvoir la dégradation de p53. Alors, p53 ne peut pas bloquer la progression du cycle cellulaire ou enclencher l'apoptose.

Pour faire suite à ce qui précède, nous pouvons tenter de déterminer l'implication d'une expression anormale de MNDA dans MDS. Un des scénarios possibles serait que MNDA empêche NPM de séquestrer ARF. Ainsi ARF pourrait lier MDM2 pour empêcher la dégradation de p53. La forte stabilisation de p53 dans les précurseurs myéloïdes provoquerait un blocage du cycle cellulaire de ces derniers, ce qui suspendrait la cascade nécessaire de division et de différenciation cellulaire se produisant lors de l'hématopoïèse pour obtenir les cellules matures. Cette forte stabilisation de p53 pourrait également engager les précurseurs vers l'apoptose.

#### **4.2 Localisation de MNDA au centrosome**

À l'occasion, nous pouvons remarquer sur certaines lames de cellules HL-60 marquées par immunofluorescence contre MNDA, un petit signal de MNDA à proximité du noyau. De façon intéressante, en plus de colocaliser avec NPM au nucléole, nous observons une co-localisation de MNDA et NPM en un signal se situant à proximité du noyau. Il est à noter que NPM se lie spécifiquement aux centrosomes non-dupliqués (Okuda, 2002). La dissociation de NPM du centrosome juste avant sa duplication est médiée par la phosphorylation de la thréonine 199 de NPM par CDK2/cycline E (Okuda *et al.*, 2000); (Valdez *et al.*, 1994). Le complexe CDK2/cycline E est activé à partir de la mi-G<sub>1</sub> jusqu'à tard en G<sub>1</sub> (Dulic *et al.*, 1992). C'est à ce moment que NPM est phosphorylée par CDK2/cycline E et que la duplication du centrosome se produit. Durant la phase S et G<sub>2</sub>, le niveau de CDK2/cycline E diminue. Par contre le complexe CDK2/cycline A augmente et est activé. Le complexe CDK2/cycline A est aussi capable de phosphoryler la thr199 de NPM. Il est suggéré que CDK2/cycline A maintiendrait NPM phosphorylée pour l'empêcher de se lier avec le centrosome plus tôt que prévu. Pendant la mitose, quand la membrane nucléaire est rompue et que le centrosome a terminé sa duplication, NPM se réassocie au centrosome. Le mécanisme n'est pas encore connu.. Par contre, on sait que les

thr 234 et 237 de NPM sont phosphorylées par CDK1/cyclin B, qui est un complexe CDK/cycline associée à la phase M. Donc, la phosphorylation de thr 234 et 237 pourrait être requise pour la réassociation de NPM au centrosome. Puisque MNDA peut s'associer à NPM, qui est localisée au nucléole et au centrosome, nos résultats suggèrent que, en plus de se retrouver au noyau avec une accumulation marquée au nucléole, MNDA se retrouve au centrosome. Étant donné que MNDA colocalise avec NPM en un signal dans le cytoplasme (probablement le centrosome, voir ci-haut), il semble que MNDA soit aussi associée au centrosome avant que celui-ci se duplique.

À ce stade de l'étude, il n'est pas clair si MNDA joue un rôle semblable à NPM au centrosome ou même, s'il y joue un rôle. Afin de vérifier la possible localisation de MNDA au centrosome, nous avons utilisé l'anticorps dirigé contre la tubuline, car le centrosome est majoritairement composé de tubuline  $\gamma$  et c'est aussi un marqueur du centrosome qui est communément utilisé dans la littérature (Joshi, 1994). La détection de la tubuline  $\gamma$  s'est avérée laborieuse sur les cellules en suspension incluant les HL-60. Cependant, nous avons obtenu de bons résultats avec les cellules adhérentes mises en culture sur lame (figure9). Nous avons donc vérifié la localisation de MNDA versus la tubuline  $\gamma$  dans des monocytes primaires car MNDA y est exprimée. Dans ces cellules, nous n'avons pratiquement pas observé de foci extra-nucléaire de MNDA et nous n'avons observé aucune colocalisation des signaux MNDA et tubuline gamma. Il est donc possible que MNDA ne se retrouve pas au centrosome de ces cellules. Ceci dit, les monocytes ne sont plus en cycle cellulaire, ils sont plutôt en  $G_0$  (voir figure8). Il est possible que les foci extra-nucléaire de MNDA ne se retrouvent pas à ce stade du cycle cellulaire et que les quelques signaux extra-nucléaires de MNDA que nous avons observés dans les monocytes soient des artéfacts. Par ailleurs, il est possible que MNDA soit localisé au centrosome pour un court laps de temps dans le cycle cellulaire des cellules qui se divisent. Car il faut noter que les monocytes primaires sont à un stade de différenciation final, ce qui n'est pas le cas des cellules HL-60 qui sont des cellules progénitrices ou encore des monoblastes qui sont très peu différenciées (Breitman *et al.*, 1980). Par le fait même, les monocytes n'ont plus recours au processus de division cellulaire et de surcroît, n'ont pas besoin de dupliquer leur centrosome. Alors, il est envisageable que MNDA ne se retrouve plus au centrosome dans des monocytes primaires. Il y a très peu d'informations sur les centrosomes dans les cellules différenciées. Il n'est pas clair si NPM joue un rôle dans les cellules différenciées tel que les monocytes afin de prévenir la duplication du centrosome ou si d'autres mécanismes prennent la relève dans ces cellules qui ne sont plus en cycle cellulaire.

Des études récentes démontrent que la mauvaise régulation de la duplication du centrosome est commune et c'est un facteur contribuant à l'instabilité des chromosomes dans les cancers humains (Pihan *et al.*, 1998). Dans le cas d'une expression anormale de MNDA, il serait possible que dans les monoblastes (c'est à ce stade que MNDA commence à être exprimée) MNDA puisse influencer le contrôle de la duplication du centrosome. Il y aurait donc un nombre anormal de centrosomes suite à la duplication. La ségrégation symétrique des chromosomes lors de la mitose ne pourrait pas se faire. Cela induirait une instabilité du génome, ce qui est commun au MDS.

#### **4.3 Localisation nucléaire de MNDA dans les cellules différenciées**

Étant donné que la technique utilisée pour isoler des monocytes permet aussi d'isoler des neutrophiles et que l'expression de MNDA se trouve aussi dans les neutrophiles (Goldberger *et al.*, 1986), nous avons décidé de marquer ces derniers avec MNDA par la technique d'immunofluorescence pour voir où est localisée MNDA dans ces cellules différenciées. Ce que nous avons constaté, c'est que MNDA demeure au noyau.

Il est rare de rencontrer une protéine dans une cellule qui ne lui soit d'aucune utilité.

Autrement, cette protéine emprunterait le chemin de la dégradation. L'expression de MNDA, commence au stade des monoblastes et augmente tout au long de la différenciation. Son expression continue jusqu'au stade de différenciation finale où elle atteint et maintient un niveau maximal (Cousar and Briggs, 1990). Dans le cas des neutrophiles, nous ne distinguons pas de structure qui ressemble à des nucléoles comme observé sur les lames de HL-60 marquées avec MNDA. Nous pensons qu'il n'y a plus de nucléole dans les neutrophiles parce que ceux-ci ne possèdent pas ou presque plus d'activité de traduction (Dawson and Trapani, 1995). Puisque que MNDA est toujours exprimée dans les cellules différenciées, monocytes et neutrophiles, et demeure au noyau, il est fort probable que MNDA y joue un rôle. Ce rôle pourrait être une implication dans la transcription de gènes en tant qu'activateur ou répresseur de la transcription de façon directe ou plus probablement indirect. Cette idée vient du fait que dans une extraction de protéines à partir de colonnes, MNDA se retrouve dans une première fraction où l'on retrouve plusieurs autres protéines nucléaires, et dans une deuxième fraction où l'on retrouve les histones. Cela signifie que MNDA lie la chromatine (Gaczynski *et al.*, 1990). Le lien est probablement indirect parce que l'étude de la séquence de MNDA ne laisse présager aucun site de liaison directe à l'ADN. Par ailleurs, MNDA interagit avec le facteur de transcription multifonctionnel YY1

(Xie *et al.*, 1998). La protéine ubiquitaire YY1 lie l'ADN avec son motif doigt de zinc (Basu *et al.*, 1993). Ce facteur est impliqué dans la régulation de divers gènes, il peut activer ou réprimer des gènes. Son action dépend des facteurs avec lesquels il interagit (Bauknecht *et al.*, 1992).

Une autre explication à la localisation de MNDA dans le noyau des cellules différenciées serait une implication dans la réparation de l'ADN. On rapporte que NPM s'associe à l'ADN endommagé (Lee *et al.*, 2005). On observe que MNDA se lie à l'ADN endommagé et aussi à l'ADN des cellules qui sont soumises à des inducteurs de différenciation cellulaire myéloïde (Duhl *et al.*, 1989). Sachant que la différenciation cellulaire est accompagnée de dommages à l'ADN, qui sont au fur et à mesure réparés (Farzaneh *et al.*, 1987), nous présumons que MNDA et NPM lieraient la chromatine. Les deux protéines seraient aussi des facteurs qui aident à maintenir l'intégrité de la chromatine tout au long de la différenciation. Autrement, si la cellule n'est pas en mesure de maintenir l'intégrité de son génome, cela favoriserait l'instabilité des chromosomes ce qui avantage l'apparition de cancers. Par ailleurs, quand les dommages à l'ADN sont trop importants, la cellule enclenche son processus d'apoptose. Il est possible que MNDA soit impliquée dans ce processus puisqu'elle possède un domaine PYD en N-terminale qui se retrouve fréquemment dans des régulateurs de réponse immune inflammatoire et régulateurs d'apoptose (Staub *et al.*, 2001) (voir section 1.6.2).

#### **4.4 MNDA et sa localisation durant le cycle cellulaire**

Quand nous examinons les lames de cellules HL-60 marquées par MNDA, nous constatons un patron de localisation majoritaire nucléolaire. Par contre, il existe à l'occasion d'autres patrons qui sont montrés à la figure 11. Il est possible que MNDA a une localisation variable selon les phases du cycle cellulaire. Suite au triage des cellules en fonction des phases du cycle cellulaire, nous voyons que dans la phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> c'est la forme nucléolaire qui prédomine sans aucun doute. La phase qui suit est la S, là où il semble que la forme granulaire prédomine. Elle est suivie de la phase G<sub>2</sub>/M qui semble être toujours en forme granulaire. Nous interprétons ces résultats tel que MNDA en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> est stockée dans le nucléole. Par la suite, la protéine sort pour former des granules dans le noyau en S et tôt en G<sub>2</sub>. Pour les cellules triées à la phase G<sub>2</sub>/M les cellules étaient très peu nombreuses. Nous ne pouvons pas ignorer que la forme granulaire apparaît être la forme dominante de cette phase d'après nos résultats. Cependant, il est possible que nos résultats reflètent

seulement la localisation pour les cellules tôt en G<sub>2</sub> et notre technique ne nous permet pas obtenir les cellules tard en G<sub>2</sub> ou à la phase M. En effet, ces cellules sont plus fragiles et il est probable que le traitement cytopsin les endommagent. Également, la dernière colonne d'images de la figure 11 illustre une cellule qui a une physiologie caractéristique de la phase M avec des chromosomes condensés (cellules HL-60 non triées). On remarque que MNDA y est diffuse et non distribuée sous un patron granulaire comme les résultats obtenus lors du triage des cellules tendent à montrer (voir figure 11 phase G<sub>2</sub>/M).

Les diverses localisations de MNDA peuvent suggérer que MNDA joue plusieurs rôles dans la cellule et que ces rôles nécessitent une localisation nucléaire différente comme pour NPM (voir section 1.7.2) ainsi que pour le grand T de SV40 «*large tumor antigen*» (Schirmbeck and Deppert, 1987).

Puisque nous avons eu de la difficulté à obtenir des cellules intactes tard dans la phase G<sub>2</sub> ou dans la phase M, nous avons utilisé des agents chimiques afin d'enrichir la population des cellules en phase G<sub>2</sub>/M. Pour ce faire, nous avons utilisé la colcémide. La colcémide est un agent qui bloque les cellules en phase G<sub>2</sub>/M en déstabilisant les microtubules car la colcémide cause une distorsion de la structure du dimère de tubuline ce qui a pour effet d'inhiber la polymérisation. Phénomène intéressant avec l'utilisation de la colcémide, est que nous retrouvons un nouveau patron qui n'a jamais été observé auparavant sur les lames marquées. MNDA est expulsée du noyau et a une localisation cytoplasmique. Il reste à déterminer s'il y a une relation entre MNDA et la tubuline. Ce point sera discuté ultérieurement.

#### **4.5 Co-Immunoprécipitation**

Toujours dans le but de savoir quelle est la fonction de MNDA, nous avons décidé de faire une co-immunoprécipitation de MNDA afin de découvrir quels sont les partenaires de MNDA, car en connaissant avec quelles protéines MNDA interagit, cela peut nous donner une indication de la fonction de MNDA. Les interactions potentielles que nous avons détectées par immunoprécipitation peuvent suggérer l'implication de MNDA dans différents mécanismes cellulaires.

#### **4.5.1. MNDA immunoprécipité avec tubuline $\alpha 6$ , tubuline $\beta 5$ et la Ran GTPase : des protéines associées aux microtubules, action sur le cycle cellulaire**

Parmi les résultats de la spectrométrie de masse, nous retrouvons la tubuline  $\alpha 6$ , la tubuline  $\beta 5$  et la Ran GTPase, ce qui évoque les microtubules. L'unité primaire des microtubules est la tubuline sous forme d'hétérodimère (Verhey and Gaertig, 2007). Le rôle des tubulines  $\alpha 6$  et des tubulines  $\beta 5$  n'est pas bien défini mais il est probable que les deux tubulines s'associent pour former un hétérodimère. De plus, les GTPases sont requises pour qu'il y ait polymérisation des microtubules. La Ran GTPase immunoprécipitée pourrait jouer ce rôle. Il est proposé que la polymérisation des microtubules ait un impact sur le cycle cellulaire (Derry *et al.*, 1995). En effet, s'il y a une instabilité dans le dynamisme normal des microtubules, cela cause l'arrêt de la mitose. Le mécanisme qui induit un blocage du cycle cellulaire lorsqu'il y a une instabilité des microtubules demeure encore inconnu.

À la figure 12, nous voyons que MNDA a un patron particulier lorsque les microtubules sont déstabilisés par l'agent chimique colcémide. Ce patron ne se retrouve pas sur les lames non-traitées à la colcémide. Il semble donc que la déstabilisation des microtubules par la colcémide provoque la relocalisation de MNDA dans le cytoplasme.

Suite à l'analyse des résultats d'immunoprécipitation et de traitement à la colcémide, nous proposons que MNDA soit influencée ou que MNDA influence la polymérisation des microtubules. Alors, l'arrêt précoce du processus d'hématopoïèse qui donnerait lieu à des désordres hématopoïétiques chez les patients atteints de myélodysplasie pourrait être induit par une diminution de l'expression de MNDA qui déstabiliserait les microtubules et bloquerait les monoblastes. En plus de son influence possible par l'entremise de la traduction, cela serait une autre façon pour MNDA d'influencer le cycle cellulaire puisque comme énoncé antérieurement, la stabilisation des microtubules influence le cycle cellulaire.

#### **4.5.2 MNDA immunoprécipité avec NPM, action sur le cycle cellulaire**

MNDA lie NPM (Ochs *et al.*, 1983). En effet, dans les immunoprécipitations avec MNDA, nous récoltons NPM. NPM peut influencer le cycle cellulaire de façon directe puisque NPM est impliquée dans le mécanisme de régulation de la duplication du centrosome (Okuda, 2002). De plus, NPM influence de façon indirecte le cycle cellulaire par son action dans la voie de régulation ARF-p53 (voir section 4.1). Puisque MNDA s'associe à NPM au moins

au nucléole, là où NPM influence la voie ARF-p53, et probablement aussi au centrosome dans les cellules en division, il est possible que MNDA participe aux mêmes mécanismes de régulation du cycle cellulaire que NPM.

Selon les interactions de MNDA avec NPM, il est possible que dans les cas de myélodysplasie quand il y a une expression irrégulière de MNDA : (i) l'association de MNDA à NPM pourrait bloquer la croissance cellulaire par le mécanisme de la traduction, ce qui arrêterait la croissance cellulaire et après coup, la progression du cycle cellulaire, ce qui réprimerait le processus normal de l'hématopoïèse, (ii) MNDA pourrait jouer un rôle dans la voie de ARF-p53 ou MNDA pourrait être impliquée dans la séquestration de NPM et/ou Mdm2 au nucléole, ce qui permettrait une forte stabilisation de p53 et qui, de façon indirecte, empêcherait le déroulement du cycle cellulaire ; et (iii) la régulation anormale de MNDA aurait un effet semblable à la régulation anormale de NPM et induirait une instabilité du génome dû à une mauvaise ségrégation des chromosomes découlant du nombre anormal de centrosomes. Cette instabilité génomique augmenterait l'incidence des mutations possibles entre autres dans les gènes d'oncoprotéine ou de supresseurs de tumeur.

#### **4.5.3 MNDA immunoprécipité avec EF1 $\alpha$ : action sur le cycle cellulaire**

Parmi les résultats des plus concluants obtenus par l'immunoprécipitation, nous avons « l'Elongation factor 1 alpha » (EF1 $\alpha$ ). La protéine EF1 $\alpha$  est localisée dans le cytoplasme et le noyau (Proud, 1994). Cette protéine a longtemps été étudiée pour son implication dans le complexe multimérique qui promouvoit l'élongation de la chaîne polypeptidique durant la transcription d'ARNm (Proud, 1994). Ce complexe multimérique régule l'efficacité et la fidélité de la traduction d'ARNm dans les cellules eucaryotiques. Le complexe consiste en plusieurs sous-unités ( $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) qui stimulent le transport d'ARNt au ribosome. L'association de MNDA à EF1 $\alpha$  peut suggérer que MNDA joue un rôle dans le processus de traduction afin d'influencer le cycle cellulaire comme mentionné auparavant.

Par ailleurs, il a récemment été rapporté que EF1 $\alpha$  ne serait pas confinée au mécanisme de traduction. Son rôle serait plus élargi et crucial dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire (Proud, 1994). De plus, lorsqu'on traite des cellules de mammifères avec du nocodazole qui a un effet semblable à la colcémide, on retrouve EF1 $\alpha$  dans un complexe avec la tubuline  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Toriyama *et al.*, 1988). Ce complexe est

proposé comme étant le «*mitotic spindle microtubule-organizing center*» (Shiina *et al.*, 1994). Donc, EF1 $\alpha$  influencerait aussi l'organisation des microtubules. Nous proposons que MNDA s'associe à EF1 $\alpha$  afin d'agir au niveau de la stabilisation des microtubules. Ainsi, la mauvaise expression de MNDA, déstabiliserait les microtubules et dérégulerait le cycle cellulaire comme il a été expliqué antérieurement.

Avec cette information, on peut se demander si les protéines immunoprécipitées : NPM, tubuline  $\alpha$ , tubuline  $\beta$ , RanGTPase et EF1 $\alpha$  forment avec MNDA un complexe qui serait impliqué dans le processus de formation de l'appareil mitotique. En mettant le tout en perspective, les résultats d'immunoprécipitation et de traitement à la colcémide ainsi que la possible localisation au centrosome de MNDA dans les cellules en division, nous proposons que : (i) MNDA s'associerait à NPM au centrosome (formé de tubuline gamma), il s'en suivrait la dissociation de NPM et (ii) MNDA favoriserait la duplication du centrosome et contribuerait à la polymérisation des microtubules qui formerait le fuseau mitotique pour la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire.

#### **4.6. Surexpression de MNDA modifie le cycle cellulaire**

Comme nous le voyons à la figure 17, la surexpression de MNDA modifie le cycle cellulaire. Nous observons que la population de cellules en phase G<sub>2</sub>/M est diminuée. La population tard en G<sub>1</sub> et en phase S semble avoir augmentée. Il semblerait que les cellules soient bloquées dans ces phases. Il faut noter que c'est tard en G<sub>1</sub> que le processus de duplication du centrosome est entamé. Également, c'est durant la phase S que la cellule active le processus de traduction pour atteindre sa croissance cellulaire autant en protéine qu'en ADN pour que les cellules filles aient leur matériel propre après la division cellulaire. Il serait possible de penser que la surexpression de MNDA vient nuire à la bonne duplication du centrosome. Parallèlement, la surexpression de MNDA viendrait interférer avec le processus de traduction. De ce fait, la cellule ne serait pas en mesure d'atteindre le niveau de croissance cellulaire nécessaire que les point de contrôle du cycle cellulaire requièrent pour laisser la cellule compléter sa division cellulaire.

#### **4.7 Conclusions**

En nous basant sur les résultats de l'analyse de la localisation cellulaire de MNDA, de la co-localisation avec d'autres protéines, de l'immunoprécipitation et de la surexpression de MNDA, nous avons donc essayé d'énumérer les avenues possibles qui pourraient être

poursuivies afin de démontrer le rôle exacte de MNDA. À ce stade de l'étude, la discussion demeure très spéculative. Cependant, à l'instar des autres protéines de la famille des HIN-200, l'expression anormale de MNDA semble avoir une influence sur le cycle cellulaire.

Cette influence pourrait se faire en utilisant :

- le processus de traduction par l'intermédiaire de NPM et EFl $\alpha$
- le mécanisme qui met en jeu p53/Mdm2/ARF/NPM
- la liaison de MNDA à l'ADN pour enclencher le processus d'apoptose lorsque l'ADN est trop endommagé
- la stabilisation des microtubules, ou le réseau mitotique.

L'avancement des connaissances sur MNDA, qui semble être une protéine multifonctionnelle, pourrait conduire au développement de traitements afin d'améliorer la qualité de vie ou de guérir les patients atteints de MDS. C'est pourquoi il serait intéressant de proposer d'autres études :

- établir un modèle cellulaire dans lequel MNDA serait inductible pour éviter les difficultés de mort cellulaire déjà rencontrées
- établir un modèle cellulaire dans lequel MNDA serait fusionnée à un marqueur fluorescent, pour suivre la protéine en temps réel pendant le cycle cellulaire
- étudier le promoteur de MNDA afin d'avoir des indications sur le contrôle d'expression de la protéine
- faire une étude *in vivo*, dans laquelle la protéine MNDA serait exprimée de façon conditionnellement dans les cellules sanguines de souris afin de voir l'effet sur l'hématopoïèse.

## Références

**Aglipay, J.A., Lee, S.W., Okada, S., Fujiuchi, N., Ohtsuka, T., Kwak, J.C., Wang, Y., Johnstone, R.W., Deng, C., Qin, J., and Ouchi, T. (2003). A member of the Pyrin family, IFI16, is a novel BRCA1-associated protein involved in the p53-mediated apoptosis pathway. *Oncogene* 22, 8931-8938.**

**Albrecht, M., Domingues, F.S., Schreiber, S., and Lengauer, T. (2003). Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2. *FEBS letters* 554, 520-528.**

**Asefa, B., Klarmann, K.D., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Keller, J.R. (2004). The interferon-inducible p200 family of proteins: a perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation. *Blood cells, molecules & diseases* 32, 155-167.**

**Basu, A., Park, K., Atchison, M.L., Carter, R.S., and Avadhani, N.G. (1993). Identification of a transcriptional initiator element in the cytochrome c oxidase subunit Vb promoter which binds to transcription factors NF-E1 (YY-1, delta) and Sp1. *The Journal of biological chemistry* 268, 4188-4196.**

**Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H.D., and zur Hausen, H. (1992). Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *The EMBO journal* 11, 4607-4617.**

**Ben-Neriah, Y., Daley, G.Q., Mes-Masson, A.M., Witte, O.N., and Baltimore, D. (1986). The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 233, 212-214.**

**Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1982). Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 51, 189-199.**

**Bischof, D., Pulford, K., Mason, D.Y., and Morris, S.W. (1997). Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol* 17, 2312-2325.**

**Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., and Nigg, E.A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379-390.**

**Bowen, D.T. (2005). Chronic myelomonocytic leukemia: lost in classification? *Hematol Oncol* 23, 26-33.**

**Brady, S.N., Yu, Y., Maggi, L.B., Jr., and Weber, J.D. (2004). ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. *Mol Cell Biol* 24, 9327-9338.**

**Breitman, T.R., Selonick, S.E., and Collins, S.J. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2936-2940.**

**Briggs, J.A., Burrus, G.R., Stickney, B.D., and Briggs, R.C. (1992). Cloning and expression of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen: regulation by interferon alpha. *Journal of cellular biochemistry* 49, 82-92.**

**Briggs, R., Dworkin, L., Briggs, J., Dessypris, E., Stein, J., Stein, G., and Lian, J. (1994a). Interferon alpha selectively affects expression of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen in late stage cells in the monocytic but not the granulocytic lineage. *Journal of cellular biochemistry* 54, 198-206.**

**Briggs, R.C., Briggs, J.A., Ozer, J., Sealy, L., Dworkin, L.L., Kingsmore, S.F., Seldin, M.F., Kaur, G.P., Athwal, R.S., and Dessypris, E.N. (1994b). The human myeloid cell nuclear differentiation antigen gene is one of at least two related interferon-inducible genes located on chromosome 1q that are expressed specifically in hematopoietic cells. *Blood* 83, 2153-2162.**

**Briggs, R.C., Kao, W.Y., Dworkin, L.L., Briggs, J.A., Dessypris, E.N., and Clark, J. (1994c). Regulation and specificity of MNDA expression in monocytes, macrophages, and leukemia/B lymphoma cell lines. *Journal of cellular biochemistry* 56, 559-567.**

**Calabretta, B., and Perrotti, D. (2004). The biology of CML blast crisis. *Blood* 103, 4010-4022.**

**Chiang, C.M., and Roeder, R.G. (1995). Cloning of an intrinsic human TFIIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267, 531-536.**

**Choubey, D., and Kotzin, B.L. (2002). Interferon-inducible p202 in the susceptibility to systemic lupus. *Front Biosci* 7, e252-262.**

**Choubey, D., and Lengyel, P. (1992). Interferon action: nucleolar and nucleoplasmic localization of the interferon-inducible 72-kD protein that is encoded by the Ifi 204 gene from the gene 200 cluster. *The Journal of cell biology* 116, 1333-1341.**

**Choubey, D., and Lengyel, P. (1993). Interferon action: cytoplasmic and nuclear localization of the interferon-inducible 52-kD protein that is encoded by the Ifi 200 gene from the gene 200 cluster. *Journal of interferon research* 13, 43-52.**

**Choubey, D., Snoddy, J., Chaturvedi, V., Toniato, E., Opdenakker, G., Thakur, A., Samanta, H., Engel, D.A., and Lengyel, P. (1989). Interferons as gene activators. Indications for repeated gene duplication during the evolution of a cluster of interferon-activatable genes on murine chromosome 1. *The Journal of biological chemistry* 264, 17182-17189.**

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

**Cousar, J.B., and Briggs, R.C. (1990). Expression of human myeloid cell nuclear differentiation antigen (MND1) in acute leukemias. *Leuk Res* 14, 915-920.**

**D'Souza, S., Xin, H., Walter, S., and Choubey, D. (2001). The gene encoding p202, an interferon-inducible negative regulator of the p53 tumor suppressor, is a target of p53-mediated transcriptional repression. *The Journal of biological chemistry* 276, 298-305.**

**Daujat, S., Neel, H., and Piette, J. (2001). MDM2: life without p53. *Trends Genet* 17, 459-464.**

**Dawson, M.J., and Trapani, J.A. (1995). The interferon-inducible autoantigen, IFI 16: localization to the nucleolus and identification of a DNA-binding domain. *Biochemical and biophysical research communications* 214, 152-162.**

**Dawson, M.J., and Trapani, J.A. (1996). HIN-200: a novel family of IFN-inducible nuclear proteins expressed in leukocytes. *J Leukoc Biol* 60, 310-316.**

**Deane, N.G., Parker, M.A., and Beauchamp, R.D. (2005). Cell proliferation: a matter of time and place. *Surgery* 138, 1-7.**

**Derry, W.B., Wilson, L., and Jordan, M.A. (1995). Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry* 34, 2203-2211.**

**Deschamps, S., Meyer, J., Chatterjee, G., Wang, H., Lengyel, P., and Roe, B.A. (2003). The mouse Ifi200 gene cluster: genomic sequence, analysis, and comparison with the human HIN-200 gene cluster. *Genomics* 82, 34-46.**

**Di Bacco, A., Keeshan, K., McKenna, S.L., and Cotter, T.G. (2000). Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist* 5, 405-415.**

**Ding, Y., Wang, L., Su, L.K., Frey, J.A., Shao, R., Hunt, K.K., and Yan, D.H. (2004). Antitumor activity of IFIX, a novel interferon-inducible HIN-200 gene, in breast cancer. *Oncogene* 23, 4556-4566.**

**Duhl, D.M., Gaczynski, M., Olinski, R., and Briggs, R.C. (1989). Intranuclear distribution of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen in HL-60 cells. *Journal of cellular physiology* 141, 148-153.**

**Dulic, V., Lees, E., and Reed, S.I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257, 1958-1961.**

**Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.**

**Faruqi, R.M., and DiCorleto, P.E. (1993). Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation. *British heart journal* 69, S19-29.**

**Farzaneh, F., Meldrum, R., and Shall, S. (1987). Transient formation of DNA strand breaks during the induced differentiation of a human promyelocytic leukaemic cell line, HL-60. *Nucleic acids research* 15, 3493-3502.**

**Gaczynski, M., Briggs, J.A., Wedrychowski, A., Olinski, R., Uskokovic, M., Lian, J.B., Stein, G.S., and Briggs, R.C. (1990). cis-diamminedichloroplatinum(II) cross-linking of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen to DNA in HL-60 cells following 1,25-dihydroxy vitamin D3-induced monocyte differentiation. *Cancer Res* 50, 1183-1188.**

**Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54, 713-733.**

**Goldberger, A., Hnilica, L.S., Casey, S.B., and Briggs, R.C. (1986). Properties of a nuclear protein marker of human myeloid cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* 261, 4726-4731.**

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

**Gutterman, J.U. (1994). Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1198-1205.**

**Harris, P., and Ralph, P. (1985). Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 37, 407-422.**

Hiller, S., Kohl, A., Fiorito, F., Herrmann, T., Wider, G., Tschopp, J., Grutter, M.G., and Wuthrich, K. (2003). NMR structure of the apoptosis- and inflammation-related NALP1 pyrin domain. *Structure* *11*, 1199-1205.

Hirai, H. (2002). Molecular pathogenesis of MDS. *International journal of hematology* *76 Suppl 2*, 213-221.

Hofmann, W.K., de Vos, S., Komor, M., Hoelzer, D., Wachsman, W., and Koeffler, H.P. (2002). Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood* *100*, 3553-3560.

Hospattankar, A.V., Law, S.W., Lackner, K., and Brewer, H.B., Jr. (1986). Identification of low density lipoprotein receptor binding domains of human apolipoprotein B-100: a proposed consensus LDL receptor binding sequence of apoB-100. *Biochemical and biophysical research communications* *139*, 1078-1085.

Inohara, N., and Nunez, G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature reviews* *3*, 371-382.

Inouye, C.J., and Seto, E. (1994). Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. *The Journal of biological chemistry* *269*, 6506-6510.

Johnstone, R.W., and Trapani, J.A. (1999). Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins. *Mol Cell Biol* *19*, 5833-5838.

**Joshi, H.C. (1994). Microtubule organizing centers and gamma-tubulin. *Current opinion in cell biology* 6, 54-62.**

**Klinken, S.P. (1999). Regulation of hemopoietic system. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 983-989.**

**Korgaonkar, C., Hagen, J., Tompkins, V., Frazier, A.A., Allamargot, C., Quelle, F.W., and Quelle, D.E. (2005). Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol* 25, 1258-1271.**

**Koul, D., Obeyesekere, N.U., Gutterman, J.U., Mills, G.B., and Choubey, D. (1998). p202 self-associates through a sequence conserved among the members of the 200-family proteins. *FEBS letters* 438, 21-24.**

**Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research* 15, 8125-8148.**

**Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D. (1998). The Ifi 200 genes: an emerging family of IFN-inducible genes. *Biochimie* 80, 721-728.**

**Lee, S.Y., Park, J.H., Kim, S., Park, E.J., Yun, Y., and Kwon, J. (2005). A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks. *The Biochemical journal* 388, 7-15.**

**Lee, Y.M., and Lee, S.C. (1994). Transcriptional activation of the alpha-1 acid glycoprotein gene by YY1 is mediated by its functional interaction with a negative transcription factor. *DNA and cell biology* 13, 1029-1036.**

**Lembo, D., Angeretti, A., Benefazio, S., Hertel, L., Gariglio, M., Novelli, F., and Landolfo, S. (1995). Constitutive expression of the interferon-inducible protein p202 in NIH 3T3 cells affects cell cycle progression. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 9, 42-46.**

**Lembo, M., Sacchi, C., Zappador, C., Bellomo, G., Gaboli, M., Pandolfi, P.P., Gariglio, M., and Landolfo, S. (1998). Inhibition of cell proliferation by the interferon-inducible 204 gene, a member of the Ifi 200 cluster. *Oncogene* 16, 1543-1551.**

**Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.**

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

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

**Lund-Johansen, F., and Terstappen, L.W. (1993). Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. *J Leukoc Biol* 54, 47-55.**

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

**Miranda, R.N., Briggs, R.C., Shults, K., Kinney, M.C., Jensen, R.A., and Cousar, J.B. (1999). Immunocytochemical analysis of MNDA in tissue sections and sorted normal bone marrow cells documents expression only in maturing normal and neoplastic myelomonocytic cells and a subset of normal and neoplastic B lymphocytes. Human pathology 30, 1040-1049.**

**Mitelman, F. (1993). The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 11 Suppl 1, 11-15.**

**Miyazato, A., Ueno, S., Ohmine, K., Ueda, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kaneko, T., Mori, M., Kirito, K., Toshima, M., Nakamura, Y., Saito, K., Kano, Y., Furusawa, S., Ozawa, K., and Mano, H. (2001). Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. Blood 98, 422-427.**

**Momoeda, M., Kawase, M., Jane, S.M., Miyamura, K., Young, N.S., and Kajigaya, S. (1994). The transcriptional regulator YY1 binds to the 5'-terminal region of B19 parvovirus and regulates P6 promoter activity. Journal of virology 68, 7159-7168.**

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

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

Ochs, R., Lischwe, M., O'Leary, P., and Busch, H. (1983). Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. *Experimental cell research* *146*, 139-149.

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

Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., Bove, K.E., and Fukasawa, K. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* *103*, 127-140.

Olson, M.O., Wallace, M.O., Herrera, A.H., Marshall-Carlson, L., and Hunt, R.C. (1986). Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. *Biochemistry* *25*, 484-491.

Opdenakker, G., Snoddy, J., Choubey, D., Toniato, E., Pravtcheva, D.D., Seldin, M.F., Ruddle, F.H., and Lengyel, P. (1989). Interferons as gene activators: a cluster of six interferon-activatable genes is linked to the erythroid alpha-spectrin locus on murine chromosome 1. *Virology* *171*, 568-578.

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

Pandolfi, P.P. (1996). PML, PLZF and NPM genes in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* *81*, 472-482.

**Parker, J.E., and Mufti, G.J. (2004). The myelodysplastic syndromes: a matter of life or death. *Acta Haematol* 111, 78-99.**

**Pihan, G.A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P., and Doxsey, S.J. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 58, 3974-3985.**

**Pine, R., Decker, T., Kessler, D.S., Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (1990). Purification and cloning of interferon-stimulated gene factor 2 (ISGF2): ISGF2 (IRF-1) can bind to the promoters of both beta interferon- and interferon-stimulated genes but is not a primary transcriptional activator of either. *Mol Cell Biol* 10, 2448-2457.**

**Poole, E., Strappe, P., Mok, H.P., Hicks, R., and Lever, A.M. (2005). HIV-1 Gag-RNA interaction occurs at a perinuclear/centrosomal site; analysis by confocal microscopy and FRET. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 6, 741-755.**

**Pradhan, A., Mijovic, A., Mills, K., Cumber, P., Westwood, N., Mufti, G.J., and Rassool, F.V. (2004). Differentially expressed genes in adult familial myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 18, 449-459.**

**Proud, C.G. (1994). Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Molecular biology reports* 19, 161-170.**

**Raskin, R.E. (1996). Myelopoiesis and myeloproliferative disorders. *The Veterinary clinics of North America* 26, 1023-1042.**

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

**Rowley, J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-293.**

**Sakai, M., Miyazaki, A., Hakamata, H., Sasaki, T., Yui, S., Yamazaki, M., Shichiri, M., and Horiuchi, S. (1994). Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *The Journal of biological chemistry* 269, 31430-31435.**

**Schirmbeck, R., and Deppert, W. (1987). Specific interaction of simian virus 40 large T antigen with cellular chromatin and nuclear matrix during the course of infection. *Journal of virology* 61, 3561-3569.**

**Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-1577.**

**Semenkovich, C.F., Ostlund, R.E., Jr., Olson, M.O., and Yang, J.W. (1990). A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry* 29, 9708-9713.**

**Sherr, C.J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.**

**Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell* 2, 103-112.**

**Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.**

**Shiina, N., Gotoh, Y., Kubomura, N., Iwamatsu, A., and Nishida, E. (1994). Microtubule severing by elongation factor 1 alpha. *Science* 266, 282-285.**

**Staub, E., Dahl, E., and Rosenthal, A. (2001). The DAPIN family: a novel domain links apoptotic and interferon response proteins. *Trends in biochemical sciences* 26, 83-85.**

**Stelzer, G.T., Shults, K.E., and Loken, M.R. (1993). CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. *Annals of the New York Academy of Sciences* 677, 265-280.**

**Suzuki, M. (1989). SPXX, a frequent sequence motif in gene regulatory proteins. *Journal of molecular biology* 207, 61-84.**

**Terstappen, L.W., Gandour, D., Huang, S., Lund-Johansen, F., Manion, K., Nguyen, M., Mickaels, R., Olweus, J., and Topker, S. (1993). Assessment of hematopoietic cell differentiation by multidimensional flow cytometry. *J Hematother* 2, 431-447.**

**Tokuyama, Y., Horn, H.F., Kawamura, K., Tarapore, P., and Fukasawa, K. (2001). Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. The Journal of biological chemistry 276, 21529-21537.**

**Toriyama, M., Ohta, K., Endo, S., and Sakai, H. (1988). 51-kd protein, a component of microtubule-organizing granules in the mitotic apparatus involved in aster formation in vitro. Cell motility and the cytoskeleton 9, 117-128.**

**Tschopp, J., Martinon, F., and Burns, K. (2003). NALPs: a novel protein family involved in inflammation. Nature reviews 4, 95-104.**

**Tuteja, N., Huang, N.W., Skopac, D., Tuteja, R., Hrvatic, S., Zhang, J., Pongor, S., Joseph, G., Faucher, C., Amalric, F., and et al. (1995). Human DNA helicase IV is nucleolin, an RNA helicase modulated by phosphorylation. Gene 160, 143-148.**

**Usheva, A., and Shenk, T. (1996). YY1 transcriptional initiator: protein interactions and association with a DNA site containing unpaired strands. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 13571-13576.**

**Valdez, B.C., Perlaky, L., Henning, D., Saijo, Y., Chan, P.K., and Busch, H. (1994). Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the protein p120. Interaction with translocation protein B23. The Journal of biological chemistry 269, 23776-23783.**

**Verhey, K.J., and Gaertig, J. (2007). The tubulin code. Cell Cycle 6, 2152-2160.**

**Wang, H., Chatterjee, G., Meyer, J.J., Liu, C.J., Manjunath, N.A., Bray-Ward, P., and Lengyel, P. (1999). Characteristics of three homologous 202 genes (Ifi202a, Ifi202b, and Ifi202c) from the murine interferon-activatable gene 200 cluster. *Genomics* 60, 281-294.**

**Weber, C.H., and Vincenz, C. (2001). The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends in biochemical sciences* 26, 475-481.**

**Xie, J., Briggs, J.A., and Briggs, R.C. (1998). Human hematopoietic cell specific nuclear protein MNDA interacts with the multifunctional transcription factor YY1 and stimulates YY1 DNA binding. *Journal of cellular biochemistry* 70, 489-506.**

**Xie, J., Briggs, J.A., Morris, S.W., Olson, M.O., Kinney, M.C., and Briggs, R.C. (1997). MNDA binds NPM/B23 and the NPM-MLF1 chimera generated by the t(3;5) associated with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Experimental hematology* 25, 1111-1117.**

**Xie, J., Briggs, J.A., Olson, M.O., Sipos, K., and Briggs, R.C. (1995). Human myeloid cell nuclear differentiation antigen binds specifically to nucleolin. *Journal of cellular biochemistry* 59, 529-536.**

**Xin, H., Curry, J., Johnstone, R.W., Nickoloff, B.J., and Choubey, D. (2003). Role of IFI 16, a member of the interferon-inducible p200-protein family, in prostate epithelial cellular senescence. *Oncogene* 22, 4831-4840.**

**Xin, H., Pereira-Smith, O.M., and Choubey, D. (2004). Role of IFI 16 in cellular senescence of human fibroblasts. *Oncogene* 23, 6209-6217.**

**Yang, T.H., Tsai, W.H., Lee, Y.M., Lei, H.Y., Lai, M.Y., Chen, D.S., Yeh, N.H., and Lee, S.C. (1994). Purification and characterization of nucleolin and its identification as a transcription repressor. *Mol Cell Biol* 14, 6068-6074.**

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

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

**Yu-Lee, L.Y., Hrachovy, J.A., Stevens, A.M., and Schwarz, L.A. (1990). Interferon-regulatory factor 1 is an immediate-early gene under transcriptional regulation by prolactin in Nb2 T cells. *Mol Cell Biol* 10, 3087-3094.**