

Thèse
Soutenue publiquement le 10 décembre 2004
En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

Par Jonathan Back

*Rôles versatiles du
facteur de transcription PU.1
dans l'hématopoïèse murine.*

Membres du jury:

Directeur de thèse: Dr. Philippe Kastner

Rapporteur interne: Pr. Jean Luc Imler

Rapporteur externe: Dr. Isabelle Godin

Rapporteur externe: Dr. Jacques Ghysdael

Merci...merci...

La partie remerciements vient (enfin) clore ce chapitre de rédaction qui pour des raisons essentiellement informatiques se révèle être imprévisible et source de mauvaises surprises uniquement. Heureusement l'intérêt scientifique sauve (parfois) le tout. Bref je vais arrêter de baragouiner inutilement pour remercier celles et ceux....que je vais remercier!

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres de mon jury, le Docteur Jacques Ghysdael, le Professeur Jean Luc Imler et le Docteur Isabelle Godin, qui ont accepté d'évaluer mon travail.

Philippe et Susan ont su encadrer ce projet avec énormément de compétences scientifiques et de qualités humaines, un cocktail apparemment rare dans la recherche.... Je les remercie pour tout ce que j'ai appris durant ces 5 années, pour avoir patiemment corrigé ce manuscrit, notamment Susan qui possède une faculté surnaturelle pour détecter les doubles espaces!!

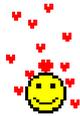
Les membres du labo, passés et présents ont permis de maintenir une ambiance sympa...bien sympa (je ne sais pas si c'est parce que c'est la fin que mon niveau de langage s'écroule). Aussi je remercie tout particulièrement Alexis, que je vais rejoindre bientôt à Lausanne, pour toutes les discussions + soirées + matchs de volley+ concerts....Également Eva "attention un nougati derrière toi c'est horrible!!"; Robin "El cocho-d'indo" et Mac Lean "I'll mess with Texas", même si son équipe de fantasy NBA à l'air un peu trop forte 🤔! Ces trois zozos sont assez compétents pour faire d'un labo, un sketch humoristique continu. Peggy également qui les premières années de ma thèse a su apporter de la bonne humeur et des sujets de discussion

toujours.... Comment dire....déroutants. Corinne, Sabrina et Gaëlle aussi, pour leur aide technique précieuse.

J'aimerais aussi remercier le Dr Wasylyk et le Pr Auwerx, pour m'avoir permis de réaliser de fructueuses collaborations avec leur équipe. Évidemment, je remercie tout particulièrement Gitali et Terrie-Anne avec qui j'ai travaillé....je fais un vœux pour que mes collaborations futures se fassent avec des personnes aussi bien....

Je vais aussi remercier Nicolas "bloody savoyard" – et porter un toast "à la gloire de l'empire"!! Konstantin « inch Ararat ».....et évidemment Jean Luc, pour trop de choses qui prendraient trop de place même à résumer!!

Gros bisous à ma chérie



Ahhh il y a encore plein de monde que je veux remercier.... Axel, Fabien, Jérôme (millo), Jérôme (bournat), Jérôme (weissou), Guigui, Stéphane (schtef), Stéphane (weightisquality), Stéphane (expresso-cataldi), Sophie (precious), Sabrina (stroumph grognon), Joël, Fred et

Louis (collège + lycée ça forme!!), Patrick.R « avé l'assen », les Chuuls  et tous les membres de ma promo de DEA qui sont à l'IGBMC (c'était un beau carton cette année la!!)....

Une pensée pour mes soeurette, puisque j'oublie tout le temps leur anniversaire!!

Un coucou pour ma marraine....

Et enfin,

Un gros merci à mes parents qui m'ont donné toute l'éducation et l'amour nécessaire pour arriver jusque la!!

Pas merci...
oh non pas merci !!!

Pour finalement finir à la fin, je ne remercie pas:

Adobe pour faire des logiciels lamentablement peu intuitifs 🤬

Le chat de mes parents car il ne m'a apporté aucun soutien scientifique (les chats c'est vraiment des branleurs...)

Le RU d'Illkirch 🤔 beurk...

Les imprimantes et leur gestion réseau catastrophique 🤬

Les chaises de bureau inconfortables

Préambule p1

Introduction p3

1^{ère} Partie. Présentation des différents types de cellules fonctionnelles du système hématopoïétique. p3

2^{ème} Partie. Génération des cellules hématopoïétiques: le compartiment précurseur hématopoïétique. p7

2.1 L'ontogénie du système hématopoïétique. p7

2.2 Les cellules souches hématopoïétiques. p9

2.2.1 Identification et caractérisation des cellules souches hématopoïétiques. p10

2.2.2 Les gènes et facteurs environnementaux qui régulent les HSC. p11

2.3 Le compartiment progéniteur multipotent. p12

2.3.1 Modèles décrivant le compartiment multipotent. p12

2.3.2 Les progéniteurs myéloïdes: CMP et GMP. p14

2.3.3 Les progéniteurs lymphoïdes: CLP et ETP p15

3^{ème} Partie. La différenciation myéloïde, lymphoïde et dendritique. p17

3.1 La différenciation myéloïde. p17

3.1.1 Évolution morphologique et phénotypique accompagnant la maturation myéloïde. p17

3.1.2 Régulation transcriptionnelle de la myélopoïèse. p17

3.2 La différenciation lymphoïde B et sa régulation. p20

3.2.1 Visualisation phénotypique de la différenciation du lignage B. p20

3.2.2 Régulation de la différenciation lymphoïde B. p22

3.3 Le développement des cellules dendritiques. p24

3.3.1 Phénotype des différents types de cellules dendritiques. p24

3.3.2 Facteurs de transcription et développement dendritique. p25

4^{ème} Partie. Le compartiment érythroïde et les érythroleucémies.

p26

4.1 Visualisation morphologique et phénotypique des cellules érythroïdes.

p26

4.2 Caractérisation fonctionnelle des précurseurs érythroïdes: BFU-E et CFU-E.

p28

4.3 Régulation de la différenciation érythroïde.

p29

4.3.1 Intégration et coopération des signaux environnementaux.

p29

4.3.1.1 Signalisation par l'érythropoïétine et son récepteur.

p29

4.3.1.2 Signalisation par SCF / c-Kit, et le récepteur des glucocorticoïdes: coopération avec la signalisation Epo.

p30

4.3.2 Facteurs de transcriptions et contrôle de l'érythropoïèse.

p32

4.3.3 Notion "d'érythroïsome".

p34

4.4 Les érythroleucémies murines aiguës de Friend.	p36
4.4.1 Phase polyclonale: subversion de la signalisation par l'EpoR.	p36
4.4.2 Évènements génétiques ultérieurs, liés à la transformation érythroleucémique.	p37
5^{ème} Partie. Le facteur de transcription PU.1/spi-1.	p39
5.1 Identification et caractérisation du facteur de transcription PU.1/spi-1.	p39
5.2 PU.1: un oncogène impliqué dans les érythroleucémies de Friend.	p40
5.2.1 La surexpression de PU.1 : un évènement clé.	p40
5.2.2 Mécanisme moléculaire du blocage de la différenciation des cellules MEL par PU.1.	p42
5.2.2.1 Interaction et antagonisme fonctionnel avec GATA-1.	p42
5.2.2.2 Interaction avec CBP/P300.	p43

5.3 Expression, gènes cibles et régulation de PU.1. p44

5.3.1 L'expression de PU.1 est restreinte au système hématopoïétique. P44

5.3.2 Gènes cibles et mécanismes d'activation de la transcription par PU.1. p45

5.3.3 Régulation de l'expression de PU.1. p46

5.4 Régulation du développement hématopoïétique par PU.1. p47

5.4.1 Conclusions apportées par l'étude des souris inactivées pour PU.1. p47

5.4.1.1 La différenciation myéloïde et lymphoïde est bloquée en absence de PU.1. p49

5.4.1.2 Le développement des cellules dendritiques dans les souris PU.1^{-/-}. p50

5.4.1.3 Le développement érythroïde semble normal dans les souris PU.1^{-/-}. p50

5.4.2 Le niveau et le stade d'expression de PU.1 déterminent différents destins dans les progéniteurs hématopoïétiques. p51

Bibliographie de l'introduction p53

Résultats p71

1^{ère} partie. Analyse du phénotype des souris PU.1^{neo}. p71

1.1 L'allèle PU.1^{neo} n'est pas un allèle nul. p71

1.2 Phénotype général des foetus PU.1^{neo/neo}. p72

1.3 Altération incomplète du compartiment myéloïde chez les mutants PU.1^{neo}. p74

1.4 Blocage de la différenciation érythroïde. p74

2^{ème} partie. PU.1 contrôle la balance entre prolifération et différenciation dans les précurseurs érythroïdes. p77

2.1 Données publiées. p77

"PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitors"

2.2 Résultats additionnels. p79

2.2.1 La perte d'un allèle de P53 ne compense pas le défaut d'amplification des précurseurs PU.1^{+/-}. p79

2.2.2 L'acétylation de GATA-1 ne semble pas altérée dans les précurseurs érythroïdes PU.1^{G/G}. p81

3^{ème} partie. Visualisation de l'expression de PU.1 par l'intermédiaire du transgène rapporteur EGFP. p84

3.1 Données soumises à publication. p84

"Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis"

3.2 Résultats additionnels concernant l'activité de PU.1 dans le système hématopoïétique. p86

3.2.1 Caractérisation transcriptionnelle des cellules Lin⁻ dans les hétérozygotes adultes. p86

3.2.2 Expression du rapporteur et de PU.1 dans les cellules B activées. p87

4^{ème} partie. Collaborations.

p89

4.1 Rôle du gène suppresseur de tumeur *p53* dans l'érythropoïèse de stress.

p89

"The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors".

4.2 La déficience du récepteur nucléaire PPAR γ influe sur l'homéostasie hématopoïétique en altérant la formation osseuse.

p90

"Enhanced bone formation in lipodystrophic PPAR γ ^{hyp/hyp} mice relocates hematopoiesis to the spleen."

Bibliographie de la partie résultats.

p91

Discussion p93

1^{ère} Partie. Quel mécanisme d'action pour PU.1 dans les précurseurs érythroïdes? p93

1.1 Une base physiologique de l'effet oncogénique de PU.1 dans les érythroleucémies de Friend. p93

1.2 Un mécanisme commun dans les précurseurs érythroïdes primaires et dans les cellules érythroleucémiques? p94

1.3 Interactions de PU.1 avec "l'érythroïsme". p94

2^{ème} Partie. PU.1 dans les précurseurs : un facteur hautement versatile. p97

2.1 La régulation de la balance entre prolifération et différenciation dans les précurseurs. p97

2.2 PU.1 et l'engagement ("commitment") dans la voie myéloïde ou lymphoïde. p100

3^{ème} Partie. Un rôle pour PU.1 dans les cellules souches hématopoïétiques? p102

4^{ème} Partie. PU.1 dans les cellules matures. p104

4.1 Expression différentielle de PU.1 dans les divers types de cellules dendritiques. p104

4.2 Relation entre l'expression de PU.1, les cellules B de la zone marginale et les cellules B1. p104

5^{ème} Partie. Conclusion: PU.1 un facteur exceptionnel chez les vertébrés? p106

Bibliographie de la partie discussion. p108

Préambule

La compréhension d'un mécanisme biologique précis requiert souvent, si ce n'est obligatoirement, d'avoir un recul important sur ce processus, de posséder des connaissances générales bien plus étendues et de pouvoir les intégrer afin d'aboutir à une hypothèse de travail efficace. Le système hématopoïétique est une excellente illustration d'un tel processus biologique complexe. Au carrefour de la biologie du développement et de l'immunologie, l'hématopoïèse constitue un modèle développemental particulier dans le sens où ce système est opérationnel tout au long de la vie d'un individu et génère continuellement l'ensemble des cellules présentes dans le sang. Ce processus requiert l'engagement séquentiel et contrôlé de cellules souches hématopoïétiques dites «multipotentes», en progéniteurs ayant un potentiel de différenciation de plus en plus restreint, de sorte que le nombre requis de chaque type cellulaire fonctionnel soit produit. Bien entendu, pour que ce processus développemental se réalise correctement, de nombreux gènes doivent être régulés de sorte qu'ils puissent contrôler le destin des multiples types cellulaires qui constituent ce système.

J'ai étudié au cours de mon travail de thèse, l'implication du gène PU.1/spi1 dans l'hématopoïèse de la souris. Ce gène code pour un facteur de transcription, qui, comme je vais le décrire au cours de ce document, s'avère être un acteur central du contrôle génétique du système hématopoïétique. Mes résultats ont permis de révéler une nouvelle fonction pour PU.1 dans les précurseurs érythroïdes. De plus, l'analyse de la régulation de son expression, dans tout le système hématopoïétique montre que ce facteur est régulé de façon très dynamique, impliquant des fonctions importantes notamment dans les cellules précurseurs. Le facteur de transcription PU.1 s'avère donc aujourd'hui avoir un rôle dans l'ensemble des compartiments du système hématopoïétique – au niveau des cellules souches, des progéniteurs plus spécifiques de certains lignages, ainsi que des cellules matures de ce système. En outre, ses fonctions apparaissent maintenant, en partie grâce à mes études, comme très versatiles. Ainsi, PU.1 peut induire la différenciation, promouvoir le renouvellement cellulaire ou alors agir en tant que facteur pro ou anti-apoptotique, selon le type cellulaire considéré. Par conséquent, afin d'introduire ces résultats, et pouvoir discuter de leur implication, je vais présenter le système hématopoïétique dans son ensemble.

Après une partie rapide décrivant les différents lignages du système hématopoïétique ainsi que les cellules matures qui les composent, j'aborderai la façon dont ces cellules sont générées. Pour cela, je décrirai le compartiment précurseur en soulignant les différentes hypothèses quant au potentiel de différenciation de ces précurseurs ainsi que les modèles décrivant comment des progéniteurs avec un potentiel de différenciation restreint peuvent être générés à partir de cellules souches multipotentes. Ceci sera particulièrement utile pour discuter de l'implication de PU.1 dans la régulation de ce processus de différenciation et de restriction de potentiel des précurseurs hématopoïétiques. Ensuite, je décrirai la régulation de la différenciation myéloïde, lymphoïde, dendritique et érythroïde en soulignant le rôle de certains facteurs de transcriptions cruciaux qui peuvent être des partenaires potentiels de PU.1 dans ces processus de régulation. Je détaillerai plus précisément le compartiment érythroïde, ses régulateurs ainsi que les érythroleucémies de Friend dans lesquelles l'expression de PU.1 est fréquemment altérée. Une partie plus axée sur PU.1 permettra ensuite de préciser l'état des connaissances sur ce gène qui ont été accumulées avant et pendant mon travail de thèse, ce qui permettra de situer les rôles majeurs de PU.1 dans les différents processus hématopoïétiques que j'aurais décrits auparavant. Je pourrais alors exposer et discuter les résultats de mes travaux en utilisant comme support les références abordées en introduction.

Introduction

Les différentes parties de cette introduction sont conçues pour apporter les éléments principaux nécessaires à l'interprétation de mes résultats. Je ne vais donc pas décrire en détail l'ensemble du système hématopoïétique, mais j'esquisserai souvent durant cette introduction, un lien avec mes résultats et leur interprétation.

1^{ère} Partie. Présentation des différents types de cellules fonctionnelles du système hématopoïétique.

La figure I1 présente une vue globale du système hématopoïétique que je vais décrire durant cette introduction. On peut regrouper les cellules hématopoïétiques matures, fonctionnelles, de différentes façons selon les critères appliqués. Ainsi, on peut distinguer deux grands groupes, si l'on classe ces cellules selon qu'elles possèdent ou non une activité immunitaire.

Dans ce cas, les cellules du compartiment érythroïde ; les érythrocytes et les mégacaryocytes se distinguent de toutes les autres cellules. Les érythrocytes sont chargés du transport de l'oxygène dans l'ensemble de l'organisme. Les mégacaryocytes sont des cellules polyploïdes géantes qui forment, par fragmentation cytoplasmique les plaquettes, ou thrombocytes qui sont responsables de l'hémostase, c'est-à-dire de la réparation des vaisseaux sanguins. Par opposition à ces deux types cellulaires, toutes les autres cellules hématopoïétiques possèdent une fonction immunitaire. Parmi ces cellules immunitaires, on peut distinguer les cellules des lignées myéloïde, lymphoïde, et dendritique.

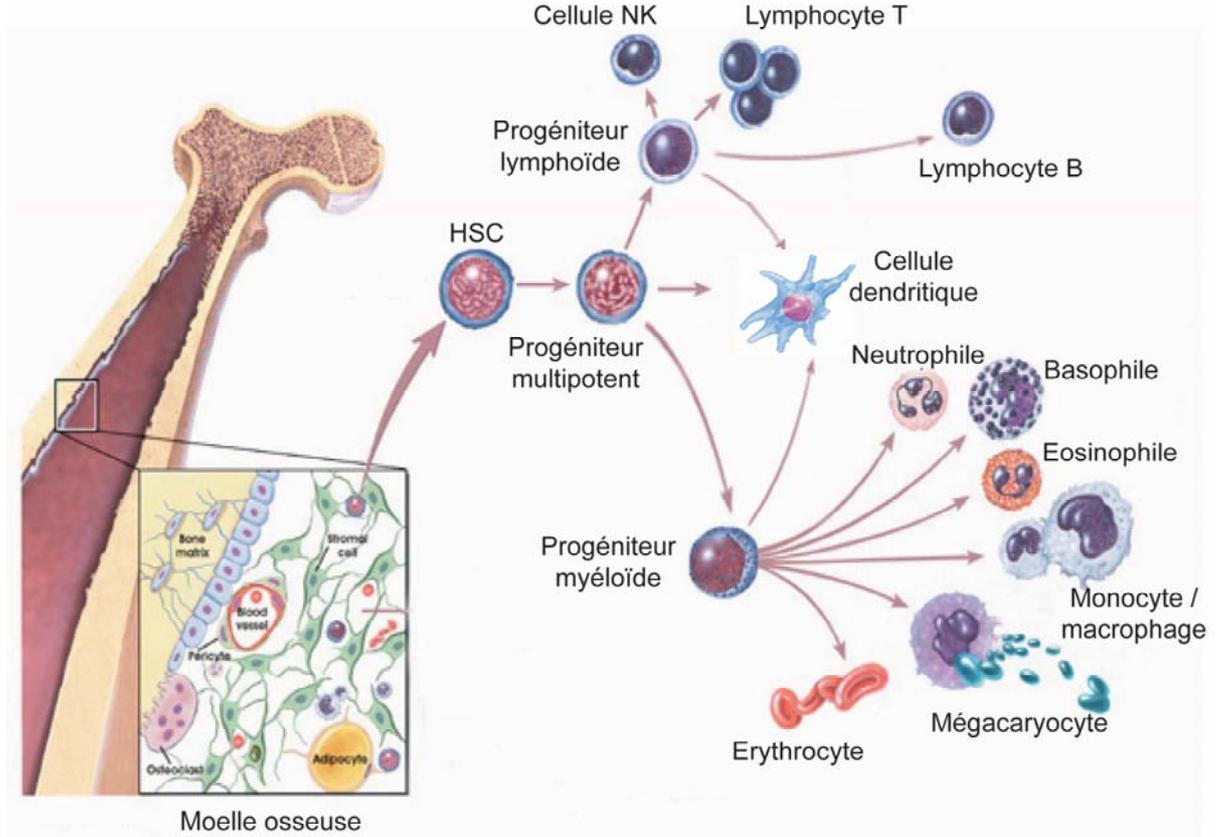


Figure I1: Le système hématopoïétique.

Ce modèle présente les principales cellules hématopoïétiques matures produites dans la moelle osseuse, à partir des cellules souches et progéniteurs. L'engagement séquentiel des progéniteurs multipotents en progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes n'est qu'une hypothèse adaptée à la représentation des diverses cellules du système hématopoïétique. HSC: cellule souche hématopoïétique; cellule NK: cellule "natural killer".

Les lymphocytes B et T sont les composants de l'immunité adaptative (ou immunité spécifique). Ces cellules peuvent être encore divisées en de multiples sous-groupes qui possèdent chacun une fonction très précise. Ainsi les lymphocytes B peuvent encore se différencier en plasmocytes, c'est-à-dire en cellules productrices d'anticorps. Ils peuvent aussi lors d'une réaction immunitaire acquérir un phénotype quiescent et devenir des lymphocytes B mémoire, qui serviront lors d'une infection ultérieure par le même pathogène. Dans la cavité péritonéale, il existe un sous-type de lymphocytes B particulier, les cellules B1. L'origine précise de ces cellules n'est pas connue et elles pourraient être issues d'une voie de différenciation distincte des lymphocytes B "classiques" (voir (Fagarasan et al., 2000) pour revue). Les lymphocytes T sont de deux grands types: les T "helpers" (T_H) ou $T CD4^+$ et les T cytotoxiques (T_C) ou $T CD8^+$. Les T_C sont impliqués dans l'élimination (par leur action de cytotoxicité cellulaire) des cellules infectées par des virus ou d'autres parasites intracellulaires, ainsi que dans l'élimination des cellules tumorales. Les T_H se sont spécialisés dans la fonction de "chef d'orchestre" du système immunitaire, modulant son action grâce au panel de cytokines qu'ils sécrètent. Ainsi, un lymphocyte T_H ne correspond pas au stade

ultime de différenciation, puisque selon le type de pathogène et de réaction immunitaire, il peut se différencier en T_{H1} ou T_{H2} et sécréter différents cocktails de cytokines. Les cellules NK ("natural killer") sont également considérées comme des lymphocytes. Elles participent notamment à la réponse immunitaire innée contre les virus et jouent également un rôle crucial dans l'élimination des cellules tumorales.

Les cellules myéloïdes constituent l'essentiel de l'immunité innée, ou immunité non-adaptative. Ce sont les macrophages ainsi que les granulocytes neutrophiles, basophiles et éosinophiles (selon leurs propriétés de réaction aux colorants cytologiques). Les macrophages ainsi que les neutrophiles sont très efficaces pour l'élimination de pathogènes qu'ils ont phagocyté car ils possèdent de nombreuses protéines qui participent à leur élimination. Je l'aborderais plus tard, mais de nombreux gènes codant pour ces protéines sont contrôlés par PU.1. Les éosinophiles possèdent également une capacité de phagocytose, mais ils sont davantage spécialisés dans l'élimination de pathogènes parasitaires comme les vers. Les basophiles deviennent des mastocytes une fois qu'ils ont quitté le sang pour atteindre un tissu. Les mastocytes sont essentiellement connus pour leur implication dans les processus d'allergies (asthme, chocs anaphylactiques...), du fait de leur capacité à sécréter l'histamine. Néanmoins leur rôle dans l'élimination des pathogènes via l'amplification de la réponse inflammatoire est important.

Enfin, les cellules dendritiques sont représentées par 3 sous-types. Les cellules dendritiques dites myéloïdes et les cellules dendritiques lymphoïdes partagent certains marqueurs de surface caractéristiques des cellules myéloïdes et lymphoïdes respectivement. Ces cellules sont spécialisées dans la fonction de présentation d'antigène. Par conséquent, elles sont au cœur de la réaction immunitaire et jouent un rôle crucial dans l'activation des lymphocytes T. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes représentent le troisième type de cellules dendritiques. Ces cellules ont été identifiées assez récemment, et ne possèdent pas la même morphologie que les autres cellules dendritiques (morphologie comportant des expansions cytoplasmiques ou dendrites). Elles ont été caractérisées comme les principales productrices d'interféron de type I (ie. $IFN\alpha$ et $IFN\beta$). Par ce biais, elles participent à la réaction immunitaire contre certaines infections virales et apparaissent comme un lien important entre la réponse innée et adaptative.

Tous ces types cellulaires sont (plus ou moins bien) caractérisés, soit par leur morphologie, soit plus généralement par les protéines de surface spécifiques qu'ils expriment. Au cours de mon travail de thèse, j'ai utilisé principalement la cytométrie de flux afin

d'identifier ces cellules à l'aide de leurs marqueurs de surface. Tous ces marqueurs seront détaillés dans la partie résultats ainsi que matériels et méthodes.

Cette classification rend toutefois peu compte de l'origine développementale de ces cellules matures. Ainsi, comme je le soulignerai un peu plus tard, les cellules érythroïdes, qui n'ont aucune fonction immunitaire, semblent posséder une origine commune avec les cellules myéloïdes. De même, les basophiles, mastocytes et éosinophiles classés en tant que cellules myéloïdes, peuvent être obtenus à partir de progéniteurs communs avec le lignage érythroïde (Migliaccio et al., 2003). Enfin, le cas le plus flagrant étant les cellules dendritiques qui possèdent soit des caractéristiques myéloïdes, soit lymphoïdes et dont l'origine est encore très mal définie. Il est donc crucial, pour comprendre le fonctionnement du système hématopoïétique, d'étudier son compartiment précurseur. De plus, même si PU.1 est impliqué dans la fonction de certaines cellules matures (cf. Introduction partie 5), beaucoup de ses fonctions s'appliquent au niveau du contrôle du destin des "précurseurs" hématopoïétiques. Je définirai plus précisément ce terme de précurseur dans la partie suivante.

2^{ème} Partie. Génération des cellules hématopoïétiques: le compartiment précurseur hématopoïétique.

On peut diviser le compartiment précurseur hématopoïétique en trois couches représentant des stades de différenciations séquentiels, mais qui s'enchaînent de façon discrète. Ces différents types de précurseurs possèdent chacun des caractéristiques d'autorenouvellement, de prolifération et de différenciation distinctes. Un premier groupe est constitué par les cellules les plus immatures, les cellules souches hématopoïétiques (HSC pour "hematopoietic stem cells"). Ces HSC peuvent se différencier en progéniteurs multi ou oligopotents, qui eux-mêmes peuvent engendrer des précurseurs qui sont restreints à un type de lignage. Cette organisation en trois couches (cellules souches, progéniteurs, précurseurs) permet une amplification importante de la production des cellules hématopoïétiques. En effet, à partir d'un nombre très restreint de cellules souches (environ 0,05% de la population totale de la moelle osseuse), le système hématopoïétique doit, chez la souris, générer chaque jour plus de 10^{10} cellules matures.

La base du fonctionnement du système hématopoïétique réside sur la différenciation de précurseurs hématopoïétiques. La mise en place de ces précurseurs lors de l'embryogenèse est donc l'événement crucial de l'émergence de ce système hématopoïétique.

2.1 L'ontogénie du système hématopoïétique.

Les différentes étapes de l'ontogénèse du système hématopoïétique sont représentées en figure I2. Les premières cellules hématopoïétiques apparaissent vers sept jours de gestation (stade E7). Ces cellules forment des îlots sanguins dans une région extra-embryonnaire; le sac vitellin (Moore and Metcalf, 1970). Néanmoins, ces précurseurs possèdent un potentiel très limité. Ils ne peuvent générer que des cellules de la lignée érythroïde primitive (cellules nucléées et exprimant l'hémoglobine embryonnaire), et possèdent un faible potentiel de différenciation myéloïde (Cumano et al., 1996). De plus, les précurseurs de ces îlots sanguins ne possèdent pas de potentiel de reconstitution à long terme, lorsqu'ils sont réinjectés dans des

souris irradiées (Cumano et al., 2001).

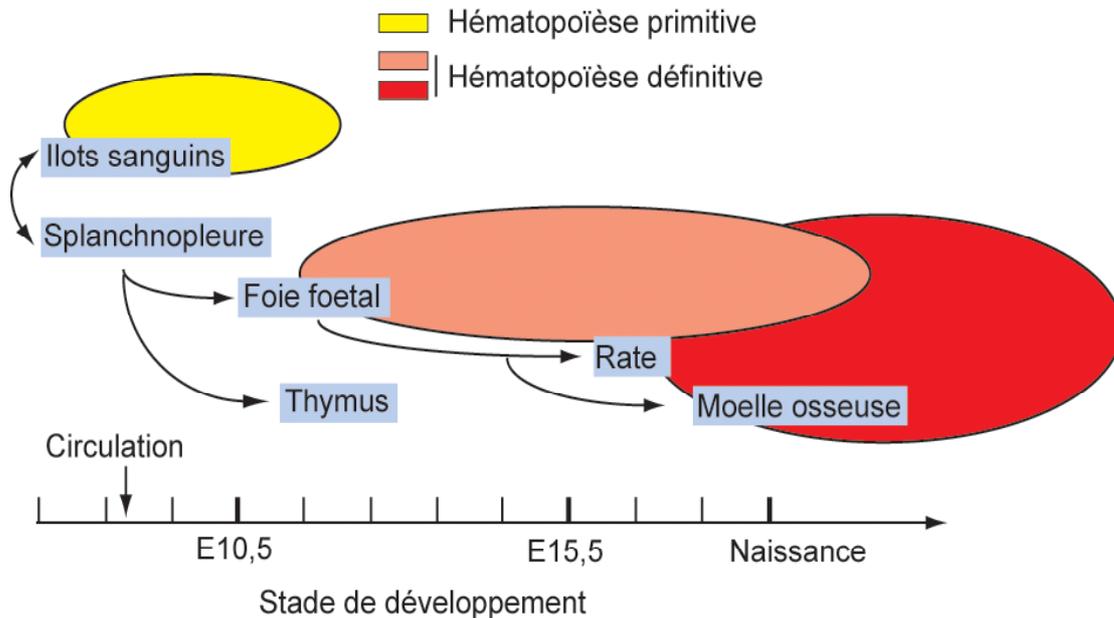


Figure I2: Développement embryonnaire de l'hématopoïèse.

Les premières cellules sanguines apparaissent dans les îlots sanguins du sac vitellin (site extra-embryonnaire) et dans la splanchnopleure para-aortique (site intra-embryonnaire). Une fois la circulation sanguine établie, les cellules hématopoïétiques de ces deux sites circulent dans l'embryon. Lorsque le foie foetal se développe (vers 10 jours de gestation), il est rapidement colonisé par les cellules hématopoïétiques. Tous les progéniteurs responsables de l'hématopoïèse définitive trouvés dans le foie foetal sont dérivées du site intra-embryonnaire. Les cellules hématopoïétiques envahissent ensuite séquentiellement le thymus, la rate puis la moelle osseuse.

La circulation sanguine s'établit vers 8,5 jours de gestation, c'est également à partir de ce moment également que l'hématopoïèse primitive est relayée par l'émergence de l'hématopoïèse définitive. C'est un deuxième site, intra-embryonnaire, qui va générer les précurseurs hématopoïétiques définitifs (Godin et al., 1995; Godin et al., 1999). Ce site correspond, aux stades E8 à E10, à la région de la splanchnopleure para-aortique de l'aorte dorsale (P-Spl) aussi appelée AGM car ce site se développe plus tard (entre 10 et 12 jours de gestation) pour former les régions de l'aorte, des gonades et du mésonéphros. Les précurseurs de cette région possèdent une capacité de reconstitution à long terme de l'hématopoïèse et peuvent générer *in vitro* des cellules des compartiments myéloïdes, lymphoïdes et érythroïdes (Cumano et al., 1996; Sanchez et al., 1996). Les précurseurs de cette région AGM peuvent donc être considérés comme les premières véritables cellules souches hématopoïétiques générées au cours du développement.

C'est le foie fœtal qui constitue le site principal de l'hématopoïèse à partir du stade E10. L'activité hématopoïétique est détectée dès 9 jours de gestation au niveau du foie fœtal (Johnson and Jones, 1973). Il est considéré que ce sont les cellules de la région AGM qui colonisent le foie fœtal (Muller et al., 1994). C'est durant cette même période (E11 à E13) que le thymus est également colonisé. Plus tard, vers E15, les cellules hématopoïétiques gagnent la rate, puis vers 16,5-17 jours de gestation, le potentiel hématopoïétique commence à s'étendre à la moelle osseuse. À partir de la naissance et pendant toute la vie adulte, c'est la moelle osseuse et le thymus (développement des lymphocytes T) qui constituent les sites de production de cellules hématopoïétiques. La rate peut également être considéré comme un organe hématopoïétique, les lymphocytes B y terminant leur maturation.

La rate peut également servir d'organe hématopoïétique "de secours", lorsqu'un stress hématopoïétique ou une déficience de la moelle osseuse surviennent. Lors d'un travail en collaboration avec l'équipe du Pr Auwerx, j'ai pu mettre en valeur ce phénomène dans des souris déficientes pour le récepteur nucléaire PPAR γ . Ces souris présentent en effet une production accrue de masse osseuse ce qui diminue l'espace disponible pour la moelle osseuse. En conséquence, une partie de l'hématopoïèse est déplacée vers la rate (Cock et al., 2004).

2.2 Les cellules souches hématopoïétiques.

Les HSC possèdent deux caractéristiques: 1- elles sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de générer toutes les cellules du système hématopoïétique. 2- elles ont une capacité d'autorenouvellement; elles peuvent donc proliférer sans entrer dans un cycle de différenciation irréversible. Ces deux propriétés impliquent que les HSC peuvent effectuer des divisions asymétriques, une cellule fille gardant entier son potentiel de HSC (autorenouvellement), la deuxième étant irréversiblement engagée dans le processus de différenciation (perte du potentiel d'autorenouvellement).

2.2.1 Identification et caractérisation des cellules souches hématopoïétiques.

La première évidence de l'existence de cellules hématopoïétiques pluripotentes avec un potentiel de cellule souche a été apporté par Till et McCulloch (Till and Mc, 1961). Cette expérience a initialement identifié une population de la moelle osseuse capable de générer des colonies myélo-érythrocytaires lorsqu'elle est injectée dans la rate de souris irradiées. Ces cellules ont été désignées par l'acronyme CFU-S pour "colony forming unit – Spleen". Seule une fraction des cellules de certaines colonies CFU-S sont capables de reconstituer, à long terme, l'ensemble du système hématopoïétique lorsqu'elles sont transférées dans une seconde souris irradiée. Ce sont ces cellules qui peuvent être qualifiées de véritables HSC.

Par la suite, ces HSC de la moelle osseuse ont été phénotypiquement caractérisées, et ont pu être isolées afin de tester leur potentiel de reconstitution hématopoïétique (Spangrude et al., 1988). Ainsi, deux types de HSC ont pu être distingués: les HSC ayant un potentiel de reconstitution à long terme, supérieur à 6 mois (LT-HSC pour "long term-HSC"), ainsi que les ST-HSC ("short term-HSC") qui ne possèdent qu'une capacité de reconstitution à court terme (4-8 semaines) du système hématopoïétique (Harrison and Zhong, 1992; Jones et al., 1989; Zhong et al., 1996). Les HSC sont caractérisées par l'absence d'expression de marqueurs de surface caractéristiques des lignages myéloïdes, lymphoïdes et érythroïdes (Cf. Résultats parties 2 et 3 pour la liste de ces marqueurs). Ces cellules sont notées comme Lin⁻ pour "lineage negative". En plus de leur phénotype Lin⁻, les HSC expriment les marqueurs Sca-1 et c-Kit. Cette fraction Lin⁻ sca-1⁺ c-Kit⁺ reste cependant très hétérogène quant à son potentiel "souche". Il est maintenant admis que la fraction présentant le phénotype Lin⁻ sca-1⁺ c-Kit⁺ CD34⁻ est hautement enrichie en LT-HSC, alors que la population Lin⁻ sca-1⁺ c-Kit⁺ CD34⁺ présente un potentiel ST-HSC (Goodell et al., 1997; Osawa et al., 1996; Sato et al., 1999). Les HSC ont également été caractérisées par leur capacité à exporter des colorants fluorescents comme la rhodamine-123 (grâce à l'expression d'une pompe membranaire du type "multi-drug resistance"). Les HSC présentent donc une faible fluorescence, alors que les cellules plus matures sont intensément fluorescentes, lorsqu'elles sont marquées avec de telles molécules fluorescentes (Li and Johnson, 1992). Il est à noter que les HSC isolées dans d'autres organes (foie fœtal, sang du cordon ombilical, AGM) possèdent des caractéristiques similaires en ce qui concerne l'expression des marqueurs de surface, avec toutefois des variations notamment vis-à-vis de l'expression de CD34.

2.2.2 Les gènes et facteurs environnementaux qui régulent les HSC.

Plusieurs gènes ayant un rôle au niveau du contrôle du potentiel d'autorenouvellement des HSC ont été identifiés. Ainsi, les cellules hématopoïétiques surexprimant *hoxB4* (un gène de la famille des homéogènes) présentent une expansion importante de la population HSC. De plus, ces HSC surexprimant *hoxB4* voient leur capacité de reconstitution augmentée (Sauvageau et al., 1995; Thorsteinsdottir et al., 1999). Le gène *bmi-1* semble également important, puisque l'activité de reconstitution à long terme des HSC dans le foie fœtal et la moelle osseuse de souris déficientes pour *bmi-1* est indétectable, suggérant un défaut d'autorenouvellement de ces cellules (Lessard and Sauvageau, 2003; Park et al., 2003). Les gènes AML-1 et SCL ont longtemps été considérés comme ayant un rôle crucial pour la préservation du potentiel LT-HSC, mais des données récentes utilisant des inactivations conditionnelles de ces gènes ont démontré le contraire.

L'environnement "stromal" ainsi que les facteurs de croissances jouent également un rôle crucial dans le contrôle de cette population souche hématopoïétique. Ces études n'ont pas toutes été réalisées sur des cellules souches de moelle osseuse murine, mais apportent des indications importantes sur l'interaction stroma-cellules souches. La voie de signalisation Hedgehog, par exemple, semble réguler positivement l'autorenouvellement des HSC, notamment via une signalisation dépendante des BMP (bone morphogenetic protein) (Bhardwaj et al., 2001). D'autres études ont suggéré que la voie Wnt est aussi un régulateur positif de l'autorenouvellement des HSC (Reya et al., 2003; Willert et al., 2003). De façon analogue, la voie de signalisation Notch est aussi impliquée dans le contrôle de cette population. Ainsi, des cellules $\text{Lin}^- \text{sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$ surexprimant, par transduction rétrovirale une forme constitutivement active de Notch1 sont immortalisées, mais gardent un phénotype immature et une capacité multipotente (Varnum-Finney et al., 2000). Enfin, une autre évidence de l'influence directe des cellules stromales sur les HSC a été apporté par des études sur les ostéoblastes. Ces études ont montré que l'activation et l'augmentation du nombre des ostéoblastes sont directement couplées à une expansion de la population HSC (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003).

Cette description du compartiment souche du système hématopoïétique sera particulièrement utile pour discuter du rôle éventuel de PU.1 dans ces HSC, notamment considérant le fait que mes données montrent une expression de PU.1 dans cette population (Cf. Résultats partie 3.1 et Discussion partie 3).

2.3 Le compartiment progéniteur multipotent.

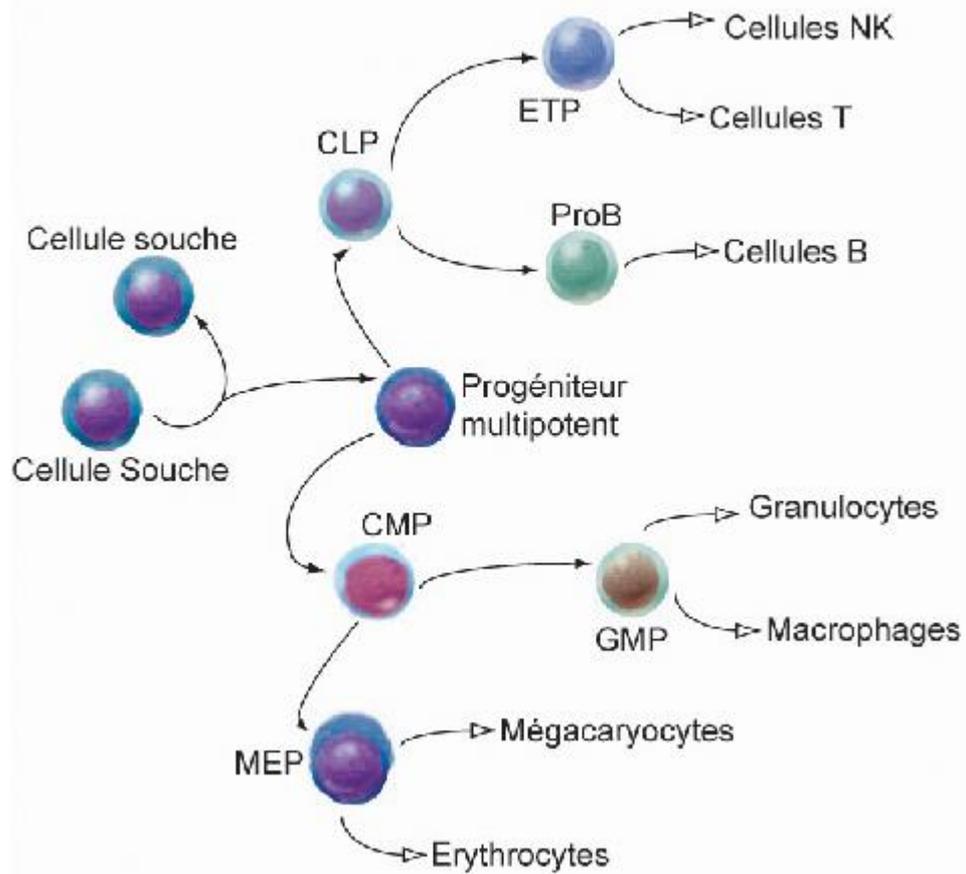
2.3.1 Modèles décrivant le compartiment multipotent.

Deux modèles ont été proposés afin d'expliquer comment des progéniteurs possédant un potentiel de différenciation restreint peuvent être générés à partir du réservoir des cellules souches hématopoïétiques (cf. figure I3).

Le premier modèle repose sur le fait qu'un progéniteur encore multipotent directement issu des HSC donne lieu à deux grands types de progéniteurs oligopotents: les CMP "common myeloid progenitors" et les CLP "common lymphoid progenitors". Ces CMP et CLP pouvant générer respectivement des progéniteurs myéloïdes, érythroïdes ainsi que des progéniteurs lymphoïdes T, B et NK. Le progéniteur multipotent pourrait correspondre aux ST-HSC, bien qu'il n'y ait aucune démonstration pour cela. Ce modèle, proposé par Akashi, Weissman *et al.* est le plus largement accepté et utilisé, notamment car les progéniteurs décrits sont bien caractérisés phénotypiquement (dans la moelle et le foie fœtal) et peuvent donc être facilement identifiés et isolés. Pour ces raisons, j'ai choisi cette nomenclature au cours de mon travail de thèse.

Néanmoins, d'autres données viennent perturber la "simplicité" de ce modèle. Il a été récemment suggéré qu'une différenciation T peut se produire indépendamment d'un progéniteur CLP (Allman *et al.*, 2003). De plus, des progéniteurs ayant un potentiel B + macrophage ont été identifiés dans le foie fœtal (Cumano *et al.*, 1992) ainsi que plus récemment dans la moelle osseuse adulte (Montecino-Rodriguez *et al.*, 2001). Enfin, en utilisant un type de culture multipotente, basé sur la culture de thymus fœtal, Lu *et al.* ont montré que la fraction Lin⁻ c-Kit⁺ sca-1⁺ dans le foie fœtal, contient des progéniteurs ayant des potentiels de différenciation inattendus. Ainsi ils ont pu observer des progéniteurs avec un potentiel multipotent (myéloïde+érythroïde+lymphoïde), mais aussi des progéniteurs générant des colonies myélo-lymphoïdes ainsi que des colonies B-myéloïdes et T-myéloïdes (Lu *et al.*, 2002). Apparemment, ces auteurs n'ont jamais détecté de progéniteurs avec un potentiel CLP, contredisant les observations d'Akashi, Weissman *et al.* Bien que ces études aient été effectuées uniquement à partir de cellules de foie fœtal et que les progéniteurs décrits ne soient pas caractérisés phénotypiquement, elles peuvent amener à enrichir le modèle de Akashi, Weissman *et al.* Ceci souligne aussi le fait que l'hématopoïèse fœtale et adultes présentent des différences importantes.

A: Modèle d'Akashi, Weissman *et al.*



B: Modèle de Lu *et al.*

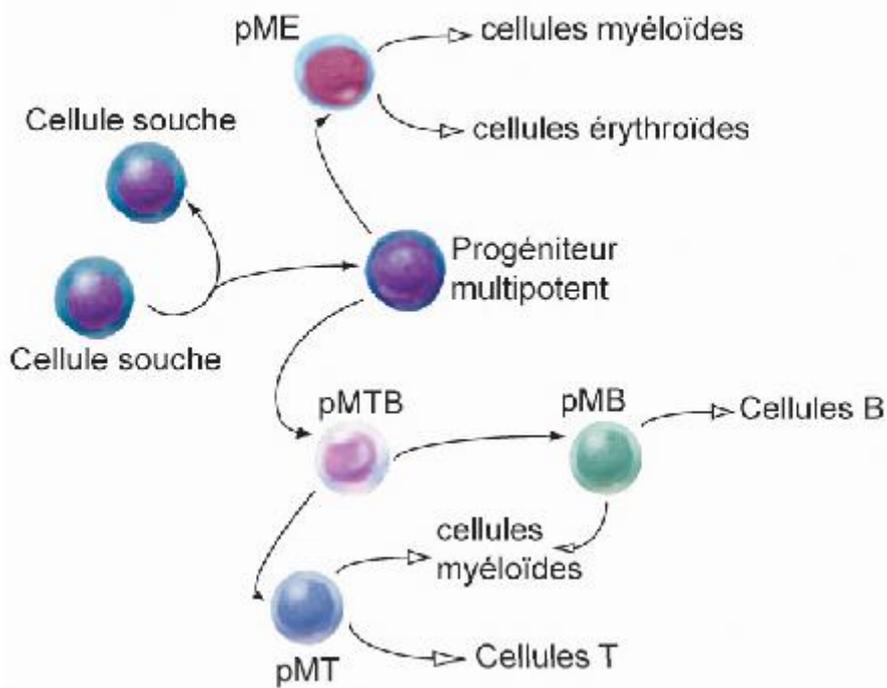


Figure I3: Modèle de génération de progéniteurs à partir du réservoir de cellules souches hématopoïétiques.

A: Ce modèle est basé sur la restriction séquentielle du potentiel de différenciation des progéniteurs. CLP: common lymphoid progenitor, CMP: common myeloid progenitor, MEP: megakaryocyte - erythrocyte progenitor, GMP: granulocyte - macrophage progenitor, ETP: early thymic progenitor. B: Ce modèle possède deux différences majeures avec le précédent. Tout d'abord, l'engagement des cellules souches se caractérise par une première divergence entre potentiel myélo-érythroïde et myélo-lymphoïde. Deuxièmement, le potentiel myéloïde accompagne le potentiel B et T dans les stades initiaux du processus de progression dans la différenciation. pME: progéniteur myélo-érythroïde, pMTB: progéniteur myélo-lymphoïde T et B, pMB: progéniteur myélo-lymphoïde B, pMT: progéniteur myélo-lymphoïde T.

2.3.2 Les progéniteurs myéloïdes: CMP et GMP.

Les CMP ont été identifiés dans la moelle osseuse par Akashi *et al.* (Akashi et al., 2000) et possèdent le phénotype $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{sca1}^- \text{CD16/32}^{\text{lo}} \text{CD34}^+$. Ces CMP peuvent générer des colonies comprenant des cellules myéloïdes (granulocytes + macrophages) ainsi que des cellules érythroïdes (érythrocytes + mégacaryocytes). De façon intéressante, après environ 4 semaines, les descendances de ces CMP ont disparu des souris reconstituées. Cette caractéristique indique leur très faible potentiel d'autorenouvellement, distinguant clairement ces progéniteurs des HSC. Il est en outre intéressant de noter que cette population a été également identifiée dans le foie fœtal par différents groupes (Lu et al., 2002; Traver et al., 2001), ainsi que dans la moelle osseuse humaine (avec un phénotype $\text{lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD38}^+ \text{CD34}^+$) (Manz et al., 2002). De façon surprenante, plusieurs études ont montré que ces CMP pouvaient générer des cellules dendritiques "de type lymphoïde" ($\text{CD11c}^+ \text{CD8}^+$) et "de type myéloïde" ($\text{CD11c}^+ \text{CD8}^- \text{Mac1}^+$), avec une efficacité similaire (Manz et al., 2001; Traver et al., 2000).

L'étape suivante de différenciation correspond à la génération de progéniteurs restreints au compartiment érythroïde (MEP pour Megakaryocyte erythroid progenitor), ou au compartiment myéloïde (GMP pour granulocyte macrophage progenitor). Les GMP possèdent un phénotype du type $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{sca1}^- \text{CD16/32}^{\text{hi}} \text{CD34}^+$. Lorsqu'ils sont réinjectés dans des souris irradiées, ces progéniteurs disposent d'une capacité de différenciation en granulocytes neutrophiles ainsi qu'en macrophages (caractérisés par l'expression des marqueurs myéloïdes Gr-1 (Ly6G) et Mac1 (CD11b)). Les GMP peuvent également générer des cellules dendritiques "myéloïdes" avec cependant une efficacité moindre que les CMP.

2.3.3 Les progéniteurs lymphoïdes: CLP et ETP

Le CLP représente le progéniteur lymphoïde correspondant au stade de différenciation équivalent au CMP. Cette population a été identifiée par Kondo *et al.* (Kondo et al., 1997) dans la moelle osseuse selon le phénotype $\text{Lin}^- \text{IL7R}^+ \text{Sca1}^{\text{lo}} \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{Thy1.1}^-$. Leur potentiel de différenciation a été initialement considéré comme restreint aux cellules T, B et NK, cependant Manz *et al.* (Manz et al., 2001) ont élargi ce potentiel aux cellules dendritiques (CD8^+ ainsi que CD8^-). Ces progéniteurs ne possèdent pas de capacité d'autorenouveau puisque les cellules dérivées de ces CLP injectés dans des souris irradiées ont disparues après quelques semaines. Par la suite, l'équivalent de cette population a également été identifié dans le foie fœtal (Mebius et al., 2001). Ces CLP fœtaux génèrent également des cellules T, B, NK et dendritiques, cependant, ils gardent un potentiel (même faible) de génération de macrophages. Enfin, la moelle osseuse humaine contient également une population comparable aux CLP (Galy et al., 1995).

Les précurseurs thymiques les plus immatures (ETP pour "early thymic progenitors" ou cellules pro-T), dans le thymus adulte, correspondent aux cellules $\text{CD3}^- \text{CD8}^- \text{CD4}^{\text{lo}} \text{CD25}^- \text{CD44}^+ \text{c-Kit}^+$ (Wu et al., 1991). Ces cellules pourraient correspondre aux CLP de la moelle osseuse qui auraient juste colonisé le thymus, puisque cette population ETP conserve le potentiel de générer des cellules B, NK et dendritiques (Ardavin et al., 1993; Matsuzaki et al., 1993; Wu et al., 1991). L'étape ultérieure coïncide avec la perte du potentiel de différenciation en cellules B et NK (Ikawa et al., 1999). Ces cellules présentent le phénotype $\text{CD3}^- \text{CD8}^- \text{CD4}^- \text{CD25}^+ \text{CD44}^+ \text{c-Kit}^+$. Ensuite, la progression vers le stade $\text{CD3}^- \text{CD8}^- \text{CD4}^- \text{CD25}^- \text{CD44}^- \text{c-Kit}^-$, s'accompagne de la perte du potentiel dendritique. Ces cellules initient le réarrangement de la chaîne β du TCR ("T cell receptor"). Il est toutefois important de remarquer qu'il a été suggéré récemment que le développement des lymphocytes T pouvait être initié indépendamment des CLP (Allman et al., 2003).

GATA-3 est un facteur central du développement précoce des lymphocytes T (Ting et al., 1996). Des études plus récentes utilisant l'inactivation conditionnelle de ce gène ont également montré un rôle aux stades ultérieurs de la maturation T, néanmoins, c'est aux stades précoces que GATA-3 constitue un partenaire potentiel de PU.1, pour le contrôle de la différenciation lymphoïde T. Il est notamment intéressant de remarquer que la surexpression de *gata-3* à l'instar de la déficience, altère profondément la génération de lymphocytes T

(Chen and Zhang, 2001; Taghon et al., 2001). Je le rappellerai plus tard, mais PU.1 possède des effets similaires à GATA-3 au niveau des précurseurs T précoces. Je ne décrirai pas les étapes ultérieures de la différenciation T (normalement le lecteur doit pousser un soupir de soulagement), car l'expression et la fonction de PU.1 est restreinte aux stades précoces du développement T (cf. Introduction partie 5.3.1).

3^{ème} Partie. La différenciation myéloïde, lymphoïde et dendritique.

3.1 La différenciation myéloïde.

3.1.1 Évolution morphologique et phénotypique accompagnant la maturation myéloïde.

Les stades finaux de différenciation des neutrophiles peuvent être évalués morphologiquement (cf. figure I4A). Chronologiquement, le promyélocyte, caractérisé par un noyau volumineux, évolue en myélocyte. Cette étape du développement est marquée par l'arrêt des divisions cellulaires. Ces deux types cellulaires peuvent être identifiés par la présence de constituants des granules primaires (myéloperoxydase, cathepsine G, élastase) dans le cytoplasme. Le myélocyte se différencie en métamyélocyte, dont le noyau commence à s'invaginer, pour finalement donner les neutrophiles matures, qui présentent la particularité d'avoir un noyau segmenté. Ces étapes finales de différenciation sont marquées par l'apparition de composants des granules secondaires (lactoferrine, gélatinase) dans le cytoplasme des cellules.

En outre, la maturation myéloïde est caractérisée du point de vue phénotypique par l'augmentation séquentielle de l'expression des marqueurs Mac1, puis Gr1 (cf. figure I4B).

3.1.2 Régulation transcriptionnelle de la myélopoïèse.

Je le décrirai plus en détail dans la partie spécifique, mais PU.1 joue un rôle crucial dans la différenciation des cellules myéloïdes. Je vais, dans cette partie, décrire certains autres gènes impliqués dans le contrôle de la myélopoïèse et qui par conséquent sont des partenaires potentiels de PU.1 dans ce processus.

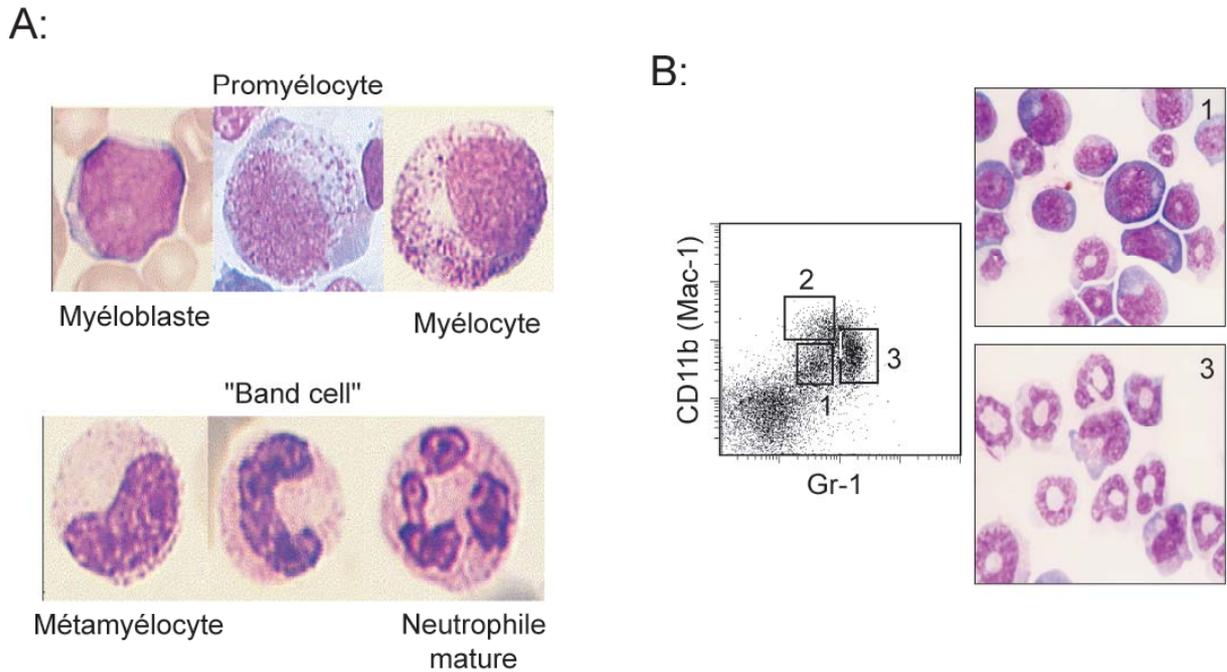


Figure I4: Visualisation de la différenciation myéloïde dans la moelle osseuse.

A: Morphologie des différents types de cellules myéloïdes en coloration de May-Grünwald Giemsa. Les promyélocytes et myélocytes sont facilement identifiables par leurs granules enzymatiques. B: Corrélation entre expression de marqueurs de surface et différenciation. La combinaison des marqueurs Gr-1 et CD11b est spécifique des cellules myéloïdes. Les images correspondent aux populations sélectionnées selon leur numéro. La population 3 est clairement plus mature que la population 1. La population 2, non représentée est composée de cellules intermédiaires en maturation.

C/EBP α appartient à la famille des facteurs de transcription C/EBP “CCAAT/Enhancer Binding Protein”. Dans le système hématopoïétique, C/EBP α est exprimé dans les myéloblastes immatures et son niveau d’expression diminue au cours de la différenciation en neutrophiles matures (Scott et al., 1992). Une de ses propriétés principales, dans le compartiment myéloïde, est d’induire la différenciation granulocytaire et de bloquer parallèlement la différenciation monocytique (Radomska et al., 1998). L’analyse de nouveaux déficients pour C/EBP α montre une absence de neutrophiles dans le foie (Zhang et al., 1997), probablement due à une réduction du niveau d’expression du récepteur pour le G-CSF (G-CSFR pour “granulocyte-colony stimulating factor receptor”), en accord avec le rôle de ce facteur comme transactivateur du gène du G-CSFR (Smith *et al.*, 1996). En outre, C/EBP α contrôle positivement l’expression d’autres facteurs myéloïdes comme C/EBP ϵ (Cf.

paragraphe suivant) et PU.1 (Cf. partie PU.1), ou encore c-Myc (Johansen et al., 2001). Enfin, des données plus récentes démontrent que l'expression forcée de C/EBP α et C/EBP β dans des précurseurs déjà engagés dans le lignage B (cellules PreB), permet de reprogrammer ces cellules vers le lignage myéloïde (Xie et al., 2004). Par conséquent, C/EBP α est maintenant considéré comme un facteur crucial du développement myéloïde.

C/EBP ϵ est exclusivement exprimé dans les cellules myéloïdes et particulièrement au cours des derniers stades de maturation (Yamanaka et al., 1997b). Comme je viens de le mentionner, C/EBP ϵ opère en aval de C/EBP α (Nakajima and Ihle, 2001). Les souris pour lesquelles le gène C/EBP ϵ a été inactivé par recombinaison homologue (Yamanaka et al., 1997a) présentent une augmentation du nombre de progéniteurs myéloïdes dans la MO ainsi qu'une augmentation du nombre de neutrophiles hyposégmentés dans le sang périphérique. Les fonctions effectrices (chimiotaxie, production de superoxyde, phagocytose de bactérie) des neutrophiles produits dans les souris C/EBP $\epsilon^{-/-}$ sont grandement altérées. Ces données montrent que C/EBP ϵ est un acteur clé de la maturation terminale des cellules myéloïdes en neutrophiles matures.

Le facteur AML-1 (RunX1) a été initialement identifié comme la cible de translocations chromosomiques générant des leucémies myéloïdes aiguës ("Acute Myeloid Leukemia"). La translocation la plus fréquente aboutit à la fusion entre *AML-1* et le gène *ETO*. La protéine de fusion générée inhibe la différenciation myéloïde en interférant avec l'activité de la protéine AML-1 normale, soulignant le rôle important de ce facteur dans la différenciation myéloïde. De nombreux gènes myéloïdes sont régulés par AML-1, notamment les gènes *cfms* et GM-CSFR codant pour le récepteur au M-CSF ("macrophage-colony stimulating factor") et GM-CSF ("granulocyte macrophage-colony stimulating factor") respectivement, ainsi que la myéloperoxydase. De plus AML-1 peut interagir et coopérer avec C/EBP α et PU.1 pour le contrôle du gène *cfms* (Petrovick et al., 1998).

3.2 La différenciation lymphoïde B et sa régulation.

3.2.1 Visualisation phénotypique de la différenciation du lignage B.

La différenciation lymphoïde B est une des mieux caractérisée phénotypiquement. Les premières étapes de cette différenciation se développent dans la moelle osseuse, et permettent de générer des cellules B qui expriment en surface des immunoglobulines avec une spécificité unique (BCR pour "B cell receptor"). Par la suite, la maturation finale se déroule dans la rate. Deux nomenclatures ont été proposées pour caractériser les différentes étapes du développement B, une par Rolink *et al.* (Rolink et al., 1994), l'autre par Hardy *et al.* (Hardy et al., 1991). J'ai utilisé cette dernière nomenclature lorsque j'ai étudié le compartiment lymphoïde B. Les différentes étapes de la différenciation lymphoïde B dans la moelle osseuse, ainsi que les marqueurs spécifiques de ces stades de différenciation, sont décrits dans la figure I5.

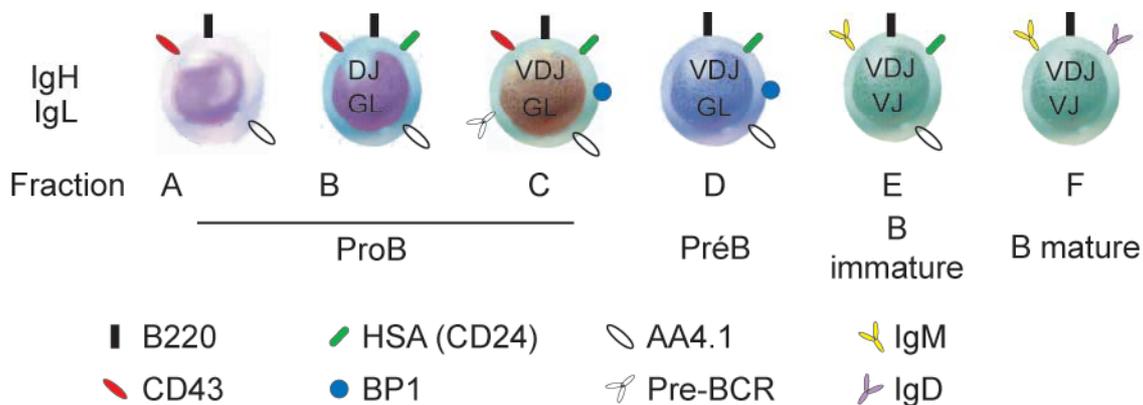


Figure I5: Représentation schématique du développement lymphoïde B dans la moelle osseuse selon Hardy *et al.*

L'expression des différents marqueurs de surface est représentée en fonction du stade de différenciation des cellules B. L'état de réarrangement du locus de la chaîne lourde (IgH) et légère (IgL) est annoté dans les cellules. GL: configuration non réarrangée; DJ: réarrangement entre les segments D_H et J_H; VDJ réarrangement entre les segments D_H et V_H; VJ: réarrangement entre les segments V_L et J_L.

La fraction A (ou cellules pre-pro-B) contient des cellules qui ne sont pas encore totalement engagées dans le lignage B (fraction A0) ainsi que des précurseurs engagés (fraction A1 et A2) (Allman et al., 1999). Il est difficile de faire une relation entre les CLP et

cette fraction A étant donné que les marqueurs utilisés sont différents. Même si la fraction F est située dans la moelle, cette population est considérée comme une population mature ayant recirculé à partir d'organes périphériques.

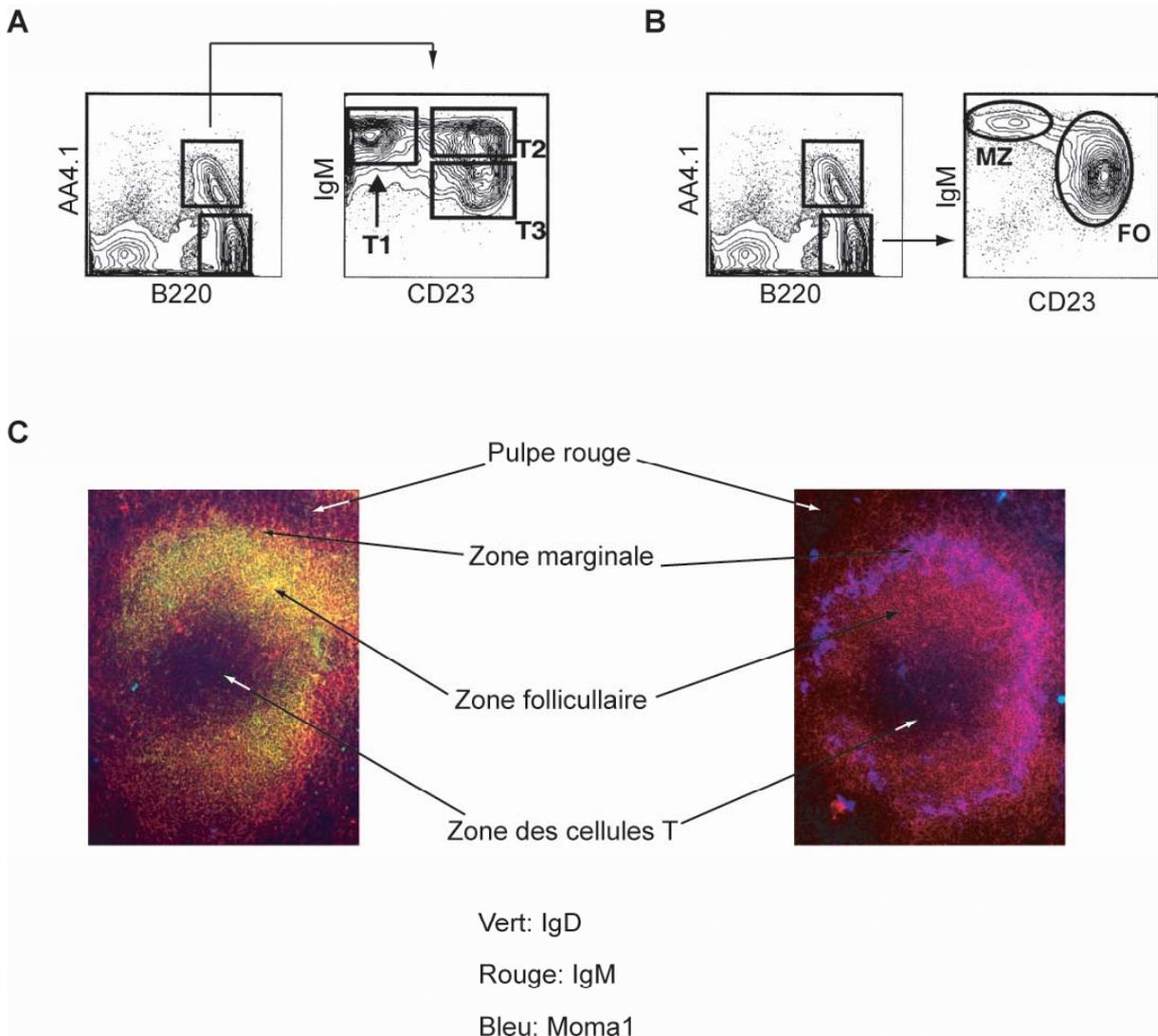


Figure I6: Populations de cellules B dans la rate.

A: Cellules B transitionnelles. Les cellules B immatures émigrant depuis la moelle osseuse expriment encore le marqueur AA4.1. B: Populations B matures. Ayant perdu l'expression du marqueur AA4.1, les cellules matures se répartissent dans les zones marginales (MZ) ou folliculaires (FO) certainement en fonction de la spécificité de leur BCR. C: Visualisation micro-anatomique des follicules. Les différentes zones des follicules peuvent être visualisées par immunofluorescence à l'aide des marqueurs IgM, IgD et Moma1. Les cellules B MZ expriment fortement IgM et quasiment pas IgD. Par contre, les cellules B folliculaires expriment fortement IgD et plus faiblement IgM. Le marqueur Moma1 est spécifique des macrophages métallophiliques qui sont situés spécifiquement dans la zone marginale. Ce marqueur permet de visualiser précisément cette zone.

Les cellules B immatures (fraction E) quittent la moelle osseuse pour terminer leur maturation dans la rate. Elles arrivent dans la rate en tant que cellules transitionnelles qui

expriment encore le marqueur AA4.1. Allman *et al* (Allman et al., 2001) ont caractérisé cette population transitionnelle en trois sous-fractions séquentielles selon l'expression des marqueurs AA4.1, IgM et CD23 (cf. figure I6A). Les lymphocytes B matures dans la rate sont divisés en cellules B de la zone folliculaire (FO) et de la zone marginale (MZ), en fonction de leur phénotype, de leur localisation micro-anatomique et de leur fonction (cf. figure I6B-C). Les cellules B MZ sont capables de déployer très rapidement une réponse immunitaire de façon indépendante des lymphocytes T, de plus, ces cellules B MZ sont supposées participer préférentiellement aux réponses rapides initiées contre des antigènes issus du sang (Martin et al., 2001). Par opposition, les lymphocytes B FO participent davantage aux réponses immunitaires T-dépendantes, qui sont plus tardives, ainsi qu'à la production d'anticorps, en se différenciant en plasmocytes (Oliver et al., 1999).

Un autre type particulier de lymphocyte B correspond aux cellules B1. Ces cellules représentent la majorité des lymphocytes B dans les cavités pleurales et péritonéales. Ces cellules expriment de faibles niveaux du marqueur myéloïde CD11b (Mac-1), et certaines expriment également le marqueur T CD5. Ces cellules B1 possèdent, à l'instar des cellules B MZ des fonctionnalités propres. Elles produisent la plupart des anticorps naturel du sérum et contribuent de manière importante aux cellules plasmatiques sécrétant des IgA dans l'intestin. Néanmoins, elles participent peu à la production d'anticorps en réponse à un stimulus antigénique T-dépendant.

Le processus de différenciation conduisant à la génération de cellules B1 et B MZ plutôt que folliculaire (ou B2) est encore très mal connu. Néanmoins, des études suggèrent que l'intensité du signal par le BCR ou sa spécificité est importante pour générer ces types distincts de lymphocytes B (voir (Martin and Kearney, 2000) pour revue). Il sera intéressant de rappeler cette hypothèse lors de l'analyse de l'expression de PU.1 dans ces types de cellules B (cf. Discussion partie 4.2).

3.2.2 Régulation de la différenciation lymphoïde B.

De multiples gènes interviennent dans le contrôle du développement lymphoïde B. Je vais décrire uniquement ceux qui présentent un lien avec PU.1, en tant que gène cible, gène inducteur ou facteur collaborateur.

La voie de signalisation de l'IL-7R régule la survie, la prolifération et la différenciation des cellules pro-B. Les stades dépendants de la signalisation par IL-7R correspondent aux étapes où les cellules réarrangent le locus de la chaîne lourde d'immunoglobuline (Cumano et al., 1990). En corrélation avec cette observation, le développement lymphoïde B dans des souris déficientes pour IL-7 ou IL-7R est arrêté à la transition pro/préB (Corcoran et al., 1998; Peschon et al., 1994).

Le facteur EBF est le seul membre de la famille des protéines régulatrices O/E ("Ofl-1/EBF helix-loop-helix transcription factor") à être exprimé dans les cellules du lignage B (Hagman et al., 1993). A l'instar des souris déficientes pour IL-7R, les souris déficientes pour EBF ne développent aucune cellules B matures et très peu de cellules pro-B (Lin and Grosschedl, 1995). Dans les rares cellules pro-B présentes, l'expression de gènes spécifiques au lignage B, notamment PU.1 et Pax5, est quasiment indétectable. Par contre, l'expression de IL-7R est quasi normale.

Le facteur de transcription Pax5 (originellement BSAP) joue un rôle central dans l'engagement définitif dans le lignage B. De façon similaire aux conclusions sur les souris déficientes pour EBF et IL-7R, le développement B est stoppé au stade pro-B. Néanmoins, les cellules pro-B Pax5^{-/-} peuvent proliférer, *in vitro*, en présence de cellules stromales et d'IL7 (Nutt et al., 1997). Elles expriment alors les gènes PU.1 et EBF notamment, suggérant que Pax-5 fonctionne en aval de ces facteurs et de la signalisation par IL-7R. De façon intéressante, les quelques cellules pro-B présentes dans les souris déficientes pour Pax-5, conservent le potentiel de se différencier en granulocytes, en cellules dendritiques, en cellules NK ainsi qu'en cellules T (Nutt et al., 2001; Rolink et al., 1999). De plus, ces cellules pro-B (en fait présentant un phénotype pro-B) continuent à exprimer des gènes non spécifiques du lignage B. La résultante de ces études est que Pax-5 est le facteur crucial de l'engagement dans le lignage B et du maintien de l'identité B. Pax-5 semble donc exercer sa fonction, d'une part en promouvant l'expression de gènes spécifiques du développement B (CD19, Ig α , LEF-1 etc.) et d'autre part en réprimant l'expression des gènes correspondants aux lignages alternatifs.

Spi-B est un gène fortement homologue à PU.1 qui est exprimé spécifiquement dans les cellules B (Chen et al., 1995b; Ray et al., 1992). Spi-B est impliqué, avec PU.1

notamment, dans la transduction du signal provenant du BCR, ainsi que dans la survie des lymphocytes B (Garrett-Sinha et al., 1999; Hu et al., 2001).

3.3 Le développement des cellules dendritiques.

3.3.1 Phénotype des différents types de cellules dendritiques.

Les différentes fonctions et caractéristiques des cellules dendritiques (DC) matures commencent à être bien connues. On sait désormais que ces cellules sont d'excellentes présentatrices d'antigène et qu'elles expriment des costimulateurs variés qui peuvent influencer la réponse immunitaire, notamment en dirigeant la différenciation des lymphocytes TH₀ en TH₁ ou TH₂. À l'heure actuelle, on distingue essentiellement trois grands types de DC en fonction de leur expression de marqueurs de surface: les DC CD8⁺, CD8⁻ et les DC plasmacytoïdes (pDC) qui expriment B220. À cela on peut ajouter les DC présentes dans la peau, ou cellules de Langerhans. Toutes les cellules dendritiques partagent l'expression du marqueur CD11c. Néanmoins, l'origine, et le processus de différenciation menant à la production de ces différents types de DC est encore très mal connu, voir même particulièrement embrouillé.

Originellement, les cellules dendritiques étaient supposées dériver exclusivement des cellules myéloïdes, notamment des monocytes (Inaba et al., 1993; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Par la suite, il a été proposé que les DC CD8⁺ et CD8⁻ avaient une origine myéloïde et lymphoïde respectivement. Cependant, comme je l'ai cité un peu plus haut, les CMP ainsi que les CLP peuvent générer ces deux types dendritiques (Manz et al., 2001; Traver et al., 2000). Ajouté à cela, une étude a également montré que les ETP disposent de la possibilité de générer des DC CD8⁺ et CD8⁻ (Martin et al., 2000), rendant cette hypothèse peu probable. Par conséquent, il reste important de déterminer si les DC sont effectivement produites à partir des CMP et CLP dans la moelle, ou alors si ces cellules sont générées par la différenciation d'un éventuel précurseur dendritique (pré-DC) situé dans les organes périphériques.

3.3.2 Facteurs de transcription et développement dendritique.

Les régulateurs génétiques de la différenciation dendritique sont évidemment très peu connus. De nombreuses souris déficientes pour un facteur de transcription exhibent une altération dans la génération de ces cellules. Ainsi, les souris exprimant une forme dominante négative d'Ikaros ne possèdent plus aucun type de DC dans la rate ou le thymus, les cellules de Langerhans étant toujours présentes dans la peau (Georgopoulos et al., 1994). Dans les souris où le gène *ikaros* a été inactivé, seules les DC CD8⁻ sont absentes (Wu et al., 1997b). En opposition, les souris déficientes pour Id2 ne produisent plus de DC CD8⁺, ni de cellules de Langerhans, mais possèdent des DC CD8⁺ (Hacker et al., 2003). Ces études montrent que la relation entre ces divers types de DC ne semble pas linéaire et que les DC CD8⁺ ne représentent pas un stade de maturation ultérieur des DC CD8⁻. Enfin, comme je le décrirai plus tard, les souris déficientes pour PU.1 présentent également des altérations dans le compartiment dendritique, de plus l'étude de l'expression de PU.1 dans ces divers types de DC apportera des informations intéressantes quant à la disparité des DC, du point de vue de leur origine ainsi que de leur maturation.

4^{ème} Partie. Le compartiment érythroïde et les érythroleucémies.

Une partie importante de mon travail a été centrée sur l'étude du compartiment érythroïde des souris mutantes pour PU.1, notamment en mettant en valeur une base physiologique expliquant l'implication de PU.1 dans les érythroleucémies de Friend. Je vais donc décrire ce lignage en abordant essentiellement les précurseurs, les érythroleucémies et les facteurs de transcriptions qui sont susceptibles de collaborer avec PU.1 dans les précurseurs érythroïdes.

4.1 Visualisation morphologique et phénotypique des cellules érythroïdes.

Morphologiquement, la cellule érythroïde la plus immature identifiable est le proérythroblaste (cf. Figure 17 pour les différents types de cellules érythroïdes). Cette cellule est de taille importante (environ 20 μ m) et possède une taille nucléaire importante ainsi qu'un cytoplasme qui se colore en bleu foncé, en coloration de May-Grünwald Giemsa. Les cellules descendantes, les érythroblastes basophiles (aussi appelés macroblastes parfois) possèdent des caractéristiques similaires, le diamètre de leur noyau étant simplement plus petit. Ces deux types cellulaires possèdent encore un potentiel prolifératif (un proérythroblaste peut générer 16 érythrocytes, donc possède un potentiel de 4 divisions). La maturation érythroïde est donc couplée au processus de division cellulaire, mais est également accompagnée par une diminution de la taille. Ainsi, les normoblastes, qui résultent de la division des érythroblastes sont plus petits (de 10 à 7 μ m). On peut distinguer les normoblastes polychromatiques, qui possèdent encore une coloration légèrement bleutée de leur cytoplasme et qui peuvent encore se diviser une fois, des normoblastes orthochromatiques. Ces derniers commencent à accumuler de l'hémoglobine dans leur cytoplasme et donc prennent une couleur plus rosée. Ils possèdent un noyau très condensé, qui est prêt à être expulsé. La cellule énucléée nouvellement formée est appelée réticulocyte, elle possède une coloration bleutée, dû à un contenu encore riche en ARN messagers et en ribosomes. Après quelques jours, le réticulocyte perd ce contenu ARN et ribosomal et devient un érythrocyte. Il faut préciser que

l'érythropoïèse primitive (dérivée des précurseurs du sac vitellin, entre 7 et 8,5 jours de développement) ne génère que des érythrocytes nucléés, dits primitifs.

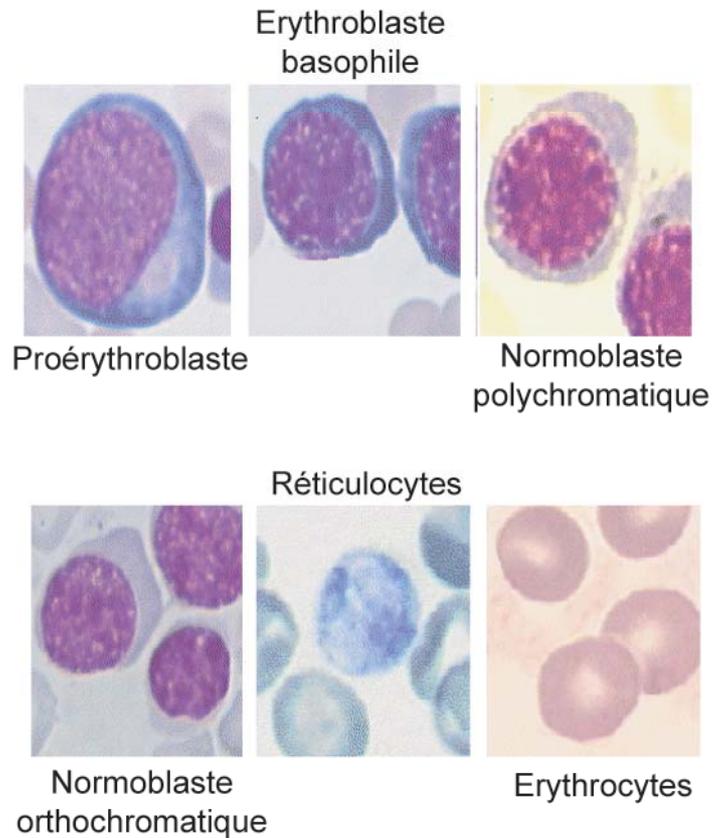


Figure I7: Morphologie des divers stades de maturation érythroïde.

Visualisation par coloration de May-Grünwald Giemsa. La taille relative des différentes cellules est respectée, le proérythroblaste étant la cellule la plus grande.

J'ai déjà rapidement décrit les mégacaryocytes dans la présentation générale des cellules du système hématopoïétique. Étant donné que je ne me suis pas particulièrement intéressé au cours de mes travaux, à la différenciation mégacaryocytaire, je ne vais pas décrire davantage ce lignage.

Du point de vue phénotypique, la caractérisation du lignage érythroïde est plus délicate, car il n'existe que peu de marqueurs spécifiques. Comme je l'ai mentionné plus haut, un précurseur avec un potentiel restreint au lignage érythroïde (MEP pour "megakaryocyte erythrocyte progenitor") a été identifié selon le phénotype $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{sca1}^- \text{CD16/32}^{\text{lo}} \text{CD34}^{\text{lo}}$ (Akashi et al., 2000). Ce précurseur est censé dériver directement des CMP qui possèdent un potentiel myéloïde ainsi qu'érythroïde. Comme son nom l'indique, ce MEP est capable de

générer des érythrocytes aussi bien que des mégacaryocytes, selon les conditions de culture. Les cellules érythroïdes matures (à partir du stade normoblaste) peuvent être visualisées grâce au marqueur TER119. Par contre, les stades intermédiaires entre le MEP et ces cellules matures ne sont pas caractérisés par des marqueurs spécifiques. Il est toutefois possible de suivre la progression de la différenciation érythrocytaire en utilisant les marqueurs CD71 (récepteur de la transférine) et TER119. J'ai utilisé cette méthode pour visualiser l'influence de PU.1 sur la différenciation érythroïde (cf. Résultats partie 2). Il est cependant difficile d'établir un parallèle entre la caractérisation morphologique et phénotypique du compartiment érythroïde. Toutefois, le MEP se situe en amont du stade proérythroblastique (qui est déjà restreint au lignage érythrocytaire).

4.2 Caractérisation fonctionnelle des précurseurs érythroïdes: BFU-E et CFU-E.

Les précurseurs érythroïdes peuvent être également identifiés avec des essais de culture *in vitro*, selon le type de colonie formée en réponse à des cytokines spécifiques. Ceci permet de distinguer deux types de précurseurs correspondant à des stades de maturation distincts. J'ai utilisé ce type de culture lors de l'analyse du compartiment érythroïde des souris mutantes pour PU.1.

Les CFU-E sont des précurseurs tardifs, proche du stade érythroblaste. Ces précurseurs possèdent une capacité de prolifération faible (4-8 mitoses) et sont entièrement dépendants de l'érythropoïétine quant à leur prolifération et différenciation. En culture, les CFU-E forment de petites colonies composées de 8 à 100 érythroblastes en 2 à 3 jours.

En revanche, les BFU-E sont des progéniteurs plus immatures et hétérogènes vis-à-vis de leur niveau de différenciation. Elles sont d'autant plus primitives que la taille des colonies obtenues est importante (et donc que leur temps d'apparition en culture est long) et que leur sensibilité à l'érythropoïétine (Epo) est moindre. Les BFU-E primitives (les plus immatures) ne sont pas entièrement déterminées vers la lignée érythroblastique, les colonies formées comprenant souvent des mégacaryocytes. Ces BFU-E primitives semblent donc correspondre à un stade proche du MEP. Les BFU-E "matures" forment des colonies plus petites et uniquement composées de cellules de la lignée érythrocytaire, après 5 à 7 jours de culture.

4.3 Régulation de la différenciation érythroïde.

La encore, il est évident qu'une multitude de signaux différents, interprétés par de nombreux récepteurs, et intégrés par beaucoup de facteurs de transcriptions, interviennent au cours du développement érythroïde. Je vais donc ne décrire que les régulateurs essentiels, notamment ceux qui interagissent avec PU.1.

4.3.1 Intégration et coopération des signaux environnementaux.

4.3.1.1 Signalisation par l'érythropoïétine et son récepteur.

L'érythropoïétine (Epo) est le principal facteur de croissance qui régule la production de cellules érythroïdes (bien que de nouvelles fonctions aient été suggérées récemment, notamment dans le système nerveux). La signalisation par son récepteur, EpoR, est donc un élément crucial au cours du développement érythroïde. De plus, comme je le mentionnerai plus tard, les premiers stades de développement des érythroleucémies de Friend sont intimement liés à l'activation de la signalisation EpoR.

La liaison de l'Epo à son récepteur provoque la dimérisation de celui-ci, ce qui induit une autophosphorylation de certains résidus tyrosines et l'activation de la kinase JAK-2. Cette kinase va à son tour phosphoryler de multiples résidus tyrosines dans la partie cytoplasmique de l'EpoR, permettant l'activation de plusieurs voies de signalisation relayées par STAT5, Ras ou la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase) (cf. figure I8). La voie dépendante de STAT5 est principalement impliquée dans la prévention de l'apoptose, via l'induction de l'expression de *bcl-X_L* (Gregory et al., 1999; Silva et al., 1996). Cette propriété antiapoptotique de la signalisation par EpoR est considérée comme la caractéristique principale de cette voie de signalisation, bien qu'il ait été montré plus récemment que *bcl-X_L* possède une également action indépendante d'un effet anti-apoptotique (Hafid-Medheb et al., 2003).

Remarquablement, la génération des précurseurs érythroïdes BFU-E et CFU-E n'est pas dépendante de la signalisation par l'Epo, puisque les souris déficientes pour les gènes codant pour l'EPO ou son récepteur, possèdent ces deux types de précurseurs (Wu et al., 1995b). La signalisation EPO est donc cruciale pour la prolifération et la survie des CFU-E,

permettant ainsi la maturation terminale, mais pas pour l'engagement des progéniteurs multipotents dans la voie érythroïde.

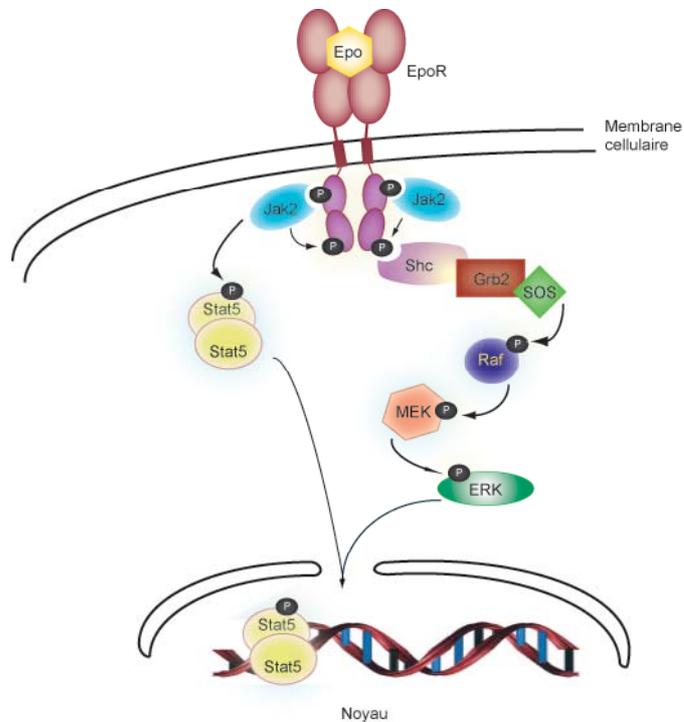


Figure I8: Signalisation par le récepteur à l'érythropoïétine.

Cette figure présente un modèle (simplifié) des voies principales de la signalisation par le récepteur à l'Epo. La liaison de l'Epo à son récepteur induit sa dimérisation, ce qui permet une phosphorylation de certains de ses résidus tyrosines cytoplasmiques. La protéine kinase JAK2 peut reconnaître ces résidus et va phosphoryler à son tour d'autres tyrosines. Cette phosphorylation additionnelle permet le recrutement de protéines adaptatrices telles que Shc, Grb2 et SOS. Ceci conduit à l'activation de la voie des Map-kinases Raf (voie Raf-MEK-ERK), qui va activer divers facteurs de transcription. Parallèlement, JAK2 peut également activer (via phosphorylation) le facteur STAT-5 qui est considéré comme le médiateur principal du signal donné par l'Epo.

4.3.1.2 Signalisation par SCF / c-Kit, et le récepteur des glucocorticoïdes: coopération avec la signalisation Epo.

L'importance du SCF ("stem cell factor") et de son récepteur (c-Kit) dans le système hématopoïétique a été initialement révélée, aussi bien chez la souris que chez l'homme, par l'étude des anémies liées à des mutations dans les locus "*dominant-white-spotting*" (W) et "*steel*" (Sl). Le locus W correspond au récepteur à tyrosine kinase c-Kit, alors que le locus Sl

correspond à son ligand, le "stem factor" ou "stem cell factor" (SCF). De façon générale, la signalisation par c-Kit est associée à une induction de la prolifération. Une des déficiences associées à ces mutations correspond à une diminution importante du nombre de progéniteurs érythroïdes (CFU-E), révélant l'importance de la signalisation c-Kit dans l'érythropoïèse (Nocka et al., 1989).

La coopération entre les signalisations par c-Kit et EpoR a été suggérée par l'observation que ces 2 récepteurs sont étroitement associés sur la membrane de cellules érythroleucémiques (Wu et al., 1995a). Ces deux récepteurs peuvent d'ailleurs activer des voies de signalisation identiques, particulièrement la voie des MAP kinases Erk, mais également la PI-3' kinase. En outre, la signalisation par c-Kit induit une phosphorylation de l'EpoR, montrant qu'au moins un type de signal de prolifération induit par c-Kit implique l'EpoR en tant que cible. Ces études ont montré que la coopération entre la signalisation c-Kit et EpoR est essentielle pour la formation et la prolifération de colonies érythroïdes du type CFU-E (Wu et al., 1997a).

Parallèlement, des études sur le modèle érythroïde aviaire ont permis de confirmer la collaboration entre c-Kit et EpoR, de plus, ces études ont également révélé un rôle important pour le récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans les précurseurs érythroïdes. Ces travaux ont été initiés par l'observation que les oncogènes aviaires v-ErbA et v-ErbB exerçaient leur activité oncogénique par l'intermédiaire d'un mécanisme présent dans les précurseurs érythroïdes normaux (Wessely et al., 1997a; Wessely et al., 1997b). En effet, les précurseurs érythroïdes aviaires expriment des récepteurs homologues à ces oncogènes viraux (récepteur aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes pour v-ErbA et EGFR et c-Kit pour v-ErbB). Par la suite, il a été démontré que la signalisation induite par c-Kit et GR coopère avec les signaux dérivés du récepteur à l'Epo, permettant une prolifération efficace et soutenue des précurseurs érythroïdes, ceci dans un modèle aviaire (Wessely et al., 1999), ainsi que mammifère (von Lindern et al., 2001; von Lindern et al., 1999). Ce mécanisme est particulièrement évident dans le cadre d'une érythropoïèse de stress, où le système doit rapidement générer de grandes quantités d'érythrocytes (Bauer et al., 1999). Ces études ont permis de développer un système de culture permettant d'amplifier les précurseurs érythroïdes primaires (Dolznic et al., 2001). Ce système m'a été particulièrement utile pour démontrer le rôle de PU.1 dans l'érythropoïèse.

4.3.2 Facteurs de transcriptions et contrôle de l'érythropoïèse.

Le facteur de transcription SCL/TAL-1 ("stem cell leukemia / T cell acute leukemia") a d'abord été caractérisé pour sa fonction dans les étapes précoces de l'hématopoïèse, notamment dans la génération des HSC (Robb et al., 1996; Robb et al., 1995; Shivdasani et al., 1995). Outre ces rôles, SCL est également un régulateur critique dans le compartiment érythroïde. L'expression de SCL est effectivement réduite suivant la différenciation hématopoïétique, à l'exception du lignage érythroïde (Begley et al., 1989; Green et al., 1992; Green et al., 1991). De plus, la surexpression de SCL dans des lignées cellulaires ainsi que des cellules hématopoïétiques primaires, favorise la différenciation érythroïde aux dépens des autres voies (Elwood et al., 1998; Hoang et al., 1996; Valtieri et al., 1998). Finalement, les études utilisant l'inactivation conditionnelle de SCL ont montré que le compartiment érythroïde (érythrocytaire + mégacaryocytaire) est sélectivement altéré dans des souris adultes dans lesquelles SCL a été inactivé (Hall et al., 2003; Mikkola et al., 2003). Il est intéressant de remarquer que c-Kit est un gène cible de SCL (Krosil et al., 1998; Lecuyer et al., 2002), et que la signalisation par l'Epo induit la transcription et la phosphorylation de SCL (Prasad et al., 1995).

LMO2 joue également un rôle central dans les étapes précoces de l'hématopoïèse, notamment en interagissant avec SCL (Yamada et al., 1998b). Le facteur Ldb1 a été identifié comme un partenaire pour de multiples facteurs de transcription de la famille à domaine Lim, dont fait partie LMO2. Sans surprise, Visvader *et al.* ont pu montrer que Ldb1 et LMO2 peuvent en effet interagir physiquement dans des cellules érythroïdes (Visvader et al., 1997). De plus, cette étude, utilisant la surexpression de ces 2 facteurs suggère que LMO2 et son partenaire Ldb1 sont des régulateurs négatifs de la différenciation érythroïde. En outre, ces deux facteurs participent à la constitution d'un complexe protéique impliquant d'autres facteurs comme GATA-1, E2A et SCL (cf. § notion "d'érythroïsome").

GATA-1 est considéré comme le facteur de transcription central dans la régulation de l'érythropoïèse. Son expression est principalement restreinte au lignage érythroïde et dans le compartiment progéniteur (il est aussi exprimé dans les mastocytes et éosinophiles). GATA-1 est essentiel au développement érythroïde. Les souris déficientes pour GATA-1 meurent vers le stade E10,5-11,5 d'anémie sévère car la maturation érythroïde est bloquée au stade

proérythroblaste (Fujiwara et al., 1996; Pevny et al., 1991). De façon similaire, les expériences sur cellules embryonnaires démontrent que les progéniteurs déficient pour GATA-1 sont bloqués au stade proérythroblaste et meurent par apoptose (Pevny et al., 1995; Simon et al., 1992; Weiss and Orkin, 1995). Parallèlement, des expériences de surexpression de GATA-1 dans des progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes (CMP, GMP et CLP) ont révélé que GATA-1 peut induire l'engagement vers la voie érythroïde, en réprimant les autres destins possibles (Iwasaki et al., 2003; Kulesa et al., 1995; Visvader et al., 1992). Comme mentionné plus haut, et comme je le répreciserai plus tard, GATA-1 peut interagir avec plusieurs autres facteurs érythroïdes, dont EKLF, LMO2, et bien sur PU.1. L'antagonisme fonctionnel entre PU.1 et GATA-1 a été bien étudié, j'y reviendrai plus en détail dans la partie consacrée à PU.1.

GATA-2 possède une expression distincte de GATA-1, puisque ce facteur est exprimé essentiellement dans les cellules immatures et réprimé lors de la différenciation érythroïde (Labbaye et al., 1995; Orlic et al., 1995; Tsai and Orkin, 1997). Les progéniteurs multipotents générés à partir de cellules embryonnaires GATA-2^{-/-} présentent une grave altération de leur capacité à proliférer et une mort par apoptose accrue (Tsai et al., 1994). Inversement, la surexpression de GATA-2 dans des précurseurs érythroïdes conduit à un blocage de la différenciation et à une prolifération accentuée (Briegel et al., 1993; Heyworth et al., 1999; Persons et al., 1999a). Il est donc important que l'expression de GATA-2 soit réprimée pour permettre la maturation érythroïde. En accord avec cette idée, une étude a montré que GATA-1 peut réprimer la transcription de GATA-2 (Grass et al., 2003).

La protéine du rétinoblastome (Rb) joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et de la différenciation. Récemment, il a été démontré que les progéniteurs érythroïdes déficient pour Rb présentent des altérations importantes dans la régulation de leur cycle cellulaire et leur capacité à se différencier est significativement compromise, ceci *in vitro* et *in vivo* (Clark et al., 2004; Condorelli et al., 1995; Spike et al., 2004). De plus, Rb peut interagir avec d'autres facteurs érythroïdes comme LMO2, Ldb1, SCL ainsi que PU.1 (Cf § notion d'érythroïsome et partie PU.1), indiquant que cette protéine peut être considérée comme un facteur central dans le contrôle de la balance entre prolifération et différenciation au niveau des précurseurs érythroïdes.

Le facteur CBP/P300 ("CREB-binding protein"), exprimé de façon ubiquitaire, possède une activité acétyltransférase et peut interagir avec une multitudes de protéines. Dans le compartiment érythroïde, CBP peut interagir avec et acétyler GATA-1 (Blobel et al., 1998; Boyes et al., 1998; Hung et al., 1999). Cette interaction augmente sensiblement l'activité transactivationnelle de GATA-1 *in vitro* et semble importante, puisque la mutation des résidus acétylés altère sévèrement la capacité de GATA-1 à restaurer la différenciation érythroïde dans une lignée cellulaire GATA-1^{-/-}. En outre, Il a été suggéré que PU.1 pouvait interférer avec l'activité acétyltransférase de CBP, je rappellerai cette caractéristique dans la partie dédiée à PU.1.

4.3.3 Notion "d'érythroïsome".

J'ai abordé, de façon rapide, dans les différents paragraphes précédents la notion d'interaction directe entre plusieurs facteurs de transcription dans les cellules érythroïdes. En effet, les fonctions gérées par ces différents acteurs ne peuvent pas toutes s'expliquer par une action autonome de l'un ou l'autre. Ainsi, beaucoup de promoteurs de gènes régulés par GATA-1 possèdent également des séquences de fixation pour d'autres facteurs, notamment des "E-box" qui peuvent lier des hétérodimères SCL/E2A. De plus, la transactivation de ces gènes cibles de GATA-1 est grandement augmentée si ce motif "E-box" est présent, suggérant que la coopération entre GATA-1 et d'autres facteurs est importante. L'interaction et la coopération fonctionnelle entre SCL et LMO2 a été décrite depuis 10 ans maintenant (Valge-Archer et al., 1994; Wadman et al., 1994). Par la suite il a été suggéré que le complexe LMO2/Ldb1 fonctionne en tant que pont moléculaire entre le dimère SCL/E2A fixé sur un motif "E-box" et GATA-1, fixé sur sa séquence cible (Osada et al., 1997; Wadman et al., 1997). De façon cohérente, il a été montré récemment que l'activation du locus globine est véhiculée par les facteurs GATA-1 ou GATA-2 selon le stade de différenciation, via leur capacité à recruter les facteurs SCL, E2A et Ldb-1 notamment (Anguita et al., 2004). En outre, l'existence d'un complexe similaire incluant la protéine du rétinoblastome (Rb), en plus de LMO2, Ldb1 SCL et E2A (E12) a été documenté (Vitelli et al., 2000). De façon intéressante, Rb potentialise efficacement l'activité transcriptionnelle du complexe SCL/E12/Ldb1/LMO2, *in vitro*. Cependant, ce complexe possède également une activité de répression de l'expression de c-kit (un gène cible de SCL), qui a été montré à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cette activité est également potentialisée par Rb.

Toutes ces études convergent vers la notion que le contrôle transcriptionnel de l'érythropoïèse n'est pas effectué indépendamment par divers facteurs, mais par des complexes multiprotéiques (cf. figure I9). On peut raisonnablement penser que ces complexes sont dynamiques, et que leur composition – et donc leur effet - varie au cours du développement érythroïde. Par exemple, SCL/TAL1 peut avoir des effets opposés sur la transcription de c-Kit, activant son expression à des stades immatures (Krosi et al., 1998) mais réprimant sa transcription dans les précurseurs érythroïdes (Vitelli et al., 2000). Ces caractéristiques opposées reflètent un contexte cellulaire distinct, où SCL est incorporé dans des complexes différents. Il est évidemment intéressant de remarquer que PU.1 est capable d'interagir avec certains membres de cet "érythroïsme" (ie. GATA-1 et Rb). Il sera utile de rappeler cette caractéristique lors de la partie PU.1 et lors de la discussion du rôle de PU.1 dans le compartiment érythroïde.

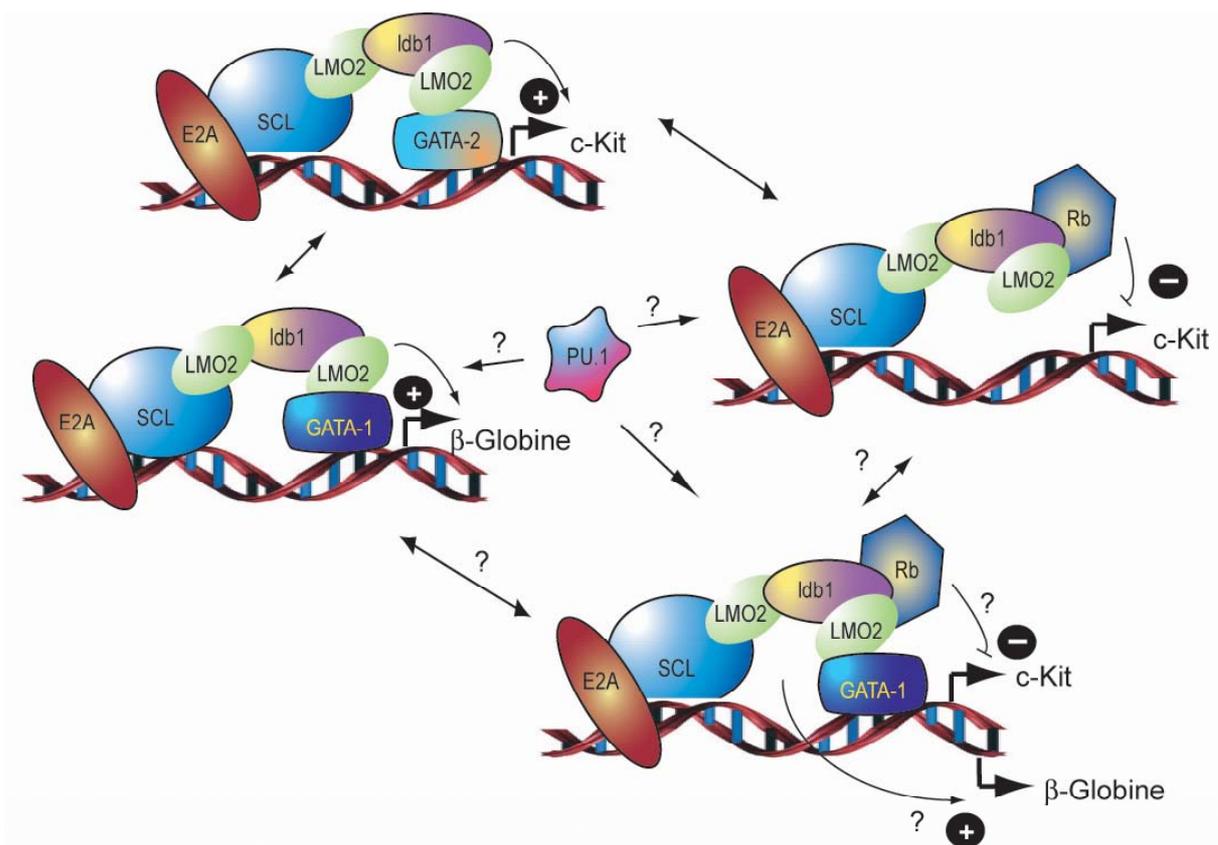


Figure I9: Complexes transcriptionnels présents ou possibles dans les cellules érythroïdes.

Les facteurs érythroïdes participant à ces complexes ne possèdent pas tous une capacité de liaison à l'ADN. SCL/Tal-1, GATA-2 et GATA-1 peuvent se lier sur des séquences cibles. De nombreux gènes exprimés durant la différenciation érythroïde possèdent dans leur promoteur des séquences de liaison

pour SCL et GATA. SCL, peut induire l'expression de c-Kit dans des cellules immatures, peut être via une interaction avec GATA-2 (Anguita et al., 2004), Ldb-1, E2A et LMO2. Lorsque GATA-1 prend part à ce complexe (à la place de GATA-2) la transcription de gènes spécifiques de la différenciation érythroïde est autorisée. Parallèlement, les gènes caractéristiques d'un état immature, comme c-Kit, sont réprimés par l'intégration de Rb dans ce complexe.

4.4 Les érythroleucémies murines aiguës de Friend.

Les érythroleucémies murines de Friend sont utilisées depuis 50 ans maintenant comme un modèle d'étude de progression tumorale. Ces études ont permis de faire d'importants progrès dans la compréhension de la mise en place séquentielle d'un processus oncogénique et ont apporté de nombreuses informations sur le mécanisme de signalisation par le récepteur à l'érythropoïétine. Les érythroleucémies de Friend sont induites par un complexe rétroviral. Ce complexe se compose de deux rétrovirus, le SFFV ("spleen focus forming virus" incapable de se répliquer), ainsi que le virus auxiliaire F-MuLV ("Friend-murine leukemia virus"). Il existe 2 souches naturelles de SFFV (Tambourin et al., 1973), qui induisent des symptômes différents, la souche SFFVp (pour "polycythemia") et la souche SFFVa (pour "anemia"). Les souris infectées avec le complexe F-MuLV + SFFVp développent une polycythémie et les cellules érythroïdes de la rate peuvent proliférer et se différencier en absence d'Epo. Les souris infectées par l'autre souche (F-MuLV + SFFVa) ne présentent pas de réelle anémie puisque le nombre absolu d'érythrocyte est augmenté, mais leur hématoците est réduite dû à une augmentation du volume plasmatique. Par contre, les précurseurs érythroïdes infectés avec le SFFVa sont incapables de se différencier sans signalisation par l'Epo.

4.4.1 Phase polyclonale: subversion de la signalisation par l'EpoR.

Les différentes étapes de la progression de cette pathologie sont maintenant assez bien comprises (cf. (Ruscetti, 1999) pour revue). C'est la souche SFFVp qui a été la plus étudiée, les mécanismes que je vais décrire ont donc été révélés grâce à cette souche.

La première phase, suivant l'infection d'une souris sensible au virus de Friend, se traduit par une expansion polyclonale d'érythroblastes dans la rate. Ces cellules ne sont

toutefois pas encore transformées et conservent la capacité de se différencier. Singulièrement, le virus de Friend ne code pour aucun oncogène, à la différence de la plupart des rétrovirus oncogéniques. L'induction de la prolifération des précurseurs érythroïdes est causée par l'activation constitutive du récepteur à l'Epo, par l'intermédiaire d'une protéine virale du SFFV, la Gp55. C'est l'interaction Gp55-EpoR qui stabilise l'EpoR sous forme active (dimérique) et induit une signalisation constitutive dans les érythroblastes infectés.

Il est à noter que l'analyse génétique des souris résistantes au virus de Friend a permis d'identifier le gène *Ron* qui code pour le récepteur à tyrosine kinase Stk, comme un élément essentiel au développement de cette pathologie (Persons et al., 1999b). Les souches de souris sensibles expriment, en plus de la forme normale, une version tronquée du récepteur Stk (SF-Stk pour "short form of Stk", qui ne possède que les domaines transmembranaires et cytoplasmiques). Le mécanisme sous-jacent à cette sensibilité, implique une interaction physique entre la GP-55 et SF-Stk, ce qui a pour effet d'induire une signalisation par SF-Stk (Nishigaki et al., 2001). Cette étude montre également qu'il existe une interaction entre SF-Stk et EpoR. Ainsi, un complexe GP-55/EpoR/SF-Stk peut se former dans les cellules érythroïdes sensibles au SFFV, permettant une signalisation et une prolifération indépendante de l'Epo. Récemment, une étude a confirmé que Stk fonctionne effectivement en aval du récepteur à l'Epo, et induit une prolifération des précurseurs érythroïdes (van den Akker et al., 2004).

4.4.2 Évènements génétiques ultérieurs, liés à la transformation érythroleucémique.

Après la phase d'expansion polyclonale, qui dure plusieurs semaines, l'étape suivante voit se développer des cellules érythroleucémiques totalement transformées, ayant la capacité de former des lignées clonales stables *in vitro* (ex les cellules MEL), et d'induire des tumeurs *in vivo* lorsqu'elles sont transférées dans des souris hôtes. Des événements génétiques récurrents accompagnent cette étape. Ainsi, près de 95% des clones érythroleucémiques qui émergent présentent une insertion du SFFV en amont du locus codant pour PU.1, impliquant un rôle déterminant pour PU.1 dans ce processus pathologique. Ce rôle sera détaillé dans la partie dédiée à PU.1.

Le F-MuLV seul est également capable d'induire des érythroleucémies. Dans ce cas, les clones transformés qui émergent présentent de manière récurrente une insertion du F-

MuLV au niveau du locus du gène *Fli-1*. Comme PU.1, Fli-1 appartient, à la famille des facteurs de transcriptions ETS. En accord avec cette implication dans les érythroleucémies, Fli-1 est capable de bloquer la différenciation et l'apoptose ainsi que d'induire la prolifération d'érythroblastes primaires, dans un modèle de culture aviaire (Pereira et al., 1999).

D'autre part, le gène suppresseur de tumeur *p53* est également altéré dans l'écrasante majorité des clones érythroleucémiques émergents, induits par le SFFV ou par le F-MuLV. Deux types d'études, utilisant des souris déficientes pour P53 ont montré que l'inactivation de ce facteur est un événement crucial dans la progression des érythroleucémies. Dans la première étude, les souris $P53^{-/-}$ infectées par le virus de Friend développent une progression accélérée vers le stade leucémique (Prasher et al., 2001). De plus, tous les clones dérivés de souris $P53^{+/-}$ ou $P53^{+/+}$ présentent des altérations du locus *p53*. De façon intéressante, certains clones isolés à partir de souris $P53^{-/-}$ ne présentent pas de surexpression de PU.1 suggérant que l'ordre temporel d'activation de PU.1 et d'inactivation de P53 est important pour la progression de cette pathologie. L'autre étude utilise les souris transgéniques pour PU.1 (PU.1tg), qui développent naturellement des érythroleucémies (Cf. Introduction partie 5.2.1) (Scolan et al., 2001). Dans ce cas aussi, les souris PU.1tg $P53^{-/-}$ progressent beaucoup plus rapidement vers le stade leucémique. Néanmoins, la moitié des clones isolés restent dépendant de l'Epo, suggérant que le processus de tumorigenèse et d'indépendance à l'Epo sont distincts.

La synthèse de l'ensemble de ces études indique que le développement des érythroleucémies de Friend progresse par une séquence d'évènements oncogéniques distincts.

5^{ème} Partie . Le facteur de transcription

PU.1/spi-1.

5.1 Identification et caractérisation du facteur de transcription PU.1/spi-1.

Le gène codant pour le facteur de transcription PU.1 a été caractérisé quasi-simultanément par deux approches. Comme cité dans la partie précédente, le locus *spi-1* a été identifié comme étant un site d'insertion récurrent pour le SFFV, dans les érythroleucémies murine de Friend (Moreau-Gachelin et al., 1989; Moreau-Gachelin et al., 1988). Parallèlement, le criblage d'une banque murine de cDNA de macrophages permis de cloner un nouveau facteur de transcription selon sa capacité à se fixer sur une séquence riche en purines (5'-GGAA-3') contenue dans le promoteur des gènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. Ce facteur était également capable d'induire la transcription de gènes rapporteurs sous contrôle de divers promoteurs myéloïdes (Klemsz et al., 1990). L'analyse de la séquence de ce facteur, baptisé PU.1, a montré qu'il était relié à la famille de protéines transcriptionnelles ETS. Remarquablement, PU.1 est le facteur présentant le plus de divergences avec les autres membres de la famille ETS. Rapidement, il s'est avéré que le facteur de transcription PU.1 correspondait au produit de l'oncogène *spi-1* (Goebel, 1990; Paul et al., 1991). Ces deux approches esquissent les principaux aspects de PU.1 qui ont été étudiés, à savoir, son implication pathologique dans les érythroleucémies de Friend et son rôle dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes.

Le gène *spi-1/pu.1* code pour une protéine de 272 ou 266 acides aminés (selon le codon d'initiation utilisé), composée de plusieurs domaines distincts (cf. figure I10). La partie C-terminale comprend un domaine ETS qui est partagé par de nombreux facteurs de transcription formant la famille ETS. Ce domaine peut lier l'ADN sous forme monomérique (Wasylyk et al., 1992) et inclut un motif de type hélice-boucle-hélice ("winged helix-turn-helix"). Ce domaine ETS est également responsable de l'interaction avec divers partenaires comme les facteurs GATA par exemple. PU.1 possède également un domaine PEST, qui est essentiellement impliqué dans des interactions protéine-protéine (avec Pip "PU.1 interacting partner" notamment) et ne semble pas avoir d'influence sur la stabilité de la protéine (les

domaines PEST ont été originellement identifiés comme des domaines favorisant la dégradation). Enfin, le domaine riche en glutamines ainsi que les résidus acides sont essentiels pour la capacité de transactivation de PU.1, même si dans les cellules hématopoïétiques, il semble que le véritable domaine de transactivation soit le domaine Gln (Shin and Koshland, 1993).

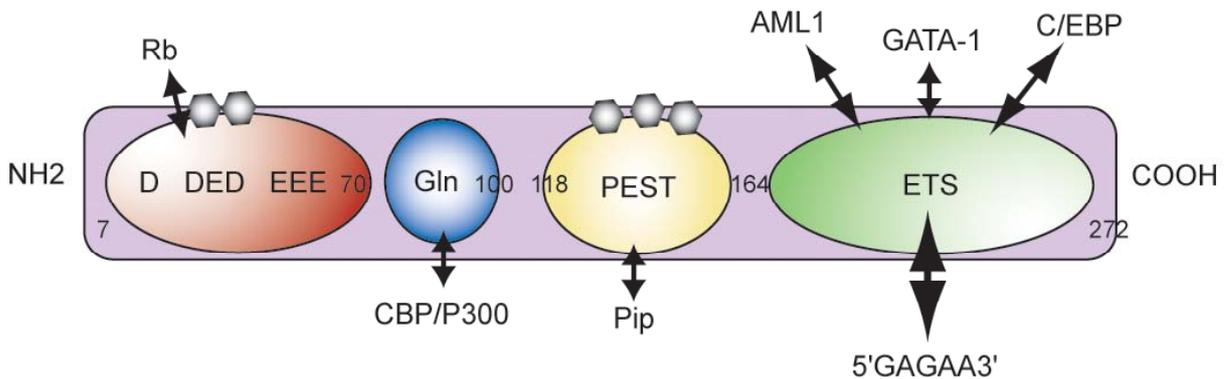


Figure I10: Représentation schématique de la protéine PU.1 et de ses domaines fonctionnels.

La partie N-terminale contient un domaine acide riche en acide aspartique (D) et glutamique (E). Ce domaine possède une activité transactivatrice *in vitro* et dans des cellules non-hématopoïétiques. Le véritable domaine d'activation fonctionnel dans les cellules hématopoïétiques est le domaine riche en glutamines (Gln). Le domaine PEST central possède 4 sites de phosphorylation. Le domaine ETS C-terminal est le domaine de liaison à l'ADN. Les chiffres indiquent les numéros des acides aminés. Les associations physiques avec les autres facteurs de transcription principaux sont indiquées avec des doubles flèches, au niveau de la partie de la protéine PU.1 qui réalise l'interaction.

5.2 PU.1: un oncogène impliqué dans les érythroleucémies de Friend.

5.2.1 La surexpression de PU.1: un évènement clé.

C'est le rôle de PU.1 dans le développement des érythroleucémies de Friend qui a été initialement découvert. En effet, une caractéristique frappante des érythroleucémies de Friend, est que les clones proérythroleucémiques émergents présentent quasiment tous (95%) une insertion du SFFV en amont (10 à 13Kb) du locus *spi-1/PU.1* (Moreau-Gachelin et al., 1989; Moreau-Gachelin et al., 1988). Cette fréquence inhabituelle de ciblage d'un gène unique a immédiatement suggéré que ce gène joue un rôle essentiel dans cette pathologie. L'insertion

du SFFV induit une surexpression de PU.1 par le biais des séquences LTR ("long terminal repeat") du virus qui fonctionnent comme des enhanceurs hétérologues.

La relation entre la surexpression de PU.1 et l'apparition de tumeurs érythroleucémiques a été clairement démontrée. Initialement, une étude a montré que des cellules de moelle osseuse transduites avec un rétrovirus codant pour PU.1, proliféraient indéfiniment et génèrent des clones érythroblastiques immortalisés (Schuetze et al., 1993). Un modèle de souris transgéniques exprimant PU.1 sous contrôle de la région LTR du SFFV a permis de reproduire la plupart des aspects des érythroleucémies de Friend (Moreau-Gachelin et al., 1996), validant la conclusion comme quoi la surexpression de PU.1 est un événement clé dans ce processus pathologique.

Par la suite, des études utilisant des lignées cellulaires dérivées de ces érythroleucémies (cellules MEL pour "Murine erythroleukemia") ont évalué la relation entre la surexpression de PU.1 et le blocage de la différenciation érythroïde. Une caractéristique importante de ces cellules MEL est qu'elles peuvent réintégrer un processus de différenciation, lorsqu'elles sont traitées avec du DMSO (diméthylsulfoxyde) ou du HMBA (hemaméthylène bisacétamide). Cette différenciation induite est accompagnée par une décroissance rapide et spécifique des transcrits et protéines PU.1 (Hensold et al., 1996; Schuetze et al., 1992). De plus, la maintenance de l'expression de PU.1 inhibe cette différenciation induite (Rao et al., 1997), démontrant que la répression de l'expression de PU.1 est requise pour autoriser la différenciation érythroïde finale.

Parallèlement, des études utilisant un modèle de culture d'érythroblastes aviaires ont également évalué l'influence de la surexpression de PU.1 dans des précurseurs érythroïdes primaires. Ces études ont permis de montrer que *spi-1/PU.1* peut inhiber la différenciation et l'apoptose des précurseurs érythroïdes aviaires et promouvoir leur prolifération, mais que ces capacités sont dépendantes des signaux dérivés du récepteur à l'Epo activé et de c-Kit pour la prolifération (Quang et al., 1997). En outre, il a été montré que PU.1 coopère directement avec la Gp-55 dans ces érythroblastes aviaires, pour induire le blocage de la différenciation ainsi que l'inhibition de l'apoptose induite par l'absence d'Epo (Pereira et al., 2000), suggérant que l'établissement du phénotype leucémique implique une synergie entre les événements précoces (interaction Gp-55/EpoR) et tardifs (surexpression de PU.1) des pathologies de Friend. En corrélation avec cette hypothèse, une étude chez la souris a souligné le fait que l'activation du récepteur pour l'Epo par la Gp-55 pouvait, *in vivo*, induire l'expression de PU.1 dans les érythroblastes, et ceci indépendamment de l'insertion du SFFV (Afrikanova et al.,

2002). Collectivement, ces études ont donc montré que PU.1 agit comme un oncogène dans le lignage érythroïde grâce à sa capacité à bloquer la différenciation terminale.

5.2.2 Mécanisme moléculaire du blocage de la différenciation des cellules MEL par PU.1.

Au niveau moléculaire, il semble que PU.1 interfère avec la différenciation érythroïde en interagissant avec d'autres facteurs de transcriptions requis pour induire la maturation érythroïde. En effet, l'expression d'une forme tronquée de PU.1, ne possédant pas le domaine de transactivation, est tout de même capable de bloquer la différenciation de cellules MEL induite par le DMSO (Yamada et al., 1997), alors qu'une forme amputée du domaine ETS (impliqué notamment dans les interactions protéine-protéine) en est incapable. Cette étude suggère que ce n'est pas l'activité transcriptionnelle de PU.1 qui est impliquée dans le blocage de la différenciation érythroïde, mais plutôt sa capacité à interagir avec d'autres facteurs.

5.2.2.1 Interaction et antagonisme fonctionnel avec GATA-1.

Un antagonisme fonctionnel entre PU.1 et le facteur érythroïde GATA-1 a été clairement mis en évidence par plusieurs études. C'est l'équipe d'Arthur Skoultschi qui a initialement révélé l'interaction physique entre GATA-1 et PU.1, via leurs domaines respectifs de liaison à l'ADN ceci *in vitro* et *in vivo* (Rekhtman et al., 1999). Cette étude a montré que PU.1 peut effectivement réprimer l'activité transcriptionnelle de GATA-1. De plus, la surexpression de GATA-1 dans les cellules MEL surpasse le blocage de la différenciation induit par PU.1, suggérant fortement que le ratio PU.1/GATA-1 est important pour réguler le destin des précurseurs érythroïdes (Choe et al., 2003; Rekhtman et al., 1999). Parallèlement, il a été montré que GATA-1 pouvait également inhiber la fonction transactivatrice de PU.1 pour des gènes cibles myéloïdes, notamment en entrant en compétition avec c-Jun un coactivateur important des gènes myéloïdes (Zhang et al., 1999). Par la suite, il a été proposé que PU.1 interfère directement avec la liaison à l'ADN de GATA-1, expliquant ainsi le blocage de la différenciation (Yamada et al., 1998a; Zhang et al., 2000). Cependant, d'autres études semblent infirmer cette hypothèse car la liaison de GATA-1 à des séquences cibles ne semble pas être diminuée dans des cellules surexprimant PU.1 que ce soit en expérience de gel retard,

par empreinte d'ADN ("DNA footprint") ou par immunoprécipitation de chromatine (Crossley et al., 1995; Hong et al., 2002; Reddy and Shen, 1993; Yamamoto et al., 1997).

Enfin, récemment, une autre étude a suggéré que l'inhibition de GATA-1 par PU.1 pouvait être médiée en partie par la protéine du rétinoblastome (Rekhtman et al., 2003). Cette étude suggère notamment que PU.1 peut se lier à GATA-1 directement sur l'ADN et ainsi, via son interaction avec Rb apporter un répresseur de la transcription au niveau du complexe transcriptionnel. Ce modèle ne fait pas intervenir la fonction de régulateur positif de l'érythropoïèse de Rb qui a été mise en évidence récemment (cf. Introduction partie 4.3.2), mais est en accord avec les observations indiquant que PU.1 n'affecte pas la liaison à l'ADN de GATA-1.

5.2.2.2 Interaction avec CBP/P300.

Comme je l'ai décrit dans la partie précédente, GATA-1 peut être acétylé par CBP/P300, et cette activation est censée augmenter son activité transcriptionnelle (cf. Introduction partie 4.3.2). Or il a été montré que PU.1 pouvait interagir avec CBP (Yamamoto et al., 1999) et par ce biais, inhiber l'acétylation de GATA-1 dans des cellules MEL (Hong et al., 2002). En outre, PU.1 prévient également l'accroissement de l'acétylation du locus de la β -globine qui accompagne la différenciation terminale. Ce mécanisme, en plus de l'interaction directe avec GATA-1 pourrait donc contribuer à l'effet d'inhibiteur de la différenciation érythroïde de PU.1.

La synthèse de l'ensemble des données sur l'implication pathologique de PU.1 dans le développement des érythroleucémies de Friend aboutit à la conclusion que PU.1 agit dans les précurseurs érythroïdes comme un oncogène, probablement en bloquant la fonction de facteurs importants pour l'érythropoïèse. La question cruciale apportée par ces études est de savoir si cette fonction pathologique est reliée à une fonction physiologique durant un processus érythropoïétique normal.

5.3 Expression, gènes cibles et régulation de PU.1.

5.3.1 L'expression de PU.1 est restreinte au système hématopoïétique.

Une des caractéristiques les plus intéressantes de PU.1 est que son expression est quasi-exclusivement restreinte au système hématopoïétique (PU.1 étant également exprimé dans les testicules, mais sans fonction associée pour l'instant), comme l'ont présenté les premières études à propos de son expression (Hromas et al., 1993; Klemsz et al., 1990). Par la suite, d'autres études ont précisé que dans le système hématopoïétique, PU.1 est exprimé essentiellement dans les cellules lymphoïdes B ainsi que dans les cellules myéloïdes matures (Chen et al., 1995b; Klemsz et al., 1990). Par contre PU.1 est totalement absent des cellules érythroïdes matures (TER-119⁺) ainsi que des lymphocytes T matures.

Les cellules du compartiment précurseur étant plus difficiles à identifier et à isoler, l'expression de PU.1 est moins bien caractérisée dans ces cellules. Durant la différenciation lymphoïde T, PU.1 semble faiblement exprimé, mais uniquement durant les stades les plus précoces (Anderson et al., 1999b). Dans les précurseurs érythroïdes, il n'existe que peu de données suggérant l'expression de PU.1. L'étude générale par Hromas *et al.*, qui utilise la détection d'ARNm par immunohistologie a documenté une expression faible de PU.1 dans des cellules ayant une morphologie comparable aux érythroblastes (Hromas et al., 1993). Akashi *et al.* ont détecté, par RT-PCR une expression de transcrits PU.1 dans les progéniteurs MEP (Akashi et al., 2000). Il n'existait donc pas d'évidence précise de l'expression de PU.1 dans les précurseurs érythroïdes avant mon étude. L'expression de PU.1 (au niveau transcriptionnel) dans les progéniteurs multipotents CMP et CLP a été documenté également (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997). Pour ce qui est des cellules souches, une étude a montré que ces cellules co-expriment un grand nombre de gènes normalement restreints aux stades différenciés, dont PU.1 (Hu et al., 1997). Cette expression a été qualifiée d'expression de pré-engagement ("pre-commitment"). En résumé, même si PU.1 est essentiellement exprimé dans les cellules matures myéloïdes et lymphoïdes B, ce facteur est également présent dans le compartiment précurseur, même si cette expression n'est pas détaillée précisément, ni reliée avec une fonction spécifique pour l'instant.

5.3.2 Gènes cibles et mécanismes d'activation de la transcription par PU.1.

L'essentiel des gènes cibles identifiés de PU.1 sont des gènes actifs dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes B. Le tableau 1 présente, selon le lignage considéré, une liste non exhaustive des gènes cibles de PU.1 ainsi que les facteurs qui collaborent avec PU.1 pour l'expression de ces gènes. En résumé, dans les cellules myéloïdes, PU.1 contrôle l'expression de nombreux composants enzymatiques des granules des neutrophiles et macrophages (macrosialine, myéloperoxydase, gp91^{phox}), en plus de l'expression des récepteurs pour le G-CSF, CM-CSF et M-CSF, suggérant que PU.1 est impliqué dans la différenciation ainsi que dans la fonction des cellules myéloïdes. Dans les cellules lymphoïdes B, de nombreux gènes d'immunoglobulines sont contrôlés par PU.1. En outre, dans les lymphocytes B et les cellules myéloïdes, PU.1 est capable de se lier à son propre promoteur et d'induire son expression, créant ainsi une boucle d'autorégulation positive (Chen et al., 1995a; Chen et al., 1996). Dans le compartiment érythroïde, le promoteur de la β -globine possède une séquence capable de lier PU.1, mais il n'a jamais été prouvé que PU.1 régule l'expression de ce gène (Galson et al., 1993). Pour l'instant, aucun élément de réponse à PU.1 n'a été clairement identifié dans les régions régulatrices de gènes spécifiques érythroïdes.

De façon intéressante, PU.1 contrôle l'expression des gènes myéloïdes en se fixant essentiellement sur des séquences présentes dans le promoteur, alors que les éléments de réponses à PU.1 des gènes lymphoïdes B sont situés essentiellement dans des régions distales de type "enhancers". De plus, le domaine riche en glutamines, qui semble constituer le domaine principal de transactivation (Shin and Koshland, 1993) est essentiel pour le développement des macrophages, alors qu'il est dispensable pour le développement lymphoïde (Pongubala and Atchison, 1997). PU.1 semble donc agir comme un transactivateur direct au cours du développement myéloïde, mais plutôt comme un élément purement architectural au niveau des promoteurs des gènes d'immunoglobulines.

	Gènes cible	Facteurs collaborateurs connus
Gènes myéloïdes	CD11b	Sp1 AP-2 Ets
	CD18	GABP Sp1
	<i>cfms</i> (M-CSFR)	C/EBP α AML-1
	G-CSFR	C/EBP α
	GM-CSFR	C/EBP α
	Scavenger receptors	Jun Ets
	Fc γ RIIIA	HLH factors TF3 and USF
	Macrosialine	Jun
	c-fes	Sp1
	myeloperoxidase	C/EBP α C/EBP β C/EBP δ
	gp91 ^{phox}	irf-1 Elf-1
	SCL/Tal-1	Elf-1 Sp1 Sp3
	PU.1	Sp1 C/EBP α
Gènes lymphoïdes	CD20	Oct2 Pip
	Btk	Sp1
	Ig κ	Oct2 Pip c-fos/Jun
	Ig λ	Pip
	IgH	ETS-1 TFE3
	Ig J-chain	SpiB (?)
	MHC class II I-A β	NF-YA NF-YB
	PU.1	Oct2 Sp1

Tableau 1: Gènes cibles de PU.1 et facteurs collaborateurs.

Les facteurs Sp1 et Jun sont des collaborateurs pour la régulation de nombreux gènes aussi bien dans les cellules myéloïdes que lymphoïdes. Les facteurs qui synergisent avec PU.1 pour l'expression de gènes cibles dans les cellules myéloïdes sont notamment les membres de la famille C/EBP. Dans les cellules lymphoïdes, Pip (PU.1 interacting partner) et le facteur Oct2 contribuent à la régulation de nombreux gènes avec PU.1.

5.3.3 Régulation de l'expression de PU.1.

Les études initiales utilisant la technique de transfection transitoire de vecteurs rapporteurs avaient identifié une région régulatrice dans le promoteur de PU.1. Cette région contient des sites de fixation pour le facteur Sp1, des séquences de type octamères qui peuvent lier des facteurs Oct, ainsi qu'un site de fixation pour PU.1 (site ETS) (Chen et al., 1995a; Chen et al., 1996). Ces études ont montré que l'expression myéloïde de PU.1 était induite notamment par la coopération entre Sp1 et PU.1. Dans les lymphocytes B, le site octamère ainsi que le site ETS sont importants pour conduire l'expression de PU.1. Dans les

cellules myéloïdes, le facteur C/EBP α est également un régulateur positif de l'expression de PU.1 (Wang et al., 1999).

Par la suite, le groupe de Daniel Tenen a identifié un fragment génomique de 91 Kb qui s'étend de part et d'autre du locus PU.1 et qui confère toutes les caractéristiques de spécificité de l'expression de PU.1 à un transgène rapporteur (Li et al., 2001). Plus précisément, dans ce fragment génomique, 14 Kb en amont du site d'initiation de la transcription, se trouve une région conférant la spécificité myéloïde. La destruction de cette région conduit à une réduction de 80% de l'expression de PU.1 dans les cellules myéloïdes (Rosenbauer et al., 2004). Cette réduction a des conséquences importantes sur la différenciation myéloïde (Cf. Discussion partie 2.1).

5.4 Régulation du développement hématopoïétique par PU.1.

Toutes ces données sur la répartition de l'expression de PU.1, la façon dont cette expression est régulée, ainsi que ses gènes cibles, indiquent que PU.1 joue certainement un rôle crucial dans plusieurs voies de développement hématopoïétiques. Ces divers rôles ont été investigués en analysant l'hématopoïèse de souris déficientes pour PU.1, puis en utilisant les cellules PU.1^{-/-} de ces souris comme outil afin de préciser la fonction de PU.1.

5.4.1 Conclusions apportées par l'étude des souris inactivées pour PU.1.

Deux stratégies d'inactivation par recombinaison homologue, du gène codant pour PU.1 ont été initialement mises en œuvre. Ces deux stratégies ont ciblé le domaine de liaison à l'ADN (codé par l'exon 5) et ont généré des mutations nulles du locus PU.1 (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994).

Les souris générées par Scott *et al.* meurent in utero autour du stade E17, alors que la mutation de McKercher *et al.* permet la naissance de souris PU.1^{-/-}, qui meurent en 48h si elles ne subissent pas de traitement antibiotique. Sous antibiothérapie, ces nouveau-nés survivent durant 15 jours environs. Cette disparité n'est pas expliquée, mais pourrait provenir

de la stratégie de recombinaison homologue. Les souris de scott *et al.* sont clairement dépourvues de toute expression d'une protéine PU.1 et peuvent donc être considérée comme des mutants nuls. McKercher *et al.* ont proclamé une absence d'activité de liaison à l'ADN de PU.1 dans leurs souris PU.1^{-/-}. Cependant la possibilité d'une expression résiduelle d'une protéine PU.1 tronquée n'est pas exclue. La figure I11 résume les altérations présentes dans les souris PU.1^{-/-}

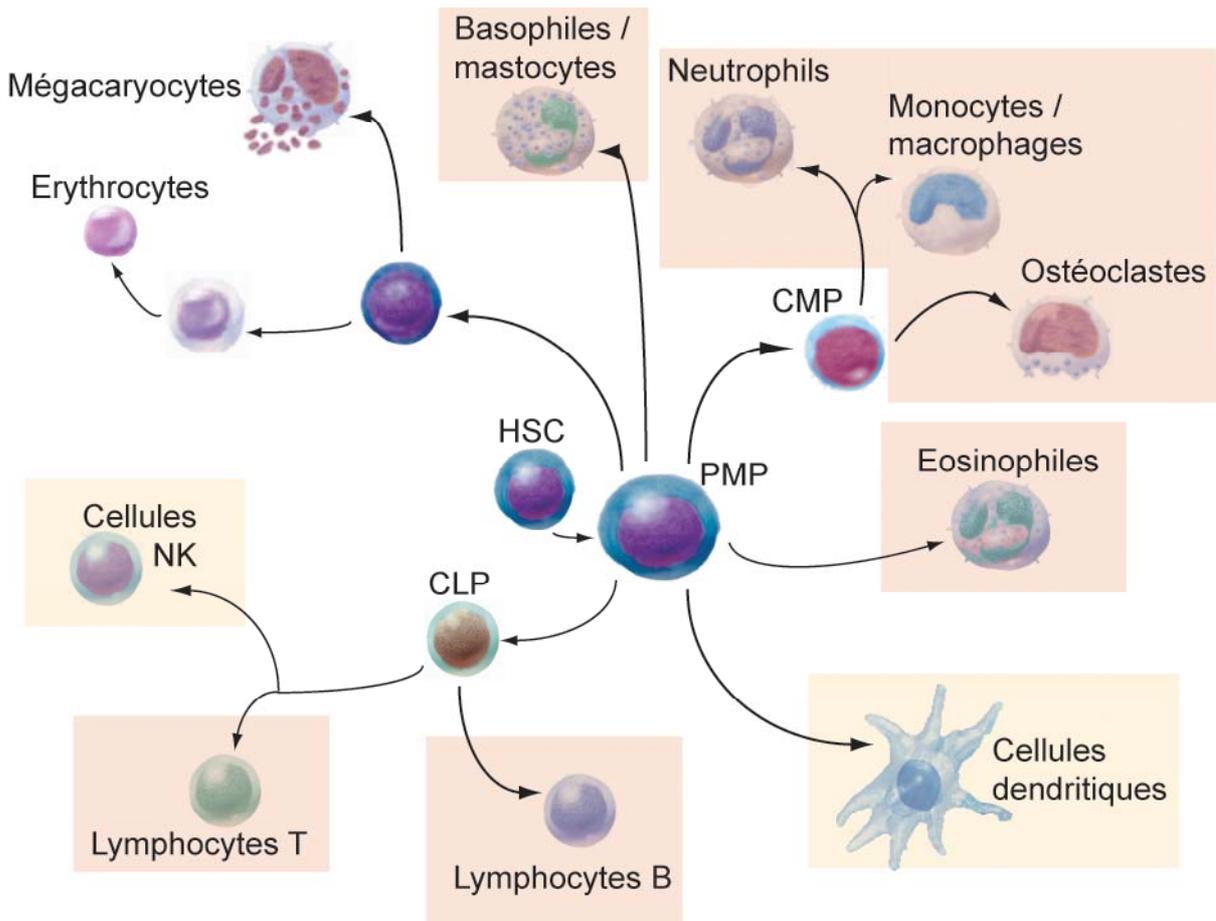


Figure I11: représentation schématique des altérations présentes chez les souris PU.1^{-/-}.

Les compartiments myéloïdes et lymphoïdes, sévèrement altérés, sont représentés en rose. La génération des cellules NK n'est que faiblement compromise et est donc représentée en jaune. Des données contradictoires ont été rapportées pour la génération des cellules dendritiques dans les mutants PU.1, c'est pourquoi ce compartiment est aussi représenté comme faiblement altéré. Les progéniteurs communs myéloïdes (CMP) et lymphoïdes (CLP) ne sont pas inclus dans les zones colorées car aucune donnée ne précise leur présence ou absence dans les mutants PU.1. HCS: cellule souche hématopoïétique; PMP: progéniteur multipotent.

5.4.1.1 La différenciation myéloïde et lymphoïde est bloquée en absence de PU.1.

L'étude du foie fœtal des embryons PU.1^{-/-} montre que la différenciation myéloïde est bloquée à un stade relativement immature. Aucune cellule GR-1⁺ Mac1⁺ (CD11b) n'est détectée. Même si quelques cellules Gr-1⁺ se développent après la naissance dans les souris de McKercher *et al.*, la différenciation granulocytaire reste anormale, et ces cellules ne présentent aucune activité phagocytaire. De plus, le nombre de précurseurs myéloïdes est drastiquement réduit. De manière similaire, aucune cellule lymphoïde B (exprimant B220) n'est détectée dans les mutant de Scott *et al.* et aucun précurseur de type pro-B, capable de répondre à l'IL7 n'est présent dans le foie fœtal. Les souris PU.1^{-/-} de McKercher *et al.* présentent une production de cellules B220⁺, mais celles-ci expriment de façon non coordonnée les autres marqueurs lymphoïdes B et ne réarrangent jamais leur locus immunoglobuline, confirmant que la différenciation B est sévèrement altérée dès un stade très précoce.

Des études ultérieures ont montré que des cellules ES PU.1^{-/-} ne contribuent pas aux compartiments myéloïdes et lymphoïdes de souris chimériques, à l'instar de cellules de foie fœtal PU.1^{-/-} transférées dans des souris irradiées, démontrant que ce défaut est bien intrinsèque aux cellules PU.1^{-/-} (Olson *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1997). Enfin, des systèmes de culture en milieu semi solide ont montré que les précurseurs PU.1^{-/-} ne répondent pas aux cytokines G-CSF, GM-CSF et M-CSF, à cause de leur très faible expression des récepteurs correspondants. Néanmoins, ces précurseurs peuvent répondre au cocktail de cytokines IL3+IL6+SCF et forment des colonies qui toutefois restent bloquées dans la différenciation myéloïde au stade myéloblastique. La réexpression des récepteurs pour le G-CSF ou le M-CSF dans ces précurseurs PU.1^{-/-} autorise leur prolifération et leur survie en réponse aux cytokines correspondantes, mais ne permet pas leur différenciation (Anderson *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 1999a; DeKoter *et al.*, 1998). Ces données démontrent que PU.1 possède un rôle crucial lors de la différenciation myéloïde, en plus du contrôle de l'expression des récepteurs de cytokines myéloïdes.

Le développement des lymphocytes T est également sévèrement altéré par la mutation de PU.1. Cette observation n'était pas aussi prévisible que le blocage myéloïde et lymphoïde B, puisque PU.1 n'est pas exprimé dans la grande majorité des thymocytes. Dans les souris de Scott *et al.*, la différenciation lymphoïde T est altérée à un stade très précoce (Spain *et al.*, 1999). La majorité des thymocytes PU.1^{-/-} présentent un phénotype CD4⁻ CD8⁻ Thy-1⁻ CD25⁻

CD44⁺ c-Kit^{lo} Sca1^{lo} HSA⁺, qui correspond à une population non engagée dans le lignage T, puisqu'elle possède encore un potentiel dendritique et NK (cf. Introduction partie 2.3.3). De façon intéressante, la différenciation des cellules NK, qui est censée prendre son origine à partir de ce progéniteur commun avec la voie T, est très peu altérée, soulignant le fait que l'absence de PU.1 altère sélectivement le développement T à partir de ce progéniteur multipotent (Colucci et al., 2001).

5.4.1.2 Le développement des cellules dendritiques dans les souris PU.1^{-/-}.

Deux études ont documenté une implication de PU.1 dans la génération de cellules dendritiques. Anderson *et al.* ont pu montrer que les précurseurs PU.1^{-/-} de la moelle osseuse et du foie de nouveau nés étaient incapable de générer des cellules dendritiques "du type myéloïde" CD11c⁺ MHCII⁺ en culture (Anderson et al., 2000). De plus, aucune cellule dendritique n'a pu être détectée dans le thymus 10 jours après la naissance. Ces cellules dendritiques thymiques sont censées être à l'origine des cellules dendritiques lymphoïdes. L'autre étude, utilisant les mutants générés par Scott *et al.* a conclu que les embryons PU.1^{-/-} étaient dépourvus de cellules dendritiques "myéloïde" CD11c⁺ CD11b⁺. Par contre, des cellules dendritiques "lymphoïdes" CD8α⁺ DEC-205⁺ sont présentes en nombre quasi normal dans le thymus des embryons PU.1^{-/-} à partir de 16,5 jours de gestation (Guerriero et al., 2000). Ces cellules sont fonctionnelles car elles peuvent activer des lymphocytes T CD4. En conclusion, même si ces deux études n'utilisent pas les mêmes approches, elles documentent un rôle critique de PU.1 dans la génération de certains types de cellules dendritiques. Toutefois, l'expression de PU.1 et son rôle précis dans l'ensemble des cellules dendritiques reste encore obscur. Mes données apportent des informations supplémentaires sur l'expression de PU.1 dans ces cellules (cf. Résultats partie 3.1 et Discussion partie 4.1).

5.4.1.3 Le développement érythroïde semble normal dans les souris PU.1^{-/-}.

Considérant l'implication de PU.1 dans les érythroleucémies de Friend, l'effet de la mutation de PU.1 sur le développement des cellules érythroïdes a également été investigué avec attention. Cependant les deux mutations ont abouti à une conclusion commune: le

développement érythroïde ne semble pas affecté par l'absence de PU.1. En effet, les cellules érythroïdes sont les seules cellules matures présentes dans les souris PU.1^{-/-}, la proportion des précurseurs érythroïdes étant normale (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994). En corrélation avec ces observations, les expériences de génération de souris chimériques à partir de cellules ES ou de souris reconstituées avec des cellules de foie fœtal, ont démontré que les cellules PU.1^{-/-} ne peuvent régénérer que le lignage érythroïde (Scott et al., 1997).

De façon intéressante, les progéniteurs foetaux PU.1^{-/-} ne reconstituent pas le compartiment érythroïde de façon durable, et les souris chimériques adultes ne possèdent plus aucunes cellules hématopoïétiques dérivées de cellules PU.1^{-/-}. En outre, une observation surprenante dans les mutants de Scott *et al.* est qu'un tiers des mutants homozygotes présentent une anémie. Ce phénomène est toutefois mal caractérisé et disparaît sur un fond génétique C57bl/6 pur. Mes résultats, ainsi que d'autres données très récentes permettront de proposer une hypothèse probable pour expliquer ces observations (cf. Discussion partie 3).

En conclusion, ces études ont institué PU.1 en tant que régulateur positif critique du développement myéloïde et lymphoïde. À l'opposé, PU.1 ne semble avoir aucun rôle normal dans le contrôle de l'érythropoïèse.

5.4.2 Le niveau et le stade d'expression de PU.1 déterminent différents destins dans les progéniteurs hématopoïétiques.

Les études sur les souris "knock-out" PU.1 ont permis de révéler un rôle important de PU.1 dans les lignages lymphoïdes et myéloïdes, cependant, peu d'informations étaient connues quant à un rôle instructif de PU.1 au niveau des progéniteurs multipotents. J'ai déjà mentionné le fait que le ratio entre PU.1 et GATA-1 est important pour spécifier le destin des précurseurs érythroïdes (cf. Introduction partie 5.2.1).

Une des premières études qui a révélé un rôle instructif pour PU.1, a été conduite par Nerlov et Graf (Nerlov and Graf, 1998). Ces auteurs ont montré que l'expression de PU.1 dans des progéniteurs aviaires multipotents (par transduction rétrovirale) induisait leur différenciation myéloïde, tout en supprimant leur potentiel érythroïde, puisque l'expression de GATA-1 était parallèlement réduite. De façon intéressante, l'expression transitoire de PU.1

conduisait à une formation d'éosinophiles à la place de neutrophiles ou de macrophages, suggérant déjà que des doses différentes de PU.1 peuvent instruire des destins différents.

Cette hypothèse a été validée par la suite, en utilisant des progéniteurs PU.1^{-/-} réexprimant PU.1 (toujours par transduction rétrovirale) (DeKoter and Singh, 2000). Ces auteurs ont observé que des progéniteurs qui réexpriment de hauts niveaux de PU.1, génèrent des macrophages, alors que ceux réexprimant des doses plus faibles, se différencient majoritairement en lymphocytes B. Par conséquent, en plus d'inhiber la différenciation myéloïde, PU.1 peut aiguiller de manière différentielle un destin lymphoïde ou myéloïde. En outre, dans le compartiment myéloïde, le niveau d'expression de PU.1 semble également orienter la différenciation granulocytaire vis-à-vis de la différenciation macrophagique (Dahl et al., 2003), un niveau plus faible de PU.1 étant lié à une différenciation préférentielle vers le lignage granulocytaire. Finalement, durant la différenciation lymphoïde T, l'expression de PU.1 doit être également contrôlée de manière très précise. En effet, l'absence de PU.1 bloque cette différenciation juste avant l'engagement définitif dans la voie T, alors que la surexpression de PU.1 conduit également à un blocage de la différenciation T au stade proT, c'est à dire juste après l'engagement définitif dans la voie T (Anderson et al., 2002).

L'ensemble de ces études a par conséquent confirmé l'importance cruciale de PU.1 dans la différenciation myéloïde et lymphoïde, en précisant que des niveaux d'expression distincts de ce facteur peuvent diriger un progéniteur multipotent vers des destins différents. De surcroît, Ces données soulignent le fait que l'expression de PU.1 dans des progéniteurs multipotents, supprime leur potentiel de différenciation érythroïde, renforçant l'hypothèse selon laquelle PU.1 n'a pas de rôle au cours de la différenciation érythroïde. Mes résultats infirment cette interprétation (cf. Résultats partie 2).

Bibliographie

(Introduction)
(Introduction)

- Afrikanova, I., Yeh, E., Bartos, D., Watowich, S. S., and Longmore, G. D. (2002). Oncogene cooperativity in Friend erythroleukemia: erythropoietin receptor activation by the env gene of SFFV leads to transcriptional upregulation of PU.1, independent of SFFV proviral insertion. *Oncogene* *21*, 1272-1284.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193-197.
- Allman, D., Li, J., and Hardy, R. R. (1999). Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J Exp Med* *189*, 735-740.
- Allman, D., Lindsley, R. C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S. A., and Hardy, R. R. (2001). Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* *167*, 6834-6840.
- Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J. P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* *4*, 168-174.
- Anderson, K. L., Perkin, H., Surh, C. D., Venturini, S., Maki, R. A., and Torbett, B. E. (2000). Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J Immunol* *164*, 1855-1861.
- Anderson, K. L., Smith, K. A., Connors, K., McKercher, S. R., Maki, R. A., and Torbett, B. E. (1998). Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood* *91*, 3702-3710.
- Anderson, K. L., Smith, K. A., Perkin, H., Hermanson, G., Anderson, C. G., Jolly, D. J., Maki, R. A., and Torbett, B. E. (1999a). PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood* *94*, 2310-2318.
- Anderson, M. K., Hernandez-Hoyos, G., Diamond, R. A., and Rothenberg, E. V. (1999b). Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development* *126*, 3131-3148.
- Anderson, M. K., Weiss, A. H., Hernandez-Hoyos, G., Dionne, C. J., and Rothenberg, E. V. (2002). Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity* *16*, 285-296.
- Anguita, E., Hughes, J., Heyworth, C., Blobel, G. A., Wood, W. G., and Higgs, D. R. (2004). Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *Embo J* *23*, 2841-2852.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* *362*, 761-763.

- Bauer, A., Tronche, F., Wessely, O., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Steinlein, P., Schutz, G., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev* 13, 2996-3002.
- Begley, C. G., Aplan, P. D., Denning, S. M., Haynes, B. F., Waldmann, T. A., and Kirsch, I. R. (1989). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10128-10132.
- Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D. P., Williams, K. P., Chadwick, K., Ling, L. E., Karanu, F. N., and Bhatia, M. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2, 172-180.
- Blobel, G. A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M., and Orkin, S. H. (1998). CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2061-2066.
- Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 396, 594-598.
- Briegleb, K., Lim, K. C., Plank, C., Beug, H., Engel, J. D., and Zenke, M. (1993). Ectopic expression of a conditional GATA-2/estrogen receptor chimera arrests erythroid differentiation in a hormone-dependent manner. *Genes Dev* 7, 1097-1109.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringham, F. R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.
- Chen, D., and Zhang, G. (2001). Enforced expression of the GATA-3 transcription factor affects cell fate decisions in hematopoiesis. *Exp Hematol* 29, 971-980.
- Chen, H., Ray-Gallet, D., Zhang, P., Hetherington, C. J., Gonzalez, D. A., Zhang, D. E., Moreau-Gachelin, F., and Tenen, D. G. (1995a). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* 11, 1549-1560.
- Chen, H., Zhang, P., Radomska, H. S., Hetherington, C. J., Zhang, D. E., and Tenen, D. G. (1996). Octamer binding factors and their coactivator can activate the murine PU.1 (spi-1) promoter. *J Biol Chem* 271, 15743-15752.
- Chen, H. M., Zhang, P., Voso, M. T., Hohaus, S., Gonzalez, D. A., Glass, C. K., Zhang, D. E., and Tenen, D. G. (1995b). Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood* 85, 2918-2928.
- Choe, K. S., Radparvar, F., Matushansky, I., Rekhtman, N., Han, X., and Skoultschi, A. I. (2003). Reversal of tumorigenicity and the block to differentiation in erythroleukemia cells by GATA-1. *Cancer Res* 63, 6363-6369.
- Clark, A. J., Doyle, K. M., and Humbert, P. O. (2004). Cell-intrinsic requirement for pRb in erythropoiesis. *Blood* 104, 1324-1326.

- Cock, T. A., Back, J., Eleftheriou, F., Karsenty, G., Kastner, P., Chan, S., and Auwerx, J. (2004). Enhanced bone formation in lipodystrophic PPAR γ (hyp/hyp) mice relocates haematopoiesis to the spleen. *EMBO Rep* 5, 1007-1012.
- Colucci, F., Samson, S. I., DeKoter, R. P., Lantz, O., Singh, H., and Di Santo, J. P. (2001). Differential requirement for the transcription factor PU.1 in the generation of natural killer cells versus B and T cells. *Blood* 97, 2625-2632.
- Condorelli, G. L., Testa, U., Valtieri, M., Vitelli, L., De Luca, A., Barberi, T., Montesoro, E., Campisi, S., Giordano, A., and Peschle, C. (1995). Modulation of retinoblastoma gene in normal adult hematopoiesis: peak expression and functional role in advanced erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4808-4812.
- Corcoran, A. E., Riddell, A., Krooshoop, D., and Venkitaraman, A. R. (1998). Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature* 391, 904-907.
- Crossley, M., Merika, M., and Orkin, S. H. (1995). Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Mol Cell Biol* 15, 2448-2456.
- Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907-916.
- Cumano, A., Dorshkind, K., Gillis, S., and Paige, C. J. (1990). The influence of S17 stromal cells and interleukin 7 on B cell development. *Eur J Immunol* 20, 2183-2189.
- Cumano, A., Ferraz, J. C., Klaine, M., Di Santo, J. P., and Godin, I. (2001). Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 15, 477-485.
- Cumano, A., Paige, C. J., Iscove, N. N., and Brady, G. (1992). Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. *Nature* 356, 612-615.
- Dahl, R., Walsh, J. C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S. R., Singh, H., and Simon, M. C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol*.
- DeKoter, R. P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.
- DeKoter, R. P., Walsh, J. C., and Singh, H. (1998). PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *Embo J* 17, 4456-4468.
- Dolznic, H., Boulme, F., Stangl, K., Deiner, E. M., Mikulits, W., Beug, H., and Mullner, E. W. (2001). Establishment of normal, terminally differentiating mouse erythroid progenitors: molecular characterization by cDNA arrays. *Faseb J* 15, 1442-1444.

- Elwood, N. J., Zogos, H., Pereira, D. S., Dick, J. E., and Begley, C. G. (1998). Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood* *91*, 3756-3765.
- Fagarasan, S., Watanabe, N., and Honjo, T. (2000). Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunol Rev* *176*, 205-215.
- Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C., and Orkin, S. H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12355-12358.
- Galson, D. L., Hensold, J. O., Bishop, T. R., Schalling, M., D'Andrea, A. D., Jones, C., Auron, P. E., and Housman, D. E. (1993). Mouse beta-globin DNA-binding protein B1 is identical to a proto-oncogene, the transcription factor Spi-1/PU.1, and is restricted in expression to hematopoietic cells and the testis. *Mol Cell Biol* *13*, 2929-2941.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* *3*, 459-473.
- Garrett-Sinha, L. A., Su, G. H., Rao, S., Kabak, S., Hao, Z., Clark, M. R., and Simon, M. C. (1999). PU.1 and Spi-B are required for normal B cell receptor-mediated signal transduction. *Immunity* *10*, 399-408.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* *79*, 143-156.
- Godin, I., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1995). Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 773-777.
- Godin, I., Garcia-Porrero, J. A., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1999). Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J Exp Med* *190*, 43-52.
- Goebel, M. K. (1990). The PU.1 transcription factor is the product of the putative oncogene Spi-1. *Cell* *61*, 1165-1166.
- Goodell, M. A., Rosenzweig, M., Kim, H., Marks, D. F., DeMaria, M., Paradis, G., Grupp, S. A., Sieff, C. A., Mulligan, R. C., and Johnson, R. P. (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* *3*, 1337-1345.
- Grass, J. A., Boyer, M. E., Pal, S., Wu, J., Weiss, M. J., and Bresnick, E. H. (2003). GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8811-8816.
- Green, A. R., Lints, T., Visvader, J., Harvey, R., and Begley, C. G. (1992). SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. *Oncogene* *7*, 653-660.

- Green, A. R., Salvaris, E., and Begley, C. G. (1991). Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. *Oncogene* *6*, 475-479.
- Gregory, T., Yu, C., Ma, A., Orkin, S. H., Blobel, G. A., and Weiss, M. J. (1999). GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* *94*, 87-96.
- Guerriero, A., Langmuir, P. B., Spain, L. M., and Scott, E. W. (2000). PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood* *95*, 879-885.
- Hacker, C., Kirsch, R. D., Ju, X. S., Hieronymus, T., Gust, T. C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S. M., Rose-John, S., Yokota, Y., and Zenke, M. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol* *4*, 380-386.
- Hafid-Medheb, K., Augery-Bourget, Y., Minatchy, M. N., Hanania, N., and Robert-Lezenes, J. (2003). Bcl-XL is required for heme synthesis during the chemical induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells independently of its antiapoptotic function. *Blood* *101*, 2575-2583.
- Hagman, J., Belanger, C., Travis, A., Turck, C. W., and Grosschedl, R. (1993). Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev* *7*, 760-773.
- Hall, M. A., Curtis, D. J., Metcalf, D., Elefanty, A. G., Sourris, K., Robb, L., Gothert, J. R., Jane, S. M., and Begley, C. G. (2003). The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 992-997.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* *173*, 1213-1225.
- Harrison, D. E., and Zhong, R. K. (1992). The same exhaustible multilineage precursor produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10134-10138.
- Hensold, J. O., Stratton, C. A., Barth, D., and Galson, D. L. (1996). Expression of the transcription factor, Spi-1 (PU.1), in differentiating murine erythroleukemia cells is regulated post-transcriptionally. Evidence for differential stability of transcription factor mRNAs following inducer exposure. *J Biol Chem* *271*, 3385-3391.
- Heyworth, C., Gale, K., Dexter, M., May, G., and Enver, T. (1999). A GATA-2/estrogen receptor chimera functions as a ligand-dependent negative regulator of self-renewal. *Genes Dev* *13*, 1847-1860.
- Hoang, T., Paradis, E., Brady, G., Billia, F., Nakahara, K., Iscove, N. N., and Kirsch, I. R. (1996). Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* *87*, 102-111.

- Hong, W., Kim, A. Y., Ky, S., Rakowski, C., Seo, S. B., Chakravarti, D., Atchison, M., and Blobel, G. A. (2002). Inhibition of CBP-mediated protein acetylation by the Ets family oncoprotein PU.1. *Mol Cell Biol* 22, 3729-3743.
- Hromas, R., Orazi, A., Neiman, R. S., Maki, R., Van Beveran, C., Moore, J., and Klemsz, M. (1993). Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood* 82, 2998-3004.
- Hu, C. J., Rao, S., Ramirez-Bergeron, D. L., Garrett-Sinha, L. A., Gerondakis, S., Clark, M. R., and Simon, M. C. (2001). PU.1/Spi-B regulation of c-rel is essential for mature B cell survival. *Immunity* 15, 545-555.
- Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C., and Enver, T. (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* 11, 774-785.
- Hung, H. L., Lau, J., Kim, A. Y., Weiss, M. J., and Blobel, G. A. (1999). CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol Cell Biol* 19, 3496-3505.
- Ikawa, T., Kawamoto, H., Fujimoto, S., and Katsura, Y. (1999). Commitment of common T/Natural killer (NK) progenitors to unipotent T and NK progenitors in the murine fetal thymus revealed by a single progenitor assay. *J Exp Med* 190, 1617-1626.
- Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. (1993). Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3038-3042.
- Iwasaki, H., Mizuno, S., Wells, R. A., Cantor, A. B., Watanabe, S., and Akashi, K. (2003). GATA-1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages. *Immunity* 19, 451-462.
- Johansen, L. M., Iwama, A., Lodie, T. A., Sasaki, K., Felsher, D. W., Golub, T. R., and Tenen, D. G. (2001). c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 21, 3789-3806.
- Johnson, G. R., and Jones, R. O. (1973). Differentiation of the mammalian hepatic primordium in vitro. I. Morphogenesis and the onset of haematopoiesis. *J Embryol Exp Morphol* 30, 83-96.
- Jones, R. J., Celano, P., Sharkis, S. J., and Sensenbrenner, L. L. (1989). Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood* 73, 397-401.
- Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van Beveren, C., and Maki, R. A. (1990). The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 61, 113-124.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.

- Krosl, G., He, G., Lefrancois, M., Charron, F., Romeo, P. H., Jolicoeur, P., Kirsch, I. R., Nemer, M., and Hoang, T. (1998). Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J Exp Med* *188*, 439-450.
- Kulesa, H., Frampton, J., and Graf, T. (1995). GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev* *9*, 1250-1262.
- Labbaye, C., Valtieri, M., Barberi, T., Meccia, E., Masella, B., Pelosi, E., Condorelli, G. L., Testa, U., and Peschle, C. (1995). Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2, and GATA-1 in normal adult hematopoiesis. *J Clin Invest* *95*, 2346-2358.
- Lecuyer, E., Herblot, S., Saint-Denis, M., Martin, R., Begley, C. G., Porcher, C., Orkin, S. H., and Hoang, T. (2002). The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* *100*, 2430-2440.
- Lessard, J., and Sauvageau, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* *423*, 255-260.
- Li, C. L., and Johnson, G. R. (1992). Rhodamine123 reveals heterogeneity within murine Lin⁻, Sca-1⁺ hemopoietic stem cells. *J Exp Med* *175*, 1443-1447.
- Li, Y., Okuno, Y., Zhang, P., Radomska, H. S., Chen, H., Iwasaki, H., Akashi, K., Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Maki, R. A., and Tenen, D. G. (2001). Regulation of the PU.1 gene by distal elements. *Blood* *98*, 2958-2965.
- Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* *376*, 263-267.
- Lu, M., Kawamoto, H., Katsube, Y., Ikawa, T., and Katsura, Y. (2002). The common myelolymphoid progenitor: a key intermediate stage in hemopoiesis generating T and B cells. *J Immunol* *169*, 3519-3525.
- Manz, M. G., Miyamoto, T., Akashi, K., and Weissman, I. L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 11872-11877.
- Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* *97*, 3333-3341.
- Martin, F., and Kearney, J. F. (2000). B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev* *175*, 70-79.
- Martin, F., Oliver, A. M., and Kearney, J. F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* *14*, 617-629.

- Martin, P., del Hoyo, G. M., Anjuere, F., Ruiz, S. R., Arias, C. F., Marin, A. R., and Ardavin, C. (2000). Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood* 96, 2511-2519.
- Matsuzaki, Y., Gytoku, J., Ogawa, M., Nishikawa, S., Katsura, Y., Gachelin, G., and Nakauchi, H. (1993). Characterization of c-kit positive intrathymic stem cells that are restricted to lymphoid differentiation. *J Exp Med* 178, 1283-1292.
- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* 15, 5647-5658.
- Mebius, R. E., Miyamoto, T., Christensen, J., Domen, J., Cupedo, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2001). The fetal liver counterpart of adult common lymphoid progenitors gives rise to all lymphoid lineages, CD45+CD4+CD3- cells, as well as macrophages. *J Immunol* 166, 6593-6601.
- Migliaccio, A. R., Rana, R. A., Sanchez, M., Lorenzini, R., Centurione, L., Bianchi, L., Vannucchi, A. M., Migliaccio, G., and Orkin, S. H. (2003). GATA-1 as a regulator of mast cell differentiation revealed by the phenotype of the GATA-1low mouse mutant. *J Exp Med* 197, 281-296.
- Mikkola, H. K., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T. M., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (2003). Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* 421, 547-551.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K. (2001). Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow. *Nat Immunol* 2, 83-88.
- Moore, M. A., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18, 279-296.
- Moreau-Gachelin, F., Ray, D., Mattei, M. G., Tambourin, P., and Tavitian, A. (1989). The putative oncogene Spi-1: murine chromosomal localization and transcriptional activation in murine acute erythroleukemias. *Oncogene* 4, 1449-1456.
- Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A., and Tambourin, P. (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* 331, 277-280.
- Moreau-Gachelin, F., Wendling, F., Molina, T., Denis, N., Titeux, M., Grimber, G., Briand, P., Vainchenker, W., and Tavitian, A. (1996). Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol Cell Biol* 16, 2453-2463.
- Muller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301.

- Nakajima, H., and Ihle, J. N. (2001). Granulocyte colony-stimulating factor regulates myeloid differentiation through CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *Blood* 98, 897-905.
- Nerlov, C., and Graf, T. (1998). PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* 12, 2403-2412.
- Nishigaki, K., Thompson, D., Hanson, C., Yugawa, T., and Ruscetti, S. (2001). The envelope glycoprotein of friend spleen focus-forming virus covalently interacts with and constitutively activates a truncated form of the receptor tyrosine kinase Stk. *J Virol* 75, 7893-7903.
- Nocka, K., Majumder, S., Chabot, B., Ray, P., Cervone, M., Bernstein, A., and Besmer, P. (1989). Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev* 3, 816-826.
- Nutt, S. L., Eberhard, D., Horcher, M., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (2001). Pax5 determines the identity of B cells from the beginning to the end of B-lymphopoiesis. *Int Rev Immunol* 20, 65-82.
- Nutt, S. L., Urbanek, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev* 11, 476-491.
- Oliver, A. M., Martin, F., and Kearney, J. F. (1999). IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* 162, 7198-7207.
- Olson, M. C., Scott, E. W., Hack, A. A., Su, G. H., Tenen, D. G., Singh, H., and Simon, M. C. (1995). PU. 1 is not essential for early myeloid gene expression but is required for terminal myeloid differentiation. *Immunity* 3, 703-714.
- Orlic, D., Anderson, S., Biesecker, L. G., Sorrentino, B. P., and Bodine, D. M. (1995). Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4601-4605.
- Osada, H., Grutz, G. G., Axelson, H., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1997). LIM-only protein Lmo2 forms a protein complex with erythroid transcription factor GATA-1. *Leukemia* 11 Suppl 3, 307-312.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245.
- Park, I. K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 302-305.

- Paul, R., Schuetze, S., Kozak, S. L., Kozak, C. A., and Kabat, D. (1991). The Sfpi-1 proviral integration site of Friend erythroleukemia encodes the ets-related transcription factor Pu.1. *J Virol* *65*, 464-467.
- Pereira, R., Quang, C. T., Lesault, I., Dolznig, H., Beug, H., and Ghysdael, J. (1999). FLI-1 inhibits differentiation and induces proliferation of primary erythroblasts. *Oncogene* *18*, 1597-1608.
- Pereira, R., Raingeaud, J., Pironin, M., Ghysdael, J., and Quang, C. T. (2000). SPI-1 transforming properties depend upon specifically activated forms of the EPOR. *Oncogene* *19*, 5106-5110.
- Persons, D. A., Allay, J. A., Allay, E. R., Ashmun, R. A., Orlic, D., Jane, S. M., Cunningham, J. M., and Nienhuis, A. W. (1999a). Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood* *93*, 488-499.
- Persons, D. A., Paulson, R. F., Loyd, M. R., Herley, M. T., Bodner, S. M., Bernstein, A., Correll, P. H., and Ney, P. A. (1999b). Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase. *Nat Genet* *23*, 159-165.
- Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., and et al. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* *180*, 1955-1960.
- Petrovick, M. S., Hiebert, S. W., Friedman, A. D., Hetherington, C. J., Tenen, D. G., and Zhang, D. E. (1998). Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol* *18*, 3915-3925.
- Pevny, L., Lin, C. S., D'Agati, V., Simon, M. C., Orkin, S. H., and Costantini, F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* *121*, 163-172.
- Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., Orkin, S. H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* *349*, 257-260.
- Pongubala, J. M., and Atchison, M. L. (1997). PU.1 can participate in an active enhancer complex without its transcriptional activation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 127-132.
- Prasad, K. S., Jordan, J. E., Koury, M. J., Bondurant, M. C., and Brandt, S. J. (1995). Erythropoietin stimulates transcription of the TAL1/SCL gene and phosphorylation of its protein products. *J Biol Chem* *270*, 11603-11611.
- Prasher, J. M., Elenitoba-Johnson, K. S., and Kelley, L. L. (2001). Loss of p53 tumor suppressor function is required for in vivo progression of Friend erythroleukemia. *Oncogene* *20*, 2946-2955.

- Quang, C. T., Wessely, O., Pironin, M., Beug, H., and Ghysdael, J. (1997). Cooperation of Spi-1/PU.1 with an activated erythropoietin receptor inhibits apoptosis and Epo-dependent differentiation in primary erythroblasts and induces their Kit ligand-dependent proliferation. *Embo J* 16, 5639-5653.
- Radomska, H. S., Huettner, C. S., Zhang, P., Cheng, T., Scadden, D. T., and Tenen, D. G. (1998). CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* 18, 4301-4314.
- Rao, G., Rekhtman, N., Cheng, G., Krasikov, T., and Skoultschi, A. I. (1997). Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. *Oncogene* 14, 123-131.
- Ray, D., Bosselut, R., Ghysdael, J., Mattei, M. G., Tavitian, A., and Moreau-Gachelin, F. (1992). Characterization of Spi-B, a transcription factor related to the putative oncoprotein Spi-1/PU.1. *Mol Cell Biol* 12, 4297-4304.
- Reddy, P. M., and Shen, C. K. (1993). Erythroid differentiation of mouse erythroleukemia cells results in reorganization of protein-DNA complexes in the mouse beta maj globin promoter but not its distal enhancer. *Mol Cell Biol* 13, 1093-1103.
- Rekhtman, N., Choe, K. S., Matushansky, I., Murray, S., Stopka, T., and Skoultschi, A. I. (2003). PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol Cell Biol* 23, 7460-7474.
- Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T., and Skoultschi, A. I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* 13, 1398-1411.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I. L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414.
- Robb, L., Elwood, N. J., Elefanty, A. G., Kontgen, F., Li, R., Barnett, L. D., and Begley, C. G. (1996). The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *Embo J* 15, 4123-4129.
- Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R. P., Metcalf, D., and Begley, C. G. (1995). Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7075-7079.
- Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T. H., Karasuyama, H., and Melchers, F. (1994). IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int Immunol* 6, 1257-1264.
- Rolink, A. G., Nutt, S. L., Melchers, F., and Busslinger, M. (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* 401, 603-606.

- Rosenbauer, F., Wagner, K., Kutok, J. L., Iwasaki, H., Le Beau, M. M., Okuno, Y., Akashi, K., Fiering, S., and Tenen, D. G. (2004). Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* 36, 624-630.
- Ruscetti, S. K. (1999). Deregulation of erythropoiesis by the Friend spleen focus-forming virus. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1089-1109.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Sanchez, M. J., Holmes, A., Miles, C., and Dzierzak, E. (1996). Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* 5, 513-525.
- Sato, T., Laver, J. H., and Ogawa, M. (1999). Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 94, 2548-2554.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C. J., Lawrence, H. J., Largman, C., Lansdorp, P. M., and Humphries, R. K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 9, 1753-1765.
- Schuetze, S., Paul, R., Gliniak, B. C., and Kabat, D. (1992). Role of the PU.1 transcription factor in controlling differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* 12, 2967-2975.
- Schuetze, S., Stenberg, P. E., and Kabat, D. (1993). The Ets-related transcription factor PU.1 immortalizes erythroblasts. *Mol Cell Biol* 13, 5670-5678.
- Scolan, E. L., Wendling, F., Barnache, S., Denis, N., Tulliez, M., Vainchenker, W., and Moreau-Gachelin, F. (2001). Germ-line deletion of p53 reveals a multistage tumor progression in spi-1/PU.1 transgenic proerythroblasts. *Oncogene* 20, 5484-5492.
- Scott, E. W., Fisher, R. C., Olson, M. C., Kehrli, E. W., Simon, M. C., and Singh, H. (1997). PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity* 6, 437-447.
- 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.
- Scott, L. M., Civin, C. I., Rorth, P., and Friedman, A. D. (1992). A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood* 80, 1725-1735.
- Shin, M. K., and Koshland, M. E. (1993). Ets-related protein PU.1 regulates expression of the immunoglobulin J-chain gene through a novel Ets-binding element. *Genes Dev* 7, 2006-2015.
- Shivdasani, R. A., Mayer, E. L., and Orkin, S. H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-434.

- Silva, M., Grillot, D., Benito, A., Richard, C., Nunez, G., and Fernandez-Luna, J. L. (1996). Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 88, 1576-1582.
- Simon, M. C., Pevny, L., Wiles, M. V., Keller, G., Costantini, F., and Orkin, S. H. (1992). Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 1, 92-98.
- Spain, L. M., Guerriero, A., Kunjibettu, S., and Scott, E. W. (1999). T cell development in PU.1-deficient mice. *J Immunol* 163, 2681-2687.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S., and Weissman, I. L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.
- Spike, B. T., Dirlam, A., Dibling, B. C., Marvin, J., Williams, B. O., Jacks, T., and Macleod, K. F. (2004). The Rb tumor suppressor is required for stress erythropoiesis. *Embo J*.
- Taghon, T., De Smedt, M., Stolz, F., Cnockaert, M., Plum, J., and Leclercq, G. (2001). Enforced expression of GATA-3 severely reduces human thymic cellularity. *J Immunol* 167, 4468-4475.
- Tambourin, P. E., Gallien-Lartigue, O., Wendling, F., and Huaulme, D. (1973). Erythrocyte production in mice infected by the polycythaemia-inducing Friend virus or by the anaemia-inducing Friedn virus. *Br J Haematol* 24, 511-524.
- Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., and Humphries, R. K. (1999). Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood* 94, 2605-2612.
- Till, J. E., and Mc, C. E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.
- Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P., and Leiden, J. M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384, 474-478.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G., and Weissman, I. L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290, 2152-2154.
- Traver, D., Miyamoto, T., Christensen, J., Iwasaki-Arai, J., Akashi, K., and Weissman, I. L. (2001). Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. *Blood* 98, 627-635.
- Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W., and Orkin, S. H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.
- Tsai, F. Y., and Orkin, S. H. (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 89, 3636-3643.

- Valge-Archer, V. E., Osada, H., Warren, A. J., Forster, A., Li, J., Baer, R., and Rabbitts, T. H. (1994). The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8617-8621.
- Valtieri, M., Tocci, A., Gabbianelli, M., Luchetti, L., Masella, B., Vitelli, L., Botta, R., Testa, U., Condorelli, G. L., and Peschle, C. (1998). Enforced TAL-1 expression stimulates primitive, erythroid and megakaryocytic progenitors but blocks the granulopoietic differentiation program. *Cancer Res* *58*, 562-569.
- van den Akker, E., van Dijk, T., Parren-van Amelsvoort, M., Grossmann, K. S., Schaeper, U., Toney-Earley, K., Waltz, S. E., Lowenberg, B., and von Lindern, M. (2004). Tyrosine kinase receptor RON functions downstream of the erythropoietin receptor to induce expansion of erythroid progenitors. *Blood* *103*, 4457-4465.
- Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W. S., and Bernstein, I. D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* *6*, 1278-1281.
- Visvader, J. E., Elefanty, A. G., Strasser, A., and Adams, J. M. (1992). GATA-1 but not SCL induces megakaryocytic differentiation in an early myeloid line. *Embo J* *11*, 4557-4564.
- Visvader, J. E., Mao, X., Fujiwara, Y., Hahm, K., and Orkin, S. H. (1997). The LIM-domain binding protein Ldb1 and its partner LMO2 act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13707-13712.
- Vitelli, L., Condorelli, G., Lulli, V., Hoang, T., Luchetti, L., Croce, C. M., and Peschle, C. (2000). A pentamer transcriptional complex including tal-1 and retinoblastoma protein downmodulates c-kit expression in normal erythroblasts. *Mol Cell Biol* *20*, 5330-5342.
- von Lindern, M., Deiner, E. M., Dolznig, H., Parren-Van Amelsvoort, M., Hayman, M. J., Mullner, E. W., and Beug, H. (2001). Leukemic transformation of normal murine erythroid progenitors: v- and c-ErbB act through signaling pathways activated by the EpoR and c-Kit in stress erythropoiesis. *Oncogene* *20*, 3651-3664.
- von Lindern, M., Zauner, W., Mellitzer, G., Steinlein, P., Fritsch, G., Huber, K., Lowenberg, B., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood* *94*, 550-559.
- Wadman, I., Li, J., Bash, R. O., Forster, A., Osada, H., Rabbitts, T. H., and Baer, R. (1994). Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *Embo J* *13*, 4831-4839.
- Wadman, I. A., Osada, H., Grutz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J* *16*, 3145-3157.

- Wang, X., Scott, E., Sawyers, C. L., and Friedman, A. D. (1999). C/EBPalpha bypasses granulocyte colony-stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts. *Blood* 94, 560-571.
- Wasylyk, C., Kerckaert, J. P., and Wasylyk, B. (1992). A novel modulator domain of Ets transcription factors. *Genes Dev* 6, 965-974.
- Weiss, M. J., and Orkin, S. H. (1995). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9623-9627.
- Wessely, O., Bauer, A., Quang, C. T., Deiner, E. M., von Lindern, M., Mellitzer, G., Steinlein, P., Ghysdael, J., and Beug, H. (1999). A novel way to induce erythroid progenitor self renewal: cooperation of c-Kit with the erythropoietin receptor. *Biol Chem* 380, 187-202.
- Wessely, O., Deiner, E. M., Beug, H., and von Lindern, M. (1997a). The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *Embo J* 16, 267-280.
- Wessely, O., Mellitzer, G., von Lindern, M., Levitzki, A., Gazit, A., Ischenko, I., Hayman, M. J., and Beug, H. (1997b). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases c-ErbB and c-Kit in regulating the balance between erythroid cell proliferation and differentiation. *Cell Growth Differ* 8, 481-493.
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., 3rd, and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.
- Wu, H., Klingmuller, U., Acurio, A., Hsiao, J. G., and Lodish, H. F. (1997a). Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1806-1810.
- Wu, H., Klingmuller, U., Besmer, P., and Lodish, H. F. (1995a). Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 377, 242-246.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H. F. (1995b). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67.
- Wu, L., Antica, M., Johnson, G. R., Scollay, R., and Shortman, K. (1991). Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* 174, 1617-1627.
- Wu, L., Nichogiannopoulou, A., Shortman, K., and Georgopoulos, K. (1997b). Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* 7, 483-492.
- Xie, H., Ye, M., Feng, R., and Graf, T. (2004). Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117, 663-676.

- Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Hashimoto, Y., and Oikawa, T. (1998a). Reduction of DNA binding activity of the GATA-1 transcription factor in the apoptotic process induced by overexpression of PU.1 in murine erythroleukemia cells. *Exp Cell Res* 245, 186-194.
- Yamada, T., Kondoh, N., Matsumoto, M., Yoshida, M., Maekawa, A., and Oikawa, T. (1997). Overexpression of PU.1 induces growth and differentiation inhibition and apoptotic cell death in murine erythroleukemia cells. *Blood* 89, 1383-1393.
- Yamada, Y., Warren, A. J., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R., and Rabbitts, T. H. (1998b). The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3890-3895.
- Yamamoto, H., Kihara-Negishi, F., Yamada, T., Hashimoto, Y., and Oikawa, T. (1999). Physical and functional interactions between the transcription factor PU.1 and the coactivator CBP. *Oncogene* 18, 1495-1501.
- Yamamoto, M., Takahashi, S., Onodera, K., Muraosa, Y., and Engel, J. D. (1997). Upstream and downstream of erythroid transcription factor GATA-1. *Genes Cells* 2, 107-115.
- Yamanaka, R., Barlow, C., Lekstrom-Himes, J., Castilla, L. H., Liu, P. P., Eckhaus, M., Decker, T., Wynshaw-Boris, A., and Xanthopoulos, K. G. (1997a). Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13187-13192.
- Yamanaka, R., Kim, G. D., Radomska, H. S., Lekstrom-Himes, J., Smith, L. T., Antonson, P., Tenen, D. G., and Xanthopoulos, K. G. (1997b). CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6462-6467.
- Zhang, D. E., Zhang, P., Wang, N. D., Hetherington, C. J., Darlington, G. J., and Tenen, D. G. (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 569-574.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.
- Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radomska, H. S., Auron, P. E., Tenen, D. G., and Sun, Z. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8705-8710.
- Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K. A., Mueller, B. U., Narravula, S., Torbett, B. E., Orkin, S. H., and Tenen, D. G. (2000). PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* 96, 2641-2648.

Zhong, R. K., Astle, C. M., and Harrison, D. E. (1996). Distinct developmental patterns of short-term and long-term functioning lymphoid and myeloid precursors defined by competitive limiting dilution analysis in vivo. *J Immunol* *157*, 138-145.

Résultats

Résultats

Comme décrit dans l'introduction, deux mutations inactivatrices du locus PU.1 ont été produites avant la mutation que j'ai étudié. Outre le fait que les phénotypes détaillés initialement pour ces deux mutations présentaient des différences notables (cf. Introduction partie 5.4.1), l'expression de PU.1, en dehors des cellules B et myéloïdes était peu documentée. La mutation générée dans mon laboratoire d'accueil cible l'exon 1 du locus (à la différence des deux précédentes stratégies qui ciblent l'exon 5), en y insérant une construction comprenant le transgène rapporteur EGFP ("Enhanced Green Fluorescent Protein") et le gène de résistance à la néomycine floxé (cf. figure R1A). Par conséquent un des intérêts principaux de cette mutation réside dans la possibilité de pouvoir visualiser la dynamique de l'expression de PU.1 dans l'ensemble du système hématopoïétique. L'analyse par cytométrie de flux permet de surcroît une étude au niveau de la cellule unique.

Le premier allèle obtenu a donc été nommé PU.1^{neo} étant donné que le gène néomycine (Neo) est encore présent dans cette construction. Après croisement de souris hétérozygotes PU.1^{+/neo} avec des souris exprimant la recombinaison cre ubiquitairement, j'ai pu obtenir une lignée de souris porteuse de l'allèle PU.1^G dans lequel le gène Neo est délété.

Lors de mon année de DEA dans l'équipe de Philippe Kastner et Susan Chan, j'ai analysé le phénotype des souris porteuses de la mutation PU.1^{neo}. Comme je vais le décrire plus bas, cet allèle n'est pas un allèle nul et le phénotype des mutants PU.1^{neo/neo} est très différent de celui des mutants PU.1^{G/G}. Par la suite je me suis donc concentré sur l'étude des souris porteuses de l'allèle PU.1^G, qui est un allèle nul (cf. figure R1B). Deux axes principaux se sont développés: 1- l'analyse de l'effet de la mutation PU.1 sur le développement érythroïde. 2- l'analyse détaillée de la dynamique de l'expression de PU.1 dans le système hématopoïétique.

En parallèle, j'ai participé à deux projets en collaboration avec les équipes du Dr Bohdan Wasylyk et du Pr Johan Auwerx. Ces deux collaborations m'ont permis de transférer mes connaissances hématopoïétiques à d'autres projets.

1^{ère} partie. Analyse du phénotype des souris PU.1^{neo}.

les souris PU.1^G ont été volontairement incluse dans cette partie afin de servir d'élément de comparaison. En outre, ceci me permettra de ne pas refaire une description du phénotype général des mutants nuls PU.1^{G/G} par la suite.

1.1 L'allèle PU.1^{neo} n'est pas un allèle nul.

L'analyse de l'expression des transcrits du gène PU.1, par RT-PCR (cf. figure R1B), montre que le transcrit total (exon 1-5) n'est pas présent chez les mutants PU.1^{neo/neo}. Cependant, des transcrits possédant des séquences en aval du site d'insertion de la cassette EGFP/PGK néo (exon 2-5 et 3-5) peuvent être détectés chez les mutants. Les foetus PU.1^{neo/neo} expriment donc des transcrits PU.1 résiduels, mais pas le transcrit comprenant l'ensemble de la séquence PU.1. Des expériences de "5' RACE PCR" indiquent que la plupart de ces transcrits sont initiés dans la cassette PGKneo (cf. figure R1D). En outre, l'analyse par western blot montre que les foetus mutants (PU.1^{neo/neo}) expriment encore des protéines détectées par l'anticorps dirigé contre PU.1 et qui possèdent un poids moléculaire similaire à celui des protéines PU.1 normales (cf. figure R1C). Cependant, ces protéines sont exprimées à un niveau beaucoup plus faible que chez les foetus de type sauvage. En outre, elles sont probablement dépourvues des séquences codées par l'exon 1, mais identiques à PU.1 pour les parties codées par les exons suivants (ie. l'essentiel de la protéine). Au contraire, l'allèle PU.1^G est un allèle nul, puisque qu'aucun transcrit possédant des séquences en aval du site de mutation n'est détecté chez les mutants PU.1^{G/G}.

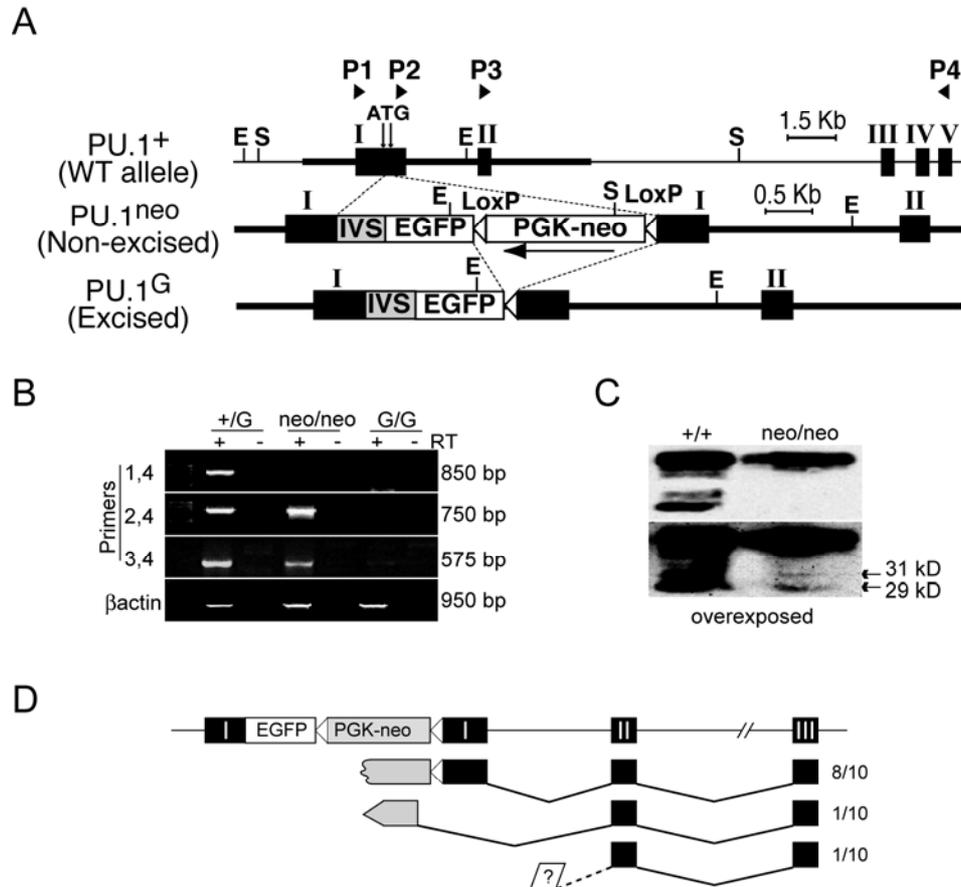


Figure R1: représentation schématique des altérations présentes chez les souris $PU.1^{-/-}$.

A: Stratégie de ciblage du locus $PU.1$ et génération de l'allèle $PU.1^G$. Les amorces (P1-P4) utilisées pour détecter les transcrits $PU.1$ sont notées en haut. Le fragment d'ADN utilisé dans le vecteur de ciblage est représenté par une ligne épaisse. Seul l'exon 1 n'est pas à l'échelle. B: Détection de transcrits $PU.1$ dans les foies foetaux $PU.1^{G/G}$ et $PU.1^{neo/neo}$ (stade E14,5). Les amorces utilisées sont P1 à P4 (cf. figure R1A). (+) (-) RT indique la présence ou l'absence d'enzyme lors de la réaction de réverse transcription. C: Western blot d'extraits nucléaires de foies foetaux (stade E14,5). D: Schéma des transcrits identifiés par 5' RACE-PCR dans les foies foetaux $PU.1^{neo/neo}$ (stade E14,5). Le nombre de transcrits possédant le type de séquence représenté est noté.

1.2 Phénotype général des foetus $PU.1^{neo/neo}$.

Les foetus $PU.1^{neo/neo}$ possèdent un phénotype clairement différent des foetus $PU.1^{+/+}$ et $PU.1^{G/G}$. Tout d'abord, à partir du stade 14,5 jours post coïtum (jpc), les mutants $PU.1^{neo/neo}$ présentent un défaut important dans le système sanguin comme l'atteste leur couleur beaucoup plus pâle comparée à celle des foetus sauvages (Figure R2A). De plus, ces mutants subissent une mortalité précoce durant le développement foetal. En effet, aucun mutant $PU.1^{neo/neo}$

vivant n'a été obtenu passé 15,5 de développement (données non figurées). Certains mutants meurent avant le stade 14,5 jpc. Enfin, le foie foetal des foetus PU.1^{neo/neo} est visiblement plus petit, ce qui est vérifié par une cellularité réduite de plus de 50% chez les mutants par rapport aux foetus de type sauvage (cf. figure R2B). Ce phénotype était déjà clairement distinct des phénotypes obtenus avec les précédentes mutations (Anderson et al., 1998; McKercher et al., 1996; Scott et al., 1997; Scott et al., 1994; Simon et al., 1996).

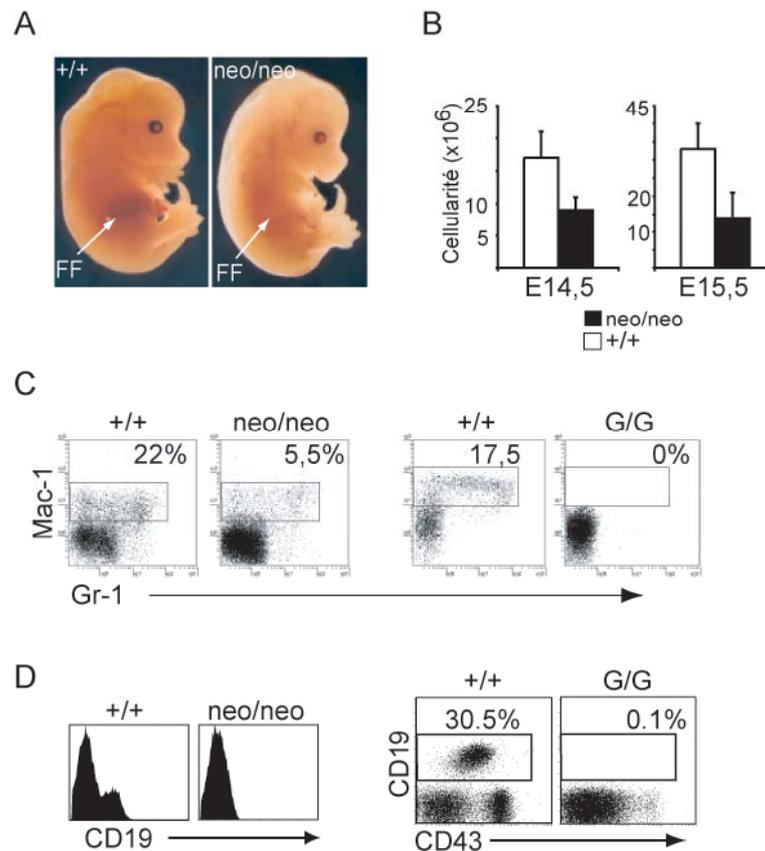


Figure R2: Phénotype général des foetus PU.1^{neo/neo}.

A: Morphologie externe des foetus contrôles et neo/neo au stade E15. FF: Foie foetal. B: cellularité des foies foetaux à 14,5 et 15,5 jours de développement. C: Cellules myéloïdes au stade E15,5 dans les mutants G/G et neo/neo. Le pourcentage de la population considérée est noté dans chaque diagramme. D: Analyse de la population lymphoïde B dans les deux types de mutants, toujours au stade E15,5.

1.3 Altération incomplète du compartiment myéloïde chez les mutants PU.1^{neo}.

À l'opposé des deux précédentes mutations, les mutants PU.1^{neo/neo} ne présentent pas de délétion complète des cellules myéloïdes Gr-1⁺ Mac-1⁺ (CD11b)⁺ (cf. figure R2C). En outre, même si le nombre de précurseurs myéloïdes répondant en culture aux cytokines GM-CSF et M-CSF est sévèrement réduit, il existe un nombre significatif de ces précurseurs dans le foie fœtal des mutants PU.1^{neo/neo} (données non figurées). Par conséquent, l'expression résiduelle de protéine PU.1 semble autoriser une différenciation myéloïde basale. De façon intéressante, ces foetus PU.1^{neo/neo} ne développent jamais de cellules B comme le montre l'absence totale d'expression du marqueur CD19 (cf. figure R2D).

1.4 Blocage de la différenciation érythroïde.

Comme je l'ai déjà indiqué, les foetus PU.1^{neo/neo} sont visiblement anémiques. L'observation cytologique des cellules du sang foetal, montre qu'au stade 15,5 jpc les érythrocytes définitifs (énucléés) sont présents en majorité chez les foetus de type sauvage, par rapport aux érythrocytes primitifs (nucléés). Par contre, chez les foetus PU.1^{neo/neo} ce sont les érythrocytes primitifs qui sont présents en majorité (cf. figure R3A). L'érythropoïèse définitive n'est cependant pas bloquée, mais semble réduite. Les mutants PU.1^{G/G} semblent normaux vis-à-vis de la transition entre érythropoïèse primitive et définitive.

L'observation cytologique des foies foetaux, toujours au stade 15,5 jpc, montre que la proportion de cellules érythroïdes au stade érythroblaste est augmentée chez les mutants, par rapport aux PU.1^{+/+} (cf. figure R3A). Des cellules à des stades ultérieurs de différenciation, comme les normoblastes, sont présentes chez les mutants mais sont plus rares que dans les foies foetaux sauvages. La réduction du nombre des cellules myéloïdes et lymphoïdes, ajoutée à la proportion augmentée des cellules au stade érythroblaste, résulte dans le fait que les foies foetaux de ces mutants sont composés pour une grande partie de cellules érythroïdes immatures. A ce stade de développement, l'observation cytologique des foies foetaux PU.1^{G/G} révèle peu de différences par rapport aux contrôles (les cellules myéloïdes et lymphoïdes étant encore minoritaires).

En outre, l'analyse par cytométrie de flux des foies foetaux souligne que chez les foetus $PU.1^{neo/neo}$, la population $TER119^+$ est réduite d'environ 65% (cf. figure R3B). Les foetus $PU.1^{neo/neo}$ possèdent donc une population érythroïde mature réduite, ce qui corrobore leur aspect morphologique anémique. Comme il sera décrit dans la partie suivante des résultats, les foetus $PU.1^{G/G}$ commencent à révéler une différence plus frappante dans la proportion de la population $TER119^+$.

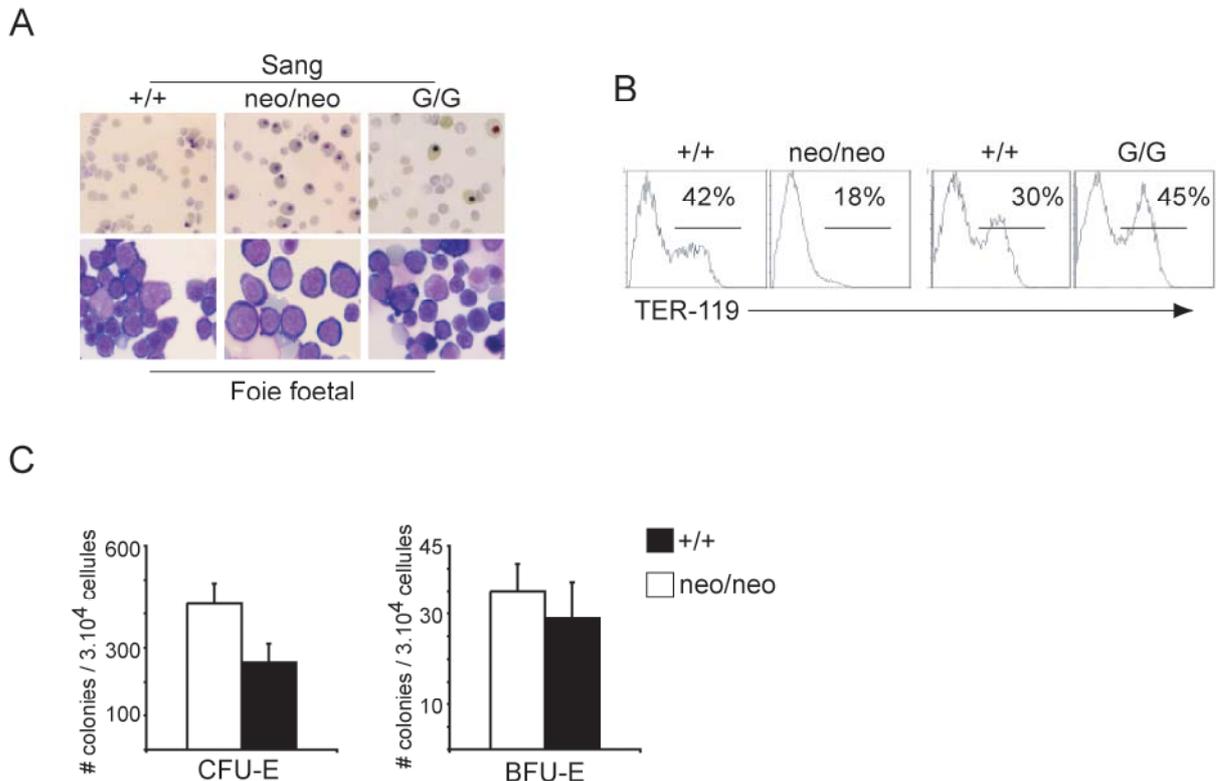


Figure R3: Blocage de la différenciation érythroïde dans les foetus $PU.1^{neo/neo}$.

A: Visualisation par coloration de May-Grünwald Giemsa de "cytopspin" de sang et de foie foetal au stade E15. Les érythrocytes primitifs sont nucléés, au contraire des érythrocytes définitifs. Une grande proportion des érythrocytes des mutants neo est de type primitif. Le foie foetal $PU.1^{neo/neo}$ contient visiblement plus de grosses cellules ayant une morphologie de type proérythroblaste. B: Analyse de la population érythroïde mature ($TER119^+$) à 15,5 jours de développement. Cette population est sévèrement réduite chez les foetus $PU.1^{neo/neo}$, et commence à être sur-représentée chez les mutants $PU.1^{G/G}$ (cf. Résultats partie 2). C: Quantification des précurseurs érythroïdes immatures (BFU-E) et matures (CFU-E) au stade E15. Les CFU-E sont quantifiées après 3 jours de culture en méthylcellulose complétée avec de l'Epo, par coloration à la benzidine. Les BFU-E sont quantifiées après 7 jours de culture dans un milieu méthylcellulose complété avec de l'Epo, du SCF, de l'IL-3 et de l'IL-6, et apparaissent comme des colonies entièrement colorées en noire par la benzidine.

La proportion des précurseurs érythroïdes CFU-E est réduite chez les mutants PU.1^{neo/neo} (257 précurseurs pour 30000 cellules de foie foetal), comparée aux foetus contrôles (430 CFU-E pour 30000 cellules) (cf. figure R3C). Il est tout de même intéressant de remarquer que la proportion des précurseurs érythroïdes plus immatures BFU-E, détectés en milieu avec IL-3, IL-6, SCF et EPO n'est pas réduite de façon significative chez ces mutants (cf. figure R3C). Par contre, les cellules érythroïdes matures (TER119⁺) sont quasiment absentes des colonies après culture avec ces cytokines, soulignant encore le défaut dans la maturation érythroïde (données non figurées).

Ce blocage est donc très similaire à celui résultant de la surexpression d'une protéine PU.1 normale. Ce résultat paraît paradoxal, considérant la quantité très faible de protéines produite chez les mutants PU.1^{neo/neo}. L'interprétation de ces résultats reste cependant délicate. En effet, la nature exacte des protéines PU.1 exprimées par ces mutants n'est pas connue. Néanmoins, il est probable que la transcription des ARNm résiduels (initiés pour la plupart dans la cassette PGKneo), ne soit pas contrôlée par les éléments régulateurs naturels du locus PU.1. Ainsi, on peut concevoir que ces transcrits puissent être exprimés de manière ectopique, notamment dans les cellules érythroïdes où normalement PU.1 devrait être absent. Considérant l'effet inhibiteur de l'expression de PU.1 sur la différenciation érythroïde, l'expression ectopique de ces protéines pourrait induire un blocage similaire. Comment une faible quantité de protéine pourrait générer un blocage aussi important? Une possibilité consiste à postuler que la délétion des séquences N-terminales de PU.1 conduit à un accroissement de sa propriété inhibitrice de la différenciation.

Quoiqu'il en soit, ces observations soulignent encore un effet important de PU.1 dans le compartiment érythroïde. Ceci, en partie, nous a incité à scruter avec attention le compartiment érythroïde des souris PU.1^{G/G}.

2^{ème} partie. PU.1 contrôle la balance entre prolifération et différenciation dans les précurseurs érythroïdes.

Comme décrit dans l'introduction, l'implication oncogénique de la surexpression de PU.1 dans les précurseurs érythroïdes a été clairement démontrée. Néanmoins, l'absence apparente de déficience dans le compartiment érythroïde des souris nulles pour PU.1, alors que le reste du système hématopoïétique est sévèrement altéré ont imposé PU.1 comme un gène maître du développement lymphoïde et myéloïde. A l'opposé, ces mêmes observations ont conduit à l'interprétation que l'activation de PU.1 par le SFFV n'est que le reflet d'une expression ectopique de ce facteur dans les précurseurs érythroïdes, sans connexion avec une fonction normale de PU.1 dans l'érythropoïèse.

Toutefois, aucune donnée dans la littérature ne démontre clairement l'expression de PU.1 dans les précurseurs érythroïdes normaux (cf. Introduction partie 5.3.1). Par ailleurs, la production de cellules érythroïdes matures en absence de PU.1 ne signifie pas nécessairement que PU.1 ne joue aucun rôle au cours de la maturation de ces cellules. De plus, la très grande spécificité de l'insertion du SFFV au niveau du locus PU.1 est intrigante: pourquoi PU.1 aurait-il acquis, par hasard et de façon hautement spécifique, des fonctions lui permettant d'interférer avec l'érythropoïèse précoce? Enfin, comme mentionné plus haut, notre mutation PU.1^{neo} conduit à une déficience érythroïde surprenante. L'hypothèse d'un rôle normal de PU.1 dans l'érythropoïèse précoce méritait donc d'être examinée de façon approfondie.

2.1 Données publiées.

J'ai pu montrer, en utilisant un système de culture érythroïde, que les PE PU.1^{G/G} ne parviennent pas à maintenir un état immature, mais arrêtent de proliférer et subissent une apoptose accrue. De façon importante, dans les souris adultes hétérozygotes, des défauts similaires sont détectés suite à une induction de l'érythropoïèse de stress. Par conséquent ces

données révèlent une nouvelle fonction pour PU.1 dans le contrôle de l'homéostasie érythroïde. En outre, cette faculté est strictement dépendante d'une expression faible de ce facteur dans les PE.

L'article "PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitors" présente l'essentiel de ces données.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells

Jonathan Back, Andrée Dierich, Corinne Bronn, Philippe Kastner, and Susan Chan

Blood, 15 May 2004, Vol. 103, No. 10, pp. 3615-3623

Pages 3615-3623 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/103/10/3615>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

2.2 Résultats additionnels.

Afin d'investiguer le mécanisme d'action de PU.1 dans les PE, j'ai évalué l'implication possible des facteurs P53, GATA-1 et CBP/P300 dans cette fonction.

2.2.1 La perte d'un allèle de P53 ne compense pas le défaut d'amplification des précurseurs PU.1^{+/-}.

L'inactivation du gène *p53* est un événement récurrent dans les érythroleucémies de Friend et important pour la progression vers le stade tumoral. Par ailleurs, en collaborant avec l'équipe du Dr Wasylyk, j'ai contribué à montrer que P53 possède la capacité de promouvoir la différenciation érythroïde (cf. (Ganguli et al., 2002) et Introduction partie 4.1). L'hypothèse d'une synergie entre l'action de PU.1 et P53 dans les précurseurs érythroïdes (PE) méritait donc d'être testée. Etant donné que les PE PU.1^{+G} se comportent de façon altérée dans le système de culture érythroïde, j'ai testé si l'inactivation d'un allèle de P53 pouvait compenser le défaut d'autorenouvellement dû à la réduction de PU.1.

Des souris PU.1^{+G} ont été croisées avec des souris P53^{+/-} afin d'obtenir des mutants doubles hétérozygotes. Ces mutants sont viables et atteignent l'âge adulte. Les cellules Lin⁻ de la moelle osseuse des animaux correspondant aux 4 génotypes possibles ont été mises en culture dans le milieu érythroïde pendant 9 jours (cf. figure R4). Comme attendu, les cultures PU.1^{+G} sont moins efficacement amplifiées et génèrent plus de cellules érythroïdes matures que leur pendant PU.1^{+/+} (cf. figure R4A et B). L'hétérozygotie pour P53 ne semble pas avoir d'effets détectables sur l'autorenouvellement ainsi que sur la différenciation. En effet, les cultures simple hétérozygotes P53^{+/-} ne présentent pas de différences significatives, tant du point de vue de l'amplification que du nombre de cellules TER119⁺ générées, indiquant qu'une demie dose de P53 est suffisante dans les PE. De plus, la perte d'un allèle P53 n'accroît pas l'amplification des PE PU.1^{+G} (cf. figure R4B, comparez les courbes rouges et vertes – toutes mes excuses aux daltoniens). De façon concordante, les cultures doubles hétérozygotes présentent, au bout de 6 ou 8 jours, une proportion similaire de cellules érythroïdes matures par rapport aux cultures PU.1^{+G}, indiquant que l'accroissement de la différenciation dû à la réduction de PU.1 n'est pas non plus compensé par la réduction de P53 (cf. figure R4A). Ces

données suggèrent que P53 et PU.1, plutôt qu'agir en synergie, influencent le développement érythroïde précoce de manière indépendante.

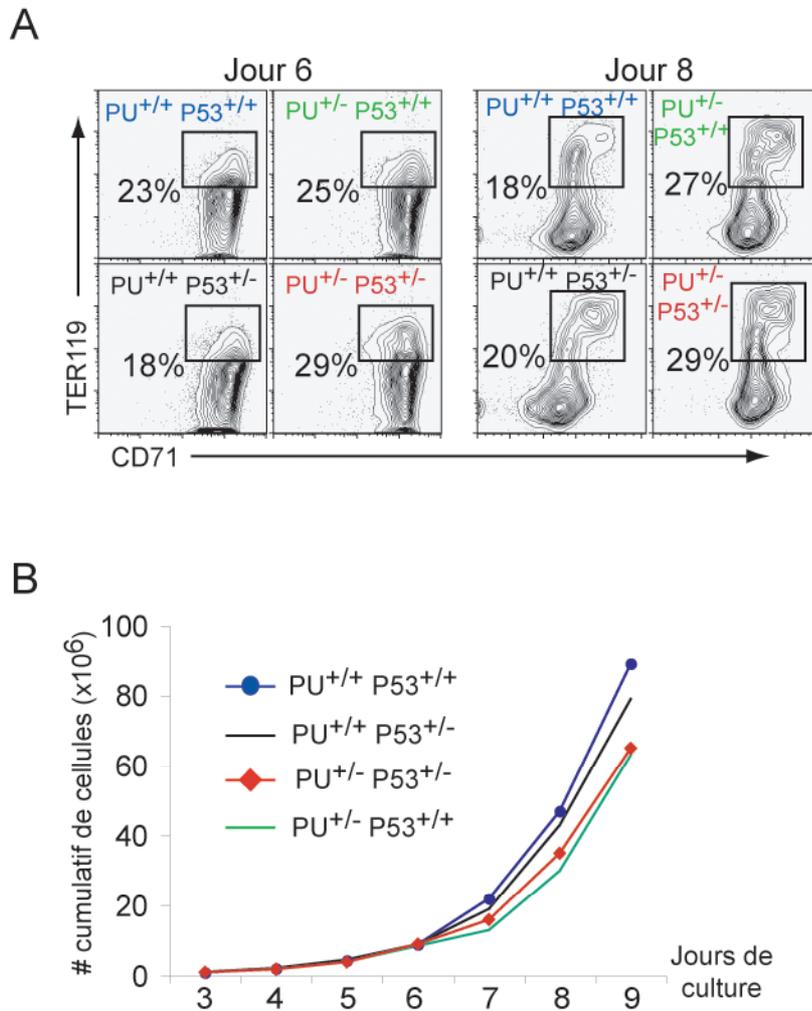


Figure R4: La perte d'un allèle P53 ne corrige pas les défauts érythroïdes des cellules PU.1^{+G}.

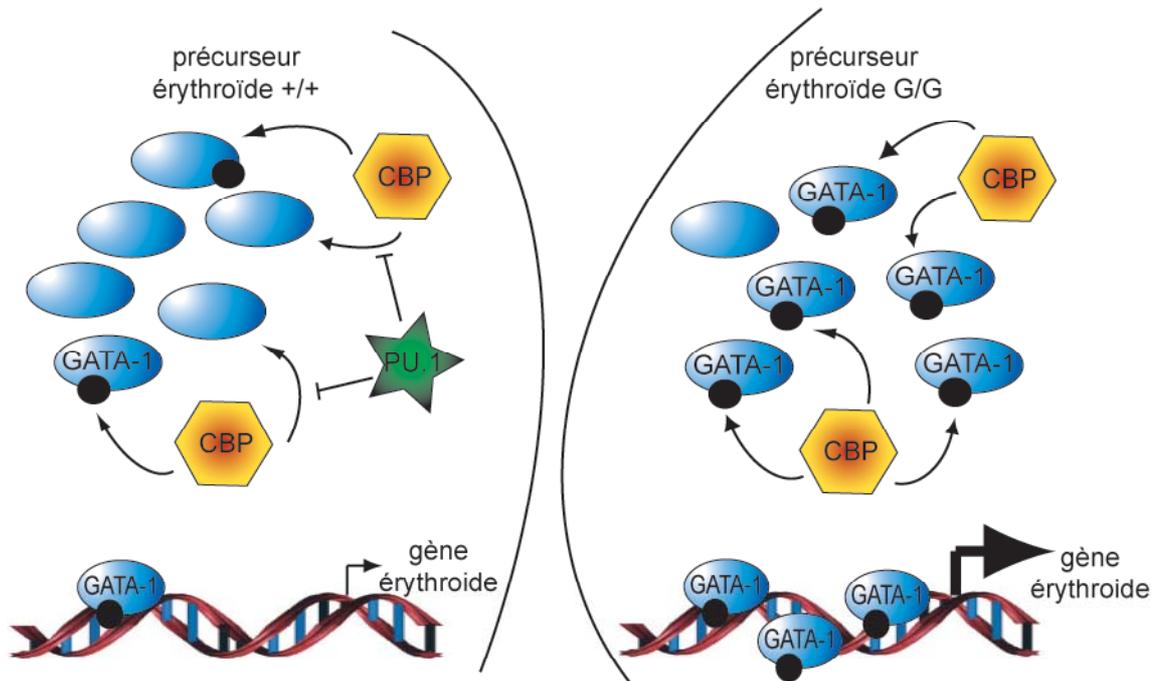
10⁵ cellules Lin⁻ (B220⁻ Gr-1⁻ TER119⁻ CD3⁻ F4/80⁻ NK1.1⁻) de moelle osseuse de souris des génotypes indiqués ont été placées en culture érythroïde (cf. Résultats partie 2). A: Analyse après 6 et 8 jours de culture de la production de cellules érythroïdes matures (TER119⁺) par les différentes cultures. Ces données sont représentatives de 3 expériences. La proportion des cellules érythroïdes matures est indiquée dans chaque graphique. B: Courbes d'amplifications des différentes cultures, entre 3 et 9 jours de culture. Ce graphique présente une expérience sur un total de 3 donnant des résultats semblables. Il n'y a pas de différence significative entre les cultures PU.1^{+G} et PU.1^{+G}P53^{+/-}.

2.2.2 L'acétylation de GATA-1 ne semble pas altérée dans les précurseurs érythroïdes PU.1^{G/G}.

L'acétylation de GATA-1 par CBP/P300 est supposée accroître son activité, et ainsi favoriser la différenciation (cf. Introduction partie 5.2.2). Or, PU.1 est capable d'inhiber l'activité acétyl-transférase de CBP. Par conséquent, l'augmentation de la différenciation des PE due à l'absence de PU.1 pourrait être, en partie, la conséquence de la suracétylation de GATA-1. Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé des immunoprécipitations avec un anticorps anti GATA-1, à partir d'extraits nucléaires de PE, soit PU.1^{+/+}, soit PU.1^{G/G} (après 3-4 jours de culture érythroïde). J'ai ensuite quantifié l'acétylation de GATA-1 par western blot, avec un anticorps anti-acétyllysine. Même si je détecte une quantité de GATA-1 plus importante dans les PE PU.1^{G/G}, le ratio de protéine GATA-1 acétylée est semblable entre les PE mutants et contrôles (cf. figure R5). Par conséquent, ce mécanisme de blocage de l'acétylation de GATA-1 par PU.1 ne semble pas pertinent dans le cadre des PE primaires.

CBP et P300 sont impliqués dans de multiples processus hématopoïétiques et peuvent jouer des rôles distincts. Ainsi, CBP semble important pour maintenir le potentiel d'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques, alors que P300 semble plus impliqué dans le processus de différenciation (Kung et al., 2000; Rebel et al., 2002). Des mutations dans le domaine KIX de P300, impliqué dans l'interaction avec c-myb et CREB notamment, conduit à de multiples déficiences hématopoïétiques (Kasper et al., 2002), alors que la mutation de ce domaine dans CBP altère peu son contrôle de l'hématopoïèse. Une observation intéressante a été apportée par Blobel *et al.*, suggérant que l'inhibition de CBP/P300 par l'expression de la protéine adénovirale E1A, dans des cellules érythroleucémiques (MEL) bloquait leur différenciation et réprimait l'expression de gènes cibles de GATA-1 (Blobel et al., 1998). Considérant l'hypothèse d'une action pour CBP/P300 favorisant la différenciation érythroïde, j'ai tenté une approche génétique pour préciser si CBP et P300 coordonnent effectivement leurs actions avec celle de PU.1 dans les PE. Pour cela, à l'instar de P53, les souris PU.1^G ont été croisées avec des souris déficientes pour CBP et P300. Malheureusement, la lignée CBP s'est révélée particulièrement difficile à amplifier dans notre animalerie.

A



B

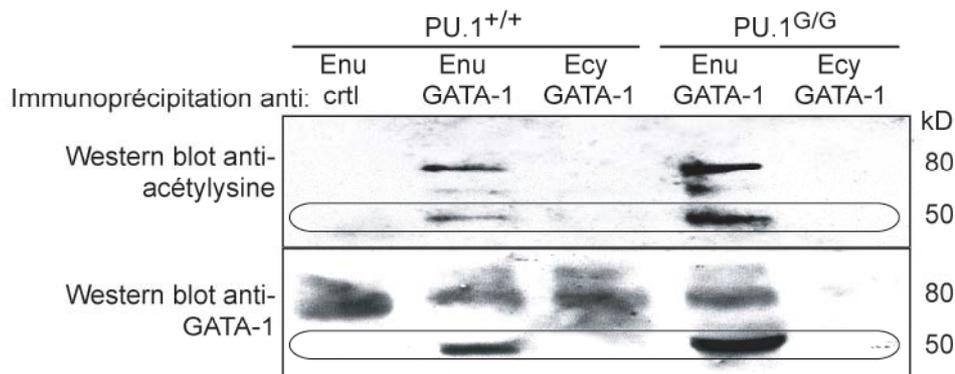


Figure R5: GATA-1 n'est pas hyper acétylé dans les PE PU.1^{G/G}.

A: Schéma décrivant l'hypothèse sous-tendante à cette expérience. Une activité d'inhibition de l'activité acétyl-transférase de CBP a été décrite pour PU.1. En conséquence l'hypothèse est que dans les PE mutants, l'activité acétyl-transférase de CBP n'est pas compromise par présence de PU.1, conduisant à une plus grande proportion de protéines GATA-1 acétylées. Ces protéines acétylées sont censées être plus efficaces transcriptionnellement. L'acétylation de GATA-1 est représentée par un cercle noir attaché à la protéine. B: Western blots anti-acétylsine et anti-GATA-1 réalisés sur les immunoprécipitations d'extraits de cultures érythroïdes PU.1^{+/+} ou PU.1^{G/G}. 500 µg d'extrait nucléaires (Enu) ou cytoplasmiques (Ecy) ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-GATA-1 ou anti-CD8 (ctrl). Un premier western-blot anti-Acétylsine a été réalisé, puis après élimination des anticorps, un second western-blot anti-GATA-1 a été effectué sur la même membrane. La taille attendue de GATA-1 est autour de 50kD (Zone encerclée).

Tout d'abord, j'ai observé que l'expression de P300 dans les PE est très inférieure à l'expression de CBP (cf. figure R6A). Ensuite, l'analyse de l'amplification des cultures érythroïdes de simples hétérozygotes indique que comme pour le cas de P53, l'hétérozygotie pour P300 ne semble pas altérer le comportement des PE. En outre, aucune différence significative dans l'amplification (cf. figure R6B) des PE doubles hétérozygotes par rapport aux PE PU.1^{+G} n'a pu être révélée. De même la proportion de cellules érythroïdes différenciées (TER119⁺) produites par les cultures doubles hétérozygotes est similaire (données non figurées). Ainsi, en corrélation avec l'observation d'une expression très faible de P300 dans les PE, la perte d'un allèle de P300 n'autorise aucune compensation du défaut d'amplification et de la différenciation accrue des PE PU.1^{+G}.

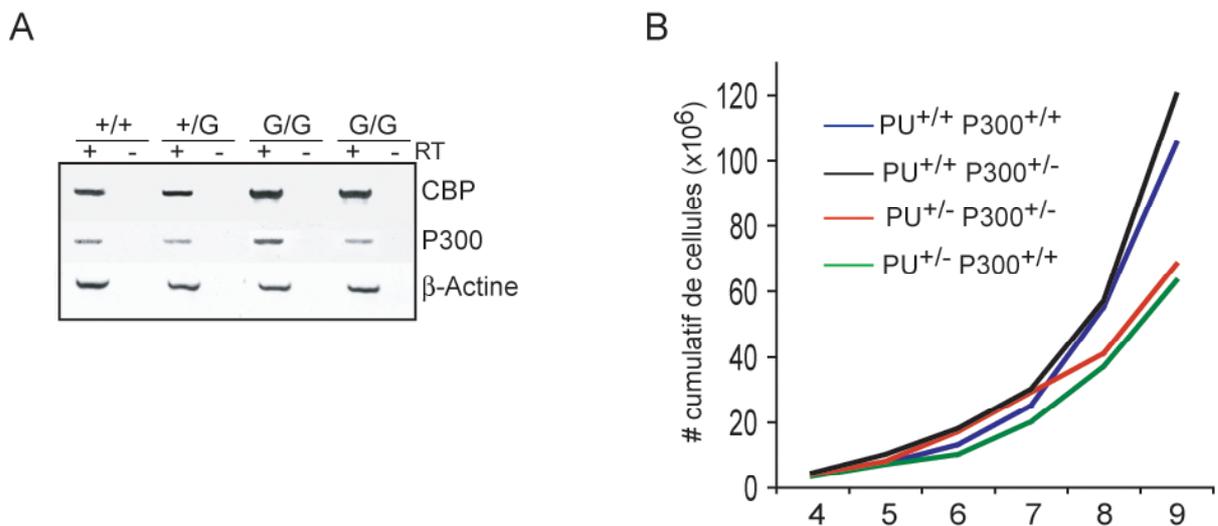


Figure R6: La perte d'un allèle de P300 ne corrige pas les défauts érythroïdes des cellules PU.1^{+G}.

A: Détection de l'expression de transcrits pour P300 et CBP dans les PE, après trois jours d'amplification en culture. CBP est exprimé environ 10 fois plus intensément que P300. B: Courbes d'amplification des différentes cultures entre 4 et 9 jours de culture. Ce graphique présente une expérience sur un total de 3 donnant des résultats semblables. Il n'y a pas de différence significative entre les cultures PU.1^{+G} et PU.1^{+G}P300^{+/-}.

3^{ème} partie. Visualisation de l'expression de PU.1 par l'intermédiaire du transgène rapporteur EGFP.

Malgré l'implication du dosage de PU.1 dans le contrôle de la différenciation, peu d'informations étaient connues quant à son rôle dans de nombreux compartiments du système hématopoïétique, comme les progéniteurs multipotents ou les cellules matures. Le manque d'outils permettant de suivre l'activité physiologique de PU.1 a sérieusement limité l'analyse de cette activité au niveau de la cellule unique ainsi que la visualisation dynamique des niveaux relatifs exprimés par différentes cellules.

Un intérêt majeur de la mutation du locus PU.1 générée au laboratoire est la présence du gène rapporteur EGFP, sous contrôle des régions régulatrices naturelles de ce locus. J'ai utilisé cet avantage, afin de visualiser précisément l'expression de PU.1 dans les différents compartiments du système hématopoïétique.

3.1 Données soumises à publication.

Les souris hétérozygotes PU.1^{+G} présentent un phénotype identique aux souris de type sauvage (à l'exception d'une tendance accrue à produire des cellules érythroïdes qui n'est révélé que dans un contexte d'érythropoïèse de stress). Les observations préliminaires ont fortement suggéré que le transgène EGFP (ou GFP pour simplifier) était un rapporteur fidèle de l'activité du locus PU.1. L'allèle porteur du transgène EGFP peut donc être utilisé comme rapporteur de l'activité du locus PU.1, dans les souris adultes, comme dans les foetus. Cette étude a révélé que l'expression de PU.1 est étendue à quasiment l'ensemble du système hématopoïétique, depuis les cellules souches jusque dans les cellules matures (à l'exception des cellules érythroïdes et T), indiquant que les fonctions de PU.1 ne semblent pas restreintes au seul processus de différenciation. PU.1 est notamment exprimé de façon hétérogène dans plusieurs populations de progéniteurs multipotents (CLP, CMP, ETP) suggérant que

l'expression de PU.1 pourrait affiner la caractérisation phénotypique de ces populations. En outre, l'analyse des populations GFP⁺ et GFP⁻, dans les hétérozygotes et les fœtus PU.1^{G/G} indique que la différenciation, mais pas l'engagement dans la voie myéloïde, requiert PU.1. Par opposition, l'engagement dans la voie lymphoïde B est bloqué par l'absence comme par l'expression à haut niveau de PU.1, même si cet engagement se traduit par un retour à une expression faible de PU.1. Toutes ces informations soulignent la régulation particulièrement dynamique de PU.1, et suggèrent de nouvelles implications pour PU.1 dans les cellules matures et en tant que marqueur précis de la différenciation.

Ces analyses sont décrites dans le manuscrit "Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis" qui a été soumis récemment à la revue Blood.

Scientific Section Heading : Hematopoiesis**Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis****Jonathan Back¹, David Allman², Susan Chan¹ and Philippe Kastner¹**

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, IGBMC CNRS/INSERM/ULP, Illkirch CU Strasbourg, France, ²Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104-6082, USA

This work was supported by institute funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National pour la Recherche Scientifique and the Hôpital Universitaire de Strasbourg, grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) #4399, #4743 and #7646 and the Ligue Régionale contre le Cancer (S.C. and P.K.), and pre-doctoral fellowships from the Ministère de la Recherche et de la Technologie and ARC (J.B.).

Correspondence: Susan Chan and Philippe Kastner
IGBMC
BP 10142
67404 Illkirch Cedex, France
Tel: 33-3-88-65-34-72
Fax: 33-3-88-65-32-01
Email: scpk@igbmc.u-strasbg.fr

Abstract: 134 words

Manuscript: 3718 words

Running title: PU.1 activity in hematopoietic cells

Abstract

PU.1 is a critical transcription factor for hematopoietic development. Although it is required for the early differentiation of myeloid, erythroid and B lineage cells, little is known about PU.1's role in multipotent progenitors and mature cell types. Using a green fluorescent protein reporter mouse line, we show here that PU.1 is dynamically and heterogeneously expressed in many hematopoietic lineages, from the stem cell stage to terminally differentiated cells, suggesting that PU.1 is important not only in early differentiation events but also may play a role in mature hematopoietic cell function. Further, examination of GFP⁺ versus GFP⁻ populations shows that differentiation, but not commitment, to the myeloid lineage requires PU.1. In contrast, B cell commitment requires low levels of PU.1, but is blocked in the presence of high PU.1 levels, or no PU.1 at all.

Introduction

Hematopoiesis is coordinated by sets of transcription factors that function in concert to influence self-renewal, cell fate choice and differentiation. PU.1, an ets family member that is expressed exclusively in hematopoietic cells, plays an important role in these processes. PU.1 has been characterized as a master regulator of myeloid and B cell development, as graded levels of this factor in multipotent progenitors can alter the cell fate choice between the B cell and myeloid lineage¹. Graded levels of PU.1 in myeloid cells have also been shown to block differentiation and cause myeloid leukemias², or to regulate macrophage versus neutrophil cell fate³. Furthermore, PU.1 is required for mast and dendritic cell differentiation, and plays a role in early T lymphopoiesis⁴⁻⁸. More recently, we have shown that very low levels of PU.1 in erythroid progenitors are necessary for maintaining the self-renewal capacity of these cells⁹. Clearly, slight changes in PU.1 activity can have a significant impact on hematopoietic differentiation and/or function.

Despite its importance, surprisingly little is known about the potential role of PU.1 in other hematopoietic cell types, such as pluripotent progenitors and mature cell populations. Previous attempts to evaluate PU.1 function in these cells have been hampered by the lack of suitable physiological tools, and instead have relied on traditional mRNA detection methods to investigate PU.1 expression in bulk populations¹⁰⁻¹². Caveats to these studies included lack of information at the single cell level, relative levels of expression and the inability to follow live the PU.1-expressing cells in question. Although progress has been made to examine PU.1 mRNA expression in single cells¹³, many limitations remain.

We recently described the generation of a green fluorescent protein (GFP) reporter line of PU.1-deficient mice⁹. The PU.1^G mutation was engineered by targeting EGFP cDNA into exon 1 of the PU.1 locus by homologous recombination. The resulting heterozygote PU.1^{+G} mice expressed PU.1 from one allele and GFP from the other. Homozygote PU.1^{G/G} animals expressed 2 copies of the GFP reporter and were null for PU.1. In this study, we present an in-depth analysis of PU.1 expression, and its relative levels, from hematopoietic stem cells to mature cell types. Our results show that PU.1 is dynamically expressed, and reveal an unexpected heterogeneity within previously defined populations of multipotent progenitors.

Materials and Methods

Mice

The PU.1^G mouse line has previously been described⁹. The 6- to 10-week-old mice used in this study were maintained under specific pathogen-free (SPF) conditions, and have been backcrossed more than 7 generations onto the C57Bl/6 genetic background. Many experiments used mice from a 10th backcross generation. All gave similar results.

Antibodies and flow cytometry

For staining of HSCs, CMPs, GMPs and MEPs, the following antibodies were used: biotin-anti-CD34, phycoerythrin (PE)-anti-IL7R α A7R34), PE-anti-Lineage (Lin; B220, CD3, NK1.1, Gr-1, CD5, TER119, CD19), PE-Cy5.5-anti-Sca-1, PE-Cy7-anti-CD16, APC-Cy7-anti-c-Kit (2B8), APC-anti-AA4.1. For staining of CLPs and B lineage cells, we used biotin-anti-IL7R, PE-anti-Flt3, PE-Cy5.5-anti-Sca-1, PE-Cy7-anti-Lin, APC-Cy7-anti-c-Kit, APC-anti-AA4.1, PE-anti-CD43, PE-Cy7-anti-B220, APC-Cy7-anti-IgM or PE-anti-IgM, PerCP-Cy5.5-anti-CD19, biotin-anti-CD11b. The above antibodies were purified and conjugated in our laboratories according to standard protocols. For staining of DC subsets, we used PE-anti-CD11c, APC-anti-120G8, biotin-anti-CD8 α , APC-anti-CD11b. For staining of NK and NKT cells, we used PE-anti-NK1.1, purified-antiCD3. For staining of ETPs, we used purified-anti-Lin antibodies (B220, CD3, CD8, NK1.1, TCR $\gamma\delta$, CD11b, Gr-1, TER119), PE-anti-CD25, biotin-anti-c-Kit. Secondary antibodies included: streptavidin (SA)-CascadeBlue, SA-PerCP, SA-Cy5 and Cy5-anti-ratIgG (the latter two from Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA). For sorting experiments, Lin⁺ cells were depleted using the following antibodies: B220, CD3, Gr-1, F4/80, TER119, and NK1.1. Unless specified, all antibodies were from BD Biosciences (BD Pharmingen, San Diego, CA). Samples were analyzed or sorted using a FacsCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA), an Epics Elite (Coulter Electronics, Hialeah, FL), a FACSVantage SE option DiVa (BD Biosciences) or a MoFlo cell sorter (Cytomation, Fort Collins, CO). Sort purity was >90% for culture assays and >95% for RNA experiments. Results were analyzed using the FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Methylcellulose colony assays

Lin⁻ populations were obtained from WT and PU.1^{+G} BM cells, or PU.1^{+G} and PU.1^{G/G} FL cells. Colonies were obtained as follows: cells were plated in triplicate in 3.5cm plates with 1.1ml of the semi-solid methylcellulose medium M3434 (StemCell Technologies, Vancouver,

BC) containing erythropoietin (Epo), stem cell factor (SCF), interleukin (IL)-3 and IL-6, according to the manufacturer's recommendations, and cultured at 37°C. After 7 days, the cultures were stained with a benzidine solution (2mg/ml benzidine, 0.5% glacial acetic acid, 0.5% H₂O₂). Large colonies containing only darkly-stained cells were counted as BFU-E (erythroid burst-forming unit), colonies containing a mix of darkly-stained and unstained cells were counted as mixed erythro-myeloid colonies. Pure unstained colonies were counted as myeloid-only colonies (CFU-GM, CFU-M, CFU-G). In some cases, colonies were picked and their cells stained with May-Grünwald-Giemsa to confirm their identity.

May-Grünwald-Giemsa staining

Cells were cytospun (~10⁵ cells per slide) at 700 rpm for 5 min onto glass slides, and stained with May-Grünwald followed by Giemsa, according to standard protocols.

RT-PCR

RNA was isolated from 1-3x10⁵ cells using the RNeasy Kit (Qiagen SA, Valencia, CA), and resuspended in 12µl H₂O. 3µl RNA were used in the RT reactions (20µl). 1-2µl of cDNA were used for the PCR. PCRs were performed as follows: 94°C for 5 min, followed by *n* cycles of 94°C 1 min, 60°C 1 min and 72°C 1 min (*n*=26-35 depending on the gene). The following primers were used.

Gene	Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
C/EBPα	AAG GCC AAG AAG TCG GTG GA	CAG TCC ACG GCT CAG CTG TT
C/EBPϵ	ACC AGT CGA GGC AGC TAC AA	CCC GAC ACC CTT GAT GAG
SCL	ACC TCA CGG CAA GCT AAG TAA	ACG CCG TTG AGC AGG ACT A
EKLF	ACC ACC CTG GGA CAG TTT CT	GAA GGG TCC TCC GAT TTC AG
GATA-1	GGG AGC TGA CTT TCC CAG T	GTC TCC TCT GCC ACA AGG TC
GATA-2	CAA GGA TGG CGT CAA GTA CC	ACA GTA ATG GCG GCA CAA G
GATA-3	GTC GGC CAG GCA AGA TGA	CAG GGC TCT GCC TCT CTA AC
GM-CSFR	GAG GTC ACA AGG TCA AGG TG	GAT TGA CAG TGG CAG GCT TC
IL7R	GGA GGA TCA CTC CTT CTG GT	CCC ATC CTC CTT GAT TCT TG
β Actin	GTG ACG AGG CCC AGA GCA AGA G	AGG GGC CGG ACT CAT CGT ACT
c-fms	CTGAGTCAGAAGCCCTTCGACAAAG	CTTTGCCAGACCAA AGGCTGTAGC
EBF	AGC CCG TGG AGA TTG AGA G	CGG ATG GCA TGA GGA GTT AT
GFP	GTG GAT CGA TCT GAG AAC TT	GCG GAT CTT GAA GTT CAC
PU.1	GGA TCT GAC CAA CCT GGA GC	AGC ACC TCG CCG CTG AA

Results

HSCs and pluripotent progenitor populations show distinct levels of PU.1 activity

PU.1 has been shown to be expressed at the mRNA level in hematopoietic stem cells (HSCs) and their downstream, lineage-restricted progenitor populations^{10,11,14}. Using GFP as a marker of PU.1 activity, we evaluated the proportion of HSCs, common myeloid progenitors (CMPs), granulocyte-myeloid progenitors (GMPs), megakaryocyte-erythroid progenitors (MEPs) and common lymphoid progenitors (CLPs) that express GFP, and its relative levels, by analyzing heterozygote PU.1^{+G} bone marrow (BM) cells, using multi-parameter flow cytometry. As shown in Figure 1, all of the progenitor populations analyzed contained significant numbers of GFP⁺ cells. However, the levels of GFP varied among cell populations. The majority of Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD34⁻ cells, corresponding to long-term reconstituting (LT)-HSCs, expressed low to medium levels of GFP while a high percentage of Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD34⁺ short-term reconstituting (ST)-HSCs expressed markedly higher GFP levels (Fig. 1A). Strong GFP expression was also detected in both CMPs and CLPs (Fig. 1A,B), each of which contained similar proportions of GFP^{hi} and GFP^{med} cells. Interestingly, the more mature GMPs and MEPs showed sharply divergent patterns of PU.1 activity. GMPs were almost exclusively GFP^{hi}, while MEPs expressed very low levels of the reporter. In the thymus, early T lineage progenitors (ETPs) appeared to be the only population to contain GFP^{hi} cells (Fig. 1C). Pre-T, all subsequent thymocyte populations and mature peripheral T lymphocytes expressed no detectable GFP above background levels. These data indicate a highly dynamic pattern of PU.1 gene activity as HSCs progress from the stem cells to committed progenitors.

Myeloid differentiation correlates with increasing PU.1 activity

High PU.1 expression has been shown to induce myeloid differentiation^{1,15,16}. We therefore evaluated the capacity of immature PU.1^{+G} BM cells expressing high or low/negative levels of GFP to differentiate along the myeloid lineage. Lin⁻ GFP⁺ and GFP^{-/lo} cells were first examined at the morphological level and for their level of PU.1 expression (Fig. 2A). Both populations were morphologically similar and appeared blastic. Further, GFP⁺ cells expressed significant levels of PU.1 mRNA while GFP^{-/lo} cells showed very low PU.1 and GFP mRNA levels. Low GFP/PU.1 expression in the GFP^{-/lo} population was unlikely to reflect contamination from GFP⁺ cells, as it consistently appeared with cells sorted from the BM but not the fetal liver (FL)(see Fig. 6). Together, these results confirm our previous data showing the high fidelity of the GFP reporter to the transcriptional activity of the PU.1 locus⁹.

We then tested the colony-forming activity of Lin⁻ GFP⁺ and GFP^{-/lo} BM cells from PU.1^{+G} mice (Fig. 2B). The majority of progenitors within the GFP⁺ population predominantly gave rise to pure myeloid-lineage colonies (CFU-GM, CFU-G, and CFU-M). In contrast, GFP^{-/lo} cells produced a broader range of colonies, about half of which were mixed colonies containing erythroid and myeloid cells. Surprisingly, GFP^{-/lo} cells also gave rise to many pure myeloid-lineage colonies. These colonies were different from those generated from GFP⁺ cells in several respects. GFP^{-/lo} colonies were large and diffuse, and contained mostly immature myeloblasts expressing low surface levels of lineage markers, while GFP⁺ colonies were small and contained terminally differentiated myeloid cells (neutrophils and macrophages) expressing high levels of lineage markers (Fig. 2C). These data indicate that differing PU.1 levels distinguish immature progenitors with high proliferative potential from myeloid-committed cells which have a limited capacity to proliferate.

Lastly, we investigated how PU.1 is regulated throughout myeloid differentiation. Although PU.1 was strongly expressed at all stages of neutrophil differentiation, its activity significantly increased with differentiation in the BM (Fig. 2D). Terminally differentiated neutrophils and macrophages, in the BM and periphery, expressed very high levels of PU.1 activity. Among all hematopoietic cell types, these cells expressed the most GFP.

PU.1 is dynamically controlled during B cell development

B cell commitment has been shown to require low levels of PU.1¹, but it is unclear how PU.1 is expressed at later stages of differentiation. We therefore analyzed GFP/PU.1 levels in B cell subpopulations corresponding to different stages of differentiation in the BM and periphery of PU.1^{+G} mice. BM B cells, as distinguished by their unique combination of the surface markers B220, CD43, CD19, AA4.1 and IgM, were divided into subpopulations of increasing maturity (Fractions B to E). These fractions exhibited rising levels of PU.1 activity in direct correlation with their maturity stage (Fig. 3A). Immature Fraction B/C cells expressed low GFP levels, Fraction D cells expressed low to medium levels, and a large portion of Fraction E cells expressed medium levels of GFP. Increasing GFP levels were also detected in the transitional B cell populations of the spleen. The most immature T1 population exhibited markedly lower GFP levels than the more mature T2 and T3 populations, with T2 cells expressing the highest GFP among the transitional populations (Fig. 3B). Lastly, mature B cells expressed the most PU.1 activity within the B cell lineage. Nevertheless, subtle differences were detected within peripheral B cell subsets. Follicular B cells in the spleen,

lymph nodes, peritoneal cavity (B2 cells), as well as circulating B cells of the BM (Fraction F), consistently expressed lower GFP levels than marginal zone (MZ) B cells of the spleen and B1 cells of the peritoneal cavity (Fig. 3). That MZ and B1 B cells expressed similar levels of GFP supports the concept that these two lineages are related¹⁷. Collectively, our data demonstrate that PU.1 is increasingly expressed in maturing B cells and that B cell subsets can be distinguished on the basis of their PU.1 activity. Interestingly, most B cell populations also contained a significant GFP^{-lo} population; these cells, however, expressed similar levels of PU.1 mRNA when compared with GFP⁺ cells (not shown), suggesting that PU.1 might often be mono-allelically transcribed in B cells.

Dendritic cell subsets exhibit distinct levels of PU.1 activity

Dendritic cells (DCs) are a heterogeneous population of cells specialized in antigen processing and presentation. Previous studies have found that both lymphoid and myeloid-derived DC development are disrupted in PU.1-deficient mice^{5,4}. We analyzed PU.1 activity in these DC subsets, as well as in the plasmacytoid DC (pDC) population. CD11c⁺CD11b⁺ myeloid DCs showed strikingly high levels of PU.1 activity in the BM and spleen, with GFP levels comparable to those detected in BM neutrophils (Fig. 4A,C). Splenic CD11c⁺CD8 α ⁺ lymphoid DCs were also GFP⁺ albeit at lower levels than myeloid DCs (Fig. 4C); reporter expression was much more subdued in thymic CD11c⁺CD8 α ⁺ DCs (Fig. 4B). Finally, pDCs, as detected by the markers CD11c and 120G8¹⁸, exhibited very low levels of GFP, both in the BM and the spleen. Collectively, these data indicate that DC subsets express distinct levels of PU.1, suggesting differential requirements for PU.1 in their differentiation and/or function.

NK and NKT cells show no detectable PU.1 activity

Natural killer (NK) and natural killer T (NKT) cells are derived from CLPs and/or ETPs^{11,19}, which show bimodal expression of the GFP reporter. We tested GFP expression in these lymphoid-related cells. As shown in Fig. 5, both NK and NKT cells expressed background levels of GFP in the BM, thymus and spleen. Thus, these populations are similar to T cells in their PU.1-negativity.

Lineage commitment in the absence of PU.1

Homozygote, PU.1-null PU.1^{G/G} animals die at birth⁹, but their FL cells can also be divided into GFP⁺ and GFP⁻ populations (Fig. 6A). In contrast to BM cells (see Fig. 2), no residual

PU.1 or GFP expression was detected in FL GFP⁻ cells (Fig. 6B). To determine how loss of PU.1, and differential activity of the PU.1 locus, affects the colony-forming activity of these populations, we analyzed Lin⁻ GFP⁺ and GFP⁻ FL cells from 17.5 day post-coitum (dpc) PU.1^{G/G} and PU.1^{+G} fetuses (Fig. 6A). Strikingly, only the GFP⁺ population from both genotypes contained cells with significant potential to become erythroid, myeloid or mixed erythro-myeloid colonies, in agreement with our previous findings that erythroid progenitors arise from GFP⁺ cells⁹. Interestingly, the overall distribution of these FL-derived colony-forming progenitors was strikingly different from that derived from adult BM cells, where most multipotent progenitors were confined to the GFP^{-/lo} population. In addition, PU.1^{+G} cells gave rise to mature granulocytes while PU.1^{G/G} cells were arrested at the promyelocyte stage of differentiation (not shown), in agreement with the previously demonstrated requirement for PU.1 in terminal myeloid differentiation^{20,21}. Thus, although GFP expression is clearly associated with colony-forming potential, PU.1 does not appear to play a significant role in directing or maintaining the identity of colony-forming progenitors.

We next analyzed the expression of a panel of genes implicated in the engagement and/or differentiation of hematopoietic progenitors in Lin⁻ GFP⁺ and GFP⁻ FL cells freshly isolated from PU.1^{G/G} and PU.1^{+G} fetuses (Fig. 6B). Among the myeloid lineage genes, GM-CSFR and the M-CSFR-encoding *c-fms* were strongly expressed in PU.1^{+G} but not PU.1^{G/G} GFP⁺ cells, in agreement with previous observations that these genes are expressed fairly late in myeloid differentiation while myeloid development is blocked early in PU.1-null fetuses, and that they are direct PU.1 target genes^{22,23}. Interestingly, *c-fms* was also weakly expressed in PU.1^{+G} GFP⁻ cells, suggesting possible promiscuous transcription of this gene in early progenitors. Moreover, weak *c-fms* expression was still detected in PU.1^{G/G} GFP⁻ cells, indicating that this early transcription is not critically dependent on PU.1. In contrast, C/EBP α and C/EBP ϵ were expressed only in the GFP⁺ fraction of both PU.1^{+G} and PU.1^{G/G} cells. As C/EBP α is considered an early marker of myeloid commitment and C/EBP ϵ a marker of granulocyte commitment, their restricted expression in GFP⁺ PU.1-deficient FL cells indicate that at least some GFP⁺ progenitors have committed to the myeloid lineage, and that this occurs independently of PU.1. Furthermore, our results also indicate that PU.1 does not autoregulate its expression, as has been suggested²⁴, since both PU.1^{+G} and PU.1^{G/G} erythro-myeloid progenitors expressed comparable GFP levels.

Among B cell lineage genes, those linked to B cell commitment such as Pax5, IL-7R and EBF were observed only in the GFP⁻ population of PU.1^{+G} cells and undetectable in

PU.1^{G/G} cells (Fig. 6B). Together with our observations that immature B cells express low levels of GFP, and that these genes are expressed in a similar manner in GFP⁻ BM cells of adult PU.1^{+G} mice (not shown), these data indicate that B cell commitment requires very low levels of PU.1, while high PU.1 levels, or its absence, blocks commitment.

Strikingly, genes associated with the erythroid lineage (ie. EpoR, EKLF, SCL, GATA-1) were expressed quite differently in PU.1^{+G} versus PU.1^{G/G} populations (Fig. 6B). They were strongly expressed in PU.1^{+G} GFP⁻ cells, but were expressed equally well in both the GFP⁻ and GFP⁺ fractions of homozygote PU.1^{G/G} cells. Similarly, GATA-2 and GATA-3, associated with immature hematopoietic differentiation, were mainly expressed in the GFP⁻ fraction of PU.1^{+G} cells, but were prominent in the GFP⁺ fraction of PU.1^{G/G} cells. These data suggest a possible role for PU.1 in repressing these genes.

Discussion

Our study of the GFP reporter in PU.1^{+G} mice provides the first comprehensive single cell analysis of PU.1 activity in hematopoietic cells. We show that GFP is a faithful reporter of PU.1 activity, and that the relative levels of GFP expression reflect PU.1 levels in most contexts (with the possible exception of B cells). Notably, we find that GFP/PU.1 is dynamically regulated in different lineages, increasing dramatically with differentiation in myeloid cells, only moderately in B cells, and losing all detectable expression in T, NK and NKT cells. Furthermore, our findings that PU.1 is constitutively expressed by mature myeloid cells, peripheral B cells and some splenic DC subsets suggest that PU.1 is important not only in early differentiation events but may also play a role in mature hematopoietic cell function.

Our results underscore the distinct roles of PU.1 in the commitment and differentiation of various hematopoietic lineages. We demonstrate that commitment to the myeloid lineage does not require PU.1 but that differentiation does, as myeloid-dedicated colonies can arise from heterozygote PU.1^{+G} GFP^{-/lo} BM cells and homozygote (PU.1-null) PU.1^{G/G} FL cells (Fig. 6), but many more myeloid-committed progenitors are consistently detected in PU.1/GFP-expressing PU.1^{+G} BM cells than the GFP^{-/lo} fraction (Fig. 2). That PU.1 is associated with, but not required for, myeloid commitment is also shown by the restricted expression of C-EBP α and ϵ in PU.1^{G/G} GFP⁺ FL cells. These data are in agreement with previous reports that early myeloid progenitors are present in PU.1-null Fls^{20,21}. In striking contrast, B cell commitment requires low levels of PU.1, and is blocked either in the presence of high PU.1 levels, or no PU.1 at all.

Interestingly, colony-forming activity differs between BM and FL cells, indicating a differential dependence on PU.1 between adult and fetal progenitors. While multipotent progenitors are mostly GFP⁺ at the fetal stage, they no longer express high GFP levels in the adult BM. These findings are consistent with previous evidence showing differences between fetal and adult hematopoiesis. For instance, lymphoid-restricted CLPs are particular to the BM, as FL progenitors always retain bipotent lymphoid-macrophage potential²⁵⁻²⁸. FL HSCs have also been shown to have more long-term repopulating power^{29,30}.

Does PU.1 activity signify a requirement for PU.1? This question has yet to be investigated in great detail for a variety of progenitors. PU.1 is expressed in some HSCs, CMPs and CLPs, suggesting a possible function in these early precursors. In this respect, PU.1 plays a role in FL HSC self-renewal³¹, similar to our findings in immature erythroid progenitors⁹.

Finally, our analyses of pluripotent progenitors reveal an unexpected heterogeneity among populations previously taken to be homogeneous. The observation that HSCs, CMPs, CLPs and ETPs are heterogeneous for PU.1 activity strongly suggests that these cells can be further subdivided and analyzed for their differentiation potential. In Figure 7, we display a summary of PU.1 activity during hematopoietic development. Seen together, it is tempting to speculate that committed populations already exist within multipotent progenitor populations. High and low PU.1 levels in CMPs, for example, may indicate an early step in the commitment towards a myeloid or erythro/megakaryocyte fate, respectively. As CMPs contain many progenitors that generate pure-myeloid colonies in vitro¹⁰, PU.1 expression may identify these early myeloid-committed cells. Furthermore, our observation that multipotent progenitors reside mostly in the Lin⁻ GFP^{-/lo} population suggests that CMP GFP^{-/lo} cells may be similarly enriched for these cells. Likewise, CLPs, precursors of B and T cells, can be split into high and low GFP-expressing populations. Immature B cells express very low levels of GFP, while ETPs express high levels of GFP, suggesting that some low GFP-expressing CLPs might already be B cell committed while high GFP-expressing CLPs might be T cell committed. Future experiments using the GFP reporter as a basis to purify subpopulations of progenitors to assess their differentiation potential will be of great interest, both to determine the importance of PU.1 for differentiation and for defining more homogeneous progenitor populations.

Acknowledgements

We thank C. Asselin-Paturel and G. Trinchieri for the 120G8 antibody; J. Barths and C. Ebel for help with flow cytometry; F. Memedov and M. Gendron for animal husbandry.

References

1. DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. 2000;288:1439-1441.
2. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet*. 2004;36:624-630.
3. Dahl R, Walsh JC, Lancki D, et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol*. 2003;4:1029-1036.
4. Anderson KL, Perkin H, Surh CD, Venturini S, Maki RA, Torbett BE. Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2000;164:1855-1861.
5. Guerriero A, Langmuir PB, Spain LM, Scott EW. PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood*. 2000;95:879-885.
6. Spain LM, Guerriero A, Kunjibettu S, Scott EW. T cell development in PU.1-deficient mice. *J Immunol*. 1999;163:2681-2687.
7. Anderson MK, Weiss AH, Hernandez-Hoyos G, Dionne CJ, Rothenberg EV. Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity*. 2002;16:285-296.
8. Walsh JC, DeKoter RP, Lee HJ, et al. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity*. 2002;17:665-676.
9. Back J, Dierich A, Bronn C, Kastner P, Chan S. PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells. *Blood*. 2004;103:3615-3623.
10. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404:193-197.
11. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997;91:661-672.
12. Anderson MK, Hernandez-Hoyos G, Diamond RA, Rothenberg EV. Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development*. 1999;126:3131-3148.
13. Miyamoto T, Iwasaki H, Reizis B, et al. Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell*. 2002;3:137-147.
14. Hu M, Krause D, Greaves M, et al. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes & Development*. 1997;11:774-785.
15. Nerlov C, Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev*. 1998;12:2403-2412.

16. McIvor Z, Hein S, Fiegler H, et al. Transient expression of PU.1 commits multipotent progenitors to a myeloid fate whereas continued expression favors macrophage over granulocyte differentiation. *Exp Hematol.* 2003;31:39-47.
17. Martin F, Kearney JF. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev.* 2000;175:70-79.
18. Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin JJ, Briere F, Trinchieri G. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol.* 2003;171:6466-6477.
19. Allman D, Sambandam A, Kim S, et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol.* 2003;4:168-174.
20. DeKoter RP, Walsh JC, Singh H. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *Embo J.* 1998;17:4456-4468.
21. Henkel GW, McKercher SR, Leenen PJ, Maki RA. Commitment to the monocytic lineage occurs in the absence of the transcription factor PU.1. *Blood.* 1999;93:2849-2858.
22. Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol.* 1995;15:5830-5845.
23. Zhang DE, Hetherington CJ, Chen HM, Tenen DG. The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol.* 1994;14:373-381.
24. Chen H, Ray-Gallet D, Zhang P, et al. PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene.* 1995;11:1549-1560.
25. Cumano A, Paige CJ, Iscove NN, Brady G. Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. *Nature.* 1992;356:612-615.
26. Lacaud G, Carlsson L, Keller G. Identification of a fetal hematopoietic precursor with B cell, T cell, and macrophage potential. *Immunity.* 1998;9:827-838.
27. Mebius RE, Miyamoto T, Christensen J, et al. The fetal liver counterpart of adult common lymphoid progenitors gives rise to all lymphoid lineages, CD45⁺CD4⁺CD3⁻ cells, as well as macrophages. *J Immunol.* 2001;166:6593-6601.
28. Lu M, Kawamoto H, Katsube Y, Ikawa T, Katsura Y. The common myelolymphoid progenitor: a key intermediate stage in hemopoiesis generating T and B cells. *J Immunol.* 2002;169:3519-3525.
29. Rebel VI, Miller CL, Eaves CJ, Lansdorp PM. The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. *Blood.* 1996;87:3500-3507.

30. Harrison DE, Zhong RK, Jordan CT, Lemischka IR, Astle CM. Relative to adult marrow, fetal liver repopulates nearly five times more effectively long-term than short-term. *Exp Hematol.* 1997;25:293-297.
31. Kim HG, De Guzman CG, Swindle CS, et al. The ETS-family transcription factor, PU.1, is necessary for the maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood.* 2004.

Figure Legends

Figure 1 – PU.1 activity in HSC and pluripotent progenitor populations.

GFP levels expressed by: **A)** BM Lin⁻cKit⁺Sca1⁺CD34⁻ and CD34⁺ stem cell populations, CMPs, GMPs, MEPs; **B)** BM CLPs; **C)** ETPs in the thymus, pre-T cells and more mature thymocyte populations. Gates and arrows signify the successive populations that were analyzed. Numbers indicate the percentage of gated cells in each histogram. White histograms indicate PU.1^{+G} cells, grey histograms indicate WT cells. Plots are representative of 4 experiments.

Figure 2 – Myeloid differentiation is correlated with rising PU.1 activity.

A) Sorted populations of BM Lin⁻ GFP⁺ and GFP^{-/lo} progenitor cells show similar morphology (May-Grunwald-Giemsa stainings) and fidelity of the GFP reporter, as shown by RT-PCR.

B) In vitro differentiation of purified BM Lin⁻ GFP⁺ and GFP^{-/lo} cells over 7 days using the indicated cytokines. Ery, erythroid-pure colonies (BFU-E). Myel, myeloid-pure colonies (CFU-GM, CFU-G, and CFU-M). Ery/myel, mixed erythro-myeloid colonies. GM-CSF induces CFU-GM and CFU-M. M-CSF induces CFU-M.

C) Phenotype of myeloid-only colonies arising from GFP^{-/lo} or GFP⁺ progenitors, after 7 days of culture in IL-3, IL-6, SCF and EPO. Left panels show a binocular view (20x amplification) of the size of typical colonies. Center panels show a May-Grunwald-Giemsa staining of cytopun cells from a typical colony. Histograms show the Lineage staining of total colonies from representative cultures (Lin: B220, CD3, Gr-1, F4/80, TER119, NK1.1).

D) Flow cytometry analysis of myeloid populations from BM and peritoneal cavity (PC). Boxes in the contour plots signify the populations that were analyzed for GFP expression. The GFP mean fluorescence intensity for each gated population is indicated in the histograms. White histograms indicate PU.1^{+G} cells, grey histograms indicate WT cells. One representative experiment out of four.

Figure 3 – Dynamic changes in PU.1 activity during B cell development.

GFP expression in: **A)** BM pro-B cells (Fraction B/C, left panels), and immature and mature B cells (Fractions D to F in ascending order, right panels); **B)** transitional splenic B cells (left panels), follicular (Fo) and marginal zone (MZ) B cells; **C)** lymph node (LN, left panels) and peritoneal cavity (PC, right panels) B lymphocytes. Boxes in the contour plots signify the populations that were analyzed for GFP expression. White histograms indicate PU.1^{+G} cells, grey histograms indicate WT cells. One representative experiment out of four.

Figure 4 – PU.1 activity is strikingly distinct in subpopulations of dendritic cells.

GFP expression in CD11c⁺ **A)** BM, **B)** thymic and **C)** splenic myeloid (CD11c⁺CD11b⁺) DCs, lymphoid (CD11c⁺CD8 α ⁺) DCs and plasmacytoid (pDC, CD11c⁺120G8⁺) DCs. Boxes in the contour plots signify the populations that were analyzed for GFP expression. White histograms indicate PU.1^{+G} cells, grey histograms indicate WT cells. One representative experiment out of three.

Figure 5 – Natural killer and NKT cells do not express detectable PU.1 activity.

GFP expression in NK (BM, spleen) and NKT (BM, spleen, thymus) cells. White histograms indicate PU.1^{+G} cells, grey histograms indicate WT cells. One representative experiment out of three.

Figure 6 – Lineage commitment in the absence of PU.1.

A) PU.1^{+G} or PU.1^{G/G} Lin⁻ FL (17.5 dpc) cells were sorted into GFP⁻ or GFP⁺ populations (left panels) and cultured with the indicated cytokines for 7 days (right panels). Erythroid, myeloid and erythro-myeloid colonies were quantified, as described in Fig. 2.

B) Similarly purified GFP⁻ or GFP⁺ populations were analyzed by RT-PCR for their gene expression. (+) or (-) RT indicates the presence or not of reverse transcriptase in the assay. The arrows in the C/EBP α lanes indicate the specific band. One representative experiment out of three.

Figure 7 – Summary of PU.1 activity during hematopoiesis.

GFP analyses in early and late progenitor populations, and mature cell types, show a dynamic regulation of PU.1 activity during differentiation, revealing unexpected heterogeneity within defined progenitor populations. EP, CD71^{hi}TER119⁻ BM cells; Mature erythroid, TER119⁺ cells.

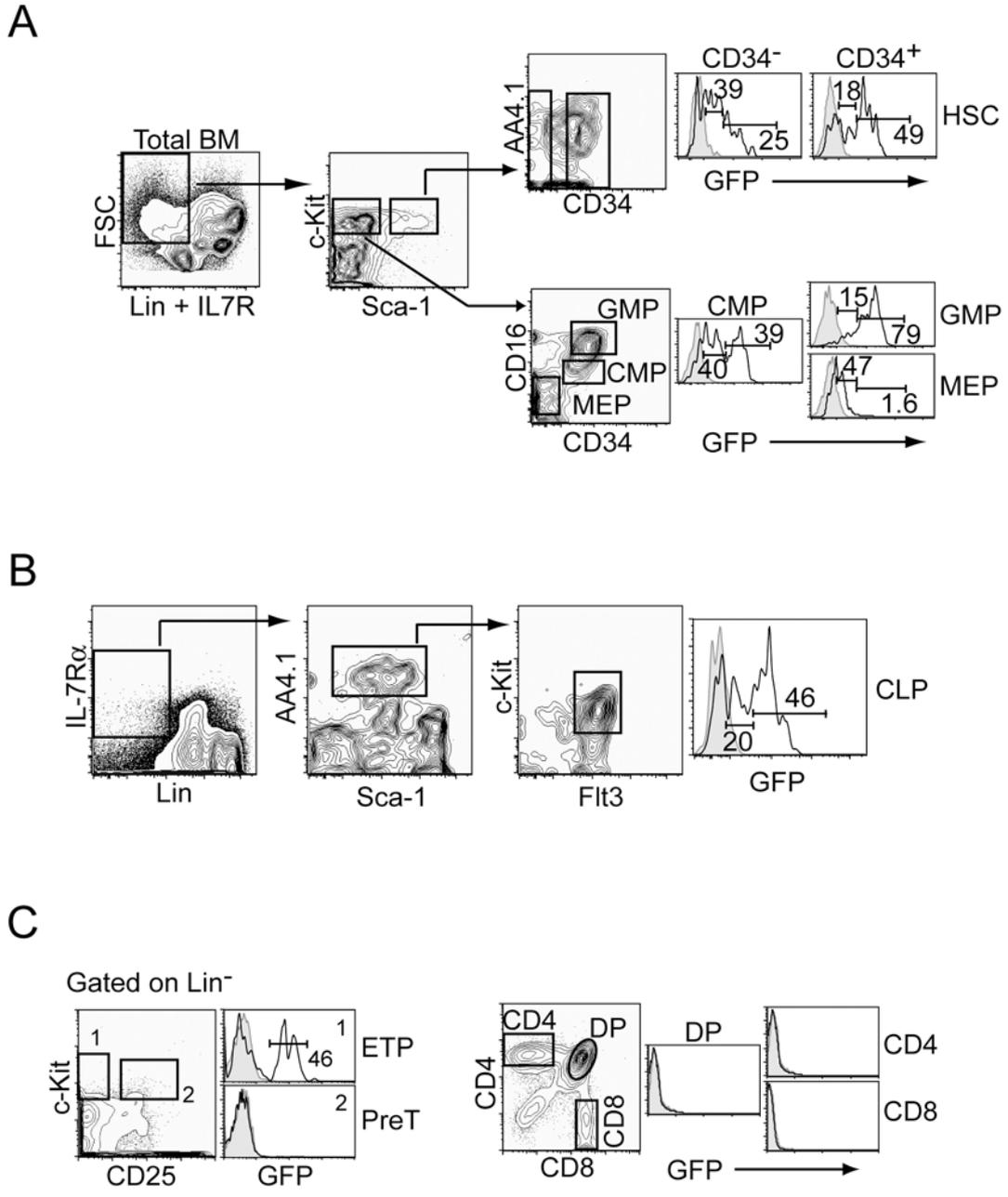


Figure 1. Back et al.

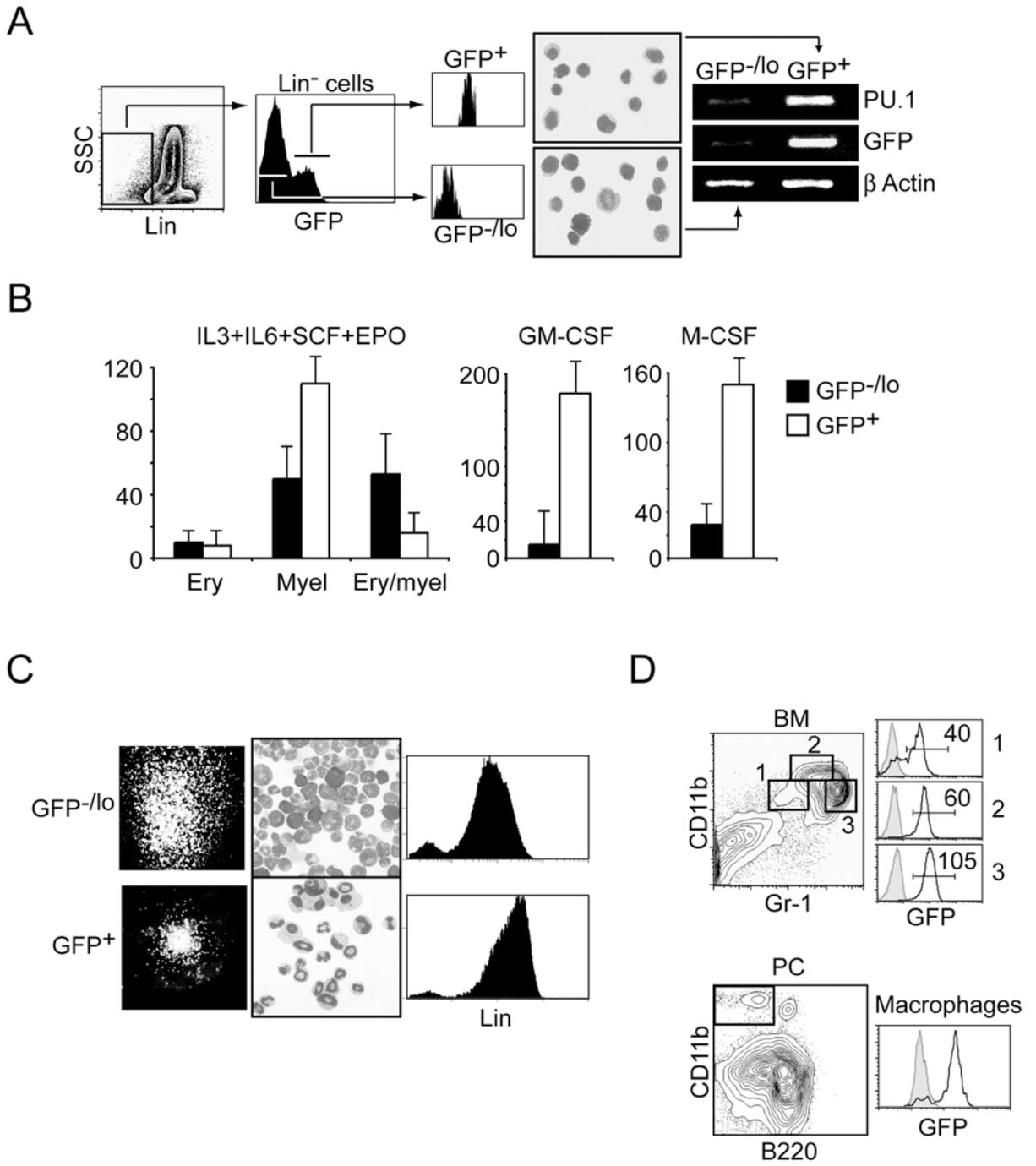


Figure 2. Back et al.

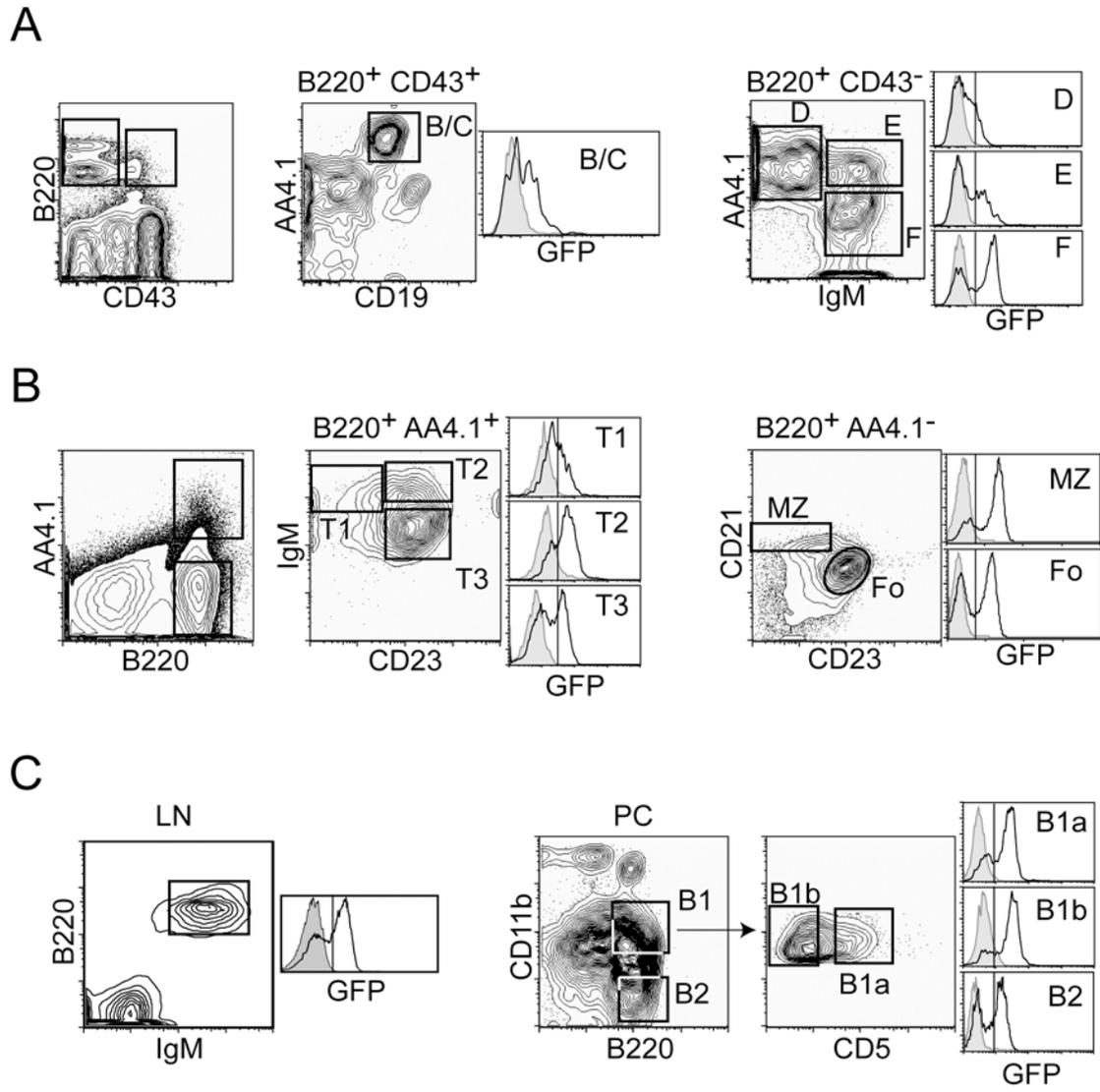


Figure 3. Back et al.

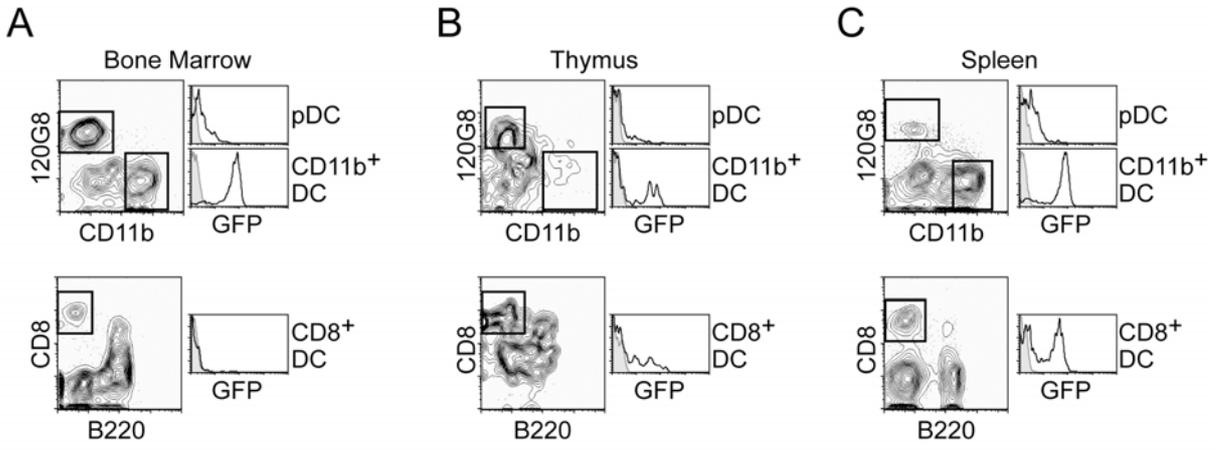


Figure 4. Back et al.

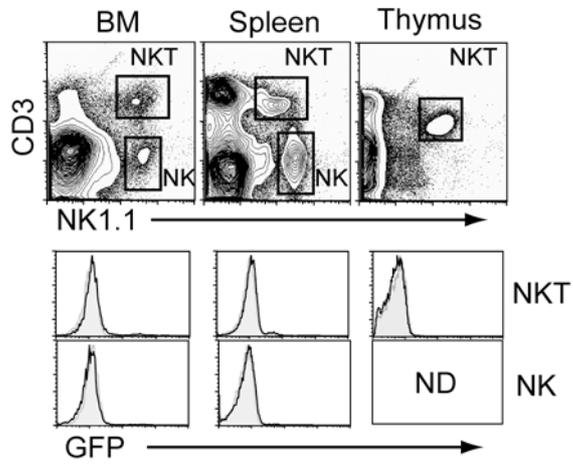
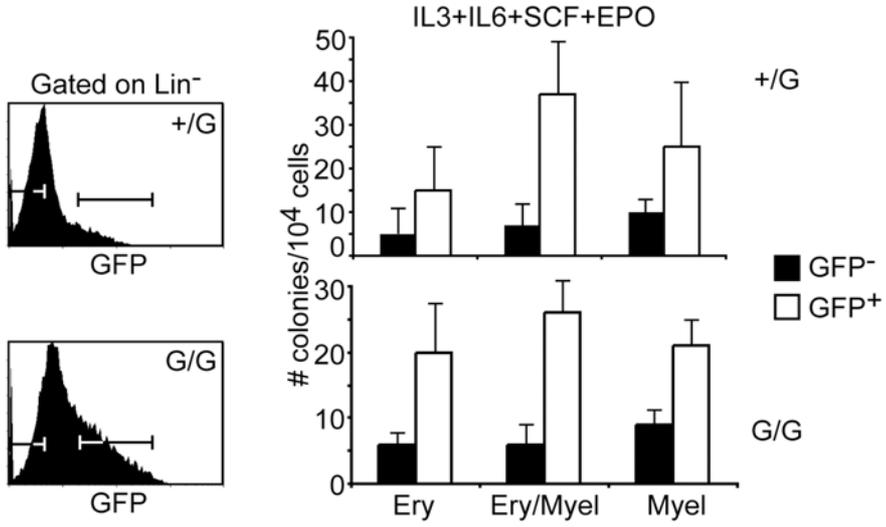


Figure 5. Back et al.

A



B

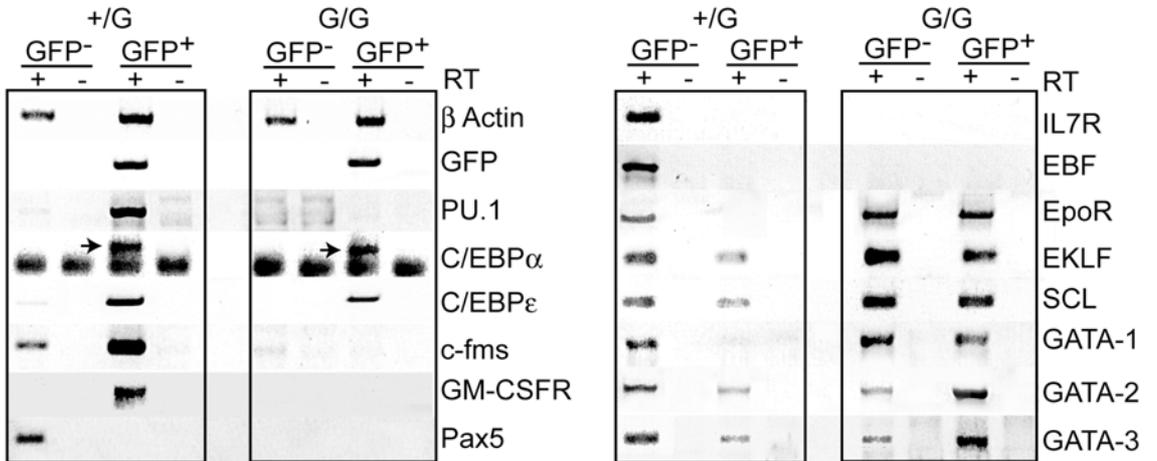


Figure 6. Back et al.

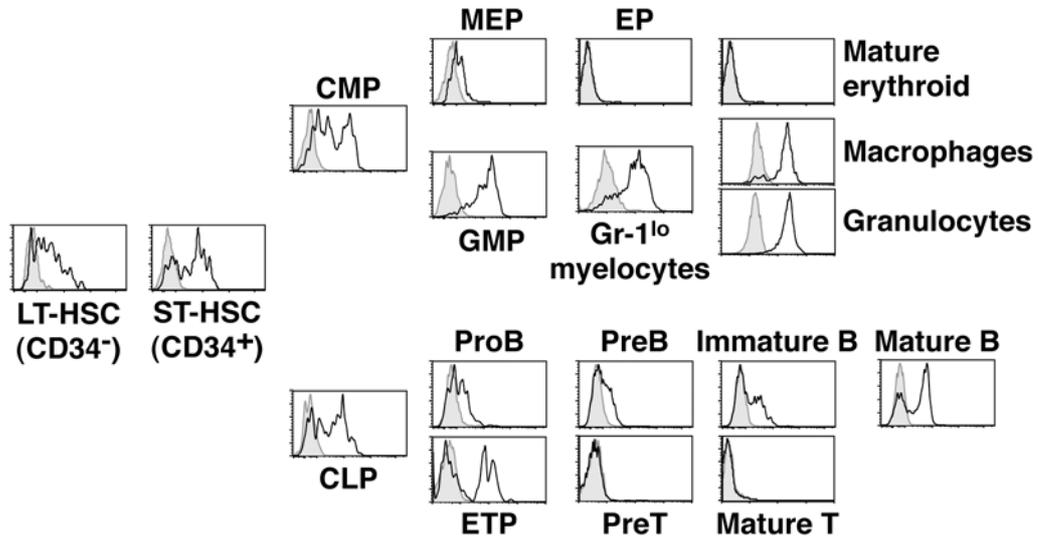


Figure 7. Back et al.

3.2 Résultats additionnels concernant l'activité de PU.1 dans le système hématopoïétique.

3.2.1 Caractérisation transcriptionnelle des cellules Lin⁻ dans les hétérozygotes adultes.

J'ai décrit dans le manuscrit que les précurseurs Lin⁻GFP⁺ de la moelle osseuse sont davantage engagés vers la voie myéloïde que leurs pendants GFP^{-/lo}. L'analyse par RT-PCR de l'expression de divers gènes caractéristiques des différents compartiments hématopoïétiques vient corroborer cette conclusion (cf. figure R7). Les précurseurs Lin⁻ GFP⁺ expriment en effet essentiellement des gènes myéloïdes (cfms, GM-CSFR, C/EBP α), alors que la fraction GFP^{-/lo} exprime à la fois des gènes érythroïdes (EpoR, GATA-1) et lymphoïdes (IL-7R, GATA-3, Pax5), mais aussi les gènes myéloïdes (plus faiblement toutefois), soulignant le fait que cette population de précurseurs GFP^{-/lo} semble plus immature et possède un potentiel de différenciation moins restreint que la fraction positive pour l'expression de la GFP.

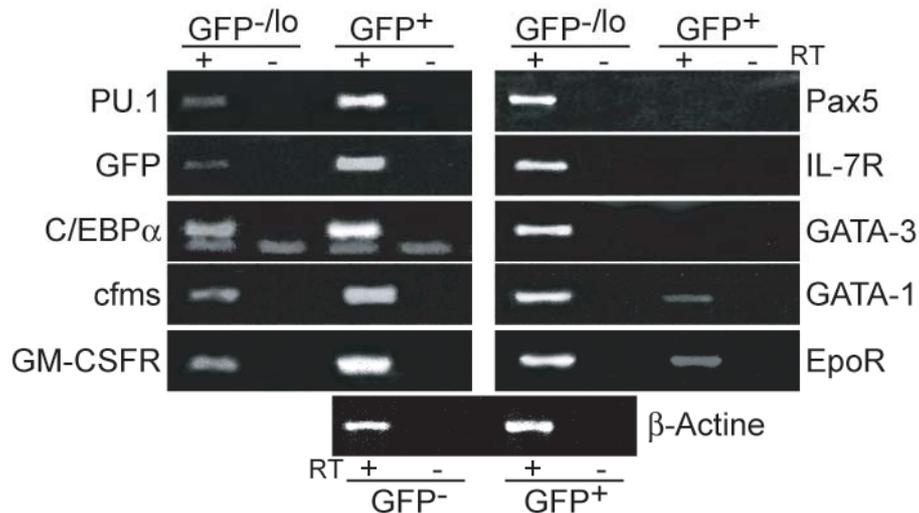


Figure R7: Caractérisation transcriptionnelle des cellules Lin⁻ GFP^{-/lo} et GFP⁺ dans la moelle osseuse adulte.

Résultats de RT-PCR réalisés à partir d'ARNm extrait de 10⁵ cellules Lin⁻ (B220⁻ Gr-1⁻ TER119⁻ CD3⁻ F4/80⁻ NK1.1⁻) GFP⁻ ou GFP⁺ de moelle osseuse de souris PU.1^{+/-}. (+) et (-) RT indiquent la présence ou l'absence d'enzyme lors de la réaction de réverse-transcription.

3.2.2 Expression du rapporteur et de PU.1 dans les cellules B activées.

Les cellules B matures, dans la rate et les autres organes périphériques, expriment le rapporteur de façon intense (moins toutefois que les cellules myéloïdes). J'ai voulu préciser si l'activation des cellules B modifie l'activité du locus PU.1. En effet, il a été documenté que PU.1, avec son homologue spi-B, est important pour la transduction du signal dérivé du BCR ("B cell receptor") (Garrett-Sinha et al., 1999). Pour cela, j'ai stimulé des splénocytes de souris PU.1^{+G} pendant 48h avec du LPS (stimulation polyclonale via le récepteur TLR4 "toll-like receptor 4") ou via leur BCR, à l'aide d'anticorps anti-IgM et CD40 (la stimulation IgM seule n'est pas suffisante et induit l'apoptose) (cf. figure R8A). Cette stimulation peut être visualisée par l'augmentation de taille des cellules, ou par l'augmentation de l'expression du marqueur CD86 (cf. figure R8A, graphiques de gauche). Ces données montrent que l'expression de PU.1 ne varie quasiment pas suite à ces 2 types de stimulation. Le niveau d'expression de la population GFP^{lo} semble augmenter suite à la stimulation, néanmoins, l'intensité du contrôle +/+ augmente parallèlement d'un même facteur, par conséquent cette amplification apparente de la fluorescence GFP est dû à une autofluorescence accrue des cellules stimulées. Cette observation indique donc que le niveau de PU.1 présent avant stimulation est suffisant pour transmettre les signaux d'activation et que PU.1 n'est certainement pas une cible de la signalisation d'activation, aspécifique (via TLR4) ou spécifique (via le BCR).

De plus, une fraction des cellules B matures exprime un niveau faible du rapporteur, bien que des niveaux normaux de PU.1 soient détectés (cf. figure R8B). J'ai testé si ce profil d'expression est conservé pendant la vie d'une cellule B, notamment après une activation, ou si l'expression du rapporteur fluctue. Pour cela, j'ai isolé des splénocytes B hétérozygotes, selon leur expression du rapporteur (fraction GFP^{-lo} et GFP⁺), puis j'ai cultivé ces cellules avec ou sans stimulation (LPS) pendant 2 jours. La figure R8C montre que l'expression du rapporteur varie très peu, que ce soit pour les cellules qui n'ont pas été activées, ou suite à une stimulation. Ceci indique qu'une fois acquise par une cellule B mature, l'expression de PU.1 ne varie plus. Cette caractéristique souligne encore le fait que PU.1 semble être requis tout au long de la vie d'une cellule B mature.

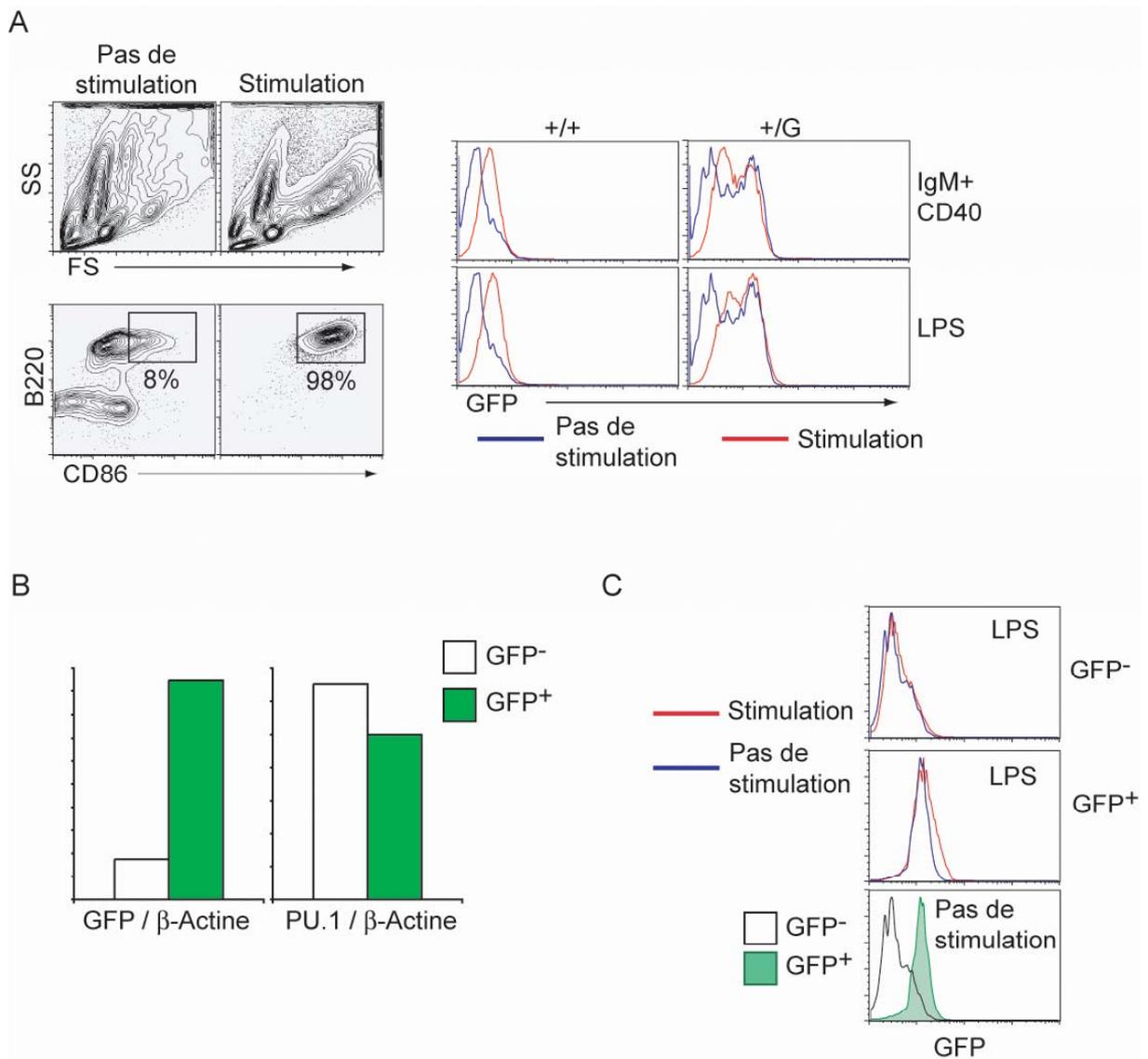


Figure R8: Evolution de l'expression du rapporteur lors de l'activation des cellules B.

A: Le profil d'expression du rapporteur ne varie pas suite à une stimulation. 10^5 splénocytes PU.1^{+/+} ou PU.1^{+/G} ont été mis en culture avec ou sans stimulation pendant 48h. Les panneaux de gauche montrent que la stimulation est très efficace. FS: Forward Scatter – ce paramètre donne la taille relative des cellules; SS: Side Scatter – ce paramètre représente la granulosité des cellules. CD86: marqueur d'activation des cellules B. Les histogrammes de droite (aucun lien avec leur idéologie politique) représentent l'intensité du rapporteur dans les populations considérées. Lorsque aucune stimulation n'est appliquée, les histogrammes (courbe bleue) représentent la fraction B220⁺ des cellules vivantes totales après 48h de culture. Les histogrammes des cultures PU.1^{+/+} correspondent au bruit de fond autofluorescent des cellules. B: Expression des transcrits PU.1 dans les fractions GFP^{-/lo} et GFP⁺ des splénocytes B PU.1^{+/G}. Les graphiques présentent l'expression normalisée par rapport à la β -actine des transcrits GFP (GFP / β -actine) et PU.1 (PU.1 / β -actine), dans les fractions GFP^{-/lo} et GFP⁺. C: Conservation du profil d'expression GFP^{-/lo} ou GFP⁺ par les cellules B. 10^5 splénocytes B (B220⁺) GFP^{-/lo} ou GFP⁺ ont été mis en culture avec ou sans stimulation (LPS) pendant 48h. Les cellules GFP^{-/lo} ou GFP⁺ gardent leur taux d'expression du rapporteur après stimulation, tout comme les splénocytes B non stimulés.

4^{ème} partie. Collaborations.

4.1 Rôle du gène suppresseur de tumeur p53 dans l'érythropoïèse de stress.

Au cours de cette collaboration, j'ai transféré certaines de mes connaissances du système hématopoïétique au Dr Gitali Ganguli, qui travaillait dans l'équipe du Dr Bohdan Wasylyk. Plus précisément, j'ai aidé à étudier l'érythropoïèse dans les souris P53^{-/-}, notamment en utilisant le système de culture érythroïde que je venais de mettre en place pour l'étude des mutants PU.1. J'ai aussi contribué à analyser l'érythropoïèse de stress dans ces souris, en quantifiant les précurseurs érythroïdes et en analysant par cytométrie de flux le phénotype des cellules érythroïdes produites en réponse à une anémie induite.

Outre la fonction bien connue de gène suppresseur de tumeur, P53 a aussi été impliqué dans le dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules hématopoïétiques (Kastan et al., 1991; Lotem and Sachs, 1993; Prokocimer and Rotter, 1994). Cette étude a permis d'identifier, dans les précurseurs érythroïdes, un antagonisme entre P53 et le récepteur des glucocorticoïdes (GR), qui avait été caractériser auparavant comme un régulateur crucial de l'érythropoïèse de stress. En réponse à une stimulation du GR par la dexaméthasone, les PE P53^{-/-} prolifèrent d'avantage par rapport aux contrôles. De plus, *in vivo*, la réponse érythropoïétique de stress à une anémie (contrôlée par le GR notamment) est accrue dans les souris déficientes pour P53, impliquant cet antagonisme dans un processus physiologique.

Cette collaboration a débouché sur la publication de l'article "The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors".

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors

Gitali Ganguli, **Jonathan Back**, Sagar Sengupta & Bohdan Wasylyk

***EMBO reports*, 2002, Vol. 3, N° 6, Pages 569–574**

Pages 569–574 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.nature.com/embor/journal/v3/n6/full/embor144.html>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

4.2 La déficience du récepteur nucléaire PPAR γ influe sur l'homéostasie hématopoïétique en altérant la formation osseuse.

Comme je l'ai mentionné dans l'introduction, l'environnement de la moelle osseuse influe énormément sur l'hématopoïèse. Cette collaboration, avec le Dr Terrie-Anne Cock de l'équipe du Pr Johan Auwerks, m'a permis de mettre en valeur cette notion. Les souris PPAR^{hyp/hyp} sont déficientes pour PPAR γ_1 et PPAR γ_2 ("peroxisome proliferator-activated receptor") dans le tissu adipeux blanc (Koutnikova et al., 2003). Du fait de cette déficience, ces souris présentent une ostéogenèse accrue, conduisant à une ostéopétrose. J'ai contribué à analyser l'hématopoïèse dans ces souris PPAR^{hyp/hyp}. J'ai ainsi pu corrélérer une déficience du potentiel hématopoïétique de la moelle osseuse, avec une réduction de la cavité osseuse du fait de l'ostéopétrose, cette déficience étant complémentée par une activité hématopoïétique accrue dans la rate. De façon importante, des expériences de reconstitution du compartiment hématopoïétique de souris irradiées ont démontré que ce défaut est non-intrinsèque aux cellules hématopoïétiques, mais dépend du génotype de l'environnement osseux de la moelle.

Ces résultats sont détaillés dans l'article "Enhanced bone formation in lipodystrophic PPAR γ ^{hyp/hyp} mice relocates hematopoiesis to the spleen."

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Enhanced bone formation in lipodystrophic PPAR γ ^{hyp/hyp} mice relocates haematopoiesis to the spleen

Terrie-Anne Cock, **Jonathan Back**, Florent Elefteriou, Gérard Karsenty, Philippe Kastner, Susan Chan & Johan Auwerx

***EMBO reports*, 2004, Vol. 5, N°10, Pages 1007–1012**

Pages 1007–1012 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.nature.com/embor/journal/v5/n10/full/7400254.html>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Bibliographie

(Résultats)
(Résultats)

- Anderson, K. L., Smith, K. A., Conners, K., McKercher, S. R., Maki, R. A., and Torbett, B. E. (1998). Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood* *91*, 3702-3710.
- Blobel, G. A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M., and Orkin, S. H. (1998). CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2061-2066.
- Ganguli, G., Back, J., Sengupta, S., and Wasylyk, B. (2002). The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors. *EMBO Rep* *3*, 569-574.
- Garrett-Sinha, L. A., Su, G. H., Rao, S., Kabak, S., Hao, Z., Clark, M. R., and Simon, M. C. (1999). PU.1 and Spi-B are required for normal B cell receptor-mediated signal transduction. *Immunity* *10*, 399-408.
- Kasper, L. H., Boussouar, F., Ney, P. A., Jackson, C. W., Rehg, J., van Deursen, J. M., and Brindle, P. K. (2002). A transcription-factor-binding surface of coactivator p300 is required for haematopoiesis. *Nature* *419*, 738-743.
- Kastan, M. B., Radin, A. I., Kuerbitz, S. J., Onyekwere, O., Wolkow, C. A., Civin, C. I., Stone, K. D., Woo, T., Ravindranath, Y., and Craig, R. W. (1991). Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res* *51*, 4279-4286.
- Koutnikova, H., Cock, T. A., Watanabe, M., Houten, S. M., Champy, M. F., Dierich, A., and Auwerx, J. (2003). Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 14457-14462.
- Kung, A. L., Rebel, V. I., Bronson, R. T., Ch'ng, L. E., Sieff, C. A., Livingston, D. M., and Yao, T. P. (2000). Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev* *14*, 272-277.
- Lotem, J., and Sachs, L. (1993). Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood* *82*, 1092-1096.
- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* *15*, 5647-5658.
- Prokocimer, M., and Rotter, V. (1994). Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. *Blood* *84*, 2391-2411.
- Rebel, V. I., Kung, A. L., Tanner, E. A., Yang, H., Bronson, R. T., and Livingston, D. M. (2002). Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 14789-14794.
- Scott, E. W., Fisher, R. C., Olson, M. C., Kehrli, E. W., Simon, M. C., and Singh, H. (1997). PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity* *6*, 437-447.

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.

Simon, M. C., Olson, M., Scott, E., Hack, A., Su, G., and Singh, H. (1996). Terminal myeloid gene expression and differentiation requires the transcription factor PU.1. *Curr Top Microbiol Immunol* 211, 113-119.

Discussion et perspectives

PU.1 a été caractérisé comme un facteur crucial pour le développement lymphoïde et myéloïde. Mes résultats étendent ce rôle au compartiment érythroïde. De plus, l'analyse de l'activité du locus PU.1 montre que ce gène est exprimé de façon dynamique et hétérogène dans beaucoup de compartiments du système hématopoïétique, depuis les cellules souches jusqu'aux cellules matures. Par conséquent, ces nouvelles données, en corrélation avec certains éléments de la littérature, placent PU.1 comme un facteur central dans le contrôle de multiples processus hématopoïétiques. Certains points ayant déjà été discutés dans les parties discussions des manuscrits de la partie résultat, je vais ici approfondir certaines de ces notions ou souligner d'autres aspects liés à mes résultats.

1^{ère} Partie. Quel mécanisme d'action pour PU.1 dans les précurseurs érythroïdes?

1.1 Une base physiologique de l'effet oncogénique de PU.1 dans les érythroleucémies de Friend.

La fonction de PU.1 dans les précurseurs érythroïdes que j'ai mise en évidence est fortement corrélée à l'effet pathologique de PU.1 dans les érythroleucémies de Friend. Ainsi, la surexpression de PU.1 dans les PE provoque un blocage de la différenciation, couplé à une prolifération accrue. À l'opposé, l'absence de PU.1 (ou sa réduction comme dans les hétérozygotes) est liée à une réduction de la capacité de prolifération des PE ainsi qu'à une différenciation accentuée. Par conséquent, l'activation de PU.1 par le SFFV correspond à une amplification de la fonction normale de PU.1 dans les précurseurs érythroïdes.

1.2 Un mécanisme commun dans les précurseurs érythroïdes primaires et dans les cellules érythroleucémiques?

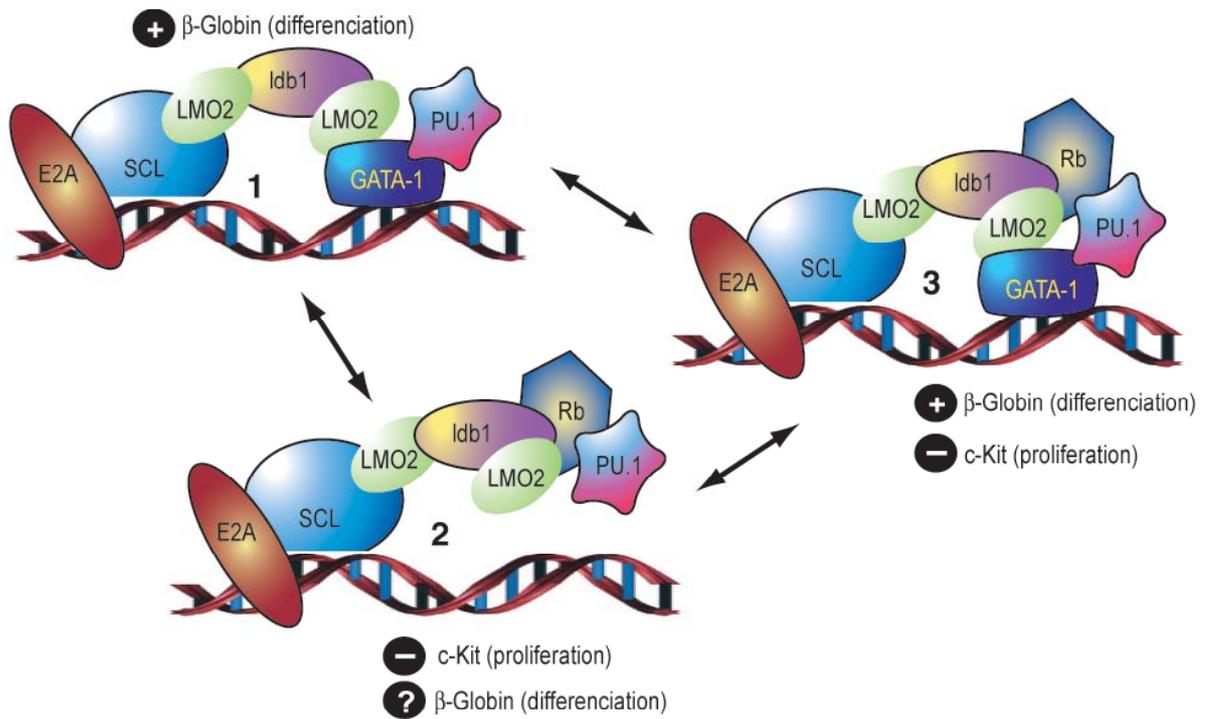
La question qui découle de la conclusion précédente est de savoir si le mécanisme moléculaire d'action mis en jeu par la protéine PU.1 surexprimée est le même que celui par lequel PU.1 contrôle le potentiel d'autorenouvellement des PE normaux. En effet, plusieurs hypothèses quant au mécanisme par lequel la surexpression de PU.1 induit ce blocage ont été proposées (cf. Introduction partie 5.2.2). Néanmoins, le mode d'action et les cibles de PU.1 dans des PE où il est surexprimé peuvent être différents dans des PE normaux où il est exprimé faiblement. Cette notion est illustrée par mes résultats concernant la proportion de GATA-1 acétylé dans les PE PU.1^{-/-} (cf. Résultats partie 2.2.1). En effet, l'inhibition de l'activité acétyl-transférase de CBP/P300 par PU.1 a été documentée en utilisant des modèles cellulaires, non érythroïdes de surcroît, transfectés avec des vecteurs d'expression pour PU.1, GATA-1 et CBP (Hong et al., 2002). Or, mes résultats n'indiquent pas d'accroissement significatif du taux d'acétylation de GATA-1 dans les PE PU.1^{-/-}. Il est probable que les conclusions tirées à partir de ce modèle basé sur la surexpression de PU.1 puissent être non pertinentes dans un cadre physiologique où PU.1 est normalement exprimé très faiblement.

1.3 Interactions de PU.1 avec "l'érythroïsome".

Une caractéristique importante des facteurs de transcriptions qui interviennent dans la régulation du développement érythroïde, est qu'ils peuvent interagir et former des complexes multimériques (cf. Introduction partie 4.3.3). Ces complexes peuvent avoir des effets soit activateurs soit répresseurs sur la transcription, conduisant à des effets positifs ou négatifs sur la différenciation. PU.1 peut interagir avec Rb et GATA-1, qui sont des composants de cet "érythroïsome" (cf. Introduction partie 5.2.2.1). Ainsi, il a été suggéré que PU.1 peut attirer au niveau des gènes cibles de GATA-1 le facteur Rb qui est connu pour avoir une action de répresseur de la transcription (Rekhtman et al., 2003). Cette hypothèse suppose donc une coopération entre PU.1 et Rb pour inhiber certains gènes cibles de GATA-1. D'autre part, l'expression de c-Kit, qui est critique pour la prolifération des PE, est diminuée, *in vitro* et *in vivo*, par la présence d'un complexe comprenant LMO2, Ldb1, SCL, E2A ainsi que Rb, qui potentialise fortement cette activité inhibitrice (Vitelli et al., 2000). En relation avec mes données, j'observe dans les cultures de PE mutants une perte rapide de l'expression de c-Kit, en liaison avec la perte de leur capacité à proliférer (au bout de 3-4 jours de culture). La

corrélation entre mes observations et ce mécanisme supposerait une interaction négative entre Rb et PU.1 pour le contrôle de l'expression de c-Kit, ce qui permettrait à PU.1 de favoriser la prolifération en maintenant l'expression de c-Kit (cf. figure D1). Une approche particulièrement intéressante sera de vérifier si, en absence de PU.1, les différents complexes décrits sont conservés, organisés de manière similaires et possèdent des activités transcriptionnelles semblables.

A



B

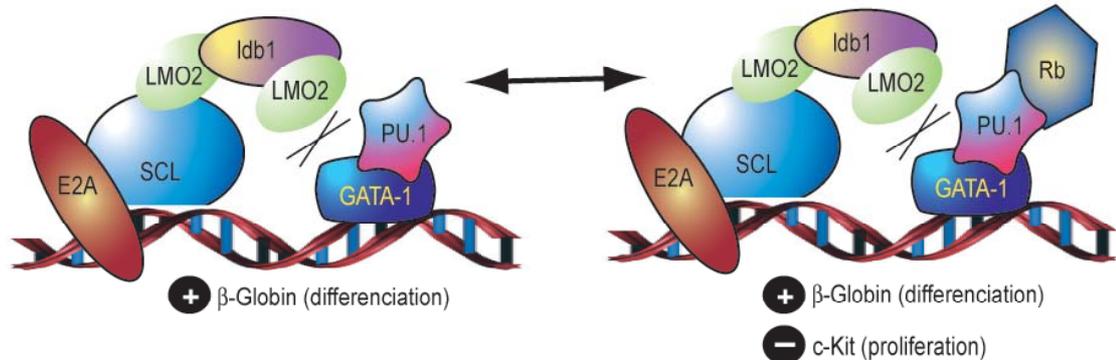


Figure D1: Modèle des interactions possibles de PU.1 avec les complexes de facteurs de transcriptions présents dans les PE.

L'effet théorique des complexes, en absence de PU.1, sur la transcription de gènes impliqués dans la prolifération (c-Kit) et la différenciation (β -globine) est représenté par les (+) ou (-). A: Modèle dans lequel PU.1 s'associe aux complexes et modifie leur activité. Le complexe 1, sans PU.1, a été décrit comme activant la transcription du gène β -globine. La liaison de PU.1 à GATA-1 pourrait inverser cet effet. En absence de PU.1, le complexe 2 est capable de réprimer la transcription de c-Kit. La possibilité de PU.1 d'interagir avec Rb pourrait brider cette capacité. Le Complexe 3 pourrait se former grâce à la capacité de PU.1 de lier à la fois GATA-1 et Rb. En amenant Rb qui possède une capacité de répresseur de la transcription, PU.1 préviendrait à la fois la capacité de ce complexe à induire la transcription de la β -globine et la capacité d'inhiber la transcription de c-Kit (via Rb). B: Modèle où PU.1 empêche la formation des complexes actifs en se liant à GATA-1 et/ou Rb. GATA-1 et Rb n'étant plus connectés au cœur du complexe, celui-ci perdrait sa capacité à réguler la transcription de ses gènes cibles.

2^{ème} Partie. PU.1 dans les précurseurs : un facteur hautement versatile.

2.1 La régulation de la balance entre prolifération et différenciation dans les précurseurs.

J'ai démontré que PU.1 joue un rôle crucial dans les PE, en déterminant leur capacité de renouvellement, freinant parallèlement leur différenciation. Cette caractéristique souligne l'aspect hautement versatile de PU.1 dans les différents lignages. En effet, PU.1 était considéré comme un facteur induisant la différenciation myéloïde et lymphoïde. L'absence de PU.1 bloque cette différenciation, et à l'opposé, l'expression forcée de PU.1 dans des progéniteurs multipotents est capable de diriger la différenciation myéloïde ou lymphoïde B (DeKoter and Singh, 2000; Nerlov and Graf, 1998). En outre, si PU.1 peut instruire la différenciation myéloïde, il semble également agir en prévenant la prolifération des précurseurs myéloïdes. Ainsi, j'ai pu identifier une différence de capacité de prolifération entre les précurseurs myéloïdes GFP⁻ (qui génèrent de grosses colonies et qui possèdent donc un potentiel de prolifération important) et les précurseurs GFP⁺ qui ont perdu ce potentiel de prolifération important (cf. Résultats partie 3). En accord avec mes observations, la réduction importante (80%) de l'expression de PU.1 dans les précurseurs myéloïdes, induit une accumulation de précurseurs myéloïdes peu différenciés, mais toujours capable de proliférer (Rosenbauer et al., 2004). Ces précurseurs représentent un réservoir de cellules pré-leucémiques, avec pour conséquence majeure le développement de leucémies myéloïdes aiguës avec un temps de latence très court. PU.1 exerce donc des effets opposés dans les précurseurs myéloïdes et les PE, vis-à-vis du contrôle de la balance prolifération/différenciation.

Cette étude évoque une autre notion à propos de PU.1: l'importance du dosage de son expression dans les différents précurseurs et progéniteurs. Au cours de la différenciation érythroïde, j'ai illustré le fait que l'expression de PU.1 est régulée de manière très précise (cf. Résultats partie 2). PU.1 est en effet significativement exprimé dans les progéniteurs multipotents, puis dans les PE, son expression est réduite, et enfin, PU.1 est absent des cellules érythroïdes différenciées (TER-119⁺). L'information importante étant que cette faible

expression dans les PE est cruciale pour contrôler correctement la balance prolifération/différenciation, de sorte que des changements, même minimes, du taux d'expression de PU.1 (en plus ou en moins) conduisent à des altérations sévères. Mes expériences de réexpression de PU.1 dans les PE PU.1^{-/-} consolident ce concept. En effet, les PE réexprimant une dose relativement faible de PU.1 sont sélectivement amplifiés alors que ceux affichant une expression importante sont délétés. Cette notion d'importance du taux de PU.1 a également été mise en évidence dans les autres lignages. Au niveau des progéniteurs multipotents, une expression importante de PU.1 peut dicter une différenciation myéloïde, alors qu'un niveau plus faible induit le développement de cellules B (DeKoter and Singh, 2000). Plus récemment, Dahl *et al.* ont suggéré que des doses différentes de PU.1 induisaient des destins myéloïdes distincts. Plus précisément, une expression importante de PU.1 conduit au développement de macrophages alors qu'une dose plus faible permet la génération de neutrophiles (Dahl et al., 2003).

La différenciation lymphoïde T est également sensible au taux ainsi qu'à la chronologie de l'expression de PU.1. L'absence de PU.1 altère en effet sévèrement la différenciation T à un stade très précoce, préalable à l'engagement définitif dans la voie T (stade ETP) (Colucci et al., 2001; Spain et al., 1999). Mais réciproquement, la surexpression de PU.1 conduit aussi à un blocage de la différenciation T, toutefois à un stade postérieur correspondant au moment de l'engagement définitif dans la voie T (stade DN3) (Anderson et al., 2002). Les cellules bloquées sont redirigées vers la voie myéloïde et peuvent se différencier normalement dans cette voie. La chronologie de la régulation de l'expression de PU.1 dans la voie T est par conséquent cruciale au déroulement normal de la différenciation T. Mes données sur l'expression du rapporteur étayent ce modèle puisque j'observe une expression du rapporteur dans les ETP, alors que les stades suivants en sont dépourvus (cf. Résultats partie 3). Remarquablement, la différenciation érythroïde et lymphoïde T partagent des similitudes quant à l'expression de PU.1. Les stades précoces de ces deux voies nécessitent une expression de PU.1 qui doit toutefois être abolie pour permettre le déroulement ultérieur de la différenciation. En plus de ces fonctions dans les cellules précurseurs, PU.1 a aussi été impliqué dans le contrôle de la prolifération des macrophages (Celada et al., 1996).

Ces données érigent PU.1 comme un facteur central du contrôle de la balance prolifération/différenciation dans l'ensemble du système hématopoïétique. En outre, elles illustrent la versatilité de PU.1, qui exerce des fonctions opposées selon le lignage où il est exprimé, son niveau d'expression, ainsi que le stade de maturation (cf. figure D2).

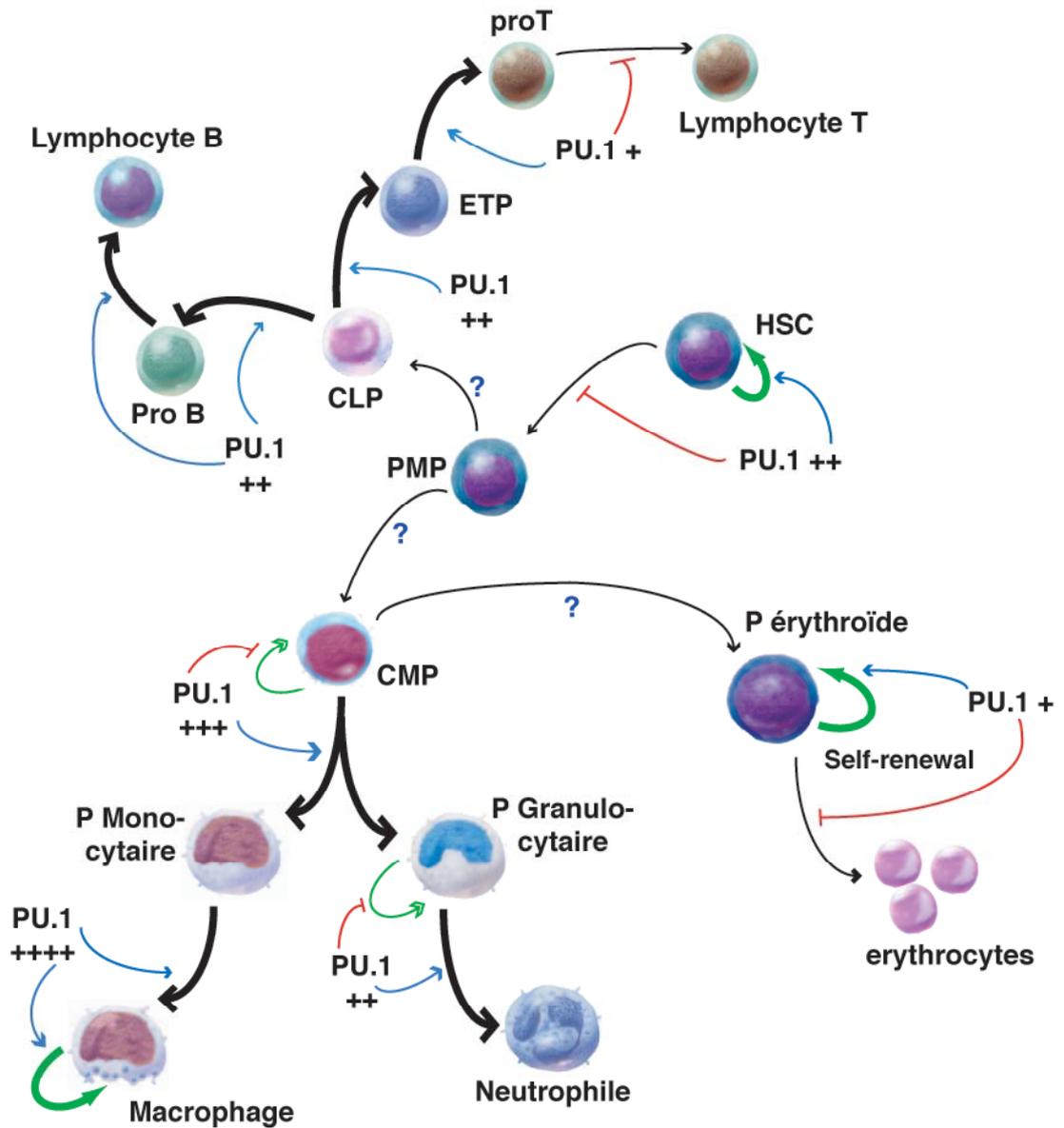


Figure D2: Modèle décrivant les implications de PU.1 sur l'autorenouveau et la différenciation.

La différenciation est indiquée par les flèches noires. Les flèches noires épaisses indiquent que la différenciation est accentuée par PU.1. La prolifération est indiquée par les flèches courbes vertes. Si elles sont épaisses, c'est que ce processus est stimulé par PU.1. Le dosage relatif de PU.1 est indiqué par les (+). Une action positive de PU.1 est représentée par une flèche bleue, une action négative par une flèche rouge. PMP: progéniteur multipotent; HSC: cellule souche hématopoïétique; CLP: progéniteur commun lymphoïde; CMP: progéniteur commun myéloïde; ETP: précurseur thymique précoce; P: précurseur.

2.2 PU.1 et l'engagement ("commitment") dans la voie myéloïde ou lymphoïde.

Le fait que PU.1 influe, via son taux d'expression, sur le destin des progéniteurs multipotents ou des précurseurs déjà déterminés, soulève une autre question: PU.1 est-il requis pour l'engagement définitif dans la voie myéloïde ou lymphoïde B? Mes données suggèrent fortement que l'engagement dans la voie myéloïde ne requiert pas PU.1, alors que par opposition, PU.1 est indispensable pour la génération de précurseurs engagés dans la voie B (exprimant des marqueurs spécifiques tels que EBF ou Pax5 - cf. Résultats partie 3). Très récemment, une étude a apporté des précisions sur le rôle de PU.1 au cours des événements précoces de la différenciation B (Medina et al., 2004). Selon ces auteurs, PU.1 est essentiel à des stades très précoces du développement lymphoïde, notamment pour induire, dans les progéniteurs encore oligopotents, l'expression des récepteurs Flt3 et IL-7R ainsi que du facteur EBF, qui sont cruciaux pour le déroulement du programme lymphoïde B. Une fois le stade proB atteint, PU.1 est supposé avoir un rôle moins critique. Mes données sur l'expression de PU.1 corrélaient bien avec cette hypothèse puisque j'observe une expression de PU.1 assez intense dans les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP), où PU.1 est censé avoir un rôle important, alors que cette expression est très réduite dans les cellules proB (fraction B/C) (cf. Résultats partie 3).

De même, mes données corroborent l'observation qu'une expression différentielle de PU.1 dirige l'engagement soit dans la voie myéloïde, soit dans la voie lymphoïde B (DeKoter and Singh, 2000). L'engagement myéloïde, visualisé par la progression du stade CMP vers le stade GMP est effectivement accompagné d'un accroissement de l'expression de PU.1, alors que l'engagement dans la voie B est caractérisé par une décroissance de cette expression. Ainsi, même si PU.1 est indispensable pour générer des précurseurs engagés dans la voie B, l'engagement dans cette voie s'accompagne d'une expression très faible de PU.1. Par opposition, l'engagement myéloïde, même s'il ne requiert pas PU.1, est corrélé avec une induction de son expression. A l'instar des effets versatiles dans le contrôle de l'auto-renouvellement et de la différenciation, PU.1 est impliqué de façon dissemblable dans l'engagement vers la voie myéloïde ou lymphoïde.

L'ensemble de ces informations tend à penser, maintenant que nombre des cibles de PU.1 sont connues, que la prochaine étape dans la compréhension des mécanismes régulés par ce facteur nécessitera d'explorer plus en détail les régulateurs de PU.1. Quels sont les évènements, les facteurs qui vont provoquer l'induction plutôt que la répression (ou inversement) de l'expression de PU.1 dans un progéniteur multipotent? Comment un niveau précis d'expression de PU.1 permettant le déroulement d'un programme de différenciation spécifique est-il atteint et maintenu? Ces questions devraient permettre de mieux décoder le fonctionnement de ce facteur et par extension du système hématopoïétique.

3^{ème} Partie. Un rôle pour PU.1 dans les cellules souches hématopoïétiques?

En 1997, le groupe de T. Enver a documenté l'expression de nombreux gènes caractéristiques de l'engagement dans une voie particulière de différenciation, dans les cellules souches et les progéniteurs multipotents hématopoïétiques (Hu et al., 1997). L'un de ces gènes était PU.1. Ce phénomène a été défini comme une expression de pré-engagement ("multilineage promiscuous expression"). Ainsi, même si PU.1 semble exprimé dans les stades très précoces de la différenciation hématopoïétique, aucune fonction n'a été reliée à cette expression. De façon intéressante, mes résultats montrent que les populations enrichies en LT-HSC ou en ST-HSC (cf. Introduction partie 2.2) expriment des proportions et des niveaux distincts de PU.1 (cf. Résultats partie 3). Ceci suggère que PU.1 pourrait avoir une fonction spécifique dans ces cellules souches, autre qu'une simple présence de pré-engagement.

Dans les mutants PU.1^{G/G}, la différenciation érythroïde est intensifiée ce qui requiert la mobilisation de progéniteurs plus immatures (CFC-ery/mix) et conséquemment du compartiment souche pour soutenir ce processus. A ce titre, plusieurs caractéristiques phénotypiques des souris mutantes pour PU.1 sont intrigantes. Tout d'abord, j'ai observé que la génération des progéniteurs immatures de type CFC-ery/mix (progéniteurs correspondant aux BFU-E + CFU-GEMM) est sévèrement altérée au cours du développement dans les mutants PU.1^{G/G} (cf. Résultats partie 2). Aux stades précoces de l'hématopoïèse dans le foie fœtal (E11-E12,5), le nombre de ces progéniteurs est supérieur chez les mutants, mais ce réservoir n'est pas amplifié au cours du développement comme chez les embryons contrôles, aboutissant à un nombre dramatiquement faible de ces progéniteurs lors des stades tardifs. De plus, nos mutants homozygotes meurent durant le premier jour après la naissance, même en conditions SPF ("specific pathogen free", donc a priori pas suite à une septicémie favorisée par l'absence de cellules immunitaires). Les mutants de Scott *et al.* meurent encore plus tôt (vers E17) et 1/3 environ présentent de façon inattendue une anémie. De surcroît, les études basées sur les précédentes mutations de PU.1 ont documenté que les cellules ES ou les progéniteurs du foie fœtal déficients pour PU.1 ne sont capables de reconstituer que transitoirement le compartiment érythroïde (cf. Introduction partie 5.4.1.3). Ainsi, la moelle osseuse des souris chimériques adultes ne possède plus aucune contribution hématopoïétique

originaires de cellules PU.1^{-/-} et les souris irradiées reconstituées avec des cellules de foie fœtal mutantes ne survivent que 2 semaines de plus que des souris non reconstituées. Ce phénomène a été interprété comme un désavantage compétitif des cellules souches PU.1^{-/-} à s'installer dans la moelle osseuse, par rapport aux cellules contrôles.

Très récemment, le groupe de C. Klug a suggéré que PU.1 est nécessaire pour la maintenance du réservoir de cellules souches dans le foie fœtal (Kim et al., 2004), renforçant l'idée que l'expression de PU.1 que j'observe dans ce compartiment est liée à une fonction réelle. Ce postulat d'un rôle dans la préservation du potentiel souche hématopoïétique pour PU.1 expliquerait les déficiences citées plus haut. La réserve en cellules souches des mutants PU.1 s'épuiserait rapidement du fait de la déficience intrinsèque dans les HSC combiné à une mobilisation accrue de ces cellules souches en réponse à la différenciation accélérée du compartiment érythroïde. Ainsi, le compartiment des progéniteurs érythroïdes immatures (CFC-mix/ery) ne pourrait pas être efficacement soutenu dans les souris PU.1^{G/G}. Similairement, la mortalité précoce des mutants, l'anémie de certains embryons mutants de Scott *et al.*, ainsi que le faible potentiel de reconstitution à long terme du compartiment érythroïde par les cellules PU.1^{-/-} serait la conséquence directe de l'assèchement du réservoir de cellules souches hématopoïétiques.

4^{ème} Partie. PU.1 dans les cellules matures.

4.1 Expression différentielle de PU.1 dans les divers types de cellules dendritiques.

Comme mentionné dans l'introduction, l'origine et le développement des cellules dendritiques sont très mal connus (cf. Introduction partie 3.3). Remarquablement, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) présentent, à l'opposé des cellules dendritiques CD8⁺ et CD11b⁺, une expression faible du rapporteur (cf. Résultats partie 3). Il est notamment intéressant de faire un parallèle avec le niveau d'expression similaire détecté dans les cellules proB. En effet, des études ont documenté que ces pDC possèdent des caractéristiques propres de cellules proB, notamment le fait qu'elles présentent des réarrangements du locus de la chaîne lourde d'immunoglobuline (Corcoran et al., 2003, Shigematsu, 2004 #1092). Il faut noter que les pDC peuvent être obtenus à partir de précurseurs myéloïdes, soulignant le fait que les cellules proB ne constituent pas un précurseur pour ces pDC. Mes données renforcent donc l'hypothèse d'une similitude importante entre les programmes génétiques proB et pDC. Sachant qu'un haut niveau d'expression de PU.1 gouverne l'engagement dans la voie myéloïde aux dépens de la voie lymphoïde, il peut être intéressant de déterminer si la surexpression de PU.1 peut bloquer le développement des pDC et favoriser au contraire la génération des autres types dendritiques, qui expriment des niveaux importants de PU.1.

4.2 Relation entre l'expression de PU.1, les cellules B de la zone marginale et les cellules B1.

Parmi les divers types de cellules B matures, deux se distinguent vis-à-vis de l'expression du rapporteur. Les cellules B de la zone marginale (MZ) ainsi que les cellules B1 expriment des niveaux légèrement supérieurs par rapport aux autres types de cellules B matures (cellules folliculaires de la rate ou des ganglions, cellules B2 de la cavité péritonéale et cellules B recirculantes de la moelle osseuse). Cette expression typique suggère une implication différente de PU.1 dans ces cellules, éventuellement au niveau de leur génération.

L'origine et la formation sélective de ces deux types de cellules B ne sont pas clairement établies. Cependant, de nombreuses études tendent à montrer que la spécificité du BCR exprimé par une cellule B naïve dirige sa ségrégation vers les compartiments B1 ou MZ plutôt que vers le type folliculaire (ou B2) (Arnold et al., 1994; Chen et al., 1997; Lam and Rajewsky, 1999; Martin et al., 1997; Martin and Kearney, 2000; Watanabe et al., 1999). Ceci implique qu'un signal issu du BCR puisse gouverner le destin folliculaire, MZ ou B1 d'un précurseur B.

PU.1 joue effectivement un rôle important dans les cellules B matures (Garrett-Sinha et al., 1999; Hu et al., 2001). Un de ces rôles est justement de participer à la transduction du signal émanant des immunoglobulines de surface (BCR pour "B cell receptor"). Il serait par conséquent intéressant d'examiner de façon plus approfondie la relation entre l'expression de PU.1 dans ces cellules B particulières et la signalisation dérivée de leur BCR, par exemple en utilisant des souris transgéniques pour le BCR, qui génèrent préférentiellement des cellules B MZ ou B1.

5^{ème} Partie. Conclusion: PU.1 un facteur exceptionnel chez les vertébrés?

PU.1 possède donc des fonctions particulièrement versatiles. D'autres facteurs peuvent également présenter des activités variées dans l'hématopoïèse. Ainsi, SCL/Tal1 participe à l'autorenouveau des progéniteurs multipotents (Krosl et al., 1998; Lecuyer et al., 2002; Mikkola et al., 2003), mais, dans le compartiment érythroïde, il contribue à accentuer la différenciation, aux dépens de la prolifération (Elwood et al., 1998; Hoang et al., 1996). Un autre exemple est P53, également impliqué dans nombres de processus antagonistes comme l'autorenouveau, l'apoptose et l'induction de la différenciation (Kastan et al., 1991; Lotem and Sachs, 1993; Prokocimer and Rotter, 1994). De la même façon, Notch (dont la partie intracellulaire est un facteur de transcription) régule de multiples aspects hématopoïétiques (cf. (Ohishi et al., 2003) pour revue). Une caractéristique commune à beaucoup de ces facteurs qui possèdent des fonctions versatiles dans l'hématopoïèse (dont ceux que je viens de citer) est qu'ils ne sont justement pas restreints au système hématopoïétique, mais exercent leurs effets multiples dans divers autres systèmes biologiques. Par opposition, les facteurs dont l'expression est spécifique du système hématopoïétique sont souvent reliés à une fonction précise. Ainsi GATA-1 est impliqué dans la différenciation érythroïde, son homologue GATA-3 dans la différenciation lymphoïde T, spi-B qui est le plus proche homologue de PU.1 est impliqué uniquement dans la différenciation B, tout comme Pax5 (cf. Introduction). PU.1 se singularise par rapport à ces facteurs par le fait qu'il est spécifique du système hématopoïétique, qu'il est exprimé dans une large proportion de celui-ci et qu'il exerce des fonctions variées voir opposées selon le compartiment où il est exprimé.

Un autre facteur présente des caractéristiques similaires: Ikaros. Exprimé dans l'ensemble des cellules hématopoïétiques (mais toutefois restreint au système hématopoïétique), ce facteur peut également réguler divers aspects comme la différenciation lymphoïde B et T, mais aussi contrôler la génération de cellules granulocytaires et érythroïdes (Dumortier et al., 2003; Kirstetter et al., 2002; Wang et al., 1996). De plus Ikaros a été associé à une activité d'activateur et de répresseur de la transcription (cf. (Georgopoulos, 2002) pour revue). PU.1 et Ikaros occupent donc une place centrale dans le contrôle de l'hématopoïèse, et considérant cela, il n'est pas étonnant que leur expression mutuelle ne semble pas dépendre l'un de l'autre (Scott et al., 1997; Wang et al., 1996).

Le concept d'un aiguillage de la différenciation basé sur le dosage d'un facteur de transcription a été mis en évidence chez la drosophile. Le modèle initial a été la spécification de l'axe antéropostérieur de l'embryon de drosophile. Cette spécification est déterminée par un gradient initial des facteurs Bicoïd et Nanos dans l'oocyte qui à leur tour vont permettre l'établissement d'un gradient des facteurs Caudal et Hunchback le long de l'axe de l'embryon précoce (cf. (Huynh and St Johnston, 2004; Riechmann and Ephrussi, 2001) pour revue). C'est l'activité graduelle de ces facteurs qui sera responsable de la détermination des différents segments qui défissent l'axe antéropostérieur. Cependant, excepté pour PU.1, un effet dose dépendante pour d'autres facteurs de transcriptions n'a pas été mis en valeur jusqu'à présent chez les vertébrés. Dans ces organismes, il est couramment considéré que ce sont des facteurs extérieurs (ou morphogènes) qui selon leur concentration vont dicter des destins différents au cours du développement (Tabata and Takei, 2004; Wolpert, 1989). Par conséquent, cette notion fondamentale d'une régulation discrète de la différenciation hématopoïétique, par opposition à un contrôle basé sur la présence ou l'absence d'un facteur couplé à un effet unique, institue PU.1 comme un facteur unique chez les vertébrés.

Bibliographie

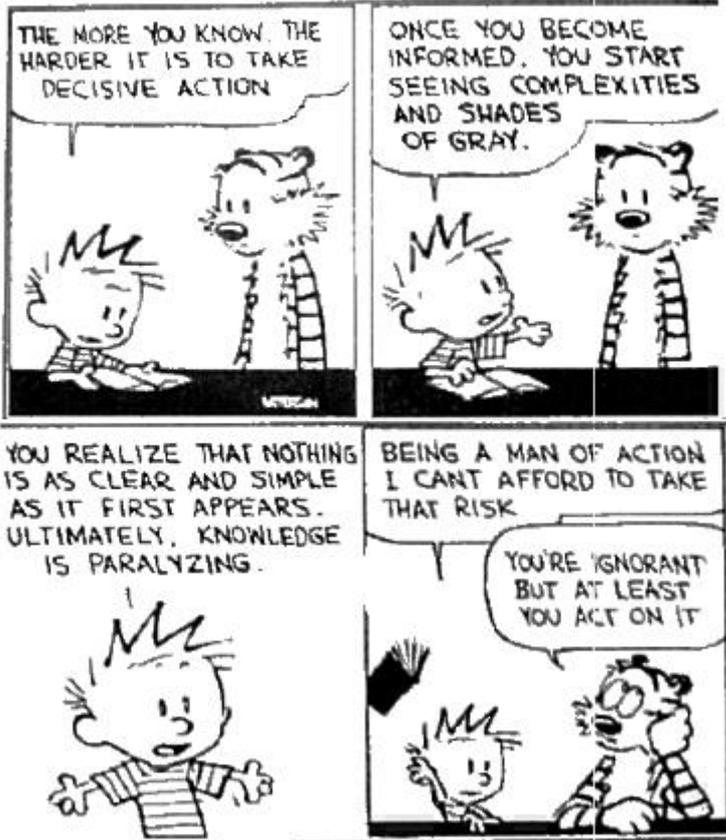
(Discussion & perspectives)
(Discussion & perspectives)

- Anderson, M. K., Weiss, A. H., Hernandez-Hoyos, G., Dionne, C. J., and Rothenberg, E. V. (2002). Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity* *16*, 285-296.
- Arnold, L. W., Pennell, C. A., McCray, S. K., and Clarke, S. H. (1994). Development of B-1 cells: segregation of phosphatidyl choline-specific B cells to the B-1 population occurs after immunoglobulin gene expression. *J Exp Med* *179*, 1585-1595.
- Celada, A., Borrás, F. E., Soler, C., Lloberas, J., Klemsz, M., van Beveren, C., McKercher, S., and Maki, R. A. (1996). The transcription factor PU.1 is involved in macrophage proliferation. *J Exp Med* *184*, 61-69.
- Chen, X., Martin, F., Forbush, K. A., Perlmutter, R. M., and Kearney, J. F. (1997). Evidence for selection of a population of multi-reactive B cells into the splenic marginal zone. *Int Immunol* *9*, 27-41.
- Colucci, F., Samson, S. I., DeKoter, R. P., Lantz, O., Singh, H., and Di Santo, J. P. (2001). Differential requirement for the transcription factor PU.1 in the generation of natural killer cells versus B and T cells. *Blood* *97*, 2625-2632.
- Corcoran, L., Ferrero, I., Vremec, D., Lucas, K., Waithman, J., O'Keeffe, M., Wu, L., Wilson, A., and Shortman, K. (2003). The lymphoid part of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J Immunol* *170*, 4926-4932.
- Dahl, R., Walsh, J. C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S. R., Singh, H., and Simon, M. C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol*.
- DeKoter, R. P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* *288*, 1439-1441.
- Dumortier, A., Kirstetter, P., Kastner, P., and Chan, S. (2003). Ikaros regulates neutrophil differentiation. *Blood* *101*, 2219-2226.
- Elwood, N. J., Zogos, H., Pereira, D. S., Dick, J. E., and Begley, C. G. (1998). Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood* *91*, 3756-3765.
- Garrett-Sinha, L. A., Su, G. H., Rao, S., Kabak, S., Hao, Z., Clark, M. R., and Simon, M. C. (1999). PU.1 and Spi-B are required for normal B cell receptor-mediated signal transduction. *Immunity* *10*, 399-408.
- Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* *2*, 162-174.
- Hoang, T., Paradis, E., Brady, G., Billia, F., Nakahara, K., Iscove, N. N., and Kirsch, I. R. (1996). Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* *87*, 102-111.

- Hong, W., Kim, A. Y., Ky, S., Rakowski, C., Seo, S. B., Chakravarti, D., Atchison, M., and Blobel, G. A. (2002). Inhibition of CBP-mediated protein acetylation by the Ets family oncoprotein PU.1. *Mol Cell Biol* 22, 3729-3743.
- Hu, C. J., Rao, S., Ramirez-Bergeron, D. L., Garrett-Sinha, L. A., Gerondakis, S., Clark, M. R., and Simon, M. C. (2001). PU.1/Spi-B regulation of c-rel is essential for mature B cell survival. *Immunity* 15, 545-555.
- Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C., and Enver, T. (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* 11, 774-785.
- Huynh, J. R., and St Johnston, D. (2004). The origin of asymmetry: early polarisation of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Curr Biol* 14, R438-449.
- Kastan, M. B., Radin, A. I., Kuerbitz, S. J., Onyekwere, O., Wolkow, C. A., Civin, C. I., Stone, K. D., Woo, T., Ravindranath, Y., and Craig, R. W. (1991). Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res* 51, 4279-4286.
- Kim, H. G., De Guzman, C. G., Swindle, C. S., Cotta, C. V., Gartland, L., Scott, E. W., and Klug, C. A. (2004). The ETS-family transcription factor, PU.1, is necessary for the maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood*.
- Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P., and Chan, S. (2002). Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol* 32, 720-730.
- Krosl, G., He, G., Lefrancois, M., Charron, F., Romeo, P. H., Jolicoeur, P., Kirsch, I. R., Nemer, M., and Hoang, T. (1998). Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J Exp Med* 188, 439-450.
- Lam, K. P., and Rajewsky, K. (1999). B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J Exp Med* 190, 471-477.
- Lecuyer, E., Herblot, S., Saint-Denis, M., Martin, R., Begley, C. G., Porcher, C., Orkin, S. H., and Hoang, T. (2002). The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* 100, 2430-2440.
- Lotem, J., and Sachs, L. (1993). Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood* 82, 1092-1096.
- Martin, F., Chen, X., and Kearney, J. F. (1997). Development of VH81X transgene-bearing B cells in fetus and adult: sites for expansion and deletion in conventional and CD5/B1 cells. *Int Immunol* 9, 493-505.
- Martin, F., and Kearney, J. F. (2000). Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity* 12, 39-49.
- Medina, K. L., Pongubala, J. M., Reddy, K. L., Lancki, D. W., Dekoter, R., Kieslinger, M., Grosschedl, R., and Singh, H. (2004). Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Dev Cell* 7, 607-617.

- Mikkola, H. K., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T. M., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (2003). Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* *421*, 547-551.
- Nerlov, C., and Graf, T. (1998). PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* *12*, 2403-2412.
- Ohishi, K., Katayama, N., Shiku, H., Varnum-Finney, B., and Bernstein, I. D. (2003). Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol* *14*, 143-150.
- Prokocimer, M., and Rotter, V. (1994). Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. *Blood* *84*, 2391-2411.
- Rekhtman, N., Choe, K. S., Matushansky, I., Murray, S., Stopka, T., and Skoultschi, A. I. (2003). PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol Cell Biol* *23*, 7460-7474.
- Riechmann, V., and Ephrussi, A. (2001). Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 374-383.
- Rosenbauer, F., Wagner, K., Kutok, J. L., Iwasaki, H., Le Beau, M. M., Okuno, Y., Akashi, K., Fiering, S., and Tenen, D. G. (2004). Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* *36*, 624-630.
- Scott, E. W., Fisher, R. C., Olson, M. C., Kehrli, E. W., Simon, M. C., and Singh, H. (1997). PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity* *6*, 437-447.
- Spain, L. M., Guerriero, A., Kunjibettu, S., and Scott, E. W. (1999). T cell development in PU.1-deficient mice. *J Immunol* *163*, 2681-2687.
- Tabata, T., and Takei, Y. (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* *131*, 703-712.
- Vitelli, L., Condorelli, G., Lulli, V., Hoang, T., Luchetti, L., Croce, C. M., and Peschle, C. (2000). A pentamer transcriptional complex including tal-1 and retinoblastoma protein downmodulates c-kit expression in normal erythroblasts. *Mol Cell Biol* *20*, 5330-5342.
- Wang, J. H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A. H., Bigby, M., and Georgopoulos, K. (1996). Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* *5*, 537-549.
- Watanabe, N., Nisitani, S., Ikuta, K., Suzuki, M., Chiba, T., and Honjo, T. (1999). Expression levels of B cell surface immunoglobulin regulate efficiency of allelic exclusion and size of autoreactive B-1 cell compartment. *J Exp Med* *190*, 461-469.
- Wolpert, L. (1989). Positional information revisited. *Development* *107 Suppl*, 3-12.

La conclusion de 4 années
de thèse



© Bill Waterson.

Rôles versatiles du facteur de transcription PU.1 dans l'hématopoïèse murine.

Le facteur de transcription PU.1 a été initialement identifié sous le nom de spi-1, un oncogène impliqué dans les érythroleucémies murines induites par le virus de friend, en tant que site d'insertion majeur pour ce virus. Par la suite, PU.1 a été caractérisé comme un régulateur positif crucial du développement myéloïde et lymphoïde, mais sans fonction au cours de l'érythropoïèse. Nous avons généré une lignée de souris porteuse d'une mutation nulle ciblant le premier exon du locus PU.1, en y insérant le gène rapporteur GFP. L'étude de cette lignée de souris déficiente pour PU.1 a permis d'étendre le rôle de PU.1 dans les précurseurs érythroïdes, où sa fonction est fortement corrélée à l'effet pathologique de PU.1 dans les érythroleucémies de Friend. Ainsi, l'absence de PU.1 (ou sa réduction comme dans les hétérozygotes) est liée à une réduction de la capacité de prolifération des PE ainsi qu'à une différenciation accentuée. L'analyse de l'activité du locus PU.1 *in vivo*, à l'aide du gène rapporteur a révélé que l'expression de PU.1 est régulée de façon hautement dynamique et s'étend dans quasiment l'ensemble du système hématopoïétique. Ces données suggèrent de nouvelles implications pour PU.1 aussi bien dans le compartiment des progéniteurs que dans certaines cellules matures. La synthèse de ces données érige PU.1 comme un facteur central contrôlant de multiples aspects de l'hématopoïèse, en exerçant des effets antagonistes selon le lignage et son taux d'expression.

Highly versatile functions of PU.1 in hematopoiesis.

PU.1 transcription factor, first known as spi-1 an oncogene involved in the Friend virus-induced erythroleukemia, has been characterized as a crucial positive regulator of myeloid and lymphoid differentiation, but as not important for erythropoiesis. We have generated a PU.1 deficient mouse line in which the PU.1 locus has been targeted with the GFP reporter transgene. The analysis of the PU.1 null mice revealed a new crucial function for PU.1 in erythroid precursors, highly correlated with its pathological involvement in friend erythroleukemia. Absence (or reduction as shown by the heterozygous phenotype) of PU.1 in erythroid progenitors alters their self-renewal capacity and increases their tendency to differentiate. PU.1 locus activity, visualized with the GFP reporter, underlined a highly dynamic expression in nearly all the hematopoietic system. These data imply PU.1 in various compartments of the hematopoietic system, suggesting new functions. All together, these results set PU.1 as a central regulator of hematopoiesis, exerting antagonistic activities depending on the lineage and the dosage of its expression.

