

Université de Montréal

**Identification de transcrits modulés par ETV6, un gène
candidat suppresseur de tumeur**

Par
Gino Boily

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté des Études Supérieures

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat (Ph.D.)
en Biologie Moléculaire

Décembre 2005

© Gino Boily, 2005



QH

506

U54

2006

v. 019

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Identification de transcrits modulés par ETV6, un gène candidat suppresseur de
tumeur

présentée par :
Gino Boily

a été évaluée par :

Jean Vacher, président-rapporteur

Edward Bradley, membre du jury

Daniel Sinnett, directeur de recherche

Mario Chevrette, examinateur externe

RÉSUMÉ

Chez l'enfant, la leucémie est la néoplasie la plus fréquemment diagnostiquée comptant pour environ 26 % des cas. Cette maladie est aussi la plus meurtrière étant responsable d'environ 30 % des décès. Des pertes de matériel génétique au niveau du chromosome 12p12-13 sont observées dans approximativement 30 % des enfants atteints de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA), suggérant la présence d'un locus suppresseur de tumeur dans cette région. L'objectif général de la présente étude était d'identifier le(s) gène(s) suppresseur(s) de tumeurs dans la région critique et de comprendre l'impact de son inactivation dans le développement et/ou la progression de la leucémie. Au moment d'initier les travaux décrits dans cette thèse, seulement deux gènes connus, ETV6 et LRP6, étaient localisés dans la région commune de délétion. Nous avons identifié trois nouveaux gènes et caractérisé de nouvelles isoformes des gènes BCL-G et MKP7, portant ainsi à sept le nombre de gènes candidats dans la région critique. Nous avons recherché dans l'ADN génomique de LLA de patients la présence de mutations dans la région codante de ces gènes. Aucune mutation somatique n'a été détectée. L'étude d'expression dans ces LLA a cependant révélé que seul le gène ETV6 était inactivé dans la majorité des cas. Les événements d'inactivation les plus fréquents étaient la délétion et la translocation t(12 ;21) sur l'allèle résiduel. Les polymorphismes identifiés au cours de la recherche de mutations ont de plus permis de réduire la région commune de délétions à un intervalle contenant les gènes ETV6 et BCL-G. Ces évidences génétiques jumelées à des données fonctionnelles font de ETV6 le principal candidat suppresseur de tumeur de la région délétée. ETV6 est un facteur de transcription (TF) de la famille ETS. Son rôle n'est toujours pas clair à ce jour, principalement à cause du nombre restreint de cibles caractérisées. Afin de mieux comprendre l'impact de l'inactivation de ce TF dans la LLA, nous avons généré des clones inductibles pour le gène ETV6 en utilisant le système Tet-On. Nous avons ensuite analysé le transcriptome de ce système cellulaire à différents temps après l'induction de ETV6 à l'aide d'une étude de microarrays. Cette étude a permis d'identifier 87 gènes modulés suite à l'induction avec la doxycycline. La

modulation de 10 de ces gènes, AKR1C1, AKR1C3, IL18, LUM, PHLD1, PTGER4, PTGS2, SPHK1, TP53 et VEGF, a été validée par RT-PCR quantitatif en temps réel. Nous avons évalué la capacité d'une vingtaine d'éléments *cis* ETS, situés dans les promoteurs de ces gènes, à lier des protéines nucléaires à l'aide de la méthode d'« electromobility shift assay » (EMSA). Des éléments *cis* situés au niveau des promoteurs des gènes AKR1C3, IL18, LUM, PTGER4, PTGS2, TP53 et VEGF ont lié des protéines nucléaires de façon dépendante à la séquence consensus ETS centrale. Parmi les gènes validés, l'expression des gènes IL18, LUM, PTGER4, SPHK1 et TP53 corrélait directement avec celle de ETV6 dans les LLA de patients, suggérant une régulation de ces gènes par ETV6 dans les LLA. L'analyse *in silico* plus approfondie des données d'expression des 87 gènes modulés par ETV6 a démontré que des gènes ayant un profil de modulation similaire partagent aussi des caractéristiques biologiques ou des éléments conservés au niveau de leur promoteur. Globalement, notre étude a permis la caractérisation de nouveaux gènes dans la région critique, l'établissement de ETV6 comme candidat gène suppresseur de tumeur le plus probablement impliqué dans les altérations du chromosome 12p12-13 retrouvées dans la leucémie, l'identification de gènes modulés par ETV6, l'identification d'éléments *cis* par lesquels ETV6 pourrait réguler ces gènes et de proposer des mécanismes hypothétiques par lesquels ETV6 pourrait agir comme suppresseur de tumeur.

Mots clés: leucémie, gène suppresseur de tumeur, chromosome 12, mutations, ETV6, microarrays, régulation de l'expression génique, cibles transcriptionnelles, sites de liaison à des facteurs de transcription, termes Gene Ontology

ABSTRACT

Leukemia is the most frequently diagnosed neoplasia in children, representing 26% of cases. This disease also kills more children than any other cancer, being responsible for 32% of deaths. Deletions of chromosome 12p12-13 are observed in approximately 30% of acute lymphoblastic leukemia cases, suggesting the presence of a tumor suppressor gene in the region. The general objective of the present study was to identify the tumor suppressor genes(s) in the critical region and to understand the impact of its inactivation in the development and/or progression of leukemia. At the moment of starting this work, only two genes, ETV6 and LRP6, were known to be located in the critical region. We have identified three new genes and characterized new mRNA isoforms of BCL-G and MKP7, bringing the number of genes in the region to 7. Somatic mutations were sought, in the coding region of the genes located in the critical region, in leukemias from patients but none were detected. However, our expression analysis showed that ETV6 was the only gene being silenced in most leukemia samples. The most frequent inactivation events were the deletion and the translocation t(12;21) on the residual allele. Moreover, the newly identified polymorphisms allowed the reduction of the shortest commonly deleted region to an interval containing ETV6 and BCL-G genes. This genetic evidence along with other functional evidence suggests that ETV6 is the main TSG candidate in the region. ETV6 is a transcription factor (TF) of the ETS family. Its function is still poorly understood, mainly because only few transcriptional targets are known so far. To better understand the role of this TF in leukemia, we generated ETV6-inducible clones using the Tet-On system. We analyzed the transcriptome of cells induced for ETV6 expression at different time points. Eighty-seven genes were found to be modulated by the induction with doxycyclin. The expression of 10/13 genes, AKR1C1, AKR1C3, IL18, LUM, PHLD1, PTGER4, PTGS2, SPHK1, TP53 and VEGF, was validated using real-time quantitative RT-PCR. We assessed the capacity of about 20 ETS *cis* elements, located in the promoter of the validated genes, to bind to nuclear proteins, using electromobility shift assays (EMSA). We identified *cis* elements binding to nuclear proteins in an ETS core sequence-

dependent manner in the promoter of AKR1C3, IL18, LUM, PTGER4, PTGS2, TP53 and VEGF. Amongst the validated genes, expression of IL18, LUM, PTGER4, SPHK1 and TP53 was shown to directly correlate with that of ETV6 in leukemias from patients, suggesting a role for ETV6 in regulating these genes in leukemia cells. Further *in silico* analyses, using expression data of the 87 ETV6 modulated genes, showed that some genes presenting similar modulation profiles shared biological features or conserved transcription factor binding sites (TFBS) in their promoter. Overall, this study allowed the characterization of new genes in the deleted region, the establishment of ETV6 as the most probable TSG involved in childhood leukemia, the identification of new ETV6-modulated genes, the identification of promoter *cis* elements by which ETV6 could regulate the expression of these genes and the proposition of hypothetical mechanisms involving ETV6 as a TSG in leukemia.

Key words: leukemia, tumor suppressor gene, chromosome 12, mutations, ETV6, microarrays, gene expression regulation, transcriptional targets, transcription factor binding sites, Gene Ontology terms

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	XII
REMERCIEMENTS	XV
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1.1 Historique du projet	1
1.2 Biologie du cancer	1
1.2.1 Oncogènes et gènes suppresseur de tumeur	2
1.2.2 Immortalisation	2
1.2.3 Transformation	8
1.2.4 Habiletés acquises des cellules cancéreuses	11
1.2.4.1 Auto-stimulation de la prolifération.....	13
1.2.4.2 Insensibilité aux signaux inhibiteurs de prolifération	13
1.2.4.3 Résistance à l'apoptose	15
1.2.4.4 Capacité de division illimitée.....	16
1.2.4.5 Capacité à former de nouveaux vaisseaux	16
1.2.4.6 Capacité d'invasion et potentiel métastatique.....	17
1.3 La leucémie de l'enfant	19
1.3.1 Statistiques sur la leucémie	19
1.3.2 Définition et classification des leucémies	20
1.3.3 Facteurs de risque de la leucémie chez l'enfant	22
1.3.4 Bases moléculaires de la LLA de l'enfant	24
1.3.4.1 Anomalies chromosomiques de nombre	24
1.3.4.2 Anomalies chromosomiques de structure	26
1.3.4.3 Gènes suppresseurs de tumeur et oncogènes	31
1.4 Délétions du locus 12p12-13 dans la LLA	35
1.5 ETV6	38
1.5.1 Famille ETS	38

1.5.1 Structure génique et protéique	43
1.5.2 Activité transcriptionnelle.....	43
1.5.3 Régulation de ETV6.....	45
1.5.4 Fonction de ETV6	47
1.5.5 ETV6 comme suppresseur de tumeur	48
1.5.6 Translocation t(12;21)(p13;q22)	49
1.6 Hypothèse et objectifs	53
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	55
2.1 Carte de transcrits détaillée de la région communément délétée dans les LLA.....	55
Introduction à l'article.....	55
Article : « A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumor suppressor locus. »	56
2.2 Étude de mutations et de l'expression des gènes candidats suppresseurs de tumeur du locus 12p12-13 dans des LLA pré-B de patients	85
Introduction à l'article.....	85
Article : « Mutational and expression analysis of the chromosome 12p13 candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia. »	86
2.3 ETV6 inhibe la croissance de la lignée cellulaire de LLA pré-B Reh	111
2.4 Identification de gènes modulés par ETV6.....	114
Introduction à l'article.....	114
Article : « Identification of transcripts modulated by ETV6, a putative tumor suppressor gene associated to childhood leukemia. »	115
2.5 Étude des connexions entre les gènes modulés par ETV6.....	166
Introduction à l'article.....	166
Article : « Connections between ETV6-modulated genes : an association study. » ..	167
CHAPITRE 3 : DISCUSSION	204
3.1 ETV6 est le GST candidat du locus 12p12-13 impliqué dans la LLA de type pré-B	205
3.2 Gènes modulés par ETV6 et leur impact sur la LLA	209
3.3 Identification d'éléments de la famille ETS dans la région promotrice de gènes modulés par ETV6	232
3.4 Analyse des connexions entre les gènes modulés par ETV6.....	234
3.5 Conclusions et orientations futures	239
RÉFÉRENCES.....	243

**ANNEXE 1 : AUTORISATION DES CO-AUTEURS ET DES ÉDITEURS POUR
L'UTILISATION DES ARTICLES INCLUS DANS LA THÈSE..... 263**

ANNEXE 2 : AUTORISATION DE RÉIMPRESSION DES FIGURES 9 ET 10... 265

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Caractéristiques des cellules transformées <i>in vitro</i>.....	10
Tableau II. Habilités acquises des cellules cancéreuses.....	12
Tableau III. Facteurs de risques de la leucémie de l'enfant.....	23
Tableau IV. Anomalies chromosomiques de nombre liées à la LLA de l'enfant.	25
Tableau V. Anomalies chromosomiques de structure liées à la LLA de l'enfant.	28
Tableau VI. Perte d'hétérozygotie (LOH) dans les LLA de l'enfant.....	33
Tableau VII. Fréquence dans la LLA de l'enfant d'altérations de GST et d'oncogènes communément associés au cancer.....	34
Tableau VIII. Exemples de gènes associés au cancer qui sont ciblés par des facteurs ETS.	40
Tableau IX. Sommaires des gènes potentiellement modulés par ETV6.....	211

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Caractère multi-étapes du cancer.....	3
Figure 2. Activation d'un oncogène.....	4
Figure 3. Inactivation d'un gène suppresseur de tumeur (GST).	5
Figure 4. Voies moléculaires impliquées dans l'immortalisation cellulaire <i>in vitro</i>.	7
Figure 5. Voies de différenciation hématopoïétique.	21
Figure 6. Mécanismes d'activation oncogénique par translocation.	27
Figure 7. Détermination d'une région commune de délétion par la recherche de perte d'hétérozygotie (loh).	32
Figure 8. Carte de transcrits de la région commune de délétion du locus 12p12-13.....	37
Figure 9. Facteurs de transcription de la famille ETS impliqués dans la différenciation hématopoïétique.....	41
Figure 10. Arbre phylogénétique de certains facteurs ETS.....	42
Figure 11. Structure de la protéine ETV6 provenant du transcrit pleine longueur (TEL-a).	44
Figure 12. Structure protéique de ETV6-AML1.	51
Figure 13. ETV6 ralentit la croissance de la lignée de LLA pré-B Reh.	113
Figure 14. Relation entre les gènes identifiés comme étant modulés par ETV6 qui sont reliés au cancer, les catégories fonctionnelles dans lesquelles les gènes peuvent être classifiés et les habiletés acquises du cancer.	215
Figure 15. Mécanisme hypothétique de l'action de ETV6 sur les cellules de LLA via IL18.	222
Figure 16. Mécanisme hypothétique de l'action de ETV6 sur les cellules LLA et/ou Lymphocytes pré-B (LB) via LUM.	225
Figure 17. Mécanisme hypothétique de l'action de ETV6 sur les cellules LLA et/ou lymphocytes pré-B (LB) via PTGER4.....	227
Figure 18. Mécanisme hypothétique de l'action de ETV6 sur les cellules LLA et/ou les lymphocytes pré-B (LB) via SPHK1.	229
Figure 19. Mécanisme hypothétique de l'action de ETV6 sur les cellules LLA et/ou les lymphocytes pré-B (LB) via TP53.....	231

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ALT : allongement télomérique alternatif (« alternative lengthening of telomeres »)

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

CDK : kinase dépendante de cycline (« cyclin-dependent kinase »)

ChIP : immunoprécipitation de la chromatine

EMSA : essais de retard sur gel (« electromobility shift assay »)

ETS : E26 transformation-specific sequence

ETV6: ETS variant 6

FACS : « fluorescent-activated cell sorting »

G0 : phase de quiescence du cycle cellulaire

G1 : phase « Gap1 » du cycle cellulaire

GO : Gene Ontology

GST : gène suppresseur de tumeur

HPV : virus du papillome humain (« human papilloma virus »)

ICE : « IL1 β -converting enzyme »

LLA : leucémie lymphoblastique aiguë

LLC : leucémie lymphoblastique chronique

LMA : leucémie myéloblastique aiguë

LMC : leucémie myéloblastique chronique

MAPK : « mitogen-activated protein kinase »

MEF : fibroblastes embryonnaires de souris (« mouse embryo fibroblasts »)

MKP7 : phosphatase de MAPK 7

PcG : protéines du groupe polycomb

PGE : prostaglandine de type E

PNT : domaine « pointed »

RNAi : « RNA interference »

RTK : récepteur à tyrosine kinase

RT-PCR : « reverse transcription polymerase chain reaction »

S : phase de synthèse de l'ADN dans le cycle cellulaire

S1P : sphingosine-1-phosphate

SFFV : virus « Spleen focus forming »

shRNA: « short hairpin RNA »

SV40 : virus simien 40 (« simian virus 40 »)

TEL : Translocation, ETS, leukemia

TF : facteur de transcription (« transcription factor »)

TFBS : site de liaison d'un facteur de transcription (« transcription factor binding site »)

À Pascale et Simon

Remerciements

J'aimerais remercier les personnes suivantes :

-Mon directeur de recherche Daniel Sinnett pour son soutien, sa disponibilité, son amitié et pour m'avoir guidé dans mes choix académiques.

-Mes collègues de laboratoire pour leur soutien au quotidien, les nombreuses discussions et leur amitié. Un merci particulier à Josiane Larose, Sylvie Langlois et Patrick Beaulieu avec qui j'ai travaillé plus étroitement.

-Pascale, ma conjointe, pour son soutien, sa compréhension et surtout sa patience, spécialement durant la rédaction de cette thèse.

-Mon fils Simon pour sa compréhension et sa patience.

-Mon frère Sébastien pour son aide avec la correction du français de cette thèse.

-Mme Vivianne Jodoin, au programme de Biologie Moléculaire, pour son dévouement constant auprès des étudiants.

Je remercie également les organisations suivantes pour leur soutien financier :

-Le Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ);

-Le programme de Biologie Moléculaire de l'Université de Montréal;

-La Faculté des Études Supérieures (bourse de la banque Toronto-Dominion).

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 Historique du projet

La leucémie de l'enfant constitue l'un des principaux intérêts de recherche de notre laboratoire. L'objectif global de cette recherche est de comprendre les mécanismes responsables du développement et de la progression de cette maladie afin de prévenir ou d'arrêter son développement. Outre cet objectif directement visé, l'étude de la leucémie présente également un intérêt en soi comme outil pour mieux comprendre le cancer en général. Il y a une dizaine d'années, notre laboratoire s'est intéressé à une région située sur le chromosome 12p qui est délétée de façon récurrente dans la leucémie de l'enfant. Puisqu'une telle délétion suggère la présence d'un gène suppresseur de tumeur (GST) situé dans la région touchée, le laboratoire a entrepris des travaux dans le but d'identifier le(s) GST en question. D'ailleurs, notre laboratoire a participé activement à la construction des cartes génétiques et physiques de cette région (Baccichet, A et Sinnett, D 1997; Aissani, B et Sinnett, D 1999). L'étude décrite dans cette thèse se veut une suite logique à ce processus menant à l'identification du (des) GST de la région et à sa (leur) caractérisation ayant pour but de mieux comprendre le mécanisme de leucémogénèse relié à cette anomalie génétique. Dans les sections suivantes, nous aborderons les notions biologiques de bases relatives au cancer, soulignerons l'importance de la LLA comme maladie de l'enfant, décrirons les principales anomalies caractérisant cette maladie puis passerons en revue nos connaissances actuelles sur ETV6, gène qui, à la lumière de nos résultats, nous semble correspondre le plus probablement au candidat GST recherché. Ce chapitre se terminera par l'énoncé des objectifs de notre étude.

1.2 Biologie du cancer

1.2.1 Oncogènes et gènes suppresseur de tumeur

Le cancer est une maladie affectant généralement les cellules somatiques. L'évolution d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse se fait en plusieurs étapes, marquées par l'acquisition d'altérations génétiques et épigénétiques, d'où le concept de processus multi-étapes du cancer (figure 1). Ces altérations permettent à la cellule de proliférer de façon incontrôlée et éventuellement de se disséminer dans tout l'organisme. En oncologie, on considère généralement les gènes impliqués dans le cancer de façon dichotomique, c'est-à-dire qu'on les classe en 2 grands groupes, soit les oncogènes et les GSTs. Les oncogènes peuvent être définis comme étant des gènes, normaux à l'origine (proto-oncogènes), qui ont subi une altération résultant en un gain de fonction du produit génique promouvant le développement ou la progression du cancer (figure 2). À l'opposé, les GST sont des gènes dont l'inactivation (perte de fonction du produit génique) promeut le développement ou la progression du cancer (figure 3). Un grand nombre d'oncogènes et de GSTs ont été caractérisés jusqu'à ce jour. Les sections suivantes citeront des exemples de quelques-uns d'entre eux afin d'illustrer des concepts plus généraux reliés au cancer.

1.2.2 Immortalisation

Comment une cellule passe-t-elle de l'état normal à l'état tumoral? L'étude de cellules en culture nous a beaucoup appris sur ce phénomène. Pour passer d'un état dit « normal » à un état « tumoral », une cellule doit franchir essentiellement 2 étapes, l'immortalisation et la transformation. L'immortalité cellulaire est un phénotype qui réfère à la capacité que possède une cellule à se diviser virtuellement de façon infinie (Hahn, WC 2002). L'état de transformation, bien qu'associé à de multiples caractéristiques dont nous parlerons plus loin, repose essentiellement sur la capacité qu'ont les cellules à former une tumeur lorsqu'injectées dans un animal (Kufe, D et al. 2003).

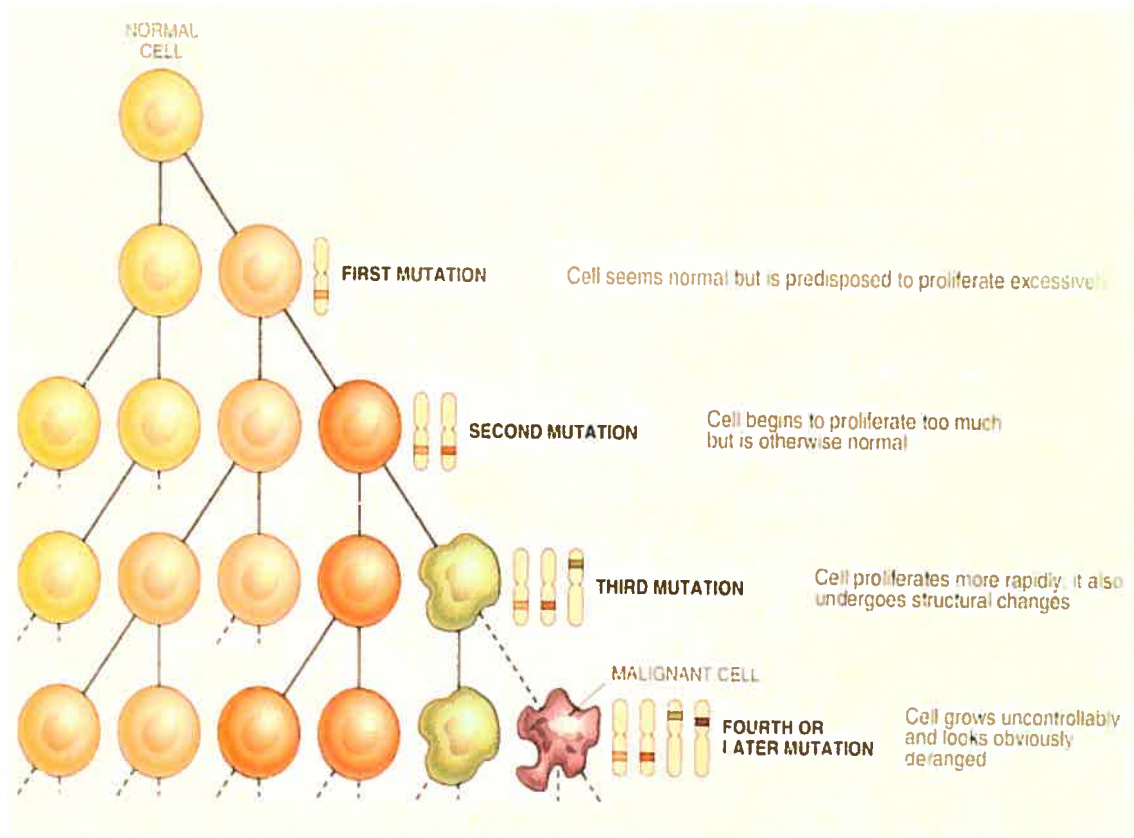


Figure 1. Caractère multi-étapes du cancer.

Une cellule normale doit subir plusieurs altérations génétiques et épigénétiques pour acquérir un phénotype cancéreux. Cette figure illustre le concept multi-étapes de la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Figure tirée des notes du cours MMD1005.

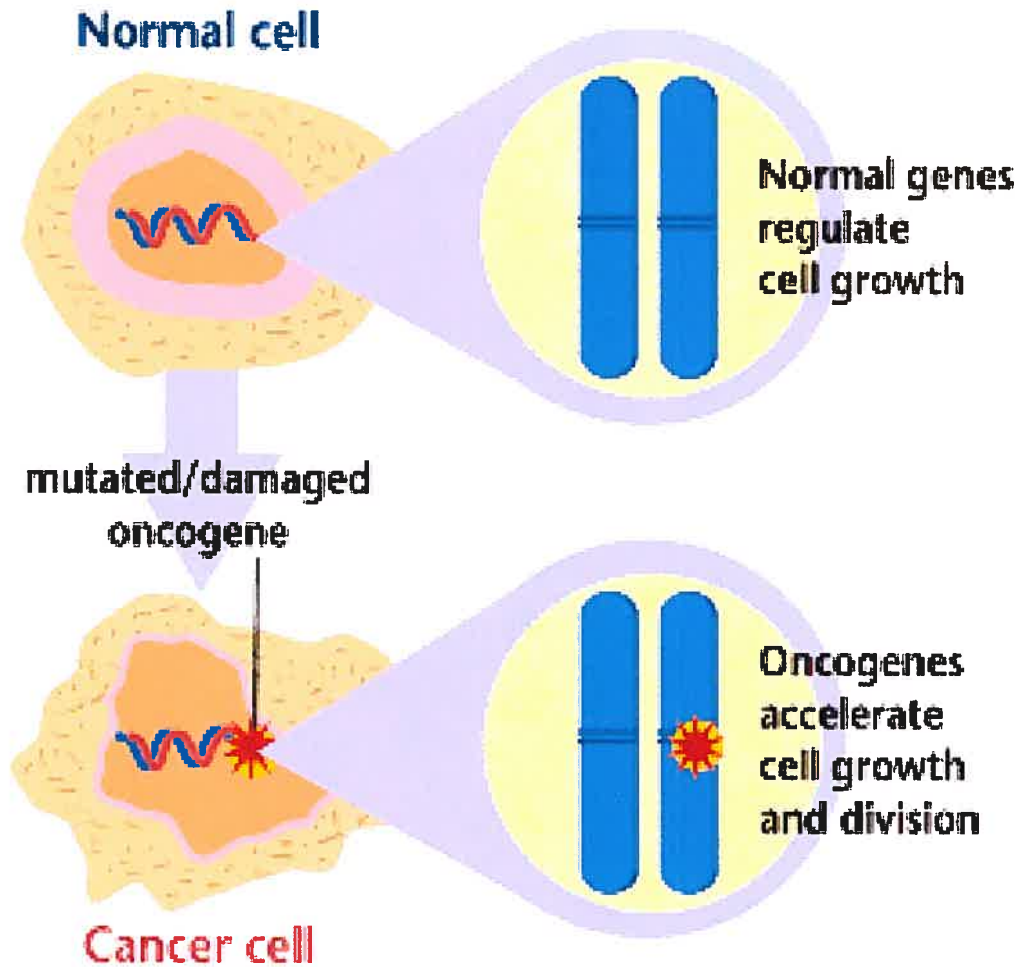


Figure 2. Activation d'un oncogène.

La cellule normale contient dans son génome des gènes que l'on appelle proto-oncogènes et qui remplissent des fonctions physiologiques de la cellule qui sont aussi associées au cancer. Dans le processus de développement du cancer, ces gènes peuvent subir des altérations génétiques (mutations) ou épigénétiques qui entraîneront un gain de fonction et favoriseront l'apparition du cancer. L'activation d'un oncogène réfère à ce phénomène. Figure tirée des notes du cours MMD1005.

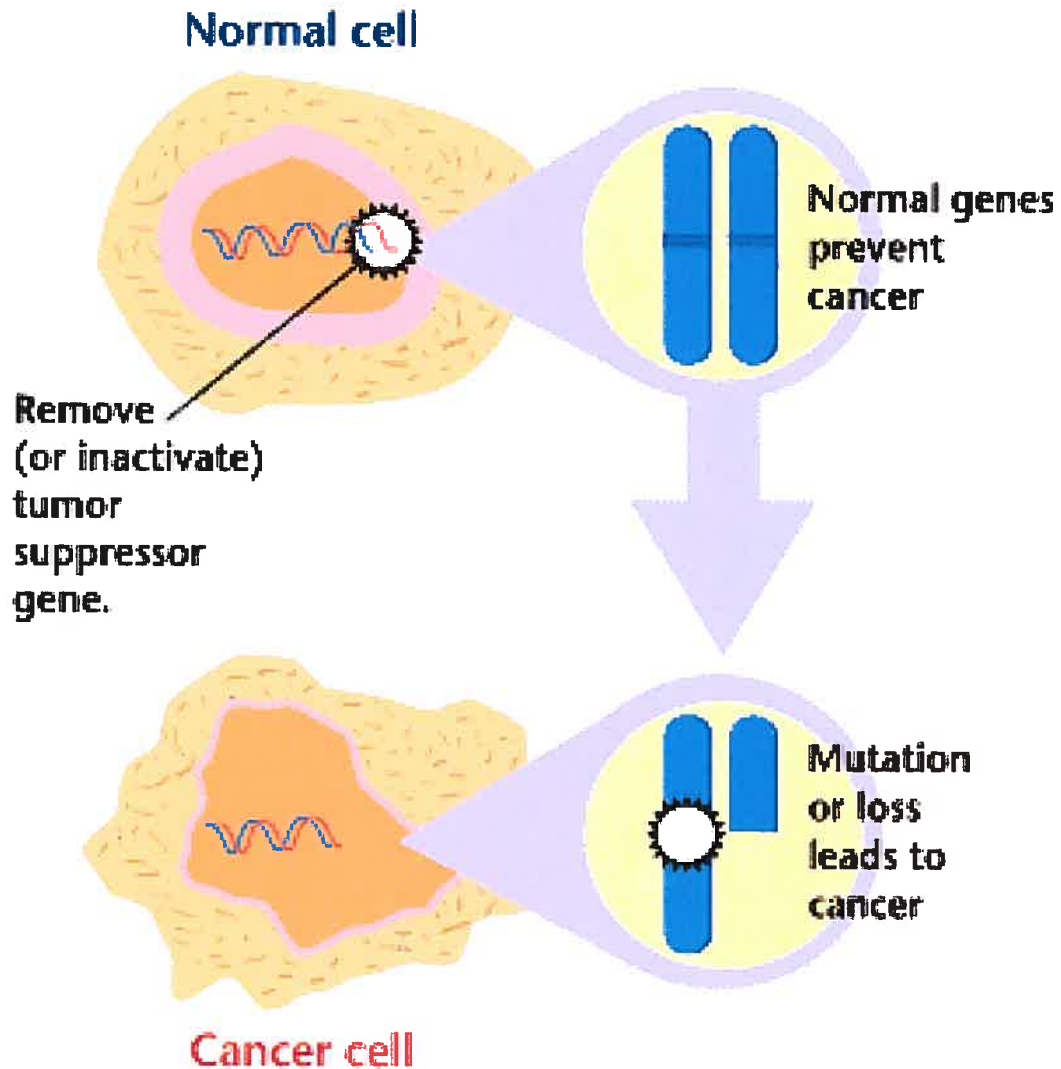


Figure 3. Inactivation d'un gène suppresseur de tumeur (GST).

La cellule normale contient dans son génome des gènes qui par leur activité freinent des phénotypes physiologiques qui sont aussi associés au cancer. Dans le processus de développement du cancer, ces gènes peuvent subir des altérations génétiques (mutations) ou épigénétiques qui entraîneront leur inactivation, ce qui favorisera l'apparition du cancer. Figure tirée des notes du cours MMD1005.

Lorsque des cellules sont explantées d'un animal et mises en culture, elles doivent d'abord s'adapter à leur nouveau milieu, une capacité qui diffère grandement selon le type cellulaire (Hahn, WC 2002). Lorsque cette étape est réussie, les cellules proliféreront mais le nombre de divisions qu'elles subiront sera limité et variable selon le type cellulaire après quoi les cellules entreront dans un stade de sénescence répllicative qui se caractérise par un arrêt de la prolifération, un changement morphologique et un maintien des activités métaboliques (Hayflick, L 1965; Hahn, WC 2002). Certains marqueurs moléculaires sont associés à la sénescence répllicative soit l'expression de p21 (Noda, A et al. 1994), p16^{INK4} (Alcorta, DA et al. 1996; Hara, E et al. 1996; Reznikoff, CA et al. 1996), PAI-1 (Mu, XC et al. 1998) et de la bêta-galactosidase acide (Dimri, GP et al. 1995). L'absence d'expression de l'unité catalytique de la télomérase TERT, qui caractérise généralement les cellules somatiques, fait en sorte que les télomères des chromosomes diminuent à chaque division cellulaire, ce qui précipiterait les cellules dans l'état de sénescence répllicative (Hahn, WC 2002). Il semble que la sénescence répllicative soit régulée par essentiellement 3 voies (figure 4): la stabilisation des télomères, la voie de pRB et celle de p53. L'expression ectopique de hTERT dans des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules épithéliales pigmentées de la rétine et des cellules mésothéliales permet à celles-ci d'éviter la sénescence répllicative et de devenir immortelles (Bodnar, AG *et al.* 1998; Vaziri, H et Benchimol, S 1998; Yang, J *et al.* 1999; Dickson, MA *et al.* 2000). Pour certains types cellulaires comme les kératinocytes, les cellules épithéliales mammaires ou les cellules épithéliales des voies respiratoires, l'expression ectopique de la télomérase est parfois insuffisante pour l'immortalisation (Kiyono, T et al. 1998; Dickson, MA et al. 2000; Lundberg, AS et al. 2002) qui peut par contre être achevée par la co-transfection avec la protéine du virus du papillome humain (HPV) E7, un inhibiteur de pRB (Foster, SA et Galloway, DA 1996), ou par l'inactivation spontanée de p16^{INK4}, une protéine intervenant aussi dans la voie de pRB (Kiyono, T et al. 1998; Dickson, MA et al. 2000) (figure 4). La voie de p53 pourrait également être impliquée dans l'immortalisation puisque, lorsque ce processus survient de façon spontanée dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), p53 ou p19^{ARF} est presque

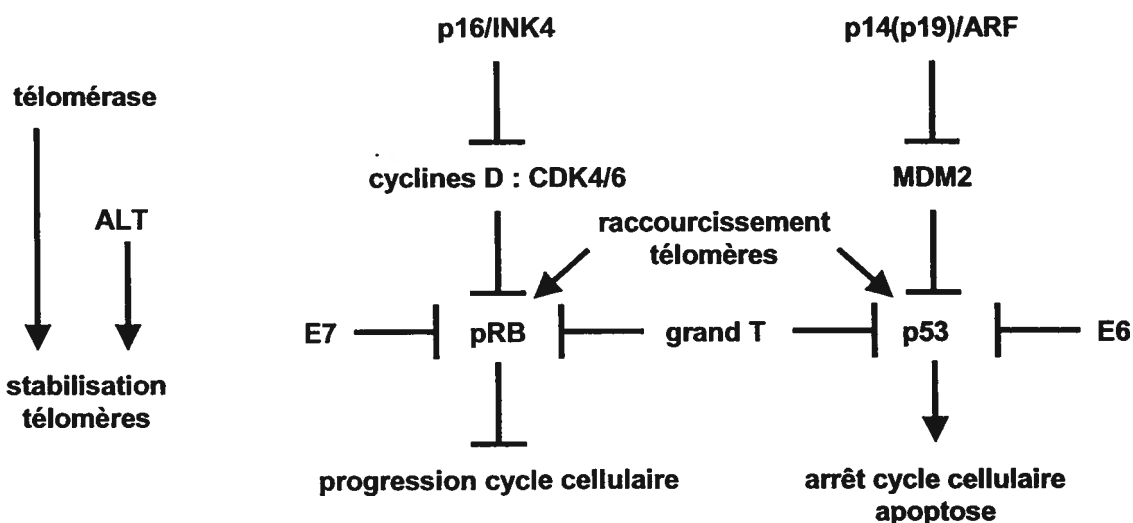


Figure 4. Voies moléculaires impliquées dans l'immortalisation cellulaire *in vitro*.

Trois voies moléculaires sont impliquées dans l'immortalisation de cellules *in vitro* :

- 1) la stabilisation des télomères, qui est assurée le plus souvent par la télomérase ou plus rarement par une voie alternative nommée ALT;
- 2) l'inhibition de la voie menant à l'activation de pRB, qui peut entre autres se faire par l'inhibition de p16^{INK4} ou par l'expression des oncoprotéines E7 ou grand T et
- 3) l'inhibition de TP53, qui peut se produire par l'inactivation de p14(p19)^{ARF}, de TP53 ou par l'expression des oncoprotéines grand T ou E6.

Dans certains types cellulaires, la stabilisation des télomères par l'expression de la télomérase est suffisante pour éviter la sénescence répliquative et enclencher l'immortalisation alors que dans d'autres types la voie de pRB doit aussi être inhibée. Il est également possible de retarder la sénescence répliquative par l'inactivation simultanée des voies de pRB et TP53 mais dans ce cas, l'immortalisation à proprement dite nécessitera également une stabilisation des télomères. Le raccourcissement des télomères mène à l'activation des voies de pRB et de TP53. Flèche : activation; ligne perpendiculaire : inhibition. Figure inspirée et adaptée de (Hahn, WC 2002).

invariablement inactivé (figure 4) (Harvey, DM et Levine, AJ 1991; Kamijo, T *et al.* 1997). Mentionnons que l'inactivation simultanée des voies de pRB et de p53 permettrons également d'éviter la sénescence répllicative, du moins à court terme, tel que suggéré par l'expression de la protéine grand T du virus simien 40 (SV40) (Shay, JW et Wright, WE 1989), qui inactive à la fois pRB et p53, ou par l'expression simultanée des protéines E6 et E7 de HPV (Bright, RK *et al.* 1997; Bond, JA *et al.* 1999) qui inactivent p53 et pRB, respectivement (figure 4). Ces cellules, qui n'expriment pas la télomérase, ne sont toutefois pas immortelles à ce stade. Elles subiront subséquemment une crise de laquelle émergeront des clones immortels ayant acquis la capacité de maintenir la stabilité de leurs télomères, un phénotype qui semble être un événement incontournable (Hahn, WC 2002). La stabilisation des télomères implique le plus souvent l'expression de la télomérase (Counter, CM *et al.* 1994; Kim, NW *et al.* 1994) mais peut aussi se faire, quoique plus rarement, de manière télomérase-indépendante (« alternative lengthening of telomeres » (ALT)) (Bryan, TM *et al.* 1995; Bryan, TM *et al.* 1997) (figure 4). Il a été proposé que le raccourcissement des télomères met en branle des mécanismes qui ultimement activent p53 et pRB (Karlseder, J *et al.* 1999; DePinho, RA 2000) (figure 4). Les cellules survivant à une crise qui deviennent immortelles présentent typiquement une aneuploïdie et des réarrangements chromosomiques (Counter, CM *et al.* 1992). Il est important de noter que, malgré ces anomalies et souvent l'inactivation des voies de pRB et TP53, ces cellules immortelles sont généralement incapables de former des tumeurs dans un animal et ne sont donc pas transformées (Shay, JW et Wright, WE 1989; Hahn, WC *et al.* 1999).

1.2.3 Transformation

Les voies impliquées dans l'immortalisation jouent également un rôle important dans la transformation puisqu'une majorité de cancers présentent une inactivation des voies de p53, pRB et une activité de la télomérase. Pourtant, nous avons mentionné que des cellules arborant ces anomalies ne forment pas nécessairement de tumeur dans un animal. Quels sont alors les événements

menant à la transformation? Abordons d'abord quelques caractéristiques de cellules transformées observées *in vitro* (tableau I) (Kufe, D et al. 2003). Les cellules transformées sont immortelles, c'est-à-dire qu'elles ont une capacité virtuellement infinie à se diviser. La caractéristique d'inhibition de contact qu'ont les cellules normales, c'est-à-dire le ralentissement de croissance observé lorsqu'elles atteignent une certaine densité en culture, est diminuée ou abolie chez les cellules transformées. Ainsi, elles pourront continuer à croître en s'empilant les unes sur les autres. Leur dépendance au sérum et aux facteurs de croissance est diminuée car les voies de signalisations mitogéniques sont souvent activées de façon constitutive ou par une stimulation autocrine. Les cellules transformées peuvent pousser de façon indépendante à un substrat d'ancrage et ainsi acquérir la capacité de former des colonies dans des milieux semi-solides. Elles peuvent perdre les points de contrôle de leur cycle cellulaire lorsqu'elles sont soumises à des conditions sous-optimales, comme lorsqu'on réduit ou retire le sérum. Ces cellules sont plus résistantes à l'apoptose. Elles présentent souvent des réarrangements chromosomiques observables en cytogénétique. Morphologiquement, elles ont des caractéristiques que l'on peut également observer *in vivo*, par exemple : un rapport cytoplasme/noyau diminué, un nombre parfois augmenté de nucléoles, qui sont souvent plus gros, et une grande proportion de cellules en mitose. Et l'ultime critère, comme nous l'avons mentionné précédemment, est que ces cellules ont la capacité de former des tumeurs lorsqu'injectées dans un animal.

Il y a près de 25 ans, des études effectuées sur les cellules NIH3T3 suggéraient qu'un seul oncogène introduit dans des cellules était suffisant pour induire leur transformation (Shih, C *et al.* 1979; Pulciani, S *et al.* 1982; Balmain, A et Pragnell, IB 1983). On a réalisé par la suite que pour ce faire, ces cellules devaient déjà à tout le moins être immortelles pour être transformées (Newbold, RF *et al.* 1982; Newbold, RF et Overell, RW 1983). Ceci est également bien illustré par le fait que l'utilisation de lignées primaires de rongeurs nécessite l'action d'au moins 2 oncogènes, par exemple *myc* et *ras* (Land, H et al. 1983) ou *E1A* et *ras* (Ruley, HE 1983), pour qu'il y ait transformation. Dans des souris

Tableau I. Caractéristiques des cellules transformées *in vitro*.

Caractéristiques liées à la croissance

- Immortelles*
- Capable de former une tumeur lorsque injectées dans un animal*
- Perte d'inhibition de contact
- Perte de la dépendance au sérum
- Voie(s) de signalisation mitogénique(s) constitutivement activée(s)
- Perte de dépendance à un substrat d'ancrage
- Perte de point de contrôle du cycle cellulaire
- Résistance à l'apoptose

Caractéristiques cytogénétiques

- Altération du nombre de chromosomes
- Réarrangements chromosomiques

Caractéristiques morphologiques

- Rapport cytoplasme/noyau diminué
- Augmentation de la taille et du nombre de nucléoles
- Nombre augmenté de cellules en mitose

Inspiré de (Kufe, D et al. 2003). Les caractéristiques indiquées ne sont pas toujours observées sauf lorsque marquées d'un astérisque (*). Voir détails dans le texte.

transgéniques sur-exprimant myc ou ras on note principalement des dysplasies ou hyperplasies alors que dans les doubles transgéniques on observe un taux plus élevé de néoplasies, appuyant l'hypothèse de la collaboration d'oncogènes dans le développement du cancer (Sinn, E et al. 1987; Thompson, TC et al. 1989). Cependant, la cinétique du développement de ces cancers suggère que la sur-expression de ces deux oncogènes est insuffisante pour induire le développement d'un cancer et que d'autres événements doivent se produire, ce qui est consistant avec l'hypothèse que le développement du cancer comporte de multiples-étapes (figure 1). La situation semble encore plus complexe dans les cellules humaines puisque la transfection d'oncogènes capables de transformer des cellules de rongeur s'avère souvent inefficace pour transformer des cellules humaines (Sager, R et al. 1983; Stevenson, M et Volsky, DJ 1986). En résumé, il semble donc que la transformation tumorale soit un processus multi-étapes et que les événements menant au stade de tumeur pourraient différer selon les espèces.

1.2.4 Habilidadés adquiridas des células canceréuses

À ce jour, des milliers d'altérations moléculaires reliées au cancer ont été recensées mais on ne connaît toujours pas quelles sont les combinaisons d'altérations requises qui conduisent à l'apparition d'un cancer (Hahn, WC et Weinberg, RA 2002). Bien que ces différentes combinaisons soient certainement multiples, il a été proposé que le cancer possède tout de même des « habilités adquiridas » qui sont partagées par la plupart sinon tous les cancers (Hanahan, D et Weinberg, RA 2000) et qui seraient adquiridas par l'entremise des changements génétiques et épigénétiques observés dans les cancers. Ces habilités s'apparentent aux caractéristiques de cellules transformées présentées précédemment (tableau II): 1) l'auto-stimulation de la prolifération; 2) l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de prolifération; 3) la résistance à l'apoptose; 4) la capacité de division illimitée (immortalité); 5) la capacité à former de nouveaux vaisseaux et 6) la capacité d'invasion et à former des métastases.

Tableau II. Hâbiletés acquises des cellules cancéreuses

Hâbileté acquise	Exemples d'anomalies observées dans les cancers
Auto-stimulation de la prolifération	-Sur-expression PDGF; -Sur-expression TGF α ; -Amplification ou sur-expression de HER2/neu; -Mutations de RAS.
Insensibilité aux signaux inhibiteurs de prolifération	-Mutations de RB; -Délétions p16 ^{INK4} ; -Régulation à la baisse ou mutation TGF β ; -Mutations SMAD4; -Sur-expression de MYC.
Résistance à l'apoptose	-Mutation de TP53; -Sur-expression de MDM2; -Délétion de p14 ^{ARF} ; -Sur-expression de BCL2.
Capacité de division illimitée	-Expression de la télomérase; -Délétion de p16 ^{INK4} ; -Mutation de TP53; -Mutations de RB.
Capacité à former de nouveaux vaisseaux	-Expression VEGF; -Expression bFGF; -Régulation à la baisse thrombospondine-1; -Régulation à la baisse interféron β .
Capacité d'invasion et à métastaser	-Régulation à la baisse de NCAM; -Mutation de E-cadhérine; -Mutation de β -caténine; -Sur-expression MMP2/9.

1.2.4.1 Auto-stimulation de la prolifération

Les cellules normales ont besoin d'être stimulées par des signaux de croissance pour passer de la quiescence à un état prolifératif. Par contre, les cellules cancéreuses peuvent être stimulées à croître de façon autonome par trois principales stratégies : altération de signaux extra-cellulaires de prolifération, altération de la transduction trans-membranaire de ces signaux et altération des voies de signalisation intra-cellulaires. Les cellules produisent parfois des facteurs de croissance auxquels elles sont sensibles, ce qui donne lieu à une stimulation autocrine de croissance. Ceci est illustré par certains glioblastomes qui sur-expriment le facteur PDGF ou encore de sarcomes qui produisent du TGF- α , résultant ainsi en une stimulation autocrine (Hanahan, D et Weinberg, RA 2000). Des récepteurs liés à des stimuli de croissance, les récepteurs à tyrosine kinase par exemple, sont parfois sur-exprimés ou subissent des mutations qui les rendent constitutivement actifs. Le gène du récepteur à tyrosine kinase HER2/neu est amplifié ou simplement sur-exprimé dans une proportion importante des cancers du sein, entraînant une augmentation de la signalisation mitogénique (Ross, JS et Fletcher, JA 1999). Un exemple classique de l'altération des voies mitogéniques intracellulaires est celui du gène RAS qui, lorsque muté, produit une protéine qui est dans un état constitutivement activé dans environ le quart des cancers et qui produit un signal mitogénique continu indépendant de toute stimulation externe (Hahn, WC et Weinberg, RA 2002).

1.2.4.2 Insensibilité aux signaux inhibiteurs de prolifération

Les cellules normales possèdent des systèmes moléculaires qui s'opposent à la prolifération cellulaire. Une stratégie importante consiste à bloquer la progression du cycle cellulaire, principalement au niveau du point de contrôle en G1 qui garde les cellules en quiescence (G_0) et prévient l'entrée de la cellule en phase de synthèse (S) (Hanahan, D et Weinberg, RA 2000). Ces systèmes inhibiteurs de prolifération empêchent ultimement la phosphorylation des protéines de la famille de pRB, leur permettant ainsi de séquestrer et d'altérer la fonction d'activateur de transcription de E2F. Les cibles de E2F comptent des gènes dont

l'expression est impliquée dans l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Sellers, WR et Kaelin, WG, Jr. 1997). Or, la voie de pRB est fréquemment défectueuse dans les cancers ce qui entraîne la perte d'efficacité du point de contrôle en G1 et ainsi une entrée précipitée en phase S. Les exemples d'altérations entraînant la défektivité de la voie de pRB sont nombreux. Des mutations inactivantes du gène RB1 sont observées dans plusieurs cancers comme le rétinoblastome, l'ostéosarcome, le carcinome du poumon à petites cellules, le glioblastome, le carcinome de la vessie et le carcinome du sein (Sellers, WR et Kaelin, WG, Jr. 1997). Le gène p16^{INK4}, un inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines (CDK) situé en amont dans la voie de pRB (figure 4), est fréquemment inactivé dans une multitude de cancers incluant ceux affectant le pancréas, l'oesophage, le poumon ainsi que dans la leucémie de type T (Sellers, WR et Kaelin, WG, Jr. 1997). L'inactivation de la voie de TGF β est aussi un exemple souvent observé dans les cancers. Cette voie peut réprimer l'expression de c-myc, qui stimule normalement la prolifération en agissant en G1 d'une façon encore inconnue (Hanahan, D et Weinberg, RA 2000). Il peut aussi induire l'expression de p15^{INK4B} et de p21, deux inhibiteurs de CDK (Hannon, GJ et Beach, D 1994; Datto, MB *et al.* 1997). Dans les cancers, la voie de TGF β est parfois inactivée par une régulation à la baisse de TGF β ou par des mutations inactivant TGF β ou SMAD4, ce dernier étant situé en aval dans cette voie (Hanahan, D et Weinberg, RA 2000). Il a été rapporté que virtuellement tous les cancers du pancréas ainsi qu'environ 80 % des cancers du colon présenteraient des mutations affectant au moins une des composantes de cette voie (Villanueva, A *et al.* 1998; Grady, WM *et al.* 1999). L'entrée dans un état cellulaire dit post-mitotique, associée à une différenciation, bloque également les signaux mitotiques dans une cellule normale et ce processus peut aussi être évité dans une cellule cancéreuse de différentes façons. Ceci est bien illustré par l'oncogène Myc qui, lorsque sur-exprimé, entre en compétition avec Mad pour la liaison de Max ce qui a pour effet d'inhiber la sortie du cycle cellulaire que l'on croit pouvoir être exercée par l'hétérodimère Mad-Max au cours de la différenciation cellulaire (Foley, KP et Eisenman, RN 1999).

1.2.4.3 Résistance à l'apoptose

L'apoptose est un processus de mort programmé latent dans toute cellule. Certains stimuli physiologiques déclencheront ce processus qui s'avérera, dans des conditions normales, comme étant un avantage pour l'organisme au détriment de la cellule éliminée. Ce processus est particulièrement critique dans le développement du cancer car les molécules « senseurs » de la cellule, comme p53, pourront détecter certaines anomalies (e.g. dommage à l'ADN) et pourront déclencher la mort cellulaire, protégeant ainsi l'organisme de ce qui pourrait potentiellement évoluer vers le développement d'un cancer (Hahn, WC et Weinberg, RA 2002). L'apoptose est donc critique dans la défense de l'organisme contre le cancer et ce dernier sera d'autant plus favorisé si ce processus est défectueux. De nombreuses anomalies associées au cancer résultent en une résistance à l'apoptose. Un exemple incontournable est celui de la voie de p53, qui est défectueuse dans beaucoup de cancers (Hahn, WC et Weinberg, RA 2002). p53 est un facteur de transcription (TF) qui peut induire l'apoptose par l'activation de l'expression de plusieurs molécules pro-apoptotiques incluant BAX (Miyashita, T et Reed, JC 1995), APAF1 (Kannan, K et al. 2001; Moroni, MC et al. 2001; Robles, AI et al. 2001), caspase 6 (MacLachlan, TK et El-Deiry, WS 2002), DR4 (Liu, X et al. 2004), DR5 (Sheikh, MS et al. 1998) et FAS (Muller, M et al. 1998). Il active aussi la transcription de MDM2, qui régule négativement sa stabilité (Barak, Y et al. 1993). Il semble qu'il pourrait aussi induire l'apoptose de façon indépendante à son activité de TF (Yu, J et Zhang, L 2005). Le gène TP53 est directement la cible de mutations dans plus de 50 % des cancers. MDM2 est sur-exprimé dans environ 7 % des néoplasies par des mécanismes impliquant entre autres l'amplification du gène (Momand, J et al. 1998). Parmi d'autres exemples, citons l'inactivation de p14^{ARF} par mutations ou délétions, qui touche une large proportion des cancers (Sharpless, NE et DePinho, RA 1999). p14^{ARF} lie MDM2 et l'empêche de provoquer la dégradation de p53 (figure 4). Entre autres exemples d'anomalies moléculaires rendant les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose, mentionnons la sur-expression de BCL2 dans les cas de lymphomes de type B (Monni, O et al. 1999).

1.2.4.4 Capacité de division illimitée

Nous avons mentionné plus tôt que l'immortalité de cellules en culture nécessitait le maintien de la stabilité des télomères. Il semble qu'il en soit de même *in vivo* puisqu'environ 90 % des tumeurs humaines expriment la télomérase et que le reste des tumeurs les stabiliseraient par la voie ALT qui est indépendante de la télomérase (Hahn, WC et Weinberg, RA 2002). L'utilisation de modèles murins démontre bien l'importance de l'activité de la télomérase pour le développement du cancer. Les souris mutantes homozygotes pour le gène $p16^{\text{INK4A}}$ sont plus susceptibles au développement de tumeurs. Lorsque celles-ci sont également mutantes pour la télomérase, l'incidence de tumeurs est réduite (Greenberg, RA et al. 1999). La réintroduction de la télomérase dans les cellules rétablit le potentiel oncogénique.

1.2.4.5 Capacité à former de nouveaux vaisseaux

Si une tumeur solide n'avait pas recours à l'angiogénèse, elle serait contrainte à une taille d'environ 1 à 1,5 mm de diamètre (Tonini, T et al. 2003). Au fur et à mesure que la masse tumorale grossit, l'hypoxie s'installe et rend défavorable la croissance et la survie de celle-ci (Tonini, T et al. 2003). Dans ces conditions, la tumeur peut demeurer dans un état latent pendant des années jusqu'à ce que se produise ce qu'il est convenu d'appeler l' « angiogenic switch » qui signifie que la balance qui existe entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques favorise l'angiogénèse (Tonini, T et al. 2003). Deux groupes de molécules sont impliqués dans ce processus, des facteurs solubles et leur récepteur, puis les intégrines et autres molécules d'adhésion qui régulent les interactions cellule-matrice et cellule-cellule (Hanahan, D et Weinberg, RA 2000). Typiquement, les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF ou le bFGF, qui vont lier leur récepteur sur des cellules endothéliales, ce qui provoquera l'attraction de ces cellules au site tumoral, leur croissance et leur différenciation menant à la formation de nouveaux vaisseaux (Hahn, WC et Weinberg, RA 2002). La situation est par contre beaucoup plus complexe puisque les facteurs pro-angiogéniques sont nombreux, notamment VEGF, bFGF, PDGF,

angiopoïétine-1 et -2, de même que les facteurs anti-angiogéniques, comme la thrombospondine-1, l'interféron- β , l'angiostatine et l'endostatine (Costa, C et al. 2004; Nyberg, P et al. 2005). De plus, certains facteurs angiogéniques sont séquestrés dans la matrice extracellulaire et leur bio-disponibilité peut être régulée par des protéases dégradant cette matrice (Whitelock, JM et al. 1996). VEGF et bFGF sont des facteurs souvent sur-exprimés dans les cancers alors que des inhibiteurs d'angiogenèse comme la thrombospondine-1 et l'interféron β sont fréquemment régulés à la baisse (Hanahan, D et Weinberg, RA 2000). Certaines classes d'intégrines sont aussi associées et fonctionnellement impliquées dans la néovascularisation (Varner, JA et Cheresh, DA 1996).

1.2.4.6 Capacité d'invasion et potentiel métastatique

La capacité d'invasion et de former des métastases est l'une des caractéristiques qui rendent le cancer particulièrement menaçant pour l'organisme et serait responsable de 90 % des cas de décès par cancer (Sporn, MB 1996). Le processus responsable de la dissémination de cellules de la tumeur primaire vers des sites distants est extrêmement complexe et peut être divisé en 7 étapes : dissociation de cellules de la masse primaire, invasion dans le tissu environnant, intravasation, dissémination dans l'organisme, arrêt en un site cible, extravasation et colonisation de sites distants (Engers, R et Gabbert, HE 2000).

Pour mener à bien toutes ces étapes, les cellules cancéreuses requièrent un ensemble de compétences, soit la capacité de protéolyse, la capacité à former des interactions temporaires avec les cellules et la matrice avoisinante puis une capacité de locomotion active (Engers, R et Gabbert, HE 2000). Certaines molécules d'adhésion auront une influence prépondérante dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice durant le processus, soit des molécules du groupe des immunoglobulines, comme NCAM et DCC, des molécules de la famille des cadhérines, dont l'activité dépend du calcium, comme E-cadherine, des intégrines et des sélectines. Des pertes ou gains de fonction de molécules dans ces systèmes sont susceptibles d'augmenter la capacité à l'invasion et à former des

métastases. Par exemple, l'expression de NCAM est réduite dans les cancers pancréatiques (Fogar, P et al. 1997). Des expériences dans un modèle murin de cancer pancréatique ont montré que les tumeurs chez les mutants de NCAM développent des métastases contrairement aux contrôles et que l'introduction de l'isoforme 120 kDa de NCAM chez ces mutants rétablit le phénotype des non-mutants (Perl, AK et al. 1999). On observe aussi un changement dans le type d'isoforme de NCAM dans plusieurs cancers, notamment dans la tumeur de Wilms, le neuroblastome et le cancer du poumon à petites cellules (Hanahan, D et Weinberg, RA 2000). La protéine E-cadherine joue un rôle important d'adhérence pour les cellules épithéliales et est l'une des molécules d'adhésion ayant été le plus étudiées pour son rôle de suppresseur d'invasion et de formation de métastases (Engers, R et Gabbert, HE 2000). C'est une protéine transmembranaire qui interagit, à l'extérieur de la cellule, avec d'autres E-cadherines localisées sur les cellules voisines et, dans le cytoplasme, avec les α -, β - et γ -caténines qui forment un pont entre les E-cadherines et le cytosquelette d'actine (Engers, R et Gabbert, HE 2000). Toute défectuosité dans l'un de ces constituants entraînera une perte d'adhésion cellulaire. L'inactivation de E-cadherine, par mutation, délétion ou méthylation, est associée à pratiquement tous les types de carcinome incluant ceux du sein, de la prostate, de l'estomac, du colon, du foie, de l'œsophage, de la peau, du rein et des poumons (Christofori, G et Semb, H 1999). Des mutations dans le gène de la β -caténine sont aussi observées dans de nombreux cancers, incluant le mélanome, cancer du colon, de la prostate et de l'estomac (Christofori, G et Semb, H 1999).

La locomotion implique la formation de pseudopodes ou lamellipodes réalisée par la polymérisation d'actine et peut être régulée par la voie PI3K, sollicitant également la GTPase Rac1 et Cdc42 (Keely, PJ et al. 1997; Sander, EE et al. 1998). Les tumeurs présentent souvent une activité protéolytique plus élevée que l'on croit être un pré-requis pour l'invasion (Engers, R et Gabbert, HE 2000). Parmi les protéinases qui dégradent la matrice extracellulaire, les métalloprotéinases (MMPs) et le système urokinase plasminogène ont été particulièrement étudiées dans le contexte de l'invasion. Parmi les MMPs, MMP2

et MMP9 sont particulièrement reconnues pour jouer un rôle important dans ce processus (Ray, JM et Stetler-Stevenson, WG 1994). L'efficacité de dégradation sera déterminée par le rapport entre les enzymes protéolytiques et leurs inhibiteurs, comme les TIMPs (Engers, R et Gabbert, HE 2000).

Lorsque des cellules s'échappent dans la circulation sanguine et/ou lymphatique, il semble qu'elles dériveraient passivement jusqu'à ce qu'elles soient arrêtées dans des capillaires par restriction de taille plutôt que par un phénomène similaire au « homing » des lymphocytes lors de l'inflammation, tel que suggéré par des études en vidéomicroscopie *in vivo* (Chambers, AF et al. 1995). Contrairement à ce qu'on a longtemps cru, la majorité des cellules arrêtées dans des capillaires seront extravasées, suggérant que cette étape n'est pas limitante dans le processus métastatique (Chambers, AF et al. 1995). La sélectivité prépondérante de sites de colonisation pour un cancer donné serait principalement dû à leur capacité à survivre et à se diviser à un site donné, tel que proposé par l'hypothèse du « seed and soil » de Paget (Paget, S 1989; Engers, R et Gabbert, HE 2000; Fidler, IJ 2002).

1.3 La leucémie de l'enfant

1.3.1 Statistiques sur la leucémie

Chez l'enfant, le cancer le plus fréquemment diagnostiqué est la leucémie, représentant 26 % des cas. Malgré le fait que cette maladie constitue un exemple de réussite dans le traitement du cancer, avec un taux de rémission d'environ 80 %, elle est encore responsable de la mort d'environ 30 % des cas de cancer chez l'enfant, ce qui en fait le tueur le plus important par maladie. En d'autres termes, ceci signifie qu'environ 330 enfants auront un diagnostic de leucémie au Canada cette année et que près de 70 en mourront (Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada 2005). Malgré le fait que le cancer peut être considéré comme une maladie rare chez les enfants, il est tout de même la

principale cause de décès par maladie dans la tranche d'âge de 0 à 14 ans (American Cancer Society 2005). De plus, les traitements peuvent laisser des séquelles importantes, entre autres la stérilité, les troubles d'apprentissage, les carences hormonales et un risque de 10 à 15 fois plus élevé de développer un autre cancer ultérieurement (Agence de santé publique du Canada 1997). La compréhension des mécanismes du développement et de la progression de cette maladie est donc importante afin de mieux prévenir cette maladie et d'intervenir en limitant les impacts négatifs.

1.3.2 Définition et classification des leucémies

Le terme leucémie provient des mots grecs « leukos » qui signifie « blanc » et « haima » qui réfère à « sang ». Il peut ainsi se traduire littéralement par « sang blanc » qui correspond d'ailleurs à l'aspect blanchâtre du sang des patients atteints. La leucémie est une affection hématologique maligne caractérisée par la prolifération incontrôlée de cellules hématopoïétiques immatures dans la moëlle osseuse et le sang périphérique. Cette maladie peut se développer à n'importe quel stade de différenciation hématopoïétique (figure 5) et peut s'étendre aux ganglions lymphatiques, à la rate, au foie, au système nerveux central ainsi qu'à d'autres organes (Colby-Graham, MF et Chordas, C 2003). Les leucémies peuvent être divisées en deux grandes catégories selon le type histologique, soit le type myéloblastique, affectant des intermédiaires cellulaires de la voie de différenciation myéloïde, ou le type lymphoblastique, prenant origine dans des intermédiaires cellulaires menant à la différenciation en lymphocytes. Les leucémies peuvent également être classées selon la vitesse de leur évolution, on utilise le qualificatif aiguë lorsque celles-ci sont rapides, ou chronique, lorsqu'elles sont plus lentes (Colby-Graham, MF et Chordas, C 2003). La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est la forme prédominante chez les enfants, représentant environ 75-80 % des cas de leucémie. La leucémie myéloïde aiguë (LMA) compte pour environ 20-25 % des cas et la leucémie myéloïde chronique (LMC) pour moins de 5 %. Pour sa part, la leucémie lymphoblastique chronique (LLC) est très rarement diagnostiquée chez l'enfant

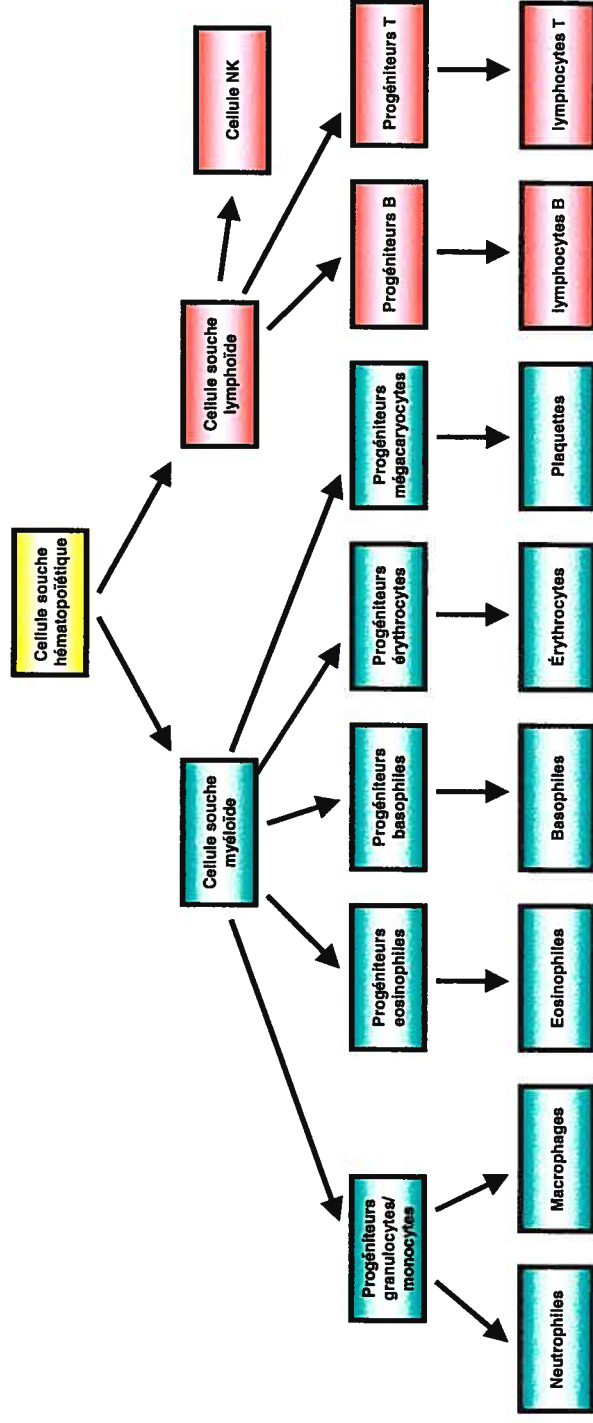


Figure 5. Voies de différenciation hématopoïétique.

La différenciation hématopoïétique est le processus par lequel une cellule initiale, dite cellule souche hématopoïétique, subit des changements épigénétiques et génétiques menant à la formation des divers types de cellules sanguines. Le schéma met l'accent sur le fait que les cellules souches hématopoïétiques s'engagent dans l'une ou l'autre des deux principales lignées hématopoïétiques, soit myéloïdes (vert) ou lymphoïdes (rouge). Les rectangles « précurseurs » ne symbolisent pas nécessairement un seul type cellulaire mais parfois plusieurs intermédiaires menant à la cellule pleinement différenciée.

(Colby-Graham, MF et Chordas, C 2003). Ces différentes formes de leucémie portent ensuite des noms plus spécifiques, selon le stade de différenciation de celle-ci, déterminé généralement par immunotypage. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à la LLA de type pré-B qui est la forme la plus fréquente des LLA chez l'enfant.

1.3.3 Facteurs de risque de la leucémie chez l'enfant

Les causes de la leucémie chez l'enfant sont encore largement inconnues. Des facteurs de risques ont toutefois été identifiés et certains sont présentés dans le tableau III. Les malades atteints du syndrome de Bloom, de l'anémie de Fanconi et de l'ataxie télangiectasie, toutes des maladies caractérisées par une instabilité chromosomique, présentent un risque accru de développer la leucémie (Rubnitz, JE et Crist, WM 1997). Les individus présentant le syndrome de Klinefelter, la neurofibromatose ou le syndrome de Schwachmann sont aussi plus enclins à développer la leucémie (Colby-Graham, MF et Chordas, C 2003). Une augmentation du risque d'être atteint de leucémie de 15 fois est aussi associée au syndrome de Down (Rubnitz, JE et Crist, WM 1997). Notons toutefois que toutes ces conditions sont en cause dans relativement peu de cas de leucémie. Il a aussi été rapporté que les plus gros bébés (Hjalgrim, LL et al. 2004) ainsi que les garçons (Colby-Graham, MF et Chordas, C 2003) présentent un risque plus grand de développer la maladie. En ce qui a trait aux facteurs environnementaux, l'exposition aux radiations ionisantes, à certains produits chimiques comme le benzène ou à certains médicaments anti-néoplasiques augmente également le risque de développer la maladie (Rubnitz, JE et Crist, WM 1997). Plusieurs équipes se sont intéressées à l'effet des champs électromagnétiques de lignes à haute tension à proximité des maisons mais les conclusions sont contradictoires et le sujet encore controversé (Ahlbom, A et al. 2000; Draper, G et al. 2005). On rapporte également une association entre l'utilisation de pesticide, dans la maison ou autour, et l'incidence de la leucémie chez l'enfant (Infante-Rivard, C et al. 1999). On documente de plus en plus des associations entre des polymorphismes géniques fonctionnels dans des gènes candidats et la susceptibilité à la leucémie

Tableau III. Facteurs de risques de la leucémie de l'enfant.

Leucémies, types confondus

Syndrome de Schwanman
 Syndrome de Down
 Proximité de lignes à haute tension*
 Pesticides domestiques
 Polymorphismes enzymes métabolisme xénobiotiques

LLA

Ataxie télangiectasie
 Irradiation après naissance (cadre thérapeutique)
 Exposition aux rayons X *in utero*
 Garçon
 Race (Caucasien > Américain Africain)*
 Statut socio-économique élevé

LMA

Anémie de Fanconi
 Syndrome de Bloom
 Neurofibromatose de type I
 Monosomie 7 familiale
 Granulocytopénie de Kostmann
 Agents chimiothérapeutiques (agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérase II)
 Race (hispanique)

*Facteur controversé. Adapté de (Colby-Graham, MF et Chordas, C 2003).

de l'enfant (Krajinovic, M et al. 2001), soulignant encore une fois l'impact de la génétique dans l'étiologie de cette maladie. Les études d'association, à la fois de déterminants géniques à des facteurs environnementaux, nous apprendront vraisemblablement beaucoup sur les causes de cette maladie.

1.3.4 Bases moléculaires de la LLA de l'enfant

Comme c'est le cas pour la plupart des cancers, la leucémie compte un grand nombre d'anomalies génétiques et épigénétiques. Par contre, ce qui est particulier aux leucémies, c'est qu'environ 80 % d'entre elles présentent des aberrations chromosomiques détectables, incluant un nombre élevé de translocations. Dans cette partie, nous allons traiter des plus fréquentes anomalies rencontrées dans la LLA de l'enfant ainsi que de certains GST classiques inactivés dans le cancer et de leur importance dans la leucémie de l'enfant.

1.3.4.1 Anomalies chromosomiques de nombre

Les anomalies chromosomiques peuvent être divisées en deux classes, les anomalies de nombre et celles de structure. Bien que les mécanismes moléculaires de la pathogenèse de la leucémie impliquant ces anomalies sont souvent largement inconnus, certaines ont tout de même une grande valeur diagnostique et pronostique. C'est d'ailleurs le cas des anomalies chromosomiques de nombre (tableau IV). L'hyperdiploïdie élevée (51-65 chromosomes) est observée dans approximativement 30 % des cas de LLA de l'enfant et est associée à un bon pronostic avec 80 % des cas qui demeurent en rémission plus de 5 ans après le diagnostic (Secker-Walker, LM et al. 1978; Harrison, CJ 2001a). Le pronostic est d'autant meilleur si les leucémies de ce groupe présentent une trisomie des chromosomes 4, 6, 10, 17 et 18 (Jackson, JF et al. 1990; Harris, MB et al. 1992; Heerema, NA et al. 2000). Toutefois, la présence du chromosome 5 en surnombre viendra assombrir le bon pronostic de ce groupe (Heerema, NA et al. 2000). L'association entre le pronostic et les

Tableau IV. Anomalies chromosomiques de nombre liées à la LLA de l'enfant.

Groupe	Nombre de chromosomes	Fréquence LLA (%)
Quasi-haploïde	23-29	<1
Hypodiploïde bas	30-44	<1
Hypodiploïde élevé	45	6
Pseudodiploïde	46	29
Hyperdiploïde bas	47-50	12
Hyperdiploïde élevé	>50	32
Quasi-triploïde	66-80	1
Quasi-tétraploïde	>80	1
Normal	46	18

Adapté de (Harrison, CJ 2001b)

chromosomes surnuméraires suggère que certains chromosomes contiennent un (des) oncogène(s) qui, par leur surnombre ou dose supplémentaire, influence la progression de la maladie. Dans les hypodiploïdies, on retrouve essentiellement 2 groupes, les quasi-haploïdes, très rares et comptant 23 à 29 chromosomes, et les autres (30-45 chromosomes), dont la majorité des cas possède 45 chromosomes (Harrison, CJ 2001a). Le premier groupe est associé à un mauvais pronostic (Pui, CH et al. 1987), alors que le second se situe plutôt à un niveau intermédiaire (Heerema, NA et al. 1999). De façon générale, le pronostic des hypodiploïdes s'alourdit progressivement avec la diminution du nombre de chromosomes ou lorsqu'une monosomie 7 est observée (Heerema, NA et al. 1999).

1.3.4.2 Anomalies chromosomiques de structure

Les anomalies de structure, présentes dans environ 65% des cas de LLA de l'enfant (Harrison, CJ 2000), comprennent tout type de réarrangement qui affecte la structure des chromosomes et incluent les translocations, délétions, amplifications et inversions. Les translocations et les inversions ont pour effet de juxtaposer des éléments du génome qui ne sont normalement pas physiquement liés. Ceci est susceptible d'entraîner deux principaux impacts : 1) des séquences régulatrices, activant ou réprimant la transcription génique, peuvent être amenées à proximité d'un oncogène ou d'un GST, résultant en une dérégulation de l'expression du gène en question (figure 6A) ou 2) des séquences géniques peuvent être juxtaposées et résulter en la formation d'un nouveau gène de fusion entraînant l'expression d'une protéine chimérique nouvelle qui n'existe pas normalement dans une cellule (figure 6B) (Harrison, CJ 2000). Les délétions entraîneront la perte de matériel génétique et l'allèle des gènes qui sont liés à cet élément perdu sera inactivé. Si un GST est lié à une région délétée, ceci constituera un événement susceptible de contribuer au développement d'un cancer. Si à l'opposé une région génomique est amplifiée et qu'elle contient un proto-oncogène, une dose supplémentaire de ce gène pourrait être exprimée et avoir des effets oncogéniques. Le tableau V présente les principales anomalies chromosomiques de structure rencontrées dans la LLA. Dans les lignes qui

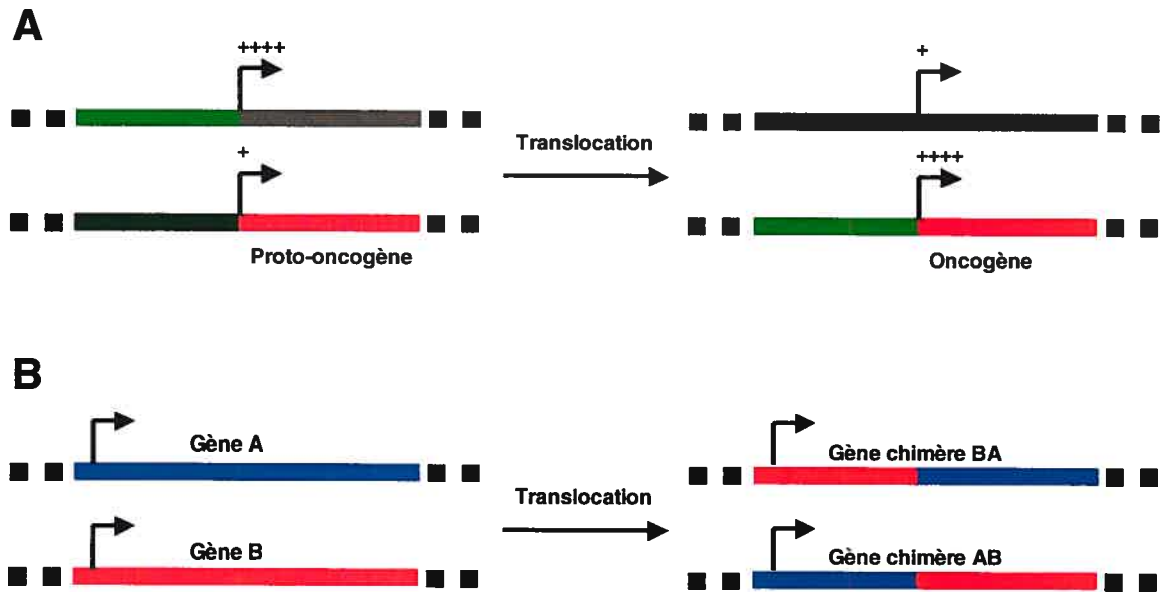


Figure 6. Mécanismes d'activation oncogénique par translocation.

A) Lorsqu'un promoteur fort (vert pâle) est amené en 5' d'un proto-oncogène (rouge) par translocation, l'expression de ce dernier est augmentée (changement de + à ++++), ce qui promeut le cancer. Le proto-oncogène devient donc un oncogène. B) Lorsqu'une translocation juxtapose les séquences d'un gène A à celle d'un gène B et/ou l'inverse, il peut y avoir génération d'un (de) nouveau(x) gène(s) de fusion ou chimérique(s) qui peu(ven)t avoir des propriétés oncogéniques.

Tableau V. Anomalies chromosomiques de structure liées à la LLA de l'enfant.

Altération de structure	Gène(s) impliqué(s)	Fréquence LLA (%)
T(4;11)(q21;q23)	MLL et AF4	1
Autres 11q23	MLL	2; 85 [#]
T(9;22)(q34;q11)	BCR et ABL	2
T(1;19)(q23;p13)	EA2 et PBX1	3
T(12;21)(p13;q22)	ETV6 et AML1	25 ^{&}
8q24	MYC	<1
14q32	IGH	1
T(1;14)(p33;q11)	TAL1 et TCRA/D	3 [*]
TALd	TAL1 et SIL	16-30 [*]
T(10;14)(q24;q11)	HOX11 et TCRAD	4-7 [*]
T(7;10)(q35;q24)	TCRB et HOX11	

[&] : fréquence spécifique aux LLA pré-B. ^{*} : fréquence spécifique aux LLA de type T.
[#] : fréquence spécifique aux LLA d'enfants moins de 1 an. TCRA/D : TCRA et TCRD, tous deux sont situés au même locus. TALd : délétion d'environ 100 kb qui juxtapose TAL1 à la région promotrice du gène SIL. Adapté de (Harrison, CJ 2001b).

suivent, nous présenterons quelques exemples de ces translocations en illustrant les mécanismes oncogéniques tels que nous les concevons à l'heure actuelle.

La translocation $t(9;22)(q34;q11)$, générant le chromosome de Philadelphie, est caractéristique de la LMC chez l'adulte mais est tout de même rencontrée chez environ 2-4% des cas de LLA de l'enfant (tableau V) (Harrison, CJ 2001b). Cette translocation entraîne la fusion des gènes BCR et ABL (tableau V). ABL est une tyrosine kinase qui régule la structure du cytosquelette en transduisant des signaux provenant de récepteurs de facteurs de croissance et d'adhésion (Ren, R 2005). BCR est une sérine/thréonine kinase aussi impliquée dans la signalisation. Dans le cas de BCR-ABL, l'activité kinase de ABL augmentée et les domaines fonctionnels supplémentaires amenés par BCR seraient responsables de l'activité oncogénique de la protéine chimérique. BCR-ABL peut interagir et/ou phosphoryler une multitude de protéines, ce qui résulterait, entre autres, à une activation de protéines comme RAS, PI3K, AKT, JNK et kinases de la famille SRC (Ren, R 2005). Ceci aurait pour effet de stimuler la croissance, d'augmenter la résistance à l'apoptose et d'affecter l'adhésion/migration cellulaire (Ren, R 2005). BCR-ABL a la capacité de transformer plusieurs types de lignées cellulaires comme des fibroblastes immortalisés ou des cellules hématopoïétiques (Ren, R 2005) et les souris transgéniques exprimant ce gène présentent des désordres myéloprolifératifs ressemblants à la LMC en phase chronique (Pear, WS *et al.* 1998; Zhang, X et Ren, R 1998; Li, S *et al.* 1999).

Le gène MLL est la cible de nombreux réarrangements dans les LLA de l'enfant et ces réarrangements sont observés dans environ 85% des cas chez les enfants de moins de 1 an (tableau V) (Harrison, CJ 2000). La présence de tels réarrangements est associée à un mauvais pronostic (Heerema, NA *et al.* 1994). La translocation $t(4;11)(q21;q23)$ est l'événement le plus fréquent des réarrangements affectant MLL (tableau V). Elle est principalement associée à un immunophénotype pro-B et résulte en l'expression de la protéine de fusion MLL-AF4 (Pui, CH 1992). Le mécanisme oncogénique de cette protéine n'est pas encore clair et fait l'objet de controverse en ce moment. Il a été montré que le « knock-down » de MLL-AF4 par interférence à l'ARN (RNAi) dans des lignées

cellulaires de LLA humaines entraîne une réduction de plusieurs phénotypes liés au cancer soit une diminution de la prolifération, une diminution de la capacité de formation de colonies, une induction de l'apoptose, l'apparition de marqueurs de différenciation et une réduction de la mortalité et de la morbidité lorsque ces cellules sont injectées dans des souris. Ces changements sont accompagnés d'une réduction de l'expression de gènes HOX qui sont impliqués dans la différenciation hématopoïétique et dont l'expression est régulée par le gène MLL (Thomas, M et al. 2005).

La translocation $t(8;14)(q24;q32)$ et celles qui s'y apparentent fonctionnellement, $t(2;8)(p13;q24)$ et $t(8;22)(q24;q11)$, bien que typiquement retrouvées dans les lymphomes de Burkitt, sont aussi rencontrées dans environ 5 % de toutes les LLAs et sont associées au type B (tableau V). Dans ces réarrangements, l'oncogène MYC, situé sur le chromosome 8, est juxtaposé aux gènes de la chaîne lourde des immunoglobulines situées en 14q32, de la chaîne légère kappa en 2p13 ou de la chaîne légère lambda en 22q11. Les régions régulatrices des immunoglobulines sont amenées à proximité du proto-oncogène MYC et provoquent sa sur-expression, entraînant ainsi une prolifération incontrôlée (Harrison, CJ 2001b). Le même type de translocations est retrouvé dans les LLA de type T alors que les gènes HOX11, TAL1/2, LMO1/2 ou LYL1 deviennent sur-exprimés suite à leur juxtaposition aux régions régulatrices des gènes de récepteurs de cellules T (TCR) TCRA/D ou TCRB, localisés au niveau des chromosomes 14q11 et 7q32-36, respectivement (tableau V) (Harrison, CJ 2001b). Ces gènes codent pour des TFs et leur sur-expression serait de nature oncogénique (Ferrando, AA et Look, AT 2003).

La translocation $t(12;21)(p13;q22)$ est la plus fréquemment observée dans la LLA pré-B, avec 25% (tableau V) (Shurtleff, SA et al. 1995). La protéine de fusion ETV6-AML1 qui en découle sera décrite en détail à la section 1.5.6.

La délétion est l'un des mécanismes qui peuvent conduire à l'inactivation de GST. Donc, la caractérisation de régions présentant une telle délétion est une stratégie qui est beaucoup utilisée pour découvrir de nouveaux GST. En

cytogénétique, des délétions au niveau des chromosomes 6q, 9p et 12p sont observées dans environ 5-10% des cas de LLA (Baccichet, A et al. 1997). Ceci est probablement une sous-estimation car les petites délétions (moins de 2Mb) ne sont pas détectées par l'approche cytogénétique classique. La recherche de perte d'hétérozygotie (LOH) par le typage de polymorphismes a permis de mettre en évidence plusieurs délétions plus fines et de réduire des régions communes de délétions, étape essentielle dans le processus de clonage positionnel (figure 7). Notre laboratoire a identifié de telles régions délétées en génotypant le génome de patients LLA (Baccichet, A et al. 1997). Cette étude fut en quelque sorte l'étape initiale du présent projet. Pour le moment, mentionnons simplement que cette étude a révélé des délétions récurrentes au niveau des chromosomes 6, 9, 12 et 17 (tableau VI). Notons que ces délétions présentent parfois des proportions différentes selon que la LLA soit de type B ou T (tableau VI). Par exemple, la délétion en 9p est observée dans 80 % des cas de type T comparativement à 17 % pour le type B et les délétions en 6q et 9q sont essentiellement spécifiques au type B (tableau VI).

1.3.4.3 Gènes suppresseurs de tumeur et oncogènes

Certains GST, comme RB et TP53, sont inactivés dans une grande proportion des cancers. La recherche dans les leucémies d'altérations génétiques affectant RB et TP53 a tout d'abord suggéré que ces derniers étaient fort peu touchés comparativement aux cancers solides (Krug, U et al. 2002). Toutefois, la situation s'est par la suite avérée être plus complexe. Dans le cas de RB, bien que ce gène soit rarement délété dans les LLA (2 %), environ 47 % des cas présentent une expression réduite de ce gène (tableau VII) (Krug, U et al. 2002). On s'est aussi rendu compte que bien qu'un gène considéré individuellement ne présentait pas d'altération, d'un point de vue fonctionnel, des partenaires étaient pour leur part souvent altérés, conduisant à l'inactivation de la (des) même(s) voie(s) fonctionnelle(s). Ceci est bien illustré par l'exemple de TP53 qui présente une mutation dans seulement 14 % des maladies hématologiques malignes (Hernandez-Boussard, T et al. 1999) et dans 5 % des LLA (Gump, J et al. 2001)

Patients	Marqueurs						
	A	B	C	D	E	F	G
1	loh	loh	loh	loh	ni	+	+
2	+	ni	loh	loh	loh	loh	ni
3	ni	ni	loh	loh	ni	+	+
4	+	ni	loh	loh	+	+	+
5	+	loh	ni	ni	loh	loh	loh
6	+	loh	loh	loh	ni	+	+
7	ni	loh	loh	loh	+	ni	ni
8	+	loh	loh	loh	ni	+	+
9	loh	loh	loh	loh	loh	+	ni
10	+	ni	loh	loh	loh	loh	+

Figure 7. Détermination d'une région commune de délétion par la recherche de perte d'hétérozygotie (loh).

Matrice illustrant le sommaire des résultats d'un génotypage fictif utilisée pour la détermination d'une région commune de délétion. Des marqueurs polymorphiques (A-G) sont génotypés à partir d'ADN génomique de LLA de patients (1-10) et comparé à celui effectué sur de l'ADN génomique normal du même individu. Loh : perte d'hétérozygotie; + : hétérozygotie du marqueur; ni : non-informatif dû à l'homozygotie du matériel génomique normal. La région commune de délétion est délimitée entre les deux lignes noires épaisses et chevauche les marqueurs B, C et D (région en rouge).

Tableau VI. Perte d'hétérozygotie (LOH) dans les LLA de l'enfant.

LOH ou GST	Proportion de LLA (%)	Proportion LLA type B (%)	Fréquence LLA type T (%)
6p	10	8	20
6q	11	13	0
9p	29	17	80
9q	5	6	0
12p	32	35	20
17p	4	5	0
17q	5	7	0

Tiré de (Baccichet, A et al. 1997)

Tableau VII. Fréquence dans la LLA de l'enfant d'altérations de GST et d'oncogènes communément associés au cancer.

Gène	mécanisme	Fréquence (%)		Référence
		Type B	Type T	
RB	délétion	2 ^{&}		(Krug, U et al. 2002)
	↓ expression	47 ^{&}		(Krug, U et al. 2002)
P16 ^{INK4}	délétion	28	68	(Zhou, M et al. 1997)
	méthylation	0		(Wong, IH et al. 2000)
	méthylation	0	0	(Iravani, M et al. 1997)
	délétion mutation	nd	>80	(Cayuela, JM et al. 1996)
P15 ^{INK4B}	délétion	28	68	(Zhou, M et al. 1997)
	méthylation	13	46	(Tsellou, E et al. 2005)
	méthylation	38		(Wong, IH et al. 2000)
	méthylation	41	47	(Iravani, M et al. 1997)
P21	méthylation	41 ^{&}		(Roman-Gomez, J et al. 2002)
TP53	mutation	5 ^{&}		(Krug, U et al. 2002)
	mutation ↓ expression	14		(Krug, U et al. 2002)
MDM2	↑ expression	22		(Gustafsson, B et Stal, O 1998)
RAS	mutation	15		(Perentesis, JP et al. 2004)

& : concerne les LLA de l'enfant et de l'adulte confondues. nd : non-déterminé

(tableau VII). Cependant, MDM2, qui stimule la dégradation de la protéine p53, est sur-exprimée dans 22% des LLA de l'enfant, ce qui résulte en une réduction nette de p53 (tableau VII) (Gustafsson, B et Stal, O 1998). De même, p14^{ARF}, un gène situé au locus p16^{INK4}/p15^{INK4B} sur le chromosome 9p et qui inhibe l'activité de MDM2, est inactivé par presque toutes les altérations génétiques touchant les gènes p16^{INK4} et p15^{INK4B} (Calero Moreno, TM et al. 2002). P21, un inhibiteur de complexes cycline-CDK dont l'expression est activée par p53, voit son expression réduite par méthylation de son promoteur dans 41% des leucémies de l'enfant (tableau VII) (Roman-Gomez, J et al. 2002). Dans le cas de RB, en plus de la réduction de l'expression mentionnée ci-haut, d'autres acteurs intervenant dans le point de contrôle en G1, soit p16^{INK4} et p15^{INK4B}, sont fréquemment inactivés dans la LLA de l'enfant, principalement par délétion ou méthylation, entraînant ainsi une inactivation de RB par une augmentation de sa phosphorylation (tableau VII) (Zhou, M et al. 1997; Wong, IH et al. 2000; Tsellou, E et al. 2005). Certains proto-oncogènes, tels RAS et MYC, sont également fréquemment activés (mutés) dans les cancers. D'ailleurs, la sur-expression de MYC est un événement observé dans les LLA (tableau V). Pour ce qui est de RAS, on a récemment montré qu'il est muté dans environ 15 % des LLA (tableau VII) (Perentesis, JP et al. 2004).

1.4 Délétions du locus 12p12-13 dans la LLA

Des délétions hémizygotiques au locus 12p12-13 sont observées dans plusieurs néoplasies hématologiques de types lymphoïde et myéloïde (Berger, R et al. 1986; Raimondi, SC et al. 1986; Chan, LC et al. 1992). Dans la LLA de l'enfant, environ 32% des cas présentent une délétion dans cette région (Baccichet, A et al. 1997). Il est à noter que des délétions dans la région ont aussi été rapportées dans plusieurs tumeurs solides, soit le cancer de l'ovaire, de la prostate, du sein, du poumon, de l'endomètre et du col de l'utérus (Takeuchi, S et al. 1996; Hatta, Y et al. 1997; Aissani, B et al. 1999; Kibel, AS et al. 1999). Les délétions récurrentes sont souvent l'indication de l'inactivation d'un GST situé dans la région (Knudson, AG, Jr. 1971). Les mécanismes d'inactivation peuvent être divers. D'une part, il y a la délétion de l'un des deux allèles, et d'autre part, l'allèle résiduel

doit subir un autre événement inactivant : 1) un réarrangement altérant l'intégrité du gène; 2) des mutations conduisant à une perte de fonction de la protéine produite ou 3) une réduction ou perte d'expression de l'expression génique par méthylation du promoteur ou par tout autre mécanisme épigénétique relié à la régulation génique. L'identification d'un GST passe donc par la mise en évidence qu'il y a inactivation de l'allèle résiduel d'un gène dans la région par l'un ou l'autre de ces mécanismes. Bien que cette règle s'applique à la plupart des GST, il faut tout de même considérer le phénomène d'haplo-insuffisance, c'est-à-dire que lorsqu'un seul des deux allèles est inactivé, la dose de l'allèle actif est insuffisante pour maintenir une activité « normale » et ainsi prévenir un effet oncogénique (revue dans (Santarosa, M et Ashworth, A 2004).

Dans le but d'identifier un GST candidat sur le chromosome 12p12-13, des cartes génétiques et physiques ont été construites afin de mieux caractériser la région critique de 750 kb (figure 8) (Aissani, B et Sinnett, D 1999; Baens, M *et al.* 1999). Au moment de publier notre étude sur la caractérisation des transcrits de la région (Montpetit, A *et al.* 2002), présentée dans la partie « Résultats », 4 gènes étaient connus dans l'intervalle critique, soit ETV6, BCL-G, LRP6 et MKP7 (figure 8) (Baens, M *et al.* 1999; Guo, B *et al.* 2001; Masuda, K *et al.* 2001; Tanoue, T *et al.* 2001), tous des candidats GST de par leur localisation. ETV6 est un facteur de transcription de la famille ETS que nous aborderons en détail à la prochaine section (section 1.5). BCL-G code pour deux isoformes, une longue, BCL-G_L et une courte, BCL-G_S, qui possèdent toutes deux une activité pro-apoptotique (Guo, B *et al.* 2001). Ce gène est donc un candidat intéressant puisque son inactivation serait susceptible d'entraîner une résistance à l'apoptose. LRP6 (LDL-receptor-related protein) agit comme co-récepteur pour la signalisation de WNT par le récepteur frizzled (Pinson, KI *et al.* 2000; Tamai, K *et al.* 2000; Wehrli, M *et al.* 2000). L'activation de cette voie résulte en la stabilisation de l'oncogène β -caténine qui active le facteur de transcription TCF/LEF. La sur-expression de LRP6 dans des cellules en culture conduit à une augmentation de l'activité de cette voie et résulte en une augmentation de la croissance, de la capacité de former des colonies en agar mou et de la capacité à former des tumeurs dans des

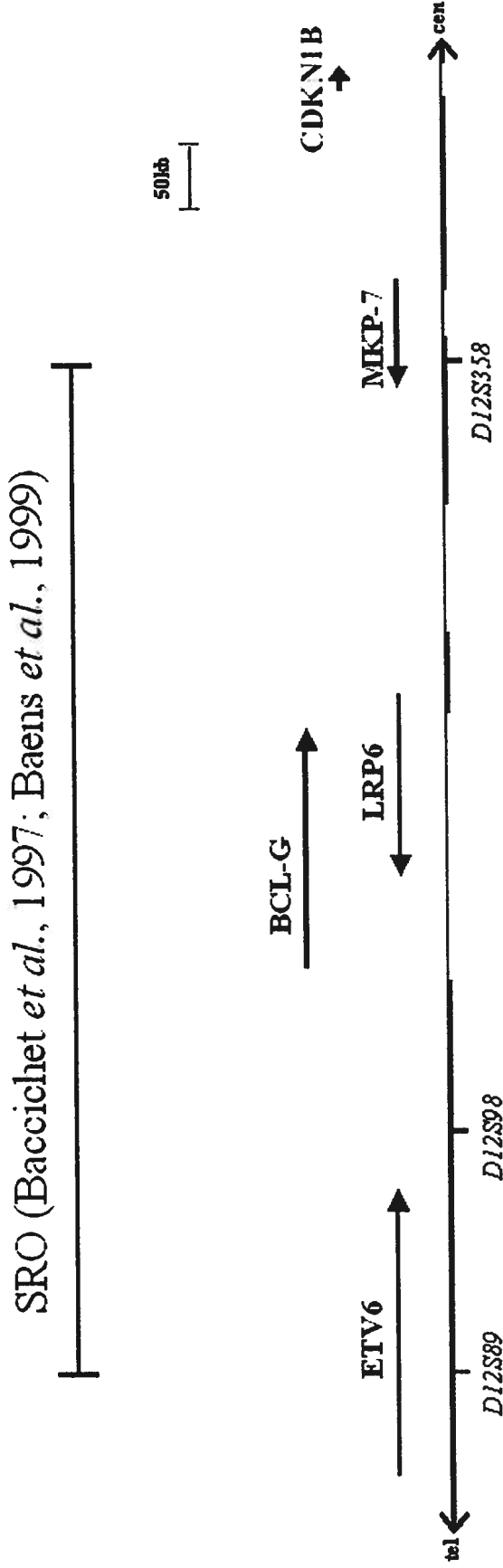


Figure 8. Carte de transcrits de la région commune de délétion du locus 12p12-13.

La flèche bidirectionnelle représente la région génomique en 12p12-13. Les flèches indiquent l'emplacement et la direction des gènes dans la région. Les symboles géniques au-dessus des flèches réfèrent au nom du gène. Les codes sous la flèche bidirectionnelle indiquent le nom du marqueur polymorphique. SRO: « shortest region of overlapping » (region commune de deletion). Tel : télomérique. Cen : centromérique. Figure adaptée de (Montpetit, A et al. 2004).

souris ainsi qu'à une résistance à l'apoptose (Li, Y et al. 2004; Wang, X et al. 2004). LRP6 ne semble donc pas être un bon candidat suppresseur de tumeur. MKP7 est une phosphatase de « mitogen-activated protein kinases » (MAPK). La phosphorylation des MAPK par des kinases de MAPK (MAPKK) les active alors que la déphosphorylation par des phosphatases de MAPK (MKP) les inhibe. Bien que MKP7 puisse lier les MAPK JNK, p38 et ERK, son activité de régulation est surtout observée au niveau de JNK, une MAPK activée principalement par des stimuli de stress (Masuda, K et al. 2001). JNK régule la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Les effets qui résultent de son activation sont très divers et dépendent grandement du contexte. Une activation constitutive des MAPK est souvent associée à la transformation oncogénique (Antonyak, MA et al. 1998; Lewis, TS et al. 1998). MKP7 est donc un candidat suppresseur de tumeur intéressant. À cet effet, il a été rapporté que MKP7 inhibe la croissance de la lignée Rat.1 transformée avec BCR-ABL, réduit sa capacité à former de grandes colonies en agar mou et lorsque ces cellules sont injectées dans des souris, on observe une réduction de la masse moyenne des tumeurs (Hoornaert, I et al. 2003).

De nombreuses évidences suggèrent que ETV6 serait le ou l'un des GST parmi les gènes de la région critique en 12p12-13. C'est pourquoi nous avons décidé de concentrer nos efforts sur ETV6 pour la suite de notre étude.

1.5 ETV6

1.5.1 Famille ETS

Tel que mentionné précédemment, ETV6 est un TF de la famille ETS. Faisons donc d'abord une brève description de cette famille. Les ETS comptent approximativement 30 membres qui présentent tous un domaine ETS homologue qui leur permet de lier l'ADN au niveau du consensus GGAA/T (Oikawa, T 2004). Un certain nombre d'entre eux, comme c'est le cas de ETS-1, ETS-2, ERG, FLI1,

GABP α , Yan et ESE, présentent également un domaine appelé « pointed » (PNT) (Laudet, V *et al.* 1999). La plupart de ces TF sont activateurs de transcription mais quelques-uns d'entre eux sont répresseurs, dont ERF, Yan, ETV6 et NET (Sementchenko, VI et Watson, DK 2000). Il est important de noter que certains ETS peuvent agir à la fois comme activateur et répresseur, selon le contexte. FLI1 peut par exemple agir comme activateur pour le gène TN-C (Shirasaki, F *et al.* 1999) alors qu'il est plutôt répresseur pour Rb (Tamir, A *et al.* 1999). Les TF ETS sont impliqués dans des fonctions extrêmement diverses incluant la croissance cellulaire, l'apoptose, la différenciation hématopoïétique, l'angiogenèse et la régulation de l'adhésion cellulaire et de la matrice extra-cellulaire (Oikawa, T 2004). Certains gènes, qui sont particulièrement intéressants dû à leur association au cancer, sont régulés par des ETS (tableau VIII). Mentionnons également que certains TF de cette famille sont impliqués dans l'hématopoïèse, dont PU.1, FLI1, Spi-B et ETS-1 (figure 9) (Bartel, FO *et al.* 2000).

Les TF de la famille ETS peuvent être divisés en différentes sous-familles, selon leur degré d'homologie (figure 10) (Laudet, V *et al.* 1999). La protéine la plus proche de ETV6, sans toutefois être considérée comme son orthologue, est Yan, un gène de la drosophile (figure 10) (Laudet, V *et al.* 1999). Yan a d'abord été identifié comme étant un régulateur négatif de la différenciation du photorécepteur neuronal R7 durant le développement de l'œil de la drosophile (Mavrothalassitis, G et Ghysdael, J 2000). On a ensuite montré qu'il inhibe la différenciation de plusieurs autres processus durant le développement (Rebay, I et Rubin, GM 1995). Yan se situe en aval et régule négativement les voies de Sevenless, FGF et EGF (Mavrothalassitis, G et Ghysdael, J 2000). Les mutants hypomorphiques de Yan entraînent le développement de photorécepteurs R7 surnuméraires alors que les mutants plus actifs empêchent la différenciation neuronale et du mésoderme (Rebay, I et Rubin, GM 1995; Lai, ZC *et al.* 1997). Dans d'autres systèmes expérimentaux, Yan empêche l'entrée dans le cycle cellulaire en l'absence de signaux appropriés (Rogge, R *et al.* 1995). L'activité de Yan est régulée par relocalisation dans la cellule. En l'absence de signal de MAPK, Yan serait retrouvé dans le noyau. Lorsque certains récepteurs tyrosine

Tableau VIII. Exemples de gènes associés au cancer qui sont ciblés par des facteurs ETS.

Gène cible	ETS régulateur	Catégorie fonctionnelle
VEGFR1	ETS-1, ETS-2, ERG	RTK, Croissance cellulaire
HER2	ETS-1, PEA3	RTK, Croissance cellulaire
M-CSFR	ETS-1, ETS-2, PU.1, ETV6	RTK, Croissance cellulaire
c-FOS	Net	Régulateur cycle cellulaire
ERG-1	Net	Régulateur cycle cellulaire
c-MYC	FLI1	Régulateur cycle cellulaire
BCL-X _L	ETV6	Apoptose
REL	ETS-1	Apoptose
MMP3	EGR, ETS-1, ETS-2, ETV6	Matrice extracellulaire/adhesion cellulaire
MMP7	PEA3, ETS-1	Matrice extracellulaire/adhesion cellulaire

Inspiré de (Oikawa, T 2004)

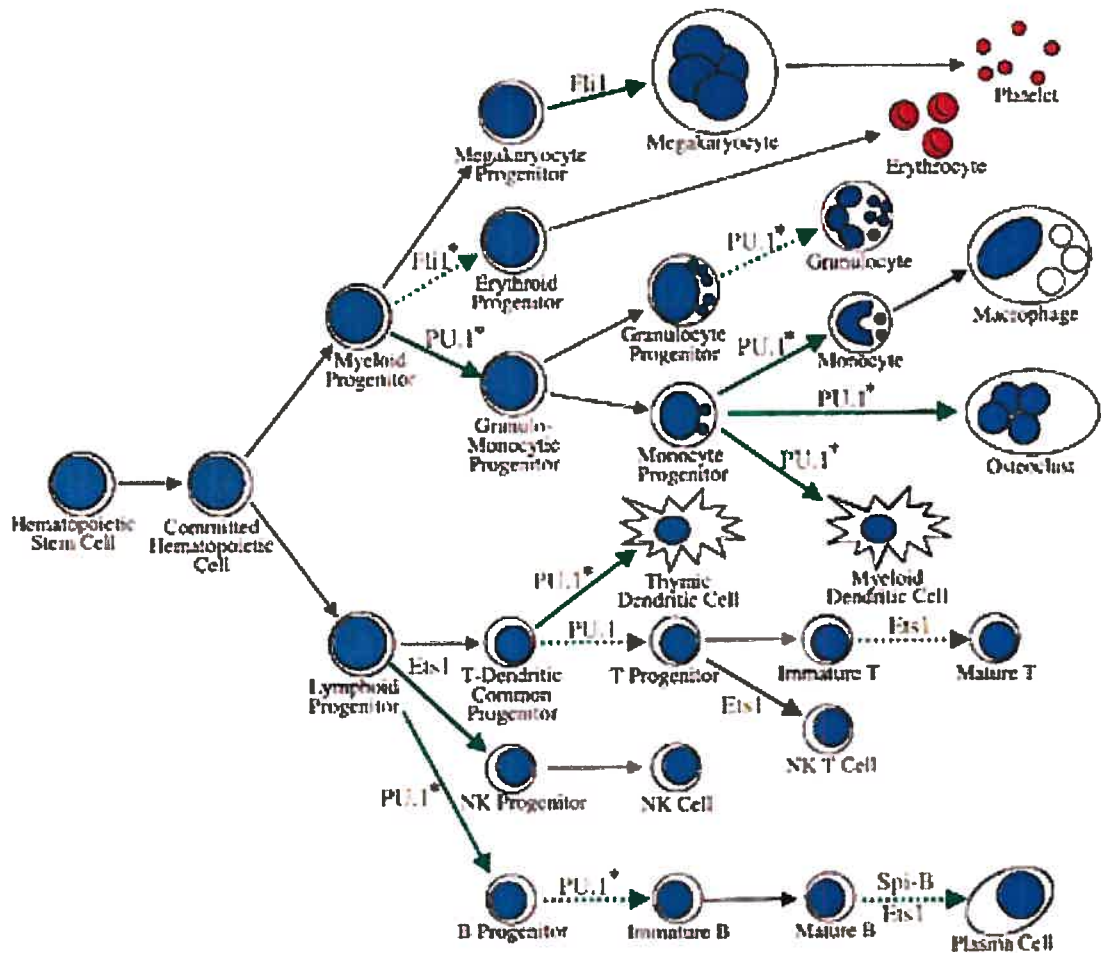


Figure 9. Facteurs de transcription de la famille ETS impliqués dans la différenciation hématopoïétique.

Schéma présentant les voies de différenciation hématopoïétique et les principaux intermédiaires. Les TF ETS impliqués dans la différenciation d'un intermédiaire vers un autre sont indiqués à l'étape concernée. Flèches pleines : le TF est indispensable pour le développement; flèches pointillées : le TF affecte la fonction ou le nombre de cellules; * : implication du TF controversée. Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: *Oncogene* (Bartel, FO *et al.* 2000), copyright (2000).

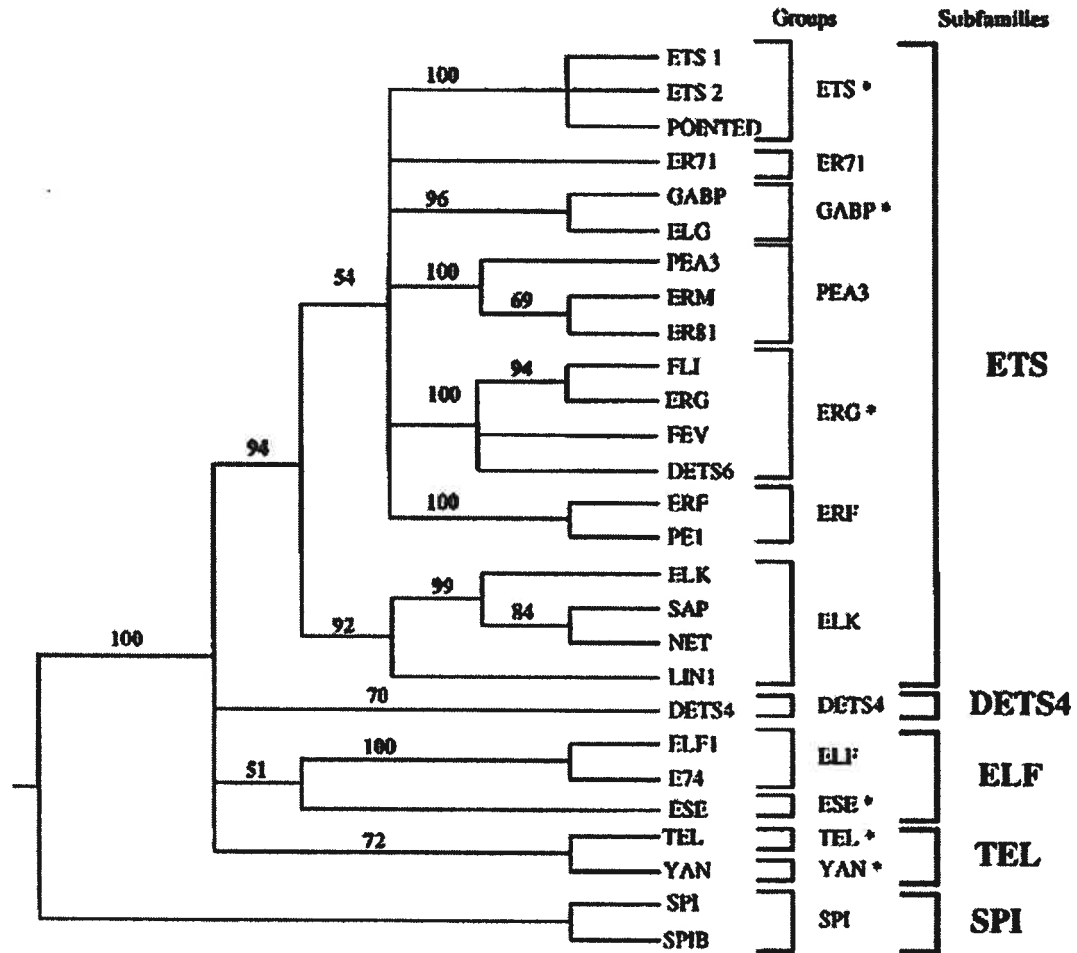


Figure 10. Arbre phylogénétique de certains facteurs ETS.

La longueur des branches ne donne pas d'information sur la distance phylogénétique. Les chiffres indiquent les valeurs de l'analyse bootstrap. *: correspond aux groupes contenant un domaine PNT. Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: *Oncogene* (Laudet, V *et al.* 1999), copyright (1999).

kinase (RTK) sont activés, Yan serait phosphorylé par une MAPK et relocalisé au cytoplasme où il serait dégradé (Klamt, C 1993; Scholz, H *et al.* 1993).

1.5.1 Structure génique et protéique

ETS variant 6 (ETV6), également connu sous le nom de « translocation ETS leukemia (TEL) est un facteur de transcription (TF) de la famille ETS. Son gène s'étend sur un peu plus de 240 kb et comporte 8 exons (Baens, M *et al.* 1996). Six ARNm ont été caractérisés, TEL-a-f (Sasaki, K *et al.* 2004). Sa protéine compte deux principaux domaines d'homologie, le domaine B/Pointed (PNT)/HLH/SAM en N-terminal et le domaine d'homologie ETS en C-terminal, qui est partagé par tous les membres de la famille (figure 11). Contrairement à ETS1 et ERG2, le domaine pointed de ETV6 lui permet une interaction homotypique (Jousset, C *et al.* 1997) ainsi qu'une interaction hétérotypique avec FLI1 (Kwiatkowski, BA *et al.* 1998) ou TELB/TEL2 (Poirel, H *et al.* 2000). Tel qu'observé pour les domaines ETS des autres TF de cette famille, celui de ETV6 lui permet sa liaison à l'ADN via le consensus GGAA/T et est responsable de sa localisation nucléaire (Poirel, H *et al.* 1997). Entre ces deux domaines, on retrouve ce qu'il est convenu d'appeler le « domaine central » qui ne présente aucune homologie particulière et qui sert à la liaison de certains co-facteurs (figure 11). ETV6 comporte deux sites d'initiation de la traduction, un premier au codon méthionine 1 (M1) et un second au codon 43 (M43) (figure 11) (Poirel, H *et al.* 1997). La protéine est exprimée dans virtuellement tous les tissus (Poirel, H *et al.* 1997; Wang, LC *et al.* 1997). On la détecte principalement sous la forme de 4 bandes, soit 50 et 57 kDa ainsi que leur forme apparentée phosphorylée 52 et 60 kDa (Poirel, H *et al.* 1997).

1.5.2 Activité transcriptionnelle

ETV6 est connu comme étant un répresseur de transcription (Chakrabarti, SR et Nucifora, G 1999; Fenrick, R *et al.* 1999; Lopez, RG *et al.* 1999). La répression peut être assurée par le recrutement des co-facteurs répresseurs

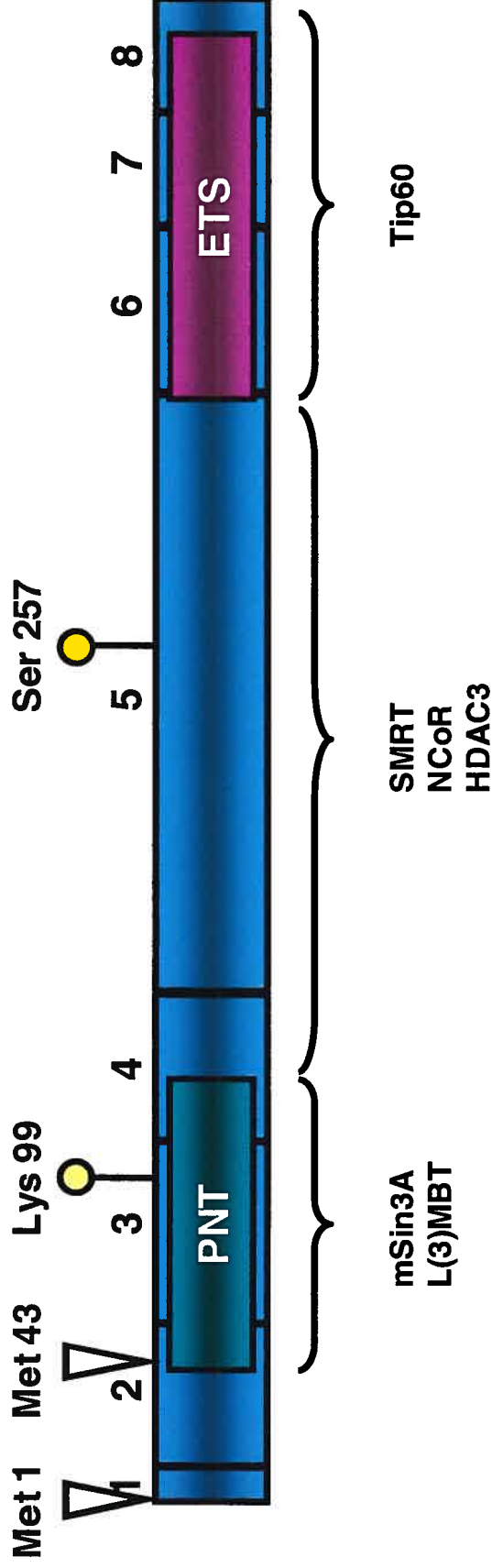


Figure 11. Structure de la protéine ETV6 provenant du transcrit plein longueur (TEL-a).

La longue structure bleue formée de rectangles placés bout à bout représente la protéine de ETV6 et chaque rectangle est la portion en acides aminés codée par l'exon indiqué par le numéro juste au-dessus (8 exons). Le rectangle en vert représente la région du domaine « Pointed » (PNT) et le rectangle en rose celle du domaine ETS. La région centrale est représentée par toute la partie située entre les domaines PNT et ETS. Les méthionines 1 et 43 (Met1 et Met43, respectivement) sont indiquées par les triangles. La lysine 99, qui est la cible de sumoylation, est représentée par le cercle jaune pâle et la sérine 257, qui est la cible de phosphorylation, par un cercle jaune foncé. Les sigles au bas de la figure sont ceux de co-facteurs de transcription qui interagissent avec ETV6 au niveau des régions indiquées par les accolades. La structure a été conçue à l'échelle.

SMRT (Chakrabarti, SR et Nucifora, G 1999), NcoR (Guidez, F *et al.* 2000; Wang, L et Hiebert, SW 2001) et HDAC3 (Wang, L et Hiebert, SW 2001; Kuwata, T *et al.* 2002) via le domaine central et mSin3A via le domaine PNT (Chakrabarti, SR et Nucifora, G 1999; Fenrick, R *et al.* 1999; Wang, L et Hiebert, SW 2001) (figure 11). Malgré le fait que l'interaction de mSin3A soit ciblée au domaine d'oligomérisation PNT, celle-ci ne dépend pas de l'oligomérisation de ETV6 (Fenrick, R *et al.* 1999). L(3)MBT est un membre de la famille des protéines du groupe polycomb (PcG) qui sont connues pour exercer une répression stable ne dépendant pas d'une activité désacétylase. Cette protéine lie aussi ETV6 au niveau de son domaine PNT (figure 11) et augmente son activité de répresseur, notamment au niveau du promoteur de MMP3/stromelysin, une des rares cibles bien établies de ETV6 (Boccuni, P *et al.* 2003). ETV6 peut aussi lier l'histone acétylase Tip60 par sa partie C-terminale incluant le domaine ETS (figure 11) (Nordentoft, I et Jorgensen, P 2003). Bien que l'activité de Tip60 soit généralement associée à une activation de la transcription, lorsqu'il est partenaire de ETV6, il semble qu'il agisse comme co-répresseur de celui-ci (Nordentoft, I et Jorgensen, P 2003).

Malgré le fait que l'activité de ETV6 comme répresseur soit bien établie, peu de cibles transcriptionnelles de ETV6 sont connues à ce jour. On sait que les gènes GPIb (Kwiatkowski, BA *et al.* 1998), GPIX (Kwiatkowski, BA *et al.* 1998), MMP3/stromelysin (Fenrick, R *et al.* 2000), MCSFR (Fears, S *et al.* 1997), BCL-X_L (Irvin, BJ *et al.* 2003), Col1a1 et SLPI (Van Rompaey, L *et al.* 1999) sont modulés à la baisse par ETV6 alors que Smad5, Col3a1, CD44 et fibronectin sont régulés à la hausse (Van Rompaey, L *et al.* 1999). Une douzaine de gènes ont été identifiés dans une étude utilisant des microarrays comme étant modulés par ETV6 et deux gènes parmi ceux-ci ont fait l'objet d'une validation par « real-time » RT-PCR, soit RHOG et D4-GDI (Sakurai, T *et al.* 2003). Cependant à l'heure actuelle, les seuls gènes que l'on sait être des cibles directes de ETV6 de par sa liaison à leur promoteur sont MMP3 (Fenrick, R *et al.* 2000) et BCL-X_L (Irvin, BJ *et al.* 2003).

1.5.3 Régulation de ETV6

Presque rien n'est connu sur la régulation transcriptionnelle de ETV6. On sait seulement que l'abondance de son ARNm est régulée à la hausse par l'expression de STAT3 (Schick, N et al. 2004). Cette activation semble mener à une boucle de rétroaction négative puisque ETV6 peut lier STAT3 et inhiber son activité. La répression de STAT3 exercée par ETV6 dépend du domaine PNT et d'une activité désacétylase mais est toutefois indépendante du domaine ETS et donc présumément de la liaison à l'ADN.

On en sait un peu plus sur sa régulation post-transcriptionnelle de ETV6. Il est connu que ETV6 peut être phosphorylé (Poirel, H et al. 1997) et que cette modification régule son activité. Lorsque la MAPK p38 est activée par différents stress, par exemple suite à une exposition à des rayons ultra-violet de type C ou à une solution saline hypertonique, elle lie ETV6, la phosphoryle au niveau de la sérine 257 et inhibe son activité comme répresseur transcriptionnel (Arai, H et al. 2002). Mentionnons que JNK, une autre MAPK régulée par des stress, ne présente pas la même activité envers ETV6 (Arai, H et al. 2002). Une autre kinase, v-SRC, entraîne la relocalisation de ETV6-M1 du noyau au cytoplasme dans des NIH 3T3 mais pas celle de ETV6-M43 (Lopez, RG et al. 2003). La recherche du site potentiel de phosphorylation dans les 42 premiers acides aminés par mutations ponctuelles de tyrosines, sérines et thréonines a mené à la conclusion qu'aucun site phosphorylable n'était nécessaire à la relocalisation de ETV6 (Lopez, RG et al. 2003). Ceci indique que l'action de v-SRC ne semble pas être médiée par la phosphorylation directe de ETV6 mais par un mécanisme alternatif encore inconnu. Fonctionnellement, seulement la forme ETV6-M43 est capable d'inhiber la transformation par v-SRC, suggérant qu'une inhibition de l'activité de ETV6 par la relocalisation du noyau au cytoplasme est nécessaire pour cette transformation, du moins dans les NIH 3T3 (Lopez, RG et al. 2003). Il est intéressant de mentionner ici que la transformation par SRC dépend de l'activité de STAT3 et que, comme nous l'avons mentionné ci-haut, ETV6 peut réprimer son activité (Schick, N et al. 2004).

ETV6 peut aussi être régulé par sumoylation, c'est-à-dire qu'une protéine appelée SUMO-1 lui est conjuguée de façon covalente (Chakrabarti, SR et al.

2000). Cette modification se fait au niveau de la lysine 99 de ETV6 (figure 11) (Chakrabarti, SR et al. 2000) et induit la relocalisation de ETV6 dans des corps nucléaires (Chakrabarti, SR et al. 2000) ou dans le cytoplasme (Irvin, BJ et al. 2003). Les deux types de relocalisation pourraient se faire différemment selon le type cellulaire puisque celle dans les corps nucléaires a été observée dans des cellules 293 alors que celle dans le cytoplasme l'a été dans la lignée NIH 3T3. Il a été montré que ETV6 peut lier l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine UBC9, que cette liaison n'entraînait pas la dégradation de ETV6 mais plutôt une inhibition de l'activité de répression de ce dernier (Chakrabarti, SR et al. 1999). Puisque UBC9 peut conjuguer SUMO-1 à différentes protéines (Desterro, JM et al. 1997), on croit qu'elle serait l'enzyme responsable de la conjugaison de SUMO-1 à ETV6.

Différentes isoformes de ETV6 semblent pouvoir réguler l'activité de la protéine ETV6 pleine longueur (TEL-a). L'isoforme appelée TEL-f, qui ne possède pas les exons 6 et 7 et donc qui n'a plus de domaine ETS, a été caractérisée et agit comme dominant négatif de TEL-a. TEL-f ne lie pas l'ADN, est localisé dans le cytoplasme et séquestre TEL-a partiellement dans le cytoplasme, ce qui contribue vraisemblablement à l'inhibition de l'activité de TEL-a observée en co-transfection. De plus, TEL-f inhibe la différenciation de la lignée érythroleucémique MEL médiée par TEL-a (Sasaki, K et al. 2004).

1.5.4 Fonction de ETV6

On connaît encore assez peu de choses concernant les processus biologiques dans lesquels ETV6 est impliqué. Les souris mutantes hétérozygotes meurent autour du jour E11 et présentent un défaut d'angiogenèse dans le sac vitellin et un excès d'apoptose dans les cellules mésenchymateuses et nerveuses (Wang, LC et al. 1997). En accord avec cette étude, un rôle pour ETV6 dans l'angiogenèse est aussi appuyé par le fait que lorsque ETV6 est sur-exprimé dans des NIH3T3-UCLA, on observe la formation d'agrégats qui forment des prolongements creux (lumière) que les auteurs croient s'apparenter à la formation physiologique de vaisseaux (Van Rompaey, L et al. 2002). Lorsque des souris

mutantes chimériques sont produites, bien que l'hématopoïèse soit normale dans le placenta et le foie foetal, aucune cellule mutante homozygote n'est détectée après la naissance dans la moëlle osseuse (Wang, LC et al. 1998). Ceci est vraisemblablement dû au fait que ETV6 est essentiel à la survie des cellules souches hématopoïétiques adultes (Hock, H et al. 2004). Cette dernière étude montre également que lorsque ETV6 est inactivé spécifiquement dans différentes cellules hématopoïétiques déjà engagées dans une voie de différenciation lymphoïde ou myéloïde, l'action de ETV6 est accessoire, sauf lors de la différenciation mégacaryocytaire (Hock, H et al. 2004). En apparence contradiction avec cette étude, il a été montré que ETV6 inhibe la différenciation mégacaryocytaire de la lignée de leucémie myéloïde K562 induite par FLI1 (Kwiatkowski, BA et al. 2000), ainsi que la transactivation de marqueurs de différenciations mégacaryocytiques comme GP1b et GPIX par FLI1 (Kwiatkowski, BA et al. 1998). ETV6 peut par contre accélérer la différenciation érythroïdique de la lignée érythroleucémique MEL induite par un traitement avec du HMBA ou du DMSO alors qu'une forme ETV6 n'ayant plus le domaine PNT (comme c'est le cas de l'isoforme TEL-e (Sasaki, K et al. 2004)) bloque cette différenciation (Waga, K et al. 2003).

1.5.5 ETV6 comme suppresseur de tumeur

Plusieurs évidences fonctionnelles suggèrent que ETV6 est un GST puisqu'il inhibe plusieurs phénotypes tumoraux (voir section 1.2.3). Dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), ETV6 ralentit la croissance et provoque un arrêt en G0/G1 (Rompaey, LV et al. 2000). Lorsque la lignée NIH 3T3 est transformée avec Ras, ETV6 inhibe la croissance (Fenrick, R et al. 2000), induit l'apoptose (Irvin, BJ et al. 2003), réduit la capacité de former des colonies en agar mou (Fenrick, R et al. 2000; Rompaey, LV et al. 2000) et réduit la croissance tumorale lorsque ces cellules sont injectées dans des souris (Rompaey, LV et al. 2000). Dans la lignée de leucémie myéloïde K562, la sur-expression de ETV6 retarde également la croissance (Sakurai, T et al. 2003). La perte de ETV6 pourrait entraîner un blocage dans la différenciation hématopoïétique tel que le

suggère l'étude montrant que ETV6 accélère la différenciation érythroïde dont nous avons parlé au paragraphe précédent (Waga, K et al. 2003). Par contre, aucune donnée n'est disponible pour avancer une telle hypothèse dans le cas de la différenciation lymphoïde.

Il est connu que certains TF de la famille ETS peuvent agir comme oncogène. D'ailleurs, comme son nom l'indique, E26 transformation-specific sequence (ETS) a été donné aux premiers gènes ETS, c-est-1 et c-ets-2, transduits par des rétrovirus causant le développement de leucémies (revue dans (Blair, DG et Athanasiou, M 2000)). Le gène FLI1 est un site commun d'intégration rétroviral par le virus de Friend, entraînant sa sur-expression et le développement de la leucémie érythropoïétique de Friend (Ben-David, Y et al. 1991). La sur-expression de FLI1 empêcherait la différenciation terminale et favoriserait l'auto-renouvellement (Pereira, R et al. 1999). Au niveau moléculaire, FLI1 régule à la baisse pRb (Tamir, A et al. 1999), qui contrôle la progression du cycle cellulaire, et à la hausse Bcl-2 et inhibite l'apoptose (Pereira, R et al. 1999). Un autre exemple classique est celui du gène spi-1/PU.1 qui est aussi la cible d'insertion du virus « Spleen focus forming » (SFFV), une forme défective en réplication du virus de Friend. Cette insertion entraîne sa sur-expression et le développement de leucémies (Moreau-Gachelin, F et al. 1988). Hypothétiquement, ETV6 pourrait entrer en compétition avec un de ces TF oncogènes pour la liaison au consensus ETS sur l'ADN et ainsi antagoniser son effet. Bien que ce mécanisme oncogénique ne soit encore appuyé par aucune étude concernant la LLA, on sait que ETV6 peut antagoniser FLI1 en s'y liant et probablement en recrutant des cofacteurs de répressions qui viennent contrer la trans-activation de cibles de FLI1 (Kwiatkowski, BA et al. 1998; Kwiatkowski, BA et al. 2000).

1.5.6 Translocation t(12;21)(p13;q22)

La délétion hémizygote observée au niveau du locus 12p12-13, et qui inactive l'un des deux allèles de ETV6, est très étroitement liée à la translocation t(12;21)(p13;q22) (Cave, H et al. 1997), qui résulte en la protéine de fusion ETV6-

AML1. Cette translocation est observée spécifiquement dans environ 25 % des LLA de type pré-B, ce qui en fait la translocation la plus fréquente de ce type de leucémie (Shurtleff, SA et al. 1995). Ce produit de fusion est composé des 5 premiers exons de ETV6 (Golub, TR et al. 1995; Wiemels, JL et Greaves, M 1999) qui encodent les domaines PNT et central mais qui excluent le domaine ETS, et généralement de tout le gène AML1 sauf le premier exon (figure 12) (Thandla, SP et al. 1999; Wiemels, JL et Greaves, M 1999; Wiemels, JL et al. 2000). Il en résulte une protéine capable potentiellement d'interagir avec les partenaires de ETV6 via le domaine PNT, dont ETV6 (McLean, TW et al. 1996), capable de recruter des co-répresseurs de transcription par les domaines PNT et central mais qui a le pouvoir de lier les cibles de AML1 et non plus celles de ETV6. À cet effet, il a été montré que ETV6-AML1 peut antagoniser la transactivation de AML1 via les séquences régulatrices des gènes TCR β (Hiebert, SW et al. 1996), IL3 (Uchida, H et al. 1999) et MCSFR (Fears, S et al. 1997). ETV6-AML1 peut également contrer la répression transcriptionnelle exercée par ETV6 au niveau du promoteur de la MMP3/stromélysine (Gunji, H et al. 2004) mais ETV6 ne peut contrer celle de ETV6-AML1 au niveau de celui de TCR β (Hiebert, SW et al. 1996). D'un point de vue fonctionnel, il peut aussi empêcher ETV6 d'inhiber la formation de colonies en agar mou ainsi que diminuer la capacité de AML1 de former de telles colonies (Gunji, H et al. 2004). Cependant, plusieurs évidences suggèrent que ETV6-AML1 à elle seule ne suffit pas pour induire une leucémie. Les oncogènes de cellules hématopoïétiques, par exemple ETV6-JAK et BCR-ABL, ont souvent pour effet de rendre des lignées cellulaires hématopoïétiques indépendantes à certaines cytokines pour leur survie. Il a été montré que ETV6-AML1 ne rend pas les lignées cellulaires Ba/F3 ni les 32D indépendantes à l'IL3, ni les cellules 32Dcl.3 à l'IL7 (Andreasson, P et al. 2001). De même, les souris transgéniques exprimant ETV6-AML1 dans les lignées lymphoïdes ne développent pas de problèmes hématologiques, suggérant que ETV6-AML1 seul ne suffit pas pour développer une leucémie (Andreasson, P et al. 2001). Tout récemment, une étude utilisant un modèle de transplantation de cellules souches hématopoïétiques transduites avec ETV6-AML1 montre que cette protéine chimérique induit une

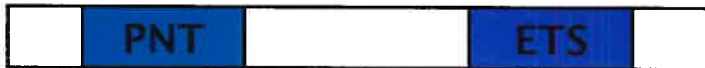
ETV6**AML1****ETV6-AML1****AML1-ETV6**

Figure 12. Structure protéique de ETV6-AML1.

La translocation t(12;21) fusionne les gènes ETV6 et AML1, ce qui résulte en l'expression de la protéine chimérique ETV6-AML1. Cette protéine est composée des domaines PNT et central de ETV6 que l'on retrouve en fusion avec presque toute la protéine AML1. PNT : domaine pointed; ETS : domaine ETS; RUNT : domaine de liaison à l'ADN de AML1; TA : domaine de trans-activation de AML1.

accumulation de cellules B immatures, principalement de pro-B, alors que les cellules B matures transduites sont présentes en moindre proportion (Tsuzuki, S et al. 2004; Fischer, M et al. 2005). On ne parle pas ici d'un blocage dans la différenciation et les souris ne développent pas de leucémies (Fischer, M et al. 2005). De plus, chez l'humain, on détecte ETV6-AML1 dans environ 1 % de la population générale dans le sang de cordon, ce qui est 100 fois supérieur au risque de développer une leucémie présentant cette translocation (Mori, H et al. 2002). D'autres événements génétiques ou épigénétiques semblent devoir survenir pour que ETV6-AML1 puisse induire le développement de la leucémie. À cet effet, un autre groupe a montré que lorsque des cellules de moëlle osseuse sont transplantées et que celles-ci expriment non seulement ETV6-AML1 mais sont aussi mutantes pour les gènes $p16^{\text{INK4}}$ et $p19^{\text{ARF}}$, on observe le développement des leucémies, bien que ceci ne survienne pas dans tous les cas (Bernardin, F et al. 2002). La délétion de l'allèle résiduel de ETV6 pourrait constituer un événement critique secondaire à la translocation $t(12;21)$. Puisque ETV6 peut interagir avec ETV6-AML1, il est possible qu'une éventuelle action oncogénique exercée par ETV6-AML1 puisse être inhibée par la présence de ETV6 mais que lorsque le gène de celui-ci est délété, ETV6-AML1 puisse agir librement. Une seule expérience a été faite en ce sens par un essai luciférase couplé à une séquence régulatrice de TCR β en amont et ETV6 n'a montré aucun impact sur la capacité d'empêcher ETV6-AML1 d'exercer son effet inhibiteur (Hiebert, SW et al. 1996), rendant moins probable cette dernière hypothèse. Néanmoins, il est tout de même possible que la combinaison des deux événements puisse favoriser le développement de la leucémie ou constituer un avantage au phénotype tumoral. Une étude parue récemment abonde en ce sens, décrivant le cas d'une jeune femme ayant développé une leucémie arborant ETV6-AML1 à 6 ans chez qui on a diagnostiqué une récurrence 12 ans plus tard au niveau d'un ovaire. Les cellules tumorales retrouvées dans l'ovaire étaient reliées clonalement à celles de la leucémie d'origine et présentaient la même translocation $t(12;21)$. Alors que dans la leucémie primaire l'allèle résiduel de ETV6 était intact, les cellules tumorales de la rechute en affichaient la perte (Ly-Sunnaram, B et al. 2005). Notons également que, contrairement à la translocation $t(12;21)$ seule, la combinaison avec la perte de ETV6 n'a jamais été rapportée dans des cellules saines.

La translocation $t(12;21)(p13;q22)$ est réciproque et donc, non seulement le gène chimérique ETV6-AML1 est généré mais AML1-ETV6 l'est aussi (figure 12). Contrairement à l'ARNm de ETV6-AML1 qui est exprimé dans tous les cas présentant la translocation $t(12;21)(p13;q22)$, celui de AML1-ETV6 est exprimé dans 58 % à 86 % des cas (Kim, DH *et al.* 1996; Nakao, M *et al.* 1996; Raynaud, S *et al.* 1996; Stams, WA *et al.* 2005). Au niveau protéique, AML1-ETV6 ne serait exprimé que dans 3/8 (38 %) des cas (Poirel, H *et al.* 1998). Le fait que, contrairement à ETV6-AML1, AML1-ETV6 ne soit pas exprimé dans tous les cas présentant la translocation a fait dire à plusieurs groupes que le produit de ce gène n'apporte probablement pas une contribution majeure à la pathogenèse des LLA et a provoqué un désintérêt général, tel que le montre le nombre d'articles publiés récemment dans la littérature. AML1-ETV6 possède quelques acides aminés de AML1 et le domaine ETS de ETV6 (figure 12). Cette structure suggère donc que AML1-ETV6 pourrait potentiellement compétitionner avec ETV6 pour la liaison du promoteur des cibles de ce dernier. Dans la réalité, il n'est toujours pas connu si une telle compétition est effective.

1.6 Hypothèse et objectifs

Nous posons l'hypothèse que la région commune de délétion au locus 12p12-13 contient un GST qui contribue au développement et/ou à la progression de la leucémie, lorsqu'inactivé. L'objectif général du travail décrit dans cette thèse était d'identifier un (des) gène(s) inactivé(s) au niveau du locus 12p12-13 dans les LLA pré-B présentant une délétion et de caractériser le produit de ce gène afin de mieux connaître l'impact de son absence dans la maladie. Pour ce faire, nous avons poursuivi les objectifs spécifiques suivants : 1) caractériser de nouveaux transcrits de la région communément délétée; 2) rechercher des mutations somatiques dans la séquence codante de ces gènes dans des LLA de patients; 3) déterminer leur niveau d'expression dans des LLA de patients; 4) identifier des gènes modulés par ETV6, le gène jugé meilleur candidat GST, dans un modèle cellulaire inductible; 5) identifier des sites de liaison potentiels de ETV6 dans les

régions régulatrices de gènes modulés par ETV6; 6) déterminer si l'expression des gènes modulés dans le modèle cellulaire corrèle avec celle de ETV6 dans les LLA pré-B et 7) étudier les corrélations possibles entre la co-modulation de l'expression génique et la fonction, la similarité de séquence dans les promoteurs ou la similarité de sites de liaison conservés dans les promoteurs. L'identification d'un GST au locus 12p12-13 et la caractérisation de sa fonction constituent un pas supplémentaire dans la compréhension de cette anomalie génétique fréquente et augmenteront éventuellement notre capacité à agir pour prévenir et/ou combattre la leucémie de l'enfant.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

2.1 Carte de transcrits détaillée de la région communément délétée dans les LLA

Introduction à l'article

Environ 30 % des enfants atteints de leucémie lymphoblastique aiguë présentent une délétion au niveau du locus chromosomique 12p12-13, ce qui suggère la présence d'un gène suppresseur de tumeur dans la région. Le travail décrit dans cet article avait pour objectif d'identifier des gènes présents dans la région de délétion commune, une étape cruciale dans l'identification de candidats suppresseurs de tumeur. Trois nouveaux gènes ont été découverts et caractérisés, portant à 7 le nombre total de gènes candidats présents au locus suppresseur de tumeur. De plus, de nouveaux isoformes de ces gènes ont été mis en évidence. Nous avons utilisé une stratégie mettant à profit des outils bio-informatiques et une approche de piégeage d'exons pour mettre en évidence les nouveaux transcrits. A. Montpetit a effectué le travail bio-informatique et de piégeage d'exons pour identifier les nouveaux transcrits. Ma participation a consisté à sous-cloner les ARNc de ces gènes et à les séquencer, ce qui a permis de confirmer l'existence de ces transcrits, en plus de mettre en évidence certains isoformes d'ARNm. D. Sinnett a participé à la conception de l'étude, a supervisé le projet et a participé à la rédaction du manuscrit. L'article a été publié dans la revue : « *European Journal of Human Genetics* » (Montpetit, A *et al.* 2002).

A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus

Alexandre Montpetit^{1,2}, Gino Boily¹ and Daniel Sinnett^{1,2,3}

¹Division of Hematology-Oncology, Charles-Bruneau Cancer Center, Research Center, Sainte-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montreal, QC H3T 1C5, Canada

²Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

³Department of Pediatrics, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

Correspondence to: Daniel Sinnett, Charles-Bruneau Cancer Center, Sainte-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montreal, QC H3T 1C5, Canada. Tel: (514) 345-2990; Fax: (514) 345-4731; [REDACTED] [REDACTED]

Keywords

tumour suppressor gene; leukaemia; chromosome 12; transcriptional units; gene expression

Abstract

Loss of heterozygosity of the short arm of chromosome 12 is a frequent event in a wide range of haematological malignancies and solid tumours. In previous studies, the shortest commonly deleted region was delimited to a 750-kb interval, defined by the markers *D12S89* and *D12S358*, in pre-B acute lymphoblastic leukaemia patients, suggesting the presence of a tumour suppressor locus. Here we report the construction of a transcriptional map that integrates the data obtained by genomic sequence analysis, EST database search, comparative analysis and exon amplification. We identified seven putative transcriptional units as well as six pseudogenes. Four of these candidate genes were already known: *ETV6*, encoding an ets-like transcription factor, *LRP6*, a member of the LDL receptor gene family, *BCL-G*, a recently identified pro-apoptotic gene and *MKP-7*, encoding a new member of the dual-specificity phosphatase family. The products encoded by the three new genes identified in this study, *LOH1CR12*, *LOH2CR12* and *LOH3CR12*, have no clear homology to known proteins. The gene predictions were all confirmed by expression analysis using RT-PCR and Northern blot. This transcriptional map is a crucial step toward the identification of the tumour suppressor gene at 12p12.

Introduction

The short arm of chromosome 12 is frequently rearranged in a wide variety of haematological malignancies of both myeloid and lymphoid origins.^{1,2,3} Most of these 12p alterations result from unbalanced translocations and deletions that lead to a loss of genetic material.⁴ The frequent loss of genetic material in tumour cells is usually indicative of the inactivation of tumour suppressor genes, which prompted the search for a suppressor locus on chromosome 12p. Loss of heterozygosity studies showed hemizygous deletions of chromosome 12p12 in 26 to 47% of pre-B acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cases, making it one of the most common genetic alterations found in this disease.^{5,6,7} The construction of both high-resolution genetic and physical maps led to the delineation of the shortest commonly deleted region within a 750 kb interval delimited by markers *D12S89* and *D12S358*.^{8,9,10} The existence of a putative 12p12 tumour suppressor gene is further substantiated by the observation of hemizygous deletions in a variety of haematological malignancies, as well as in certain solid tumours including breast, lung, ovarian and prostate carcinomas.^{11,12}

This region was shown to contain two known genes, *LRP6* and *ETV6*. *LRP6* encodes a member of the LDL receptor family¹³ that was recently shown to act as the WNT co-receptor.^{14,15,16} However Baens *et al.*¹⁰ failed to reveal any inactivating mutations in leukaemia patients. *ETV6*, also known as TEL, is a member of the ets-like family of DNA binding proteins, that was originally identified by virtue of its fusion to the platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β) in chronic myelomonocytic leukaemia with the translocation t(5;12) (q33;p13).¹⁷ Recently, it has been shown that *ETV6* acts as a transcriptional repressor of several matrix metalloproteinases and that its expression could counteract the transformation of cultured cells by ras.^{18,19} However, mutational analysis failed to detect deleterious mutations in the second *ETV6* allele of ALL patients with hemizygous deletion at this locus^{6,20} as expected for a classical tumour suppressor gene. These observations taken together led to the suggestion that an as yet unidentified suppressor locus might be located between *D12S89* and *D12S358*.¹¹

Here, we describe the application of a strategy that integrates the use of data mining tools, exon amplification experiments, gene expression studies and comparative genomic analysis to identify putative transcriptional units in the chromosome 12p12 locus. This strategy led to the identification of seven genes, including three uncharacterised genes, and six pseudogenes, indicating the usefulness of integrating different complementary genome-based approaches to identify candidate genes in a large chromosomal interval.

Materials and methods

Genomic clones

BAC clones RP11-525I13, RP11-267J23, RP11-757G14 and RP11-253I19 (GenBank accession numbers AC022222, AC007537, AC007621 and AC007619 respectively) were obtained from Incyte Genomics, Inc (St-Louis, MO, USA). The sequence of these BACs, of BAC RPC111-180M15 (GenBank accession number AC008115) as well as the whole *ETV6* contig (GenBank accession numbers NT_000600, AC005989 and NT_000601) were selected for analysis based on their localization within or near the shortest commonly deleted region according to the chromosome 12 physical map at the Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu>).

Sequence analysis

The genomic sequences available from the selected BAC clones were used as queries for BLAST searches and analysed using the NIX software (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/NIX>) that displays the results from 15 different prediction algorithms (Grail-CpG, Grail-exons, FGenes, Hexon, FEX, GenScan, etc) and BLAST analysis on many public databases (dbEST, Unigene, htgs, etc.). The programme Exofish (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetraodon>) was used to identify the presence of conserved regions at the protein level between the human sequences and the genome of *Tetraodon nigroviridis*. All other sequence analysis were performed using BLAST or CD-Search programmes on the NCBI

site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Multiple sequence alignments were obtained using the ClustalW algorithm²¹ and manually edited using the SeaView programme (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>). Alignments were displayed using the BOXSHADE programme (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

Exon amplification

Exon amplification was performed using the Exon Trapping System (GibcoBRL-Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, BAC clones were partially digested with *Sau3A*. The resulting restriction fragments ranging from 2.5 to 4 kb were isolated from 1% agarose gels and subcloned into *Bam*H1-digested pSPL3. Individual subclones were pooled and transfected into 80%-confluent COS-7 cells. Total cellular RNA was extracted 24 h after transfection and used as a template for RT-PCR using vector-specific primers. The fragments containing putative trapped exons were subcloned into pAMP10 and sequenced using T7 primer.

5'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Human testis Marathon-Ready cDNA (Clontech, Palo Alto, CA, USA) was used to amplify the transcript 5' ends according to the manufacturer's instructions. Briefly, 200 ng of Marathon-ready cDNA was amplified with AP1 primer and a gene-specific primer: 11962RACE (CTGTCCATGACTCATTTGCTGAACA), 11962RACE2 (AGGTGGTTAGTTCTGCCAGGCGAGT), LOH2RACE (CCTTTAAGGTGGCATCGCCCTAAGT) or LOH2RACE2 (CTAATCCGGAAGGTCTTGCG) by Touchdown PCR. The resulting RT-PCR products were analysed on 1% agarose gel, transferred to nylon membranes (Hybond N+, Amersham-Pharmacia Biotech Baie d'Urfé, Canada) and hybridised with a radioactive internal oligonucleotide to assess the specificity of the bands. The sequence of the putative 5'-end-derived exons was determined by dideoxy sequencing using the Thermo Sequenase Radiolabelled Terminator Cycle Sequencing kit (USB, Cleveland, OH, USA) following the subcloning of the PCR products into pGEMT-easy (Promega, Montreal, Canada).

RNA expression analysis by RT-PCR

Normal human brain, testis and prostate RNAs were obtained from Clontech (Palo Alto, CA, USA). Placenta, peripheral blood and bone marrow RNAs were isolated from healthy subjects using standard procedures. Following DNase-treatment, the RNA samples were incubated at 37°C for 60 min in the presence of 15 µM of random hexamers, 0.2 mM of each dNTPs and 200 U of MMLV reverse transcriptase (GibcoBRL, Life Technologies, Burlington, Canada). The cDNAs were amplified using 0.2 mM dNTP, 0.4 µM each primer and 2 U of ELONGase polymerase (GibcoBRL, Life Technologies, Burlington, Canada) in a 60 mM Tris-SO₄ pH 9.0 buffer containing 18 mM of (NH₄)₂SO₄, 8% of DMSO and 1.5 mM of MgSO₄. The primers amplifying the entire coding regions were 11962F (GTGGGTGTGACCTGGAAGAAAT) and 11962R (TGCACAGGACCACAGTAGACA) for the *BCL-G_L* gene; 97818F (CAAATTGTTGAGCTGCTGAAAT) and 97818R (GGGGAAGTGCAGAAGTAGGTC) for the *BCLG_M* gene; DUSPF (CTCGAGGGTGGGAAAAGAGGACTTATTG) and DUSPR (GGATCCTTTCAGATTTACAGGGAATTTTT) for the *MKP-7* gene; LOH1F (CTCGAGCCGCCGTTCTTCTGCTG) and LOH1R (GGATCCCCTTAGCTCCACACGTCCTC) for the *LOH1CR12* gene; LOH2F (GGCTACGCAAGACCTTCAGTT) and LOH2R (ACTGCTTAGTGGGCCCTTCCCAGTC) for the *LOH2CR12* gene; FLJF (CTCGAGCCTTGACCTTTGAAGACCAAAA) and FLJR (AAGCTTAGAGACACCGAGTTCCATCC) for the *LOH3CR12* gene. The cycling conditions were as follows: initial denaturation of 2 min at 94°C, 35 cycles of 94°C for 30 s, 60-64°C for 30 s, and 72°C for 60 s, and a final extension at 72°C for 10 min. RTPCR products were revealed by 1 or 2% agarose gel electrophoresis. They were then excised from the gel, cloned into pGEMT-easy (Promega, Montreal, Canada) and sequenced completely.

Northern blot hybridisation

Gel-purified RTPCR products (see above) were radiolabelled by random priming and used as probes to hybridise multiple Tissue Northern Blots (Human

MTN Blot I, Human MTN Blot II and Human Immune System MTN Blot II, Clontech, Palo Alto, CA, USA). The hybridisations were carried out at 50°C in a solution containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 1% SDS, 1 M NaCl, 50 µg/ml fish sperm DNA and 5×10^6 c.p.m./ml of a given probe. Following hybridisation, the filters were washed at high stringency with 0.1X SSC, 0.1% SDS at 55°C and autoradiographed at -80°C with X-OMAT Kodak films.

Results

Sequence analysis

The availability of BAC sequences within the chromosome 12p12 suppressor locus, as part of the human genome sequencing project, provided the molecular framework to search for transcribed sequences. Four BAC clones, RP11-525I13, RPC11-267J23, RP11-757G14 and RP11-253I19, mapped between markers *D12S89* and *D12S358*. Only partial and unordered sequences were available for clones 525I13 and 253I19 at the time of the writing of this paper. The genomic gap between the marker *D12S89* and the BAC 525I13 (Figure 1) was filled by using the data from the complete sequence of the *ETV6* locus.²² This genomic sequence was analysed with the NIX programme to identify putative transcribed sequences. We identified six pseudogenes based on the absence of introns and the presence of stop codons within the consensus coding sequence. In addition, we found four CpG islands and over 90 EST clusters, 38 of them corresponding to Unigene entries. Many of these ESTs appear to be artefacts as suggested by their low representation (i.e. either unique or only two members) or by the presence of a polyA tail at their 3' end in the corresponding genomic sequence without any upstream polyadenylation signal. This could have allowed oligo dT priming during RT-PCR on mRNA, but also on genomic DNA or on unspliced RNA. To restrict the number of ESTs to analyse, they were classified according to the following characteristics: (1) presence of spliced sequence, (2) homology with genes/ESTs or proteins, when translated, from other species, (3) evolutionarily conserved as shown by Exofish analysis, (4) matches with trapped

exon(s) and (5) presence of a polyadenylation signal at the 3' end of the cluster. In this study, only the EST clusters that fulfil at least one of the above characteristics were further investigated.

The EXOFISH algorithm compares genomic sequences to 150 Mb of *T.nigroviridis* sequence (corresponding to 33% of its genome) at the protein level. This algorithm has been successful in detecting two thirds of the known genes on human chromosome 22 with an estimated specificity of over 90%.²³ In this study, 33 hits (termed ecores) corresponded to four EST clusters (Table 1) and five pseudogenes (data not shown), but to no other regions. The exon trapping technique identified seven exons corresponding to three of the clusters found in the region analysed (Table 1). Six other trapped sequences did not reveal any match in the EST database, but the absence of a translation frame may suggest false positives rather than actual exons. Applying all these criteria, only 20 clusters were kept for further analysis (Table 1). None of the other clusters analysed contained an ORF that could encode a protein. Of the 20 clusters selected, eight contained spliced sequences and were considered the most interesting. Except for two clusters, *BCL-G_M* and *LOH2CR12*, they all had clear orthologues from other species in the dbEST. Unigene cluster Hs.97818 corresponded clearly to an alternative splicing form of the *BCL-G* gene (see below). The physical relationship of these predicted genes within the commonly deleted region is presented in Figure 1. To be more informative, we have extended the map on the proximal side in order to include the known genes *CREBL2*, *GPR19* and *CDKN1B*. No other putative transcriptional units were present on the corresponding BAC clone RPC111180M15 (data not shown). Two of the clusters corresponded to the *ETV6*²² and *LRP6*¹³ genes that were previously characterised in detail and mapped to this region^{13,22} and as such will not be further discussed in this section.

By using the assembled ESTs and exon prediction programmes it was possible to obtain an open reading frame (ORF) starting with a methionine for all the remaining selected clusters except for *LOH2CR12* (Figure 2). The region encompassing the putative ORFs of all the clusters could be amplified by RT-PCR

in multiple tissues, confirming the gene prediction (Table 2). Furthermore, many alternative splicing species could be observed by this analysis (see below).

Characterisation of the candidate genes

The human *BCL-G* gene was originally characterised as composed of six exons that encode at least two known splicing variants, *BCL-G_L* (long form, 327 amino acids) and *BCL-G_S* (short form, 252 amino acids) isoforms.²⁴ The BH3 domain, one of four BCL-2 homology domains (BH domain), is found in both isoforms and confers pro-apoptotic activity. The longer variant also possesses a BH2 domain, which negatively regulates this activity.²⁴ RT \bar{P} CR (Table 2) and Northern blot (data not shown) analyses revealed that while *BCL-G_S* is only expressed in the testes, *BCL-G_L* is expressed in many tissues including bone marrow, prostate, pancreas, colon, but predominantly in the testes, which is in agreement with Guo *et al.*²⁴ Our Blast analyses and 5'RACE experiments suggest the presence of seven additional exons (Figure 2). The first three 5' upstream exons (exons 1A to 1C) are non-coding and various combinations of these exons were observed in the dbEST. Alternative splicing involving the four additional 3' exons (exons 7 to 10) could generate a new isoform, termed *BCL-G_M* for median, whose 276 amino acid product would also lack box BH2. By RT \bar{P} CR, *BCL-G_M* was shown to be expressed only in the testes (Table 2).

MKP-7 has 7 exons (Figure 2) and codes for a new member of the dual-specificity phosphatase family that dephosphorylates MAP kinases.²⁵ This gene shows 55% sequence identity with DUSP8/hvh-5, a closely related dual-specificity phosphatase.²⁵ Northern blot hybridisation with a *MKP-7* probe revealed the expression of two mRNA species of 4.0 and 6.0 kb in all tissues tested (Figure 3). The detection of weakly hybridising 3.0 and 5.5 kb bands in some tissues, especially in the brain, could be due to cross-hybridisation with the related DUSP8/hvh-5 species, which correspond to the observed size and distribution of this mRNA.²⁶ By RT \bar{P} CR, we also observed a splicing variant, in which exon 4 is skipped and that is present in every tissue analysed by RT \bar{P} CR, although expressed at lower levels (Table 2). The predicted protein would be truncated and

lack its phosphatase domain, keeping only the conserved cdc25 domain putatively involved in protein-protein interactions.²⁷

LOH1CR12 has four exons (Figure 2) that encode a predicted 195 amino acid protein that shows high homology with hypothetical proteins from distant species: mouse BAB25030 (95% identity), *D.melanogaster* CG11802 (35% identity and 59% similarity) and *C.elegans* F59E12.11 (27% identity and 55% similarity) (Figure 4). The function of these proteins is not known, but they have some homology to one of the spectrins repeats of the TRIO protein and to an uncharacterised region from Mekk4 protein (Figure 4). Three major mRNA species at 1.2, 1.4 and 4.5 kb were detected in all tissues tested by Northern blot (Figure 3). Bands at 1.7 and 6 kb were also detected at lower levels. RT-PCR and sequencing experiments revealed the presence of a splicing variant skipping exon 2, thus explaining the 1.2 and 1.4 kb species. Interestingly this variant was not observed in the SJNB-7 cell line (Table 2). Both bands at 4.5 and 6 kb could be explained by the alternative use of termination sites (see below).

The *LOH3CR12* gene is constituted of five exons (Figure 2). The function of this gene product is unknown, but it possesses low homology to the syndecan domain, which is characteristic of membrane heparan sulfate proteoglycans (Figure 5). Blast analysis also indicated low homology to hepatocyte growth factor activator inhibitor protein and to glycoprotein 1a (data not shown). Homologues from various species were observed, including the mouse RIKEN cDNA 9130403P13 with 62% identity and 66% similarity at the protein level (Figure 5). We have also found a transcript variant (GenBank accession number AK023622) that is characterised by the presence of the 102 bp coding intron 2 that is translated in phase when left unspliced (hatched box in Figure 2). Both transcripts were present in every tissue tested by RT-PCR, the longest being the most abundant (data not shown).

The definitive structure of the *LOH2CR12* gene is still unknown at this moment: only two exons were identified from the human EST database. All those ESTs, as well as the most upstream sequence obtained by 5'RACE analysis, stopped in a GC-rich region corresponding to the *LOH1CR12* CpG island (Figure

6). By Blast analysis, a 500-bp mouse genomic fragment (clone Ti no.10921056) revealed clear homology to 5' exons from both *LOH1CR12* and *LOH2CR12*. A common ORF could be constructed for *LOH2CR12*, although the start codon was not observed and is thus presumably located in another unidentified exon (Figure 6). No homology was found with proteins from other species. RT-PCR and sequencing experiments confirmed the gene prediction and very low levels of expression were observed in the bone marrow, prostate and testes. It also revealed that its 3' end corresponded to Unigene cluster Hs.67553 (Table 1). The weak expression could explain the absence of signal in the Northern blot analysis (data not shown).

Alternative termination

In previous studies, *ETV6* was shown to use alternative termination sites.²² Three of the EST clusters found in our study, Hs.169081, Hs.293972, Hs.146381, clearly correspond to the 3' ends of the *ETV6* transcripts of 2.4, 4.3 and 6.2 kb, respectively, when placed in the genomic context (Table 1). *LRP6* possesses two transcripts of 6 and 11 kb.¹³ Using the same reasoning, it is clear that the 3' end of clusters Hs.23672, which includes the coding sequence of *LRP6*, and Hs.41269, containing over 90 ESTs, correspond to the 3' end of the short and long transcripts, respectively. All the other identified transcribed sequences, with the exception of *LOH2CR12*, were characterised by at least two different mRNA species by Northern hybridisation (Figure 3) suggesting the presence of alternative splicing or alternative usage of termination sites. The latter is supported by the identification of large Unigene clusters with consensus 3' polyadenylation sites (but without coding potential), that could explain the 6 kb-*LOH3CR12*, 6 kb-*MKP-7* and 4.5- and 6 kb-*LOH1CR12* mRNAs respectively (see Table 1 and Figures 2 and 3). RT-PCR and sequencing experiments confirmed the existence of the longer transcripts for each gene (data not shown).

CpG islands

The presence of a CpG island usually indicates the 5' extremity of an housekeeping gene. The analysis of the genomic sequences with Grail/CpG

predicted 4 CpG islands in the *D12S89-D12S358* interval. Three of them seem to be associated with the 5' ends of *LRP6*, *LOH3CR12* and *LOH1CR12*. *ETV6* also possesses a 5' CpG island,²² which is located outside the interval analysed (Figure 1). As predicted, all of them are expressed in every tissue analysed in contrast with *BCL-G* and *LOH2CR12* whose expression is more restricted (Table 2). The 5' end of *MKP-7* could not be identified since it lies in a gap between the BACs 253I19 and 180M15 (Figure 1), but Baens *et al.*¹⁰ placed a CpG island in that region. The other CpG island is associated with the pseudo-prothymosin gene and probably does not reflect the presence of a transcribed gene. Indeed, it has been shown that this CpG island is methylated *in vivo*.¹⁰

Discussion

Here we report the construction of a detailed transcriptional map of the putative chromosome 12p12 tumour suppressor locus using a combination of different approaches (comparative analysis, exon trapping and gene prediction algorithms). We identified seven distinct candidate transcriptional units, including *ETV6*, *LRP6*, *BCL-G* and *MKP-7* that were characterised previously.^{13,22,24,25} *LOH1CR1*, *LOH2CR12* and *LOH3CR12* are three novel genes characterized in this study.

ETV6 is a nuclear phosphoprotein that is widely expressed in all normal tissues²⁸ and plays an important role in angiogenesis²⁹ as well as in the normal development of the haematopoietic system.³⁰ Unlike most Ets-like proteins, *ETV6* acts as a transcriptional repressor recruiting proteins involved in the histone-deacetylase pathway.^{31,32} It can also block the transformation process induced by the overexpression of *ras* in cultured cells.¹⁹ *LRP6* is a member of the LDL-receptor family that has been recently shown to be an essential component of the Wnt pathway.^{14,15,16} This pathway is involved in many different cancers and developmental defects in humans.³³ *BCL-G* is a new member of the *BCL-2* family that possesses proapoptotic activity.²⁴ *BCL-G* has multiple splicing variants generating three proteins of different lengths. *BCL-G_L* contains both conserved

boxes BH3 and BH2, whereas BCL-G_S lacks box BH2. The latter is a more potent apoptosis inducer than the longer variant indicating that Box BH2 has an inhibitory role.²⁴ We found a third variant, BCL-G_M, that also lacks box BH2 thus predicting a function similar to BCL-G_S. Considering their function, *ETV6*, *LRP6* and *BCL-G* are good candidate genes, but the failure to detect any inactivating mutations in these genes in leukaemia patients does not support a role as classical tumour suppressor genes.^{10,20,24}

MKP-7 is a new member of the dual-specificity ser/thr and tyr phosphatases. Phosphatases play important roles in the regulation of intracellular signalling and have been associated with either oncogenic or tumour suppressor activity.³⁴ For instance, PTEN, another dual-specificity phosphatase, is often inactivated in human cancers, particularly endometrial carcinomas and glioblastomas, and germline mutations have been reported in patients affected with either of these two tumour predisposing syndromes.³⁵ MKP-7 was recently shown to bind and inactivate p38 MAPK and JNK/SAPK involved in the transmission of cellular growth signals to the nucleus.²⁵

LOH1CR12 and LOH3CR12 have no strong sequence similarity with proteins of known function, but some speculations can be made. LOH1CR12 has homologues at least in mouse, *C.elegans* and *D.melanogaster* and Blast analysis revealed some sequence similarities at the protein level with a region encompassing one of the spectrin repeats of TRIO and other closely related proteins. TRIO is a guanine nucleotide exchange factor that regulates the actin cytoskeleton organization, cell motility and cell growth via activation of Rho GTPases.^{36,37} Spectrin repeats are usually found in proteins associated with the cytoskeleton. Although the specific function of LOH1CR12 cannot be inferred, the fact that it is conserved throughout evolution points to an important role for this protein. Homologues of protein LOH3CR12 are present in various mammals including the mouse, but no homologues have been identified in lower vertebrates. It possesses a syndecan domain and has also low homology with glycoprotein 1a and hepatocyte growth factor activator inhibitor. All of them are membrane-bound or transmembrane proteins. Syndecans are transmembrane heparan sulphate

proteoglycans that play an important role in cell-matrix and cell-cell interactions.³⁸ Finally, the structure of *LOH2CR12* is still incomplete and the characterisation of the remaining 5' exons will be necessary to infer a putative function for its encoded protein.

Previous expression analysis has demonstrated that *ETV6* and *LRP6* are present in a wide range of tissues.^{13,28} In this study, we showed that *LOH1CR12*, *LOH3CR12* and *MKP-7* also have a broad range of expression. Only *BCL-G* and *LOH2CR12* have a more restricted pattern of expression. *BCL-G* variants, *BCL-G_S* and *BCL-G_M* are only expressed in the testes while *BCL-G_L* is expressed predominantly in the testes and also at lower levels in other tissues including prostate, pancreas and the bone marrow, which is consistent with the work done by Guo *et al.*²⁴ The expression of *LOH2CR12* was observed only by RT-PCR analysis in certain tissues including testes, prostate and bone marrow. The fact that all the genes in the commonly deleted region from ALL patients are expressed in the bone marrow makes them interesting tumour suppressor gene candidates.

The observation that more EST clusters were identified than the number of genes in the region was puzzling at first. One explanation is the fact that most of the genes identified in our study seem to use alternative termination sites, giving rise in the database of multiple independent clusters, since most of the ESTs are primed at their 3' end. Whether the latter phenomenon is specific to the genomic context of this locus is not known, but many examples of alternative termination exist in the literature.³⁹ The exact role of the alternative 3'UTRs length is unclear since it does not affect the coding sequence, but it could be associated with the relative mRNA stability. For instance, the gene *eIF-2a* uses at least two polyA sites generating two common transcripts of 1.6 and 4.2 kb.⁴⁰ The smaller transcript is more readily translated *in vitro* while the longer transcript is more stable. The relative ratios of these transcripts vary with each tissue. The majority of the other clusters, if not all, correspond to artefacts that could be explained by internal or genomic polyT priming during the reverse transcription reaction. Only two small clusters in our analysis, represented by only one or two ESTs, could not be ruled

out as artefacts using our criteria, indicating that we probably identified all the genes in the locus.

The construction of a transcription map of this locus and the identification of seven candidate genes provide the molecular framework to identify the tumour suppressor gene(s) at 12p12, a locus frequently deleted in haematological malignancies as well as in many different solid neoplasias.

Accession numbers

Sequence data from this article have been deposited in the EMBL/GenBank Libraries under accession numbers AY040274, AY037865, AY037866, AY037867 and AY038927.

Acknowledgements

We thank Zeina Saikali for critical reading of this manuscript. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Daniel Sinnett is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Alexandre Montpetit and Gino Boily have received studentships from the CIHR and from the FRSQ, respectively.

References

1 **Berger R, Bernheim A, Le Coniat M et al.** Abnormalities of the short arm of chromosome 12 in acute nonlymphocytic leukemia and dysmyelopoietic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; **19**: 281-289.

- 2 **Raimondi SC, Williams DL, Callihan T, Peiper S, Rivera GK, Murphy SB.** Nonrandom involvement of the 12p12 breakpoint in chromosome abnormalities of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1986; **68**: 69-75.
- 3 **Chan LC, Kwong YL, Liu HW, Lee CP, Lie KW, Chan AY.** Deletion 12p in de novo acute myeloid leukemia. An association with early progenitor cell. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **62**: 47-49.
- 4 **Raimondi SC.** Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; **81**: 2237-2251.
- 5 **Stegmaier K, Pendse S, Barker GF et al.** Frequent loss of heterozygosity at the TEL gene locus in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 1995; **86**: 38-44.
- 6 **Takeuchi S, Bartram CR, Miller CW et al.** Acute lymphoblastic leukemia of childhood: identification of two distinct regions of deletion on the short arm of chromosome 12 in the region of TEL and KIP1. *Blood* 1996; **87**: 3368-3374.
- 7 **Baccichet A, Qualman SK, Sinnett D.** Allelic loss in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 1997; **21**: 817-823.
- 8 **Baccichet A, Sinnett D.** Frequent deletion of chromosome 12p12.3 in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1997; **99**: 107-114.
- 9 **Aissani B, Sinnett D.** Fine physical and transcript mapping of a 1.8 Mb region spanning the locus for childhood acute lymphoblastic leukemia on chromosome 12p12.3. *Gene* 1999; **240**: 297-305.
- 10 **Baens M, Wlodarska I, Corveleyn A, Hoornaert I, Hagemeyer A, Marynen P.** A physical, transcript, and deletion map of chromosome region 12p12.3 flanked by ETV6 and CDKN1B: hypermethylation of the LRP6 CpG island in two leukemia patients with hemizygous del(12p). *Genomics* 1999; **56**: 40-50.

- 11 **Aissani B, Bonan C, Baccichet A, Sinnett D.** Childhood acute lymphoblastic leukemia: is there a tumor suppressor gene in chromosome 12p12.3? *Leuk Lymphoma* 1999; **34**: 231-239.
- 12 **Kibel AS, Freije D, Isaacs WB, Bova GS.** Deletion mapping at 12p12-13 in metastatic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **25**: 270-276.
- 13 **Brown SD, Twells RC, Hey PJ et al.** Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **248**: 879-888.
- 14 **Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC.** An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000; **407**: 535-538.
- 15 **Tamai K, Semenov M, Kato Y et al.** LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 2000; **407**: 530-535.
- 16 **Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K et al.** Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 2000; **407**: 527-530.
- 17 **Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG.** Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994; **77**: 307-316.
- 18 **Van Rompaey L, Dou W, Buijs A, Grosveld G.** Tel, a frequent target of leukemic translocations, induces cellular aggregation and influences expression of extracellular matrix components. *Neoplasia* 1999; **1**: 526-536.
- 19 **Fenrick R, Wang L, Nip J et al.** TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 5828-5839.
- 20 **Stegmaier K, Takeuchi S, Golub TR, Bohlander SK, Bartram CR, Koeffler HP.** Mutational analysis of the candidate tumor suppressor genes TEL and KIP1 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1996; **56**: 1413-1417.

- 21 **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 4673-4680.
- 22 **Baens M, Peeters P, Guo C, Aerssens J, Marynen P.** Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6. *Genome Res* 1996; **6**: 404-413.
- 23 **Roest Crollius H, Jaillon O, Bernot A et al.** Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using Tetraodon nigroviridis DNA sequence. *Nat Genet* 2000; **25**: 235-238.
- 24 **Guo B, Godzik A, Reed JC.** Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 2001; **276**: 2780-2785.
- 25 **Tanoue T, Yamamoto T, Maeda R, Nishida E.** A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *J Biol Chem* 2001; **276**: 26629-26639.
- 26 **Martell KJ, Seasholtz AF, Kwak SP, Clemens KK, Dixon JE.** hVH-5: a protein tyrosine phosphatase abundant in brain that inactivates mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem* 1995; **65**: 1823-1833.
- 27 **Denu JM, Dixon JE.** Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol* 1998; **2**: 633-641.
- 28 **Poirel H, Oury C, Carron C et al.** The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene* 1997; **14**: 349-357.
- 29 **Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH.** Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J* 1997; **16**: 4374-4383.
- 30 **Wang LC, Swat W, Fujiwara Y et al.** The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 1998; **12**: 2392-2402.

- 31 **Lopez RG, Carron C, Oury C, Gardellin P, Bernard O, Ghysdael J.** TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* 1999; **274**: 30132-30138.
- 32 **Chakrabarti SR, Nucifora G.** The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **264**: 871-877.
- 33 **Polakis P.** Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; **14**: 1837-1851.
- 34 **Dahia PL.** PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocr Relat Cancer* 2000; **7**: 115-129.
- 35 **Bonneau D, Longy M.** Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mutat* 2000; **16**: 109-122.
- 36 **Debant A, Serra-Pages C, Seipel K et al.** The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac- specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5466-5471.
- 37 **Seipel K, Medley QG, Kedersha NL et al.** Trio amino-terminal guanine nucleotide exchange factor domain expression promotes actin cytoskeleton reorganization, cell migration and anchorage-independent cell growth. *J Cell Sci* 1999; **112**: 1825-1834.
- 38 **Rapraeger AC.** Molecular interactions of syndecans during development. *Semin Cell Dev Biol* 2001; **12**: 107-116.
- 39 **Edwards-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C.** Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 2547-2561.
- 40 **Miyamoto S, Chiorini JA, Urcelay E, Safer B.** Regulation of gene expression for translation initiation factor eIF-2 alpha: importance of the 3' untranslated region. *Biochem J* 1996; **315**: 791-798.

Table 1 Predicted transcriptional units within the chromosome 12p12 tumour suppressor locus

Unigene/EST cluster	No. ESTs	Gene (acc.no.)	Spliced sequence	Mouse orthologue (acc.no.)	Exonish hits (scores)
Hs.169081	40	ETV6 (NIM_001987)	yes	NIM_007961	4
Hs.293972	30		no		-
Hs.146381	18		no		-
Hs.11962	20	BCL-G ₁ /G ₂ (AF281254/NIM_030766)	yes	BFT139422	-
Hs.97818	2	BCL-G _M (AY040274)	yes	-	-
Hs.23672	52	LRP6 (NIM_002336)	yes	NIM_008514	17
Hs.41269	93		no		-
Hs.5999	40	LOH3CR12 (AK023622/NIM_018050)	yes	NIM_026345	-
Hs.50860	5		no		-
yX93f07	5	LOH2CR12 (AY037867)	yes	-	-
Hs.67553	7		no		-
Hs.105040	43	LOH1CR12 (AY037865/AY037866)	yes	AK007423	2
Hs.86330	3		no		-
Hs.232681	4		no		-
Hs.20281	147	MKP-7 (AB052156/AY038927)	yes	AB052157	3
Hs.7341	61		no		-
Hs.291547	1	-	no	-	-
Hs.171346	2	-	no	-	-

*not done. BACs used in the exon trapping experiments did not cover the ETV6 region.

Table 2 Gene expression analyses by RT-PCR

Gene	Brain	Testis	Prostate	Blood	Bone marrow	Placenta	HeLa
BCL-G	-	+ ^a	+	-	+	-	-
LOH3CR12	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a
LOH2CR12	-	+	+	-	+	-	-
LOH1CR12	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a
MKP7	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a

^apresence of splicing variant(s) (see text). ^bSJNB-7: neuroblastoma-derived cell line.

Legends to figures

Figure 1. Physical and transcriptional map of the commonly deleted region on chromosome 12p12. The shortest region of overlapping deletion (SRO) is delimited by markers *D12S89* and *D12S358*. Filled rectangles indicate the presence of a CpG island. Arrows indicate the orientation of transcription. Other EST clusters (Hs. 291547 and Hs.171346) found in this study are also indicated on the map. Pseudogenes are indicated in italics. The position and size of the genomic clones, as well as their corresponding accession numbers are shown in the lower section. The dotted lines indicate partial and unordered genomic sequences. Tel, telomere; cen, centromere.

Figure 2. Genomic structure of *BCL-G*, *MKP-7*, *LOH1CR12*, *LOH2CR12* and *LOH3CR12*. Alternative splicing is indicated by solid lines joining two exons. Coding and non-coding exons are represented by open and filled boxes, respectively. Hatched boxes indicate the presence of non-coding or coding sequence depending on the context (see text). Arrows, asterisks and pA indicate initiation sites, stop sites and polyadenylation signals, respectively. The sizes of each exon and intron, when known, are indicated above and below the genes, respectively.

Figure 3. Northern blot analysis of *MKP-7*, *LOH1CR12* and *LOH3CR12* mRNAs. Multiple tissue Northern blots membranes were hybridised with probes specific for each gene. Asterisk indicates *DUSP8/hvh-5* cross-hybridisation (see text).

Figure 4. Amino acid alignment of hypothetical *LOH1CR12* proteins from distant species. Human *LOH1CR12* (GenBank acc. no. AAK71328), mouse BAB25030, *C.elegans* F59E12.11 (GenBank acc. no. T15266) and

D.melanogaster CG11802 (GenBank acc. no. AAF48107) hypothetical proteins were aligned using ClustalW and manual refinements. Regions of high similarity with mouse Mekk4 (Swissprot no. O08648) and human Trio (Swissprot no. O75962) are also shown. Residues were shaded using BOXSHADE software according to their relative conservation (dark) or similitude (grey) across all species. Positions in the corresponding proteins are indicated on the right. The shorter human splice variant would lack amino acid 20 to 66.

Figure 5. Amino acid alignment of hypothetical protein LOH3CR12 from mouse and human. Human LOH3CR12 (GenBank acc. no. BAB14621) and mouse RIKEN cDNA 9130403P13 (GenBank acc. no. NP_080621) proteins were aligned with syndecan domain (pfam 01034) using ClustalW and manual refinements. Dashes indicate gaps introduced to maintain optimal alignment. Residues were shaded using BOXSHADE software according to their relative conservation (dark) or similitude (grey) across all species. Positions in the corresponding human protein are indicated on the right. The shorter splice variant would lack amino acid 14 to 47.

Figure 6. The partial cDNA sequence and predicted open reading frame of the *LOH2CR12* gene. The observed exon/intron junction is indicated by a filled triangle. The open triangle indicates the position of the most upstream sequence that was characterised by 5'RACE and R \bar{T} PCR. Upstream genomic sequence is indicated in *italic*. The putative polyA signal is underlined.

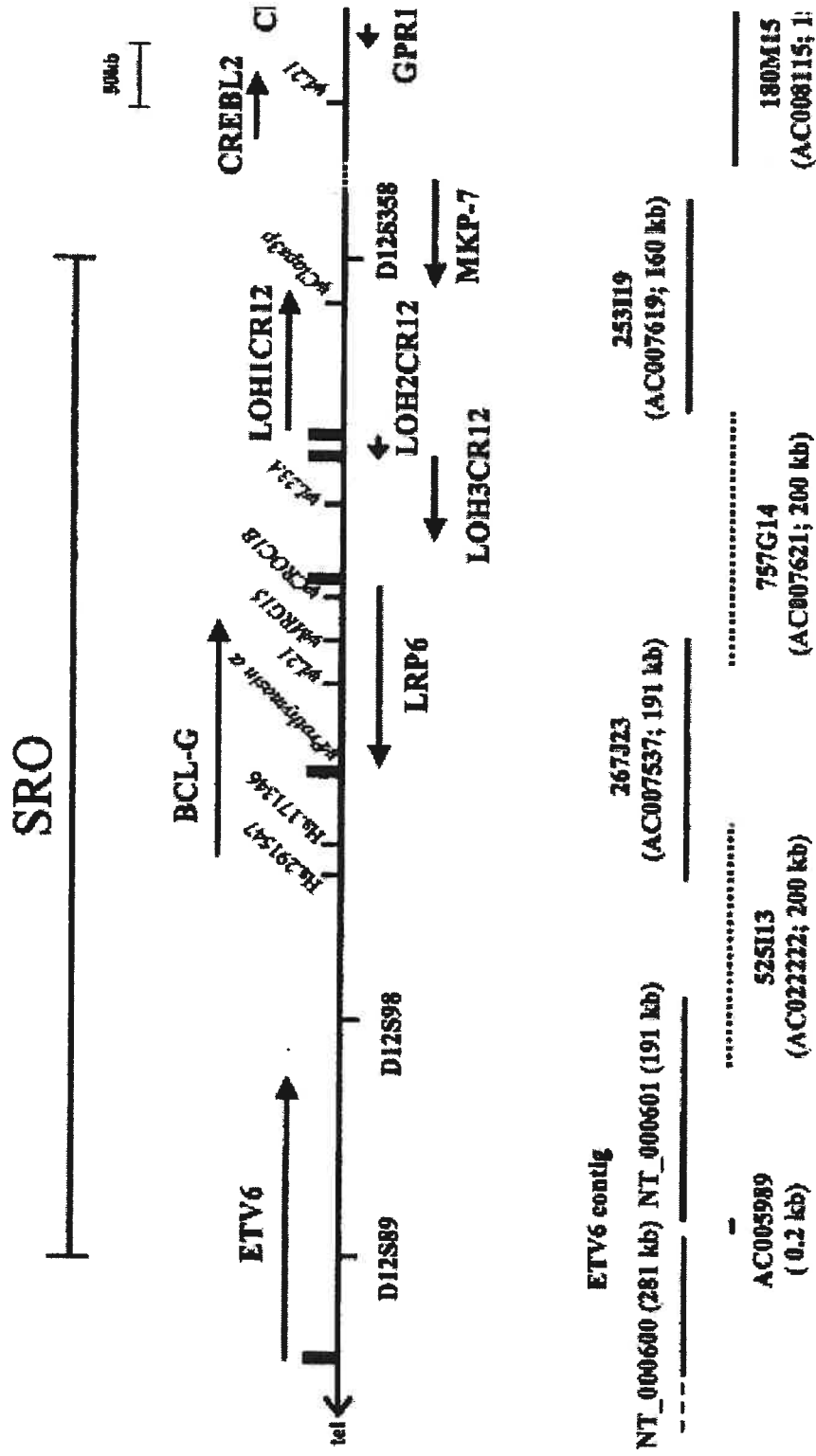


Figure 1

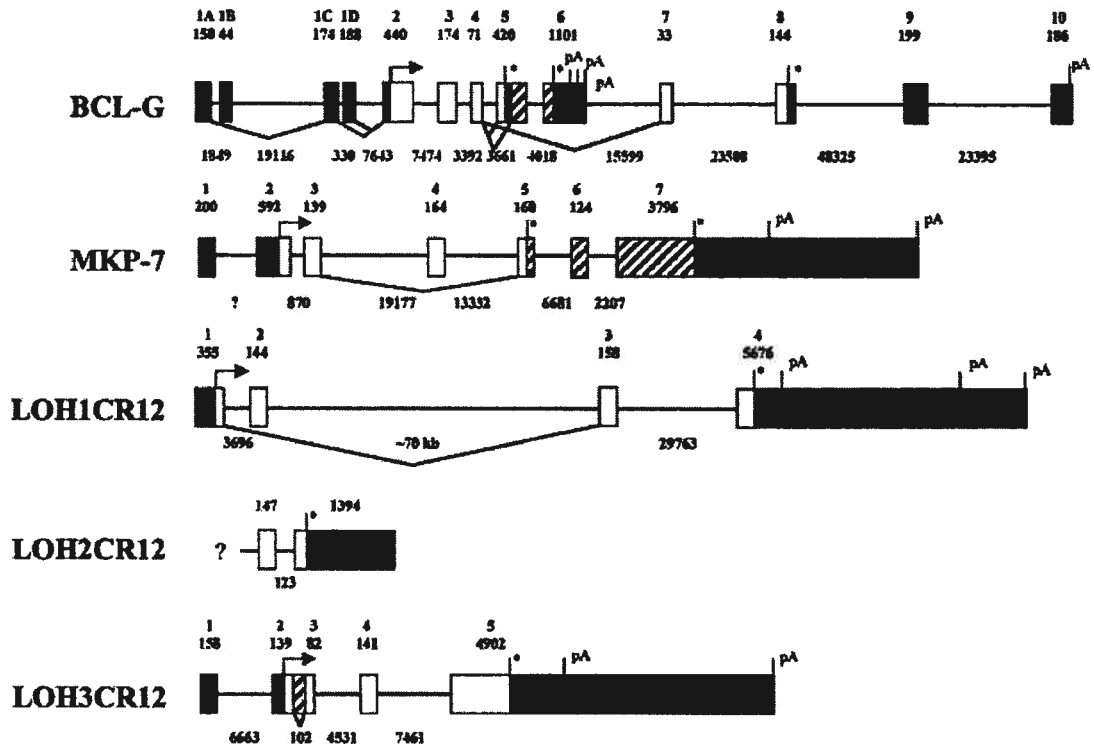


Figure 2

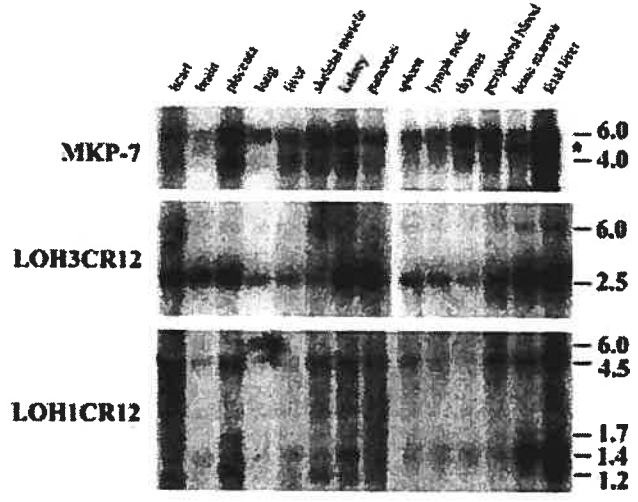


Figure 3

```

Human  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  54
Mouse  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  54
Drosophila  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  190
C.elegans  MGRKPSA-----TAGTSSMPPQWQKSTFSLTRASTKRSKGLI  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  128

Human  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  109
Mouse  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  109
Drosophila  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  246
C.elegans  MGRKPSA-----TAGTSSMPPQWQKSTFSLTRASTKRSKGLI  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  188

Mekk 4  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  344
TRIO    MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  903

Human  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  168
Mouse  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  168
Drosophila  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  306
C.elegans  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  237

Mekk 4  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  376
TRIO    MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  903

Human  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  196
Mouse  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  196
Drosophila  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  333
C.elegans  MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  264

TRIO    MGRKPSA-----FAKRRVQDLSNRVTKSANKRRAK  LKLVVVAAGSD  AGRVNSNDEEVI  912

```

Figure 4

2.2 Étude de mutations et de l'expression des gènes candidats suppresseurs de tumeur du locus 12p12-13 dans des LLA pré-B de patients

Introduction à l'article

Dans le but d'identifier un éventuel gène suppresseur de tumeur au locus 12p12-13 (voir section 2.1), nous avons vérifié si l'un des gènes de la région était inactivé dans des leucémies de patients présentant une délétion. Dans un premier temps, la recherche de mutations au niveau des régions codantes de l'allèle résiduel a été entreprise. Aucune mutation somatique n'a été détectée, seuls des polymorphismes ont été mis en évidence. Ceux-ci ont été utilisés pour vérifier la perte d'hétérozygotie dans les patients et nous ont permis de réduire davantage la région commune de délétion. Dans un deuxième temps, nous avons mené une étude d'expression, pour chacun des gènes, dans un groupe de patients représentatifs et avons montré que seul le gène ETV6 n'était plus exprimé dans les échantillons présentant une délétion et ce, dans environ 90 % des patients analysés. Cette étude suggère que ETV6 est le candidat suppresseur de tumeur le plus probable dans la région étudiée. Nous avons également mené une étude d'association entre l'expression des gènes de la région et certains paramètres cliniques et moléculaires. A. Montpetit, J. Larose et N. Trudel ont contribué principalement à l'étude de recherche de mutations. Pour ma part, j'ai participé, avec S. Langlois à l'étude d'expression par PCR en temps réel chez les patients. J'ai également réalisé l'analyse des résultats d'expression, les analyses statistiques d'associations et j'ai participé à l'écriture du manuscrit. D. Sinnett a participé à la conception de l'étude, a supervisé le projet et a participé à la rédaction du manuscrit. L'article a été publié dans la revue « Leukemia » (Montpetit, A *et al.* 2004).

Mutational and expression analysis of the chromosome 12p13 candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia

Alexandre Montpetit^{1,2}, Josiane Larose¹, Gino Boily¹, Sylvie Langlois¹, Nathalie Trudel¹ and Daniel Sinnett^{1,2,3}

¹Division of Hematology-Oncology, Research Center, Sainte-Justine Hospital, Montreal, H3T 1C5, Canada, ²Department of Biochemistry, and ³Department of Pediatrics, University of Montreal, Montreal, Canada

Running title: 12p candidate genes characterization

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research CIHR (grant number MOP-14108) D.S. is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). A.M and G.B. received studentships from the CIHR and the FRSQ, respectively.

Correspondence: Daniel Sinnett, Ph.D., Division of Hematology-Oncology, Research Center, Sainte-Justine Hospital, 3175 chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montreal, H3T 1C5, Canada. Phone: (514)345-4931 # 2990 Fax: (514) 345-4731. [REDACTED] [REDACTED]

ABSTRACT

Allelic losses on chromosome 12p12-13 are associated with childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) and several solid neoplasias, suggesting the presence of a tumor suppressor locus. The recent construction of a transcription map of this locus has enabled the identification of eight genes of which five were previously known: *ETV6*, *BCL-G*, *LRP6*, *MKP-7*, and *CDKN1B*. The three other candidate genes, *LOH12CR1*, *LOH12CR2* and *LOH12CR3*, have no known functions. To evaluate whether one (or more) of the candidate genes is the actual target of the 12p12-13 deletions we examined the genomics and the expression status of these genes in ALL patients. Although we found nine DNA variants in these genes, no inactivating mutations were found in the leukemia cells of patients with 12p hemizygous deletions. Expression analysis revealed that most 12p hemizygously deleted samples also carried a t(12;21) translocation of which none expressed *ETV6* from the non-translocated allele. Furthermore, we observed one case of t(12;21) without deletion of *ETV6*, in which the expression of this gene was greatly reduced indicating a different mechanism of inactivation. None of the other genes showed a significant decrease in expression suggesting that *ETV6* is indeed the target of deletions in ALL patients.

Keywords: Tumor suppressor gene; *ETV6*; leukemia; chromosome 12; gene expression.

INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is the most common pediatric cancer. Recent loss of heterozygosity (LOH) studies indicated that hemizygous deletions of chromosome 12p12-13 occurred in 26 to 47 % of pre-B ALL cases, making it one of the most common genetic alterations found in this disease (1-3). The frequent loss of genetic material in tumor cells is a hallmark for the presence of tumor suppressor genes on the affected chromosome regions. The existence of a putative 12p tumor suppressor gene is further substantiated by the observation of hemizygous deletions of the same region in a variety of other hematological malignancies, as well as in certain solid tumors including breast, lung, ovarian and prostate carcinomas (reviewed in 4). The construction of high-resolution genetic and transcription maps led to the delineation of the shortest commonly deleted region in pre-B ALL patients to a 750 kb interval that includes several transcribed genes (3-7).

One of the genes, *ETV6* (also known as TEL), is a repressor of transcription that was found to be essential for angiogenesis and for bone marrow hematopoiesis (8, 9). *ETV6* is frequently involved in translocations found in different hematological malignancies as well as in congenital fibrosarcoma, most of these leading to the formation of chimeric fusion products (reviewed in 10). The most frequent translocation is the t(12;21) resulting in the production of the *ETV6-AML1* fusion protein in ALL cases (11). The residual non-rearranged *ETV6* allele is frequently deleted in ALL cases expressing the *ETV6-AML1* transcripts (12). The reason for this frequent association is still unclear. It has been proposed that deletion of the normal *ETV6* allele could provide a further growth advantage to leukemic cells with t(12;21).

Six other genes were also characterized in the critical region. *BCL-G* encodes a new pro-apoptotic protein of the BCL-2 family (13). *LRP6* is a member of the lipoprotein receptor gene family and was recently characterized as the Wnt co-receptor, which activates a pathway frequently involved in human cancers (14, 15). *MKP-7* encodes a new dual-specificity phosphatase that acts specifically on

JNK and p38MAPK (16). Finally *LOH12CR1*, *LOH12CR2* and *LOH12CR3* (also known as FLJ10298) are three recently characterized genes whose functions have not yet been determined (7). Although it is located just outside the 12p critical region, the cyclin-dependent kinase inhibitor *CDKN1B* is a suitable candidate since it is hemizygotously deleted in the majority of ALL patients with 12p LOHs, its expression status has been shown to correlate with a poor prognosis in many tumor types and it is considered to be a haploinsufficient tumor suppressor (reviewed in 17).

Previous studies have focused mainly on the mutation status of certain candidate genes in ALL patients and inactivating somatic mutations were not observed in the non-deleted allele of *ETV6*, *CDKN1B* or *LRP6* (6, 18). In this study, we looked at both the mutation and expression status of eight candidate genes residing in or very close to the critical region in childhood ALL patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and cell lines

We studied 55 children who had been diagnosed with pre-B ALL by immunophenotyping in the Division of Hematology-Oncology of Ste-Justine Hospital (Montreal, Canada). The selected patients had bone marrow samples taken at diagnosis (>80% blast cells). Twenty of them were characterized in a previous study (19). Genomic DNA was available for all 55 ALL patients, but RNA was available for only 22 of them. Normal bone marrow samples were obtained from non-leukemia patients. Written informed consent was obtained from all participants in the study approved by our Institutional Review Board. Pre-B ALL cell lines, REH and 697, were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and DSMZ (Braunschweig, Germany), respectively. REH is known to contain the t(12;21) and no normal *ETV6* allele (20); whereas 697 is associated with a t(1;19) but no chromosome 12 alteration.

DNA and RNA extraction

Pretreatment bone marrow aspirates were used as a source of "leukemia" DNA, whereas constitutive DNA was isolated from either buccal epithelial cells or bone marrow in remission. A standard proteinase K/ phenol protocol was used to isolate genomic DNA from bone marrow mononuclear cells obtained by centrifugation on a Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Quebec, Canada) step gradient. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) or RNeasy mini-kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) using manufacturer's instructions.

Microsatellite analysis

Genomic DNA samples were amplified using microsatellite markers located on chromosome 12p12-13: *D12S77*, *D12S89*, *D12S98*, *D12S358* and *D12S320* as described in Baccichet *et al.* (19). Primer pairs were obtained from Research Genetics (Huntsville, AL, USA). Each result was confirmed by independent PCR amplifications.

PCR-SSCP analysis and sequencing

Primer pairs were designed to amplify all coding sequences and intron-exon boundaries of *ETV6* (8 exons), *BCL-G* (5 exons), *LOH12CR3* (4 exons), *LOH12CR2* (2 exons), *LOH12CR1* (5 exons), *MKP-7* (6 exons) and *CDKN1B* (2 exons) (supplemental Table 1). PCR was performed as described in Baccichet *et al.* (19). PCR products were denatured and resolved by electrophoresis on a 6% non-denaturing gel at 500V for 20 h. When variable band patterns were detected by SSCP, indicating the presence of a putative heterozygous sample, the corresponding normal and tumoral non-labelled PCR products were purified using CONCERT rapid PCR purification system (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) and were directly sequenced with the thermosequenase system (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Quebec, Canada), using the manufacturers' protocols.

Real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction.

Reverse transcriptions were performed at 37°C for 50 min in 20µL reactions containing 500 ng of total RNA, 0.5 mM of each dNTPs, 500 ng of pd(T)₁₂₋₁₈ primers (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada), 10 mM of DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 40 U of RNase inhibitor (Roche, Laval, QC, Canada), and 200 U of MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Reactions were stopped by heat inactivation at 70 °C for 15 min. PCR amplifications of the resulting cDNAs were performed on an ABI PRISM 7000 sequence detection system (PE Applied Biosystems inc., Foster City, CA, USA) in a total volume of 25 µL containing: 0.25 ul of the cDNA products; 1X SYBR Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems inc., Foster City, CA, Canada) and 0.2 µM of each amplimer (listed in supplemental Table 2). The ETV6 amplicon detected only transcripts from the untranslocated allele. Each PCR was optimized to ensure that a unique fragment of the expected size (76 to 132 bp) was amplified and that no fragments corresponding to genomic DNA amplification or primer dimers were present. In this regard, amplimers for the targeted genes were designed to include intron-exon boundaries to distinguish products derived from genomic and cDNA templates. Cycling parameters were: 1 cycle at 95 °C for 10 min and 40 cycles at 95 °C for 15 s followed by 1 min at annealing/extension temperature (60°C for every gene, except ETV6 at 62°C). A denaturing curve was always run to control for possible non-specific amplification. PCR performed on reverse transcription negative controls were systematically done to detect any product amplified from templates other than cDNAs. Each PCR was performed in duplicate and each RT-PCR experiment was replicated at least twice. We applied the comparative C_T method (PE Applied Biosystems Inc) to quantify the relative expression levels for each gene compared to the GAPDH control (CT values ranging from 17-19). All C_T values were averaged for each duplicate. A calibrator sample (abundance set to 1X) was run for every gene in every plate and the expression levels based on the ΔC_T values were calculated with the following formula (Applied Biosystems User Bulletin No.2, P/N 4303859 (21):

$$2^{-(\Delta\Delta C_T)} = 2^{-((C_{T_{gene}} - C_{T_{GAPDH}})_{sample} - (C_{T_{gene}} - C_{T_{GAPDH}})_{calibrator})}$$

Negativity for a given gene was assessed by a ΔC_T value of ≥ 15 for a sample and was given a value of 0.

Statistical analysis.

The distribution of expression levels was analyzed on the basis of their median values (high and low expression). Correlations between expression levels of the different candidate genes and clinical as well as molecular parameters were calculated by the one-tailed Fisher's exact test using SPSS software version 11.0

RESULTS

In our previous studies on 20 childhood ALL patients, we identified a 750 kb commonly deleted region in chromosome 12p12-13 delimited by markers *D12S98* and *D12S358* (3, 19). Here, we added 35 new cases of childhood pre-B ALL and identified an additional 9 patients with chromosome 12p12-13 allelic losses using the same panel of polymorphic markers (data not shown). Altogether, we observed the presence of LOH in 31% of ALL patients (17/55), which is in agreement with previous LOH studies on ALL patients (reviewed in 4).

These 17 patients hemizygotously deleted for at least one of the chromosome 12p marker tested were further investigated for the presence of somatic mutations in the residual allele of the candidate genes *ETV6*, *BCL-G*, *MKP-7*, *CDKN1B*, *LOH12CR1*, *LOH12CR2* and *LOH12CR3*. *LRP6* was not investigated since this gene was analysed in detail in leukemia patients, including ALL, known to carry deletions of chromosome 12p markers in another study that failed to detect any inactivating somatic mutations (6). All coding regions and exon-intron junctions of the genes were screened for point mutations by PCR-SSCP (data not shown) followed by direct sequencing. Under optimal conditions ~80-90% of mutations are detectable by this method. In the investigated genes, no leukemia-specific mutations have been identified in these genes, but we found 9 distinct polymorphisms (presence in both constitutive and tumoral DNA) (supplemental Table 3). Only two of these, the G326C and G258A variants, respectively in

CDKN1B and *ETV6*, were known (1, 22, 23). Four of the variants resulted in changes of an amino acid from the predicted coding sequence. None were specifically retained or lost in the hemizygously deleted samples. The newly developed markers were used to genotype ALL cases from which both DNA and RNA samples were available (supplemental Table 4). Based on LOH data acquired with these polymorphic markers, the proximal end of the critical region has been substantially reduced (Fig. 1). The commonly deleted region is now bound at the proximal end by the third exon of *BCL-G*, while the distal end remains delimited by D12S89, located in *ETV6*, a region of approximately 400 kb (Fig. 1).

The absence of somatic mutations might indicate the involvement of other inactivating mechanisms that influence gene expression. To evaluate this possibility we examined mRNA levels of all 8 candidate genes in 22 of the 55 ALL patients from which we had RNA samples from the bone marrow at diagnosis including 8 patients hemizygously deleted for at least one chromosome 12p12-13 marker. This expression analysis was performed by real-time quantitative RT-PCR. For *BCL-G*, *LOH12CR1*, *LOH12CR3* and *MKP-7*, primers were selected to discriminate between the different known isoforms (24). For *BCL-G*, only the long form (*BCL-G_L*) was found expressed under the conditions used, whereas we observed no variation in the ratio of the levels of expression between the other isoforms and thus only the major isoform was analyzed in each case (data not shown). We found measurable amount of all genes in most patients not deleted for chromosome 12p markers (supplemental Table 5). However these genes were not expressed at the same levels: Using the mean ΔC_T values of each gene in non-deleted patients we found that *ETV6* ($\Delta C_T=5.2$) and *CDKN1B* ($\Delta C_T = 5.9$) were highly expressed; *LRP6* ($\Delta C_T = 7.9$), *LOH12CR1* ($\Delta C_T = 9.8$) and *MKP7* ($\Delta C_T=9.1$) were expressed at intermediate level and; *BCL-G_L* ($\Delta C_T=13.1$), *LOH12CR2* ($\Delta C_T = 13.2$) and *LOH12CR3* ($\Delta C_T = 11.5$) were weakly expressed.

The relative expression levels of each gene were then plotted by groups according to the LOH status (Fig. 2). We observed that the median expressions of *CDKN1B*, *ETV6*, *LOH12CR1*, *LOH12CR2*, and *MKP7* were higher in patients not carrying any chromosome 12p deletion (LOH-). The median value of the *BCL-G_L*

expression was 0, but it was clear that its expression level was higher among the LOH- patients (Fig. 2), although not significant. Noteworthy, the expression levels of both LOH12CR3 and LRP6 were less affected by the presence of LOH. The lower expression in the LOH+ samples, as compared to expression levels of patients of LOH- group, could be explained by the loss of one allele (dosage effect). In fact, levels of expression of most of the genes in the samples possessing both the translocation and LOH were either below or just above the arbitrary threshold of 100 (supplemental Table 5). But, when we only considered the complete absence of expression of a given gene, as defined by less than 10% of the median expression, then only *ETV6* and *BCL-G* showed a clear association with either the presence of LOH or t(12;21).

The correlation between the lower expression of the genes, as defined by expression level in the first tertile (33rd percentile) in patients, and various clinical and molecular parameters, such as age at diagnosis, sex, white blood cell counts, high or standard risk of relapse, DNA index, presence of LOH and presence of the t(12;21) translocation was investigated (Table 1). The strongest correlation was found between low expression of both *ETV6* and *CDKN1B* and presence of LOH and t(12;21) (Table 1). Similar significant associations were observed with *MKP-7* and *LOH12CR1* and presence of LOH only. All other correlations were not significant.

As one could expect, patients carrying a LOH and the t(12;21) translocation show very low and homogeneous levels of *ETV6* expression, but patients with either a deletion or the translocation do not always present such an expected pattern of expression. For instance, patient ALL413 carries the t(12;21) translocation but not any LOH. This patient shows a very low expression of *ETV6*, lower than the expected 50 % expression level of LOH-, t(12;21)- patient group (supplemental Table 5). This suggests that other mechanisms than a deletion of the residual allele can contribute to the inactivation of *ETV6* when the translocation is present. Another patient, ALL34, carries a deletion ranging from *D12S89* to *BCL-G* but not the t(12;21) translocation. Interestingly, this patient presents a much higher expression of *ETV6* than the expected 50%.

DISCUSSION

The construction of a transcription map of the putative 12p12-13 leukemia suppressor locus delimited by the markers *D12S89* and *D12S358* led to the identification of 10 candidate genes (7). In this paper, to identify the actual leukemia-associated gene, all coding exons of 8 candidate genes mapping to the leukemia suppressor locus have been screened for inactivating point mutations in genomic DNA of ALL cases. We failed to detect any somatic alterations in the gene exon or exon-intron junction sequences in the childhood ALL cases investigated, indicating that these genes are not affected by a mechanism involving loss of one allele and mutation of the residual allele. Although we have not detected somatic mutations in the candidate genes investigated, we cannot rule out the possibility that existing nucleotide changes have not been detected due to the limitation of the PCR-SSCP assay. If the two-allele inactivation hypothesis for a tumor suppressor holds true and that no mutation alters the coding sequence, then expression of the target gene should be abolished or greatly diminished. We thus assessed the expression status of these genes to verify whether alterations such as promoter, intronic or UTR mutations or epigenetic changes might account for aberrant expression. Only *ETV6* showed absence of expression in a statistically significant proportion of the patients with LOH or with t(12;21). Indeed all eight t(12;21) samples which had a corresponding LOH on the non-translocated allele, did not express *ETV6*. Moreover, in these patients, the expression of most of the other genes present in the hemizyously deleted region was reduced by about 50%, which is concordant with the presence of only one residual active copy of the gene. However, this relationship was less obvious for *LRP6* and *LOH12CR3*. Although not statistically significant, the proportion of patients not expressing *BCL-G_L* was lower in LOH+ group LOH- than in the non-deleted group, suggesting that this gene could also be a tumor suppressor gene. This observation will need further investigation. Although no leukemia-specific alterations have been found in the sequences analysed, it remains possible that haploinsufficiency (gene dosage) (25) of one (or more) transcript(s) on 12p12-13 may contribute to ALL development. As recently reported, this could be the case for *MKP7* that showed

tumor suppressing potential (26). In addition, AML1 and CDKN1B genes have been found to be haploinsufficient for tumor suppression (27, 28). Noteworthy, in one ALL sample carrying the translocation t(12;21) but no detectable *ETV6* deletion, levels of expression of *ETV6* were much lower than expected when only one allele was missing thus indicating the involvement of another inactivating mechanism. The latter observation was also reported by Patel *et al.* (29). The absence of *ETV6* in this case could also be explained by an undetected micro-deletion. These data are concordant with the low levels of normal *ETV6* protein observed in t(12;21) samples (30) suggesting that the absence of protein is mainly due to the lack of transcription rather than post-transcriptional alterations. This is also consistent with earlier studies suggesting that the *ETV6* gene is translocated in most cases of childhood ALL with 12p12-13 LOH (11, 12, 31). Thus loss of the normal non-translocated *ETV6* allele occurs in parallel (or after) with the translocation of the other allele to form the *ETV6*-AML1 fusion, suggesting a role for *ETV6* as a tumor suppressor.

Deletions of the 12p12-13 locus have been observed in some ALL patients without t(12;21) (12, this study) as well as in many other cancer types, including breast, lung and prostate lacking the t(12;21) (4). This could suggest a wider role of *ETV6* in tumorigenesis or the presence of more than one 12p tumor suppressor genes. In this regard, using the new polymorphic markers We were able to minimize the common deleted region to a 400 kb interval delimited by *D12S89* and the third exon of *BCL-G*. The only known genes present in this interval are *ETV6* and *BCL-G*. Furthermore, Latil *et al.* (32) reported a decreased expression of *ETV6* in a significant proportion of the prostate cancer samples with 12p12-13 LOH.

Taken together these data suggest that the intact allele of *ETV6* is indeed the target of deletions in the t(12;21) translocated patients and thus explains most of the LOH observed in pre-B ALL. The actual hypothesis about leukemogenesis in cases carrying 12p genetic abnormalities is that the first event is the translocation, probably occurring as early as *in utero* (33, 34). However, *ETV6*-AML1 was shown not to be sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines *in vitro* or to cause hematological disease *in vivo* (35). Loss of the second allele is thus

probably a secondary event giving a selective growth advantage to the t(12;21) cells expressing ETV6-AML1. However, it is not clear whether or not it is enough to cause leukemia (36). For instance, we do not know whether the loss of the intact *ETV6* allele is essential because it segregates ETV6-AML1 by heterodimerization or because the inhibition of the ETV6 pathway is important. Functional studies will be needed to prove that ETV6 indeed acts as a tumour suppressor in these ALL samples.

Supplementary information

Supplementary material is available on leukemia website (www.nature.com/leu)

REFERENCES

1. Stegmaier K, Pendse S, Barker GF, Bray-Ward P, Ward DC, Montgomery KT, Krauter KS, Reynolds C, Sklar J, Donnelly M, . Frequent loss of heterozygosity at the TEL gene locus in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 1995;**86**:38-44.
2. Takeuchi S, Bartram CR, Miller CW, Reiter A, Seriu T, Zimmerann M, Schrappe M, Mori N, Slater J, Miyoshi I, Koeffler HP. Acute lymphoblastic leukemia of childhood: identification of two distinct regions of deletion on the short arm of chromosome 12 in the region of TEL and KIP1. *Blood* 1996;**87**:3368-3374.
3. Baccichet A, Sinnett D. Frequent deletion of chromosome 12p12.3 in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1997;**99**:107-14.
4. Aissani B, Bonan C, Baccichet A, Sinnett D. Childhood acute lymphoblastic leukemia: is there a tumor suppressor gene in chromosome 12p12.3? *Leuk Lymphoma* 1999;**34**:231-9.
5. Aissani B, Sinnett D. Fine physical and transcript mapping of a 1.8 Mb region spanning the locus for childhood acute lymphoblastic leukemia on chromosome 12p12.3. *Gene* 1999;**240**:297-305.
6. Baens M, Wlodarska I, Corveleyn A, Hoornaert I, Hagemeijer A, Marynen P. A physical, transcript, and deletion map of chromosome region 12p12.3 flanked by ETV6 and CDKN1B: hypermethylation of the LRP6 CpG island in two leukemia patients with hemizygous del(12p). *Genomics* 1999;**56**:40-50.
7. Montpetit A, Boily G, Sinnett D. A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus. *Eur.J.Hum.Genet.* 2002;**10**:62-71.
8. Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *Embo J* 1997;**16**:4374-83.
9. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, Alt FW, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 1998;**12**:2392-402.
10. Rubnitz JE, Pui CH, Downing JR. The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. *Leukemia* 1999;**13**:6-13.
11. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML, Chan GC, Pui CH, Grosveld G, Downing JR. TEL/AML1 fusion resulting from a

cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 1995;**9**:1985-9.

12. Cave H, Cacheux V, Raynaud S, Brunie G, Bakkus M, Cochaux P, Preudhomme C, Lai JL, Vilmer E, Grandchamp B. ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1997;**11**:1459-64.

13. Guo B, Godzik A, Reed JC. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 2001;**276**:2780-2785.

14. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 2000;**407**:530-5.

15. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S. Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 2000;**407**:527-30.

16. Tanoue T, Yamamoto T, Maeda R, Nishida E. A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *J Biol Chem* 2001;**276**:26629-26639.

17. Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res* 2001;**264**:148-68.

18. Stegmaier K, Takeuchi S, Golub TR, Bohlander SK, Bartram CR, Koeffler HP. Mutational analysis of the candidate tumor suppressor genes TEL and KIP1 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1996;**56**:1413-7.

19. Baccichet A, Qualman SK, Sinnett D. Allelic loss in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 1997;**21**:817-23.

20. Romana SP, Le Coniat M, Poirel H, Marynen P, Bernard O, Berger R. Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21). *Leukemia* 1996;**10**:167-70.

21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 2001;**25**:402-8.

22. Pietsenpol JA, Bohlander SK, Sato Y, Papadopoulos N, Liu B, Friedman C, Trask BJ, Roberts JM, Kinzler KW, Rowley JD, et al. Assignment of the human

- p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res* 1995;**55**:1206-10.
23. Kibel AS, Faith DA, Bova GS, Isaacs WB. Mutational analysis of ETV6 in prostate carcinoma. *Prostate* 2002;**52**:305-10.
24. Montpetit A, Boily G, Sinnott D. A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus. *Eur J Hum Genet* 2002;**10**:62-71.
25. Fodde R, Smits R. Cancer biology. A matter of dosage. *Science* 2002;**298**:761-3.
26. Hoornaert I, Marynen P, Goris J, Sciot R, Baens M. MAPK phosphatase DUSP16/MKP-7, a candidate tumor suppressor for chromosome region 12p12-13, reduces BCR-ABL-induced transformation. *Oncogene* 2003;**22**:7728-36.
27. Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 1998;**396**:177-80.
28. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM, Gilliland DG. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999;**23**:166-75.
29. Patel N, Goff LK, Clark T, Ford AM, Foot N, Lillington D, Hing S, Pritchard-Jones K, Jones LK, Saha V. Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia. *Br J Haematol* 2003;**122**:94-8.
30. Poirel H, Lacronique V, Mauchauffe M, Le Coniat M, Raffoux E, Daniel MT, Erickson P, Drabkin H, MacLeod RA, Drexler HG, Ghysdael J, Berger R, Bernard OA. Analysis of TEL proteins in human leukemias. *Oncogene* 1998;**16**:2895-903.
31. Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, Chumakov I, Le Paslier D, Berger R, Bernard OA. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 1995;**85**:3662-70.
32. Latil A, Guerard M, Berthon P, Cussenot O. 12p12-13 deletion in prostate tumors and quantitative expression of CDKN1B and ETV6 candidate genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;**31**:199-200.

33. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:4584-8.
34. Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood* 1999;**94**:1057-62.
35. Andreasson P, Schwaller J, Anastasiadou E, Aster J, Gilliland DG. The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;**130**:93-104.
36. Pine SR, Wiemels JL, Jayabose S, Sandoval C. TEL-AML1 fusion precedes differentiation to pre-B cells in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2003;**27**:155-64.

Table 1 Correlation of gene expression levels with clinical and molecular parameters in pre-B ALL patients

Parameters	Total No. of patients	No. of ALL patients with low expression levels (first tertile)							
		ETV6 No. (%)	LRP6 No. (%)	LOH12CR1 No. (%)	LOH12CR2 No. (%)	LOH12CR3 No. (%)	MKP7 No. (%)	CDKN1B No. (%)	
Age									
<1 yr, >10 yr	3	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	1 (33)	1 (33)	0 (0)	0 (0)
>1 yr, <10 yr	19	7 (37)	6 (32)	7 (37)	7 (37)	6 (32)	6 (32)	7 (37)	7 (37)
Sex									
M	12	5 (42)	3 (25)	5 (42)	3 (25)	4 (33)	6 (50)	5 (42)	5 (42)
F	10	2 (20)	4 (40)	2 (20)	4 (40)	3 (30)	1 (10)	2 (20)	2 (20)
WBC (cells/ml)									
>50X10 ⁹	6	4 (67)	1 (17)	3 (50)	3 (50)	2 (33)	3 (50)	3 (50)	3 (50)
<50X10 ⁹	16	3 (19)	6 (38)	4 (25)	4 (25)	5 (31)	4 (25)	4 (25)	4 (25)
Risk group									
High	11	5 (45)	3 (27)	4 (36)	4 (36)	5 (45)	4 (36)	4 (36)	4 (36)
Standard	11	2 (18)	4 (36)	3 (27)	3 (27)	2 (18)	3 (27)	3 (27)	3 (27)
DNA index									
>1	4	0 (0)	1 (25)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	0 (0)	1 (25)	1 (25)
1	18	7 (39)	6 (33)	5 (28)	5 (28)	5 (28)	7 (39)	6 (33)	6 (33)
-	14	0 (0) ^c	4 (29)	2 (14) ^a	4 (29)	4 (29)	1 (7) ^b	2 (14) ^a	2 (14) ^a
LOH									
+	8	7 (88)	3 (38)	5 (63)	3 (38)	3 (38)	6 (75)	5 (63)	5 (63)
-	13	0 (0) ^c	5 (38)	2 (15)	3 (23)	5 (38)	2 (15)	1 (8) ^b	1 (8) ^b
t(12;21)									
+	9	7 (78)	2 (22)	5 (56)	4 (44)	2 (22)	5 (56)	6 (67)	6 (67)

These associations were calculated by the one-tailed Fisher's exact test using the SPSS software version 11.0.

^a: p<0.05 ; ^b: p<0.01 ; ^c: p<0.001.

Supplementary materials

Table 1 Amplimers used for the PCR-SSCP mutation screening

Gene-exon	Forward	Reverse	Product Size (bp)
ETV6-1	TCTTAAATGACCGCGTCTGG	GAACAGAGCAACTGCAACAGC	243
ETV6-2	CACCCCGAGATGGTCTCATAAC	ATCAATCCTCTGTCCCTCTCG	250
ETV6-3	TCTCTTTCTTTCTGCCTCATGC	GGGTGTTAAAGACCAACCAC	271
ETV6-4	CTGCTCCGTAGATCGTTGTTG	TCAGGCAAGAAAAGAGAAACCTC	236
ETV6-5a	GTCTTTCCCTCTGCTCCACAG	GATCAGAGGGTGCATGATGG	392
ETV6-5b	TCCCATGGAGAATAACTACTGC	GGAGAGTGGGACTTTGTGTCAGG	357
ETV6-6	TGGTTAGTGCCTCAACAAGAAAC	CCAATCCAGGGATAAGGACTTC	269
ETV6-7	GCAGTGCCTTTTCTGAGGTTT	ACAGCATCCTCCAAAAGAAG	219
ETV6-8	TGGAATCTCTTACCTCCTCCAC	TCCTTTTCCACTCTCCTCAGC	248
Bcl-G-2	GGCACAGTGTGGACTTTGTTGT	AGGAAGCGGGAGAGAAAAGAAAT	502
Bcl-G-3	ACCAATGAGCCAGATGAAGTTCT	AAACTCCACCCAGGGAAG	264
Bcl-G-4	CTTACCAAGCCACAAGCATTTCAT	CAGAAATCAATCGCATCAGTTCA	199
Bcl-G-5	TCGTGGAGCCAAGCTACTGT	TGGCCACTCAAGTGTCTTAA	446
Bcl-G-6	GGTCACGCCTGGGATAGAG	ACGTGCACAGGACCACAGTA	189
LOH12CR3-2,3	TGTTTCTTCCCTTGTTTGTAAAGA	CACAAAACACATGGAACAAAGGA	430
LOH12CR3-4	CCAGTCTTAAATTATTCCAATCACA	AAAATCGCATTTCAAAATCATGC	237
LOH12CR3-5a	TTTTCAGGCAGCAGATGAGCTA	GCATGGAGTTACATAAGCCTTCC	347
LOH12CR3-5b	TGCATTTGGGCTTCTGGTTACTA	GGACTCGAAAGGCAGCTTAGAA	416
LOH12CR3-5c	CCCTGTGTTCAAAGTTAGGTTGG	AAGGCCATTCTCAGAGTTCACAA	398
LOH12CR2	CTGCTTTCACCGTCTTCTGGTATTT	CCGCTTTCACTCACTGGTTCAC	465
LOH12CR1-1	GTCAGCCCCACACATTAGCC	GGAGGAGGGTGGGAGGTTA	231
LOH12CR1-2	TGCCTAATATGCATCTCCTAAGCA	AAACGTCTCCAGCAAGTTCAGAT	231
LOH12CR1-3	CCCTGTCTTCAGTGAAGTTGTTAAA	AGAATCACAACAACCAGTCAGCA	295
LOH12CR1-4	CTGCGGAGAGGACTTGATTTAAA	TGATATGACCTTAGCTCCACACG	363
MKP7-1	TTCCTCATTTCAGTGTGTCCATTT	TTTGAGCACACCACCATTACATC	354
MKP7-2	GCTCAGCAAGATTCTGAGTCCCTTT	CCTTCTTCCTAACAAGCCTCATGT	219
MKP7-3	AAACCCAGCAATGAAGGATATTTT	ATTTTGTGCGTGGCATAATTTTT	249
MKP7-4	CACCTACACATGAGACGATCACC	TTCAAGGAAACTGGGCATTTTTA	323
MKP7-5	TGAAAAGCCAATCACAGAAGACA	TGAAAACAAGATTTCACTGCTGA	229
MKP7-6a1	GTGGAGATAAAAAGGGACCTCTGG	AGGCTGGAAGACAGCAATAAGC	343
MKP7-6a2	ATCCAGAGAGAAGGAACGCTTG	TGAAAATTCGGGTTTTTGTTTTT	432
MKP7-6b1	GATCCACCTGTTGCTTTTACACC	TGCGGAGACCAAGTCTATTCTG	372
MKP7-6b2	GTCAGCTCTGTCACTTGGCTTC	ATTGCATTGGTTCAGAACCAG	376
CDKN1B-1a	ATCCTGGCTCTCCT	ACATCTTCTCCCG	334
CDKN1B-1b	ATTCTATGGTTGGGAAAGGGT	CACCTCTTGCCACTCGTACT	285
CDKN1B-2	TCCAGTGCCTGCTCCTTTAG	TATGGGGCCAACCTTCTGC	241

Supplementary materials

Table 2 Amplimers used for real-time PCR analysis.

Gene	Forward primer		Reverse primer		Exon
	Sequence	Exon	Sequence	Exon	
ETV6	TGAACCAACATCATGGTCTCTG	5	CGTAATCCCAAGCAGTCTACA	6	
BCL-G _L	ATCAGTTGGAAAGAAAGCTGAAGA	4-5	TCCACACCCATTAGGACCTG	5	
BCL-G _s	GGAGATCAGTTGGAAAGAAAGG	4-5	GTGGAAAACCCCTGGATGCT	5	
LRP6	GCATTGGAAAGCACAAGAAG	19	CTGTGGTGTGGTCTTTCAG	20	
LOH12CR1	GCAAGAGATTCCAACCTTCC	2	CAACACCTGCTGAGAGTCCA	3	
LOH12CR2	TGCGGAAGAGGATGGAGAA	1-2 ^a	GGTCGTCCACTGCTAAACTCC	2 ^a	
LOH12CR3	AGAGGCAATGAGCCCCTAT	3	GGGTGGTCTAGCTGTTTTTCG	4	
MKP7	CAGCGAGATGTCCCTCAACAA	4	AGGCTTTGGACAGGTATTGC	5	
CDKN1B	AATAAGGAAAGCGACCTGCAA	1	GGGGAACCCGCTGAAACATT	2	
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	7	GGCATGGACTGTGGTTCATGAG	8-7	

a: relative to the known exons described in Montpetit et al., 2002.

Supplementary materials

Table 3 Germline polymorphisms detected in the candidate genes

Gene	Polymorphism^a	Amino acid change
<i>ETV6</i>	G258A	none
	G642A	none
<i>BCL-G</i>	C486T	none
	T697C	none
	A874T	Arg → Trp
<i>LOH12CR3</i>	T542C	Leu → Val
<i>LOH12CR2</i>	G149A	Glu → Lys
<i>MKP-7</i>	C1419T	none
<i>CDKN1B</i>	G326C	Gly → Val

^a The number indicates the position from the start codon. All DNA variants were present in both the leukemic and constitutive cells of each patient tested.

Supplementary materials

Table 4 Summary of chromosome 12p12-13 LOH analysis in 17 hemizigously deleted ALL cases

Markers	Patient ID																
	3	5	6	8	15	24	26	27	400	392	375	34	401	410	416	420	423
D12S77	+	LOH	ni	LOH	+	+	ni	LOH	+	+	+	+	ni	LOH	+	LOH	LOH
D12S89	LOH	LOH	LOH	LOH	ni	+	ni	LOH	ni	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	ni	LOH	LOH
D12S98	LOH	ni	ni	LOH	ni	ni	ni	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	ni	ni	LOH	LOH	ni
BCLG-3	ni	ni	+	LOH	LOH	ni	ni	LOH	LOH	ni	+	ni	LOH	ni	ni	LOH	ni
BCLG-5	LOH	ni	+	LOH	ni	ni	ni	LOH	LOH	ni	+	+	ni	LOH	+	ni	ni
LOH12CR2	ni	ni	+	ni	LOH	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni	ni
MKP7-6	ni	ni	ni	ni	ni	LOH	ni	ni	ni	LOH	ni	ni	ni	LOH	ni	ni	LOH
D12S358	LOH	LOH	ni	+	LOH	ni	ni	LOH	LOH	ni	ni	+	ni	ni	+	ni	LOH
CDKN1B-1	ni	ni	ni	ni	ni	LOH	ni	LOH	ni	LOH	ni	ni	ni	ni	+	LOH	ni
D12S320	LOH	+	+	ni	+	+	LOH	LOH	ni	LOH	+	+	LOH	LOH	+	LOH	ni

D12S77, D12S89, D12S98, D12S358 and D12S320 are the microsatellite markers used previously (3). ni, not informative; +: heterozygote; LOH: loss-of-heterozygosity.

Supplementary materials

Table 5 Relative expression levels of candidate genes in the chromosome 12p12-13 tumor suppressor locus in pre-B ALL patients as determined by real-time quantitative RT-PCR

Sample	LOH	t(12;21)	ETV6	BCL-G _L	LRP6	LOH12CR1	LOH12CR2	LOH12CR3	MKP7	CDKN1B
83	-	-	82.35	0	81.46	74.64	72.82	201.55	87.52	88.35
362	-	-	104.87	0	100.88	95.03	185.24	145.64	103.10	81.20
365	-	-	90.34	0	99.12	111.45	102.63	75.03	289.29	165.92
381	-	-	91.70	0	93.98	72.64	49.65	30.59	96.90	108.14
384	-	-	395.29	28	232.96	136.20	235.37	116.45	58.92	117.49
387	-	-	105.18	231	63.67	132.25	132.62	47.29	93.47	93.53
388	-	-	85.17	20	116.31	60.85	75.93	46.77	114.19	97.91
389	-	-	152.89	103	169.28	198.71	127.21	94.91	283.74	234.21
390	-	-	59.19	0	74.14	50.02	51.31	105.09	141.40	102.09
391	-	-	133.31	0	106.44	44.17	0	13.28	84.51	64.71
396	-	-	168.15	100	257.48	104.97	100.92	336.51	243.30	203.11
397	-	-	95.13	0	0.89	134.09	99.08	253.99	96.19	94.25
411	-	+	67.59	24	205.54	83.26	221.73	180.71	90.37	75.64
413	-	+	22.63	0	93.81	309.44	59.44	147.13	85.97	58.57
34	+	-	190.37	149	72.77	82.73	83.64	10.93	21.98	83.77
375	+	+	4.00	0	161.28	99.84	178.55	232.54	167.80	80.32
392	+	+	2.25	0	79.42	46.74	68.20	73.19	55.04	76.51
400	+	+	1.71	0	88.56	32.79	32.65	18.33	45.66	30.55
401	+	+	10.72	0	88.58	62.45	64.21	226.08	76.12	55.14
410	+	+	1.41	0	48.79	19.97	38.13	33.80	24.09	29.08
416	+	+	5.77	0	102.53	56.39	65.96	93.90	85.69	65.57
420	+	+	1.56	0	95.54	42.46	39.51	75.73	47.54	48.99
REH	ND	+	0	0	68.90	42.91	31.58	22.53	89.12	19.61
697	ND	-	38.68	0	84.51	44.23	36.21	0	69.00	22.91
BM	ND	ND	35.81	0	2.00	83.55	112.38	610.40	147.82	34.12

Number 34 to 420 corresponds to patient samples. REH and 697 are pre-B ALL cell lines. BM.: non-leukemic bone marrow. Expression levels determined by real-time quantitative RT-PCR: mean values from at least two experiments were scaled relative to the arbitrary value of 100 being the median expression of patient group negative for LOH. Because the median expression of BCL-G_L is 0, expression values of this gene were scaled to an arbitrary value of 100 being the median expression of all the samples showing an expression. LOH: loss of heterozygosity at 12p12-13 locus (see supplemental table 4).

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Physical map of chromosome 12p12-13 tumor suppressor locus. Genes are indicated in bold. Arrows indicate the orientation of transcription. Polymorphic markers are indicated in italics. SRO, shortest region of overlapping deletion. Tel, telomere; cen, centromere.

Figure 2. Comparison of the candidate gene expression levels in pre-B ALL patients according to the chromosome 12p12-13 LOH status. A box plot was built for the relative expression levels of each gene as determined by real-time quantitative RT-PCR (see supplemental Table 5). Data were plotted by groups according to their LOH status using the SPSS software version 11.0. The horizontal line in the boxes represents the 50th (median), whereas the upper and lower limits of the boxes represent 75th and 25th percentiles, respectively. The upper and lower vertical lines outside the box represent the range of the measurements in the group lying within a distance of 1.5 times the interquartile distance (IQD) (box height) from the boundaries of the boxes. Values with expression distance between 1.5 to 3 times IQD higher or lower than the boxes (statistical outliers) are shown by empty squares and values with expression distance over 3 times IQD are indicated by filled squares. Number of samples per groups: LOH-: N=14; LOH+: N=8; t(12;21)+: N=13; t(12;21)-: N=9. LOH: loss of heterozygosity at locus 12p12-13. Overall, the LOH- group had higher expression of the candidate genes than the LOH+ one.

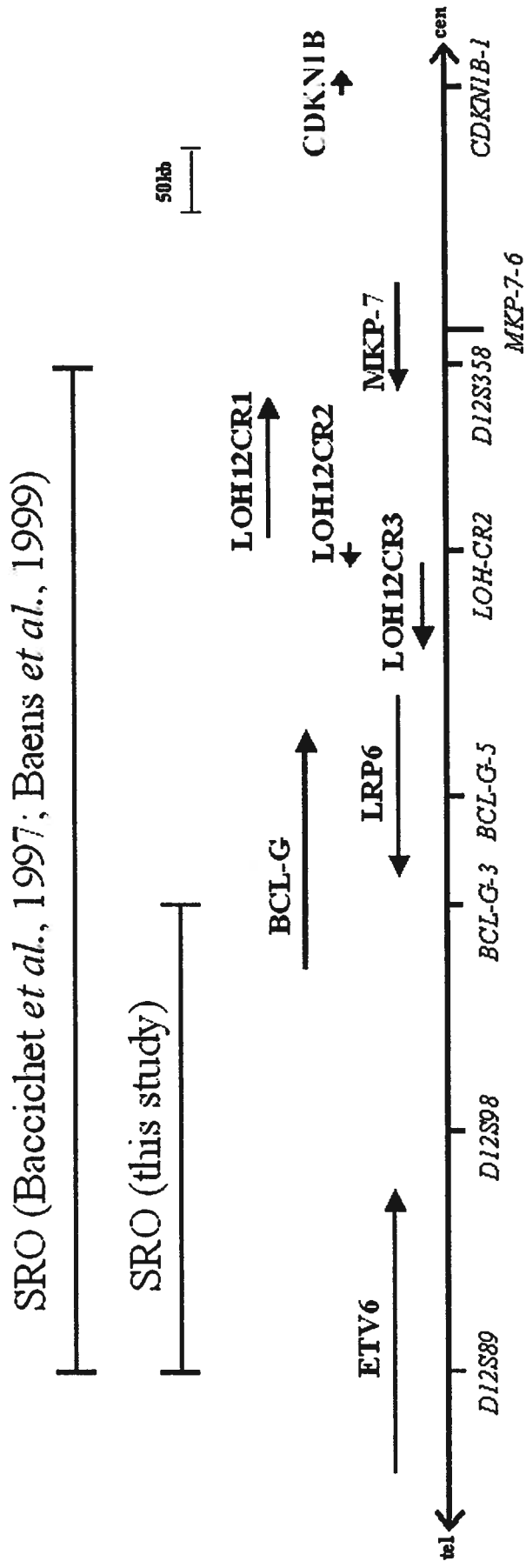


Figure 1

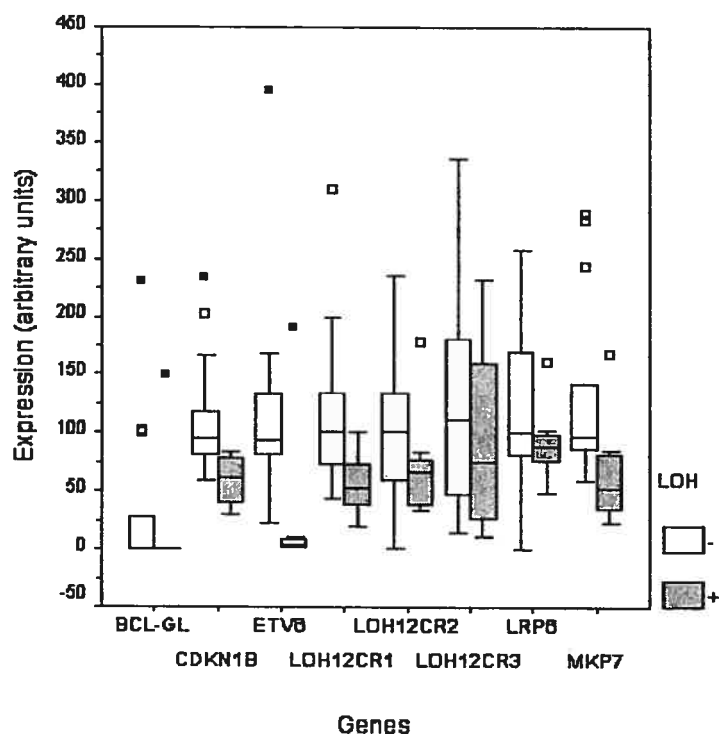


Figure 2

2.3 ETV6 inhibe la croissance de la lignée cellulaire de LLA pré-B Reh

Afin de déterminer si ETV6 a le pouvoir d'inhiber la croissance des cellules de LLA pré-B, nous avons créé des transfectants stables à partir d'une lignée cellulaire qui est dérivée d'un patient LLA pré-B qui n'exprime pas ETV6, qui présente la translocation t(12;21) et qui exprime la protéine de fusion ETV6-AML1 (figure 13A). Cette lignée présente donc des caractéristiques génétiques et phénotypiques relativement proches du type de leucémie d'intérêt. À partir de la population cellulaire hétérogène de transfectants, nous avons tenté de générer des clones par une méthode de dilution limite qui consistait à distribuer dans des puits de plaques 96-puits un petit volume d'une suspension cellulaire de faible densité. Les puits ne contenant qu'une cellule étaient ensuite identifiés et du milieu RPMI 1640 contenant 10, 15 ou 20 % de sérum fœtal de bovin (FBS) était ajouté. Parmi les quelques plaquesensemencées, la très grande majorité des cellules ne se sont jamais divisées. Certaines cellules se sont divisées jusqu'à atteindre un nombre total de quelques dizaines de cellules, après quoi leur croissance s'arrêtait. Parmi toutes les cellules isolées, seulement 11 clones stables ont pu être récupérés et seulement 2 clones exprimaient la protéine ETV6 (figure 13B) et ce, relativement faiblement, suggérant que l'expression de ETV6 présente un désavantage de croissance. La croissance des clones ETV6-15 et ETV6-21 a été comparée à celle de cellules transfectées avec le vecteur seul ou non-transfectées. La croissance des clones exprimant ETV6 était plus lente que celle des contrôles, suggérant que ETV6 a un effet suppresseur de tumeur dans les cellules LLA de type pré-B (figure 13C). Les cellules contrôles ont atteint la phase plateau à environ 124 h alors que les clones exprimant ETV6 ont atteint cette phase seulement au compte de 144 h, heure à laquelle la densité de tous les sous-types cellulaires était comparable. Bien que nous n'ayons pas documenté le nombre de cellules mortes au cours de ces expériences, l'observation sous microscope des cellules avec bleu trypan nous a permis de constater que celles-ci constituaient une proportion très faible de toutes les cellules et il ne semblait pas y avoir de différence évidente entre les sous-types cellulaires. Ceci suggère que les différences de densité cellulaires

observées sont vraisemblablement dues à un taux de croissance plus faible des transfectants ETV6 plutôt qu'à une mort cellulaire plus élevée.

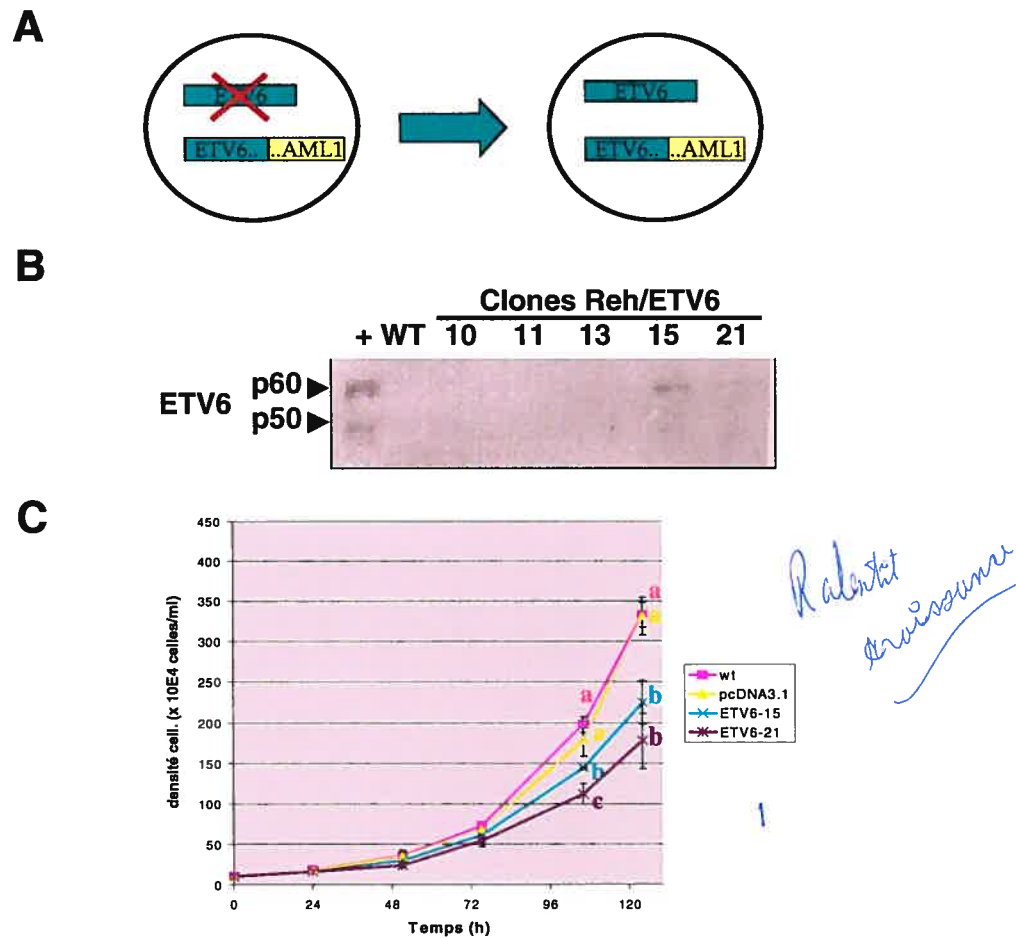


Figure 13. ETV6 ralentit la croissance de la lignée de LLA pré-B Reh.

A) La lignée de LLA pré-B Reh a été transfectée par électroporation de façon stable avec une construction contenant le vecteur pcDNA3.1 et l'ADNc complet de ETV6. B) Immunobuvardage de type Western utilisant un anticorps reconnaissant la partie N-terminale de ETV6 (anticorps provenant du laboratoire du Dr Olivier Bernard). Sur les 11 clones isolés, seulement 2 exprimaient la protéine ETV6 à un niveau détectable, soit les clones 15 et 21. + : contrôle positif lignée 697. C) Courbe de croissance des clones ETV6-15 et -21 comparée à celle des cellules non-transfectées (wt) ou transfectées avec le vecteur seul (pcDNA3.1). Les cellules vivantes ont été comptées quotidiennement pendant 5 jours avec un hémocytomètre en utilisant du bleu trypan. Le graphique présente les résultats de trois expériences indépendantes. Une analyse de variance (ANOVA) et le test post-hoc LSD ont été effectués pour les heures 106 et 124 afin de déterminer s'il y a une différence significative de la densité entre les sous-types cellulaires. Les points significativement différents ($p < 0,05$) présentent des lettres différentes.

2.4 Identification de gènes modulés par ETV6

Introduction à l'article

Des évidences génétiques et fonctionnelles (voir sections 2.1, 2.2 et 2.3) suggèrent que ETV6 possède une activité suppresseur de tumeur. ETV6 est un facteur de transcription de la famille ETS et peu de cibles lui sont connues. Dans le but de comprendre son rôle et l'effet de son inactivation dans les leucémies, nous avons entrepris d'identifier des gènes modulés lors de l'induction de son expression. Nous avons généré des clones de lignée cellulaire inductibles pour ETV6 avec le système Tet-On. Le transcriptome des cellules a été établi (> 22 000 transcrits) à différents temps suite à l'induction de ETV6 et, à l'aide d'une combinaison d'analyses statistiques, nous avons identifié 87 gènes modulés dans le temps. La modulation de 10/13 gènes a ensuite été validée par RT-PCR quantitatif. Des études de retard sur gel (EMSA) effectuées dans différentes régions des promoteurs des 10 gènes validés, ont permis d'identifier des régions liant des protéines nucléaires de façon dépendante à des éléments cis ETS. Finalement, une étude d'expression dans des leucémies de patients a montré que l'expression de 5 des 10 gènes validés était corrélée avec celle d'ETV6, validant notre approche par « microarrays » et identifiant des gènes potentiellement impliqués d'un point de vue fonctionnel dans la maladie. Des études d'association entre l'expression des gènes validés et certains paramètres cliniques et moléculaires ont également été effectuées. J'ai tenu un rôle de premier plan dans toutes les étapes de la démarche, de la génération de clones cellulaires inductibles à l'étude d'expression chez les patients, en passant par les expériences de « microarrays », les analyses statistiques, ainsi que les expériences de retard sur gel. J'ai également écrit le manuscrit. J. Larose a participé principalement à l'identification de clones cellulaires inductibles ainsi qu'aux expériences d'induction dans le temps. S. Langlois a pour sa part participé à l'étude d'expression chez les patients et a apporté une contribution intellectuelle dans les processus d'analyse. D. Sinnett a participé à la conception de l'étude, a supervisé le projet et a participé à la rédaction du manuscrit. Le manuscrit a été soumis à la revue « Blood ».

ABSTRACT

Hemizygous deletions at chromosome 12p12-13 are observed in 26 to 47% of childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) cases, suggesting the presence of a tumour suppressor gene (TSG) at this locus. Accumulating genetic and functional evidence points to ETV6 as being the most probable TSG targeted by the deletions. ETV6 is a ubiquitously expressed transcription factor (TF) of the ETS family with very few known targets. In order to understand its function and to elucidate the impact of its absence in leukemia, we conducted a study to identify targeted genes. Following the induction of ETV6 expression in a Tet-On system, global expression was evaluated at different time points (0h, 4h, 12h and 48h) using DNA microarrays (Affymetrix HG-U133A). A combination of statistical analyses led to the identification of 87 modulated genes of which 10 were validated by real-time quantitative RT-PCR. The regulatory regions of these candidate genes were further investigated for the presence of putative ETS or other transcription factor binding sites. The proximal promoter sequences of AKR1C3, IL18, LUM, PTGER4, PTGS2, TP53 and VEGF were found to bind nuclear proteins in an ETS site-dependent manner. To assess the significance of the validated candidate genes in leukemia, we determined their expression patterns as well as that of ETV6 in up to 15 pre-B ALL patients. The expression of IL18, LUM, PTGER4, SPHK1 and TP53 was significantly correlated with that of ETV6, further suggesting that ETV6 could regulate the expression of these genes in leukemia. This work constitutes another step towards the understanding of the functions of ETV6 and the impact of its inactivation in childhood leukemia.

INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent cancer in children accounting for 25 % of the new cancer cases every year in Western countries. Deletions at chromosome locus 12p12-13 are observed in 26 to 47 % of pre-B ALL, suggesting the presence of a tumour suppressor gene (TSG) in the region (Stegmaier, K et al. 1995; Takeuchi, S et al. 1996; Baccichet, A and Sinnett, D 1997). The existence of a 12p12-13 tumor suppressor locus is further substantiated by the observation of hemizygous deletions of the same region in a variety of other haematological malignancies, as well as in solid tumours including breast, lung, ovarian and prostate carcinomas (reviewed in (Aissani, B et al. 1999; Kibel, AS et al. 1999). The construction of high-resolution genetic and physical maps led to the delineation of the shortest commonly deleted region in pre-B ALL patients to a 750 kb interval flanked by markers *D12S89* and *D12S358* (Baccichet, A and Sinnett, D 1997; Aissani, B and Sinnett, D 1999; Baens, M et al. 1999; Montpetit, A et al. 2002) and including 7 genes (Baens, M et al. 1999; Guo, B et al. 2001; Masuda, K et al. 2001; Tanoue, T et al. 2001; Montpetit, A et al. 2002). All mutational analyses performed on leukemia samples failed to reveal somatic mutations on the residual non-deleted allele of the genes located in the critical region (Stegmaier, K et al. 1996; Baens, M et al. 1999; Montpetit, A et al. 2004). We have recently performed an RNA expression study of the 7 candidate genes and found that only *ETV6* was inactivated on both alleles in most cases, the second event being the translocation t(12;21) resulting in the fusion gene *ETV6-AML1* (Montpetit, A et al. 2004). Moreover, our mutational study led to better refinement of the shortest commonly deleted region between markers *D12S89*, located in *ETV6*, and a single nucleotide polymorphism in the third exon of *BCL-G* (Montpetit, A et al. 2004), thus leaving only *ETV6* and *BCL-G* as candidate genes (Montpetit, A et al. 2004). Considering that *BCL-G* is expressed at very low level or not at all in leucocytes (Guo, B et al. 2001) and bone marrow (Montpetit, A et al. 2002), and that most pre-B ALL without 12p rearrangements do not express *BCL-G* (Montpetit, A et al. 2004), *ETV6* seems to be the most suitable candidate TSG in the region.

Accumulating functional evidence supports the idea that ETV6 could act as a TSG. Mouse embryo fibroblasts transfected with ETV6 showed a slower growth and an increased percentage of cells in G0/G1 (Rompaey, LV et al. 2000). In Ras-transformed NIH 3T3 cells, the presence of ETV6 slowed growth (Fenrick, R et al. 2000), increased apoptosis (Irvin, BJ et al. 2003), reduced the capacity of colony formation in soft agar (Fenrick, R et al. 2000; Rompaey, LV et al. 2000) and retarded growth of tumours in mice graft experiments (Rompaey, LV et al. 2000). Similar effects was also observed on the cellular growth of hematopoietic cells transfected by (Sakurai, T et al. 2003). Pre-B ALL cell line Reh, which expresses ETV6-AML1 but not ETV6, showed a reduced growth rate in ETV6 stable transfectants compared to vector alone-transfected or non-transfected cells ((Boily, G et al. 2003)unpublished data). Altogether, these data strongly suggest that ETV6 may indeed play a role in tumour suppression.

ETV6 is a ubiquitously expressed transcription factor of the ETS family with a documented repressor activity (Chakrabarti, SR and Nucifora, G 1999; Fenrick, R et al. 1999; Lopez, RG et al. 1999), but only a few genes are known to be modulated by it: GPIb (Kwiatkowski, BA et al. 1998), GPIX (Kwiatkowski, BA et al. 1998), MMP3/stromelysin (Fenrick, R et al. 2000), MCSFR (Fears, S et al. 1997) and BCL-X_L (Irvin, BJ et al. 2003). A recent microarray study has identified 12 other putative ETV6-modulated genes of which two, RHOG and D4-GDI, were validated by RT-PCR (Sakurai, T et al. 2003). Among all these modulated genes, only MMP3 (Fenrick, R et al. 2000) and BCL-X_L (Irvin, BJ et al. 2003) promoters were shown to be able to bind ETV6. Thus the identification of more targets is critical to understand the physiologic and pathophysiologic functions of ETV6. Toward this goal we generated ETV6 inducible clones, induced its expression and analysed the resulting transcriptome at different time points using microarray experiments. This strategy led to the identification of 87 ETV6-modulated genes. Further validation by real-time quantitative RT-PCR revealed that at least 10 of these were significantly modulated. We screened the promoter regions of these genes to identify putative binding sites for ETS or any other known TFs. The expression of 5 of these genes was significantly correlated with that of ETV6 in leukemias from patients, suggesting a possible co-regulation of them. This work

constitutes another step towards the understanding of the functions of ETV6 and the impact of its inactivation in childhood leukemia.

MATERIALS AND METHODS

Patients and cell lines. Total RNA was obtained from 15 children who had been diagnosed with pre-B ALL by immunophenotyping in the Division of Hematology-Oncology of Sainte-Justine Hospital (Montreal, Canada). The patients had bone marrow samples taken at diagnosis (>80% blasts). Normal bone marrow sample was obtained from a non-leukemia patient. Written informed consent was obtained from all participants and the study was approved by our Institutional review Board. HeLa Tet-On Cell Line (Clontech, Palo Alto, CA, USA) was used to generate ETV6-inducible clones. This cell line has already the pTet-On vector integrated in its genome. HeLa TeT-On cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.1 µg/ml of G418. Pre-B ALL cell lines, REH and 697, were obtained from ATCC (Manassa, VA, USA) and DSMZ (Braunschweig, Germany), respectively. REH contains the t(12;21) and no normal ETV6, whereas 697 has the t(1;19) but no chromosome 12 alterations (Romana, SP et al. 1996).

PTRE2hyg/ETV6 construct. The ETV6 cDNA sequence was derived from the IMAGE clone IMAGp998P212973. Briefly, following the excision of the ETV6 coding sequence with EcoRI, 5' overhangs were filled and 3' A overhangs were generated with 5 U of Taq polymerase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) in a final volume of 100 µl containing 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 0.4 mM dNTPs, for 15 min at 72 °C. After ligation of this fragment into pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA), ETV6 sequence was cut out by digestion with NotI and inserted into NotI-linearized pTRE2hyg vector (Clontech, Palo Alto, CA, USA). ETV6 insert was sequenced on both strands to confirm the integrity of the coding sequence.

Generation of ETV6-inducible clones. HeLa ETV6-inducible and vector-alone clones were generated by transfecting the HeLa Tet-On cell line with vectors

pTRE2hyg/ETV6 or empty pTRE2hyg vector by electroporation with the Cloning Gun apparatus (Tritech Research, Los Angeles, CA, USA). Briefly, ten µg of DNA was completed to 30 µl with water and then mixed to 30 µl of cell suspension (~8 x 10⁵ cells) in DMEM. After 1 min of incubation at room temperature, the complete volume was aspirated into the pipet electrode (Tritech Research, Los Angeles, CA, USA) for 1 zap and then ejected in a 6-well containing 3 ml of DMEM supplemented with 10% FBS. Two days later, selection for stable transfectants was initiated by plating the cells in 100 mm dishes with DMEM medium containing 10% FBS, 0.1 µg/ml of G418 and 0.4 µg/ml of hygromycin. The medium was changed every 2-3 days until colonies were obtained. Clones were isolated and tested for ETV6 induction.

Induction of ETV6 expression. ETV6 was induced in HeLa/Tet-On/ETV6-56 clone cell line by growing cells in 2µg/ml doxycycline (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Later on cells were harvested at time points 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h and 48 h to capture transcriptome changes in a time-course manner. The day before the induction, cells were plated in freshly made medium supplemented with 10 % of FBS. To avoid possible variability caused by cell confluence, cells were plated at a density that would allow a confluence of approximately 70-85 % at the moment of harvest by trypsinization. The total volume of cells was split in two tubes, one for RNA and one for proteins, and cells were washed once with PBS. The pellet for proteins was dissolved in SDN buffer (100 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% sodium dodecyl sulfate and 0.5% Nonidet P40; (Poirel, H et al. 1998)) supplemented with protease inhibitors (100 µg/ml PMSF, 10 µg/ml aprotinin and 10 µg/ml leupeptin) and frozen at -80 °C. The cell pellet for RNA was used immediately for RNA isolation. The whole procedure was performed in triplicates for all time points.

Isolation of RNA and proteins. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) as recommended by the manufacturer's instructions. RNA quality was evaluated by migration on a standard denaturing formaldehyde 1% agarose gel as well as with a Bioanalyser (Agilent, Mississauga, ON, Canada). For protein isolation, whole cell lysates

dissolved in SDN buffer were sonicated 4 x 15 sec on ice, centrifuged 5 min at 4 °C and the supernatant was transferred to a fresh tube.

Immunoblotting. Two hundred µg of proteins from sonicated and cleared whole cell lysates were diluted in loading buffer (1X: Tris 60 mM, SDS 1.7%, glycerol 6%, DTT 100 mM and bromophenol blue), heat-denatured at 100 °C, migrated on standard 12.5% sodium dodecyl-sulfate (SDS) polyacrylamide gels (37.5:1) for 4 h at 130 V, and blotted on PVDF membranes. Immunodetection of ETV6 was done using an N-terminal ETV6 antibody (kindly provided by O. Bernard) diluted in Blotto A (1X TBS, 5% milk and 0.05% Tween-20). ETV6 antibody was revealed using ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Loading was controlled by stripping the ETV6 antibody from the membranes with ReBlot Plus Reagent (Chemicon International, Temecula, CA, USA) and by doing a second immunodetection with the Lamin A/C (346) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted in Blotto A. Signals were revealed using ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

Real-time quantitative RT-PCR. Reverse transcription reactions and PCR amplifications were carried out as previously described (Montpetit, A et al. 2004). Amplimers are presented in table 1 (see supplementary materials). GAPD gene was used as the reference gene. Expression values were calculated by the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ formula described elsewhere (Applied Biosystems User Bulletin No.2, P/N 4303859) (Livak, KJ and Schmittgen, TD 2001).

Microarrays and data analyses. Global expression analyses of HeLa/Tet-On/ETV6-56 and HeLa/Tet-On/V1 (vector alone) cells, harvested at time points 0H, 4H, 12H and 48H post-induction, was performed using Affymetrix HG-U133A chips (all chips with same lot number). RNA from all 3 independent induction experiments was investigated for expression analysis. The detailed protocol for the whole procedure, from target labelling to acquisition of signal is described at the McGill University /Genome Quebec Innovation Centre facility web site (genomequebec.mcgill.ca/mpf/info/Old%20labeling%20protocol-

last%20version.pdf). Briefly, 20 µg of total RNA was used to prepare the labelled targets. RNA was reverse-transcribed to double-stranded cDNA by using oligo-dT primers containing the T7 promoter followed by an *in vitro* transcription to cRNA with biotinylated ribonucleotides. After assessment of cRNA quality with a Bioanalyser (Agilent, Mississauga, ON, Canada), 15 µg of targets were used to hybridize each microarray. Chips were then stained using the Affymetrix GeneChip Fluidics Station 400 apparatus (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) and scanned with the Affymetrix GeneChip 3000 Scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Data were subjected to MAS5 analysis method and mean-scaled normalized. Scatter plots of sample data against their corresponding replicates revealed very consistent results between replicates. In order to identify genes modulated over time after the ETV6 induction, we used the ANOVA statistical test and the fold modulation parameter. Probes with ANOVA p-value ≤ 0.005 and with a fold modulation ≥ 2 fold relative to 0H were kept for further analyses. T-test was then performed to compare fold modulation values of ETV6-induced and vector-alone cells and probes differentially modulated between the two groups (p-value ≤ 0.05) were selected. Data processing, statistical and clustering analyses were performed using Microsoft Excel, GeneLinker Gold, SPSS and Statistica packages.

Electromobility shift assay. Nuclear extracts were prepared as described in Dignam et al. (Dignam, JD et al. 1983). The labelling reaction mix contained 3.5 pmol of double-stranded oligo (Table 2), 10 µCi of [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol), 1X T4 Polynucleotide kinase buffer (70 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT; Promega, Madison, WI, USA), 10 U of T4 polynucleotide kinase (Promega, Madison, WI, USA), in a final volume of 10 µl. The mix was incubated at 37°C for 10 min. The reaction was stopped by the addition of 1 µl of 0.5 M EDTA. The volume was completed to 100 µl with water. The labelled probes were purified on a G-25 column (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Binding reaction premix contained 10 µg of nuclear extract protein from HeLa/Tet-On/ETV6-56 (incubated with doxycycline 0h or 4h), REH or 697 cells, 1X Gel Shift Binding Buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 4% glycerol, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50 mM NaCl, 50 µg/ml poly(dI-dC)•poly(dI-dC); Promega, Madison, WI,

USA), in a total volume of 9 μ l. For binding reaction, the premix was incubated for 10 min at room temperature, 1 μ l of labeled oligo (probe) was added and the mix was incubated for 20 min at room temperature. For competition assays, 100-fold molar excess of unlabeled double-stranded oligonucleotide was added to the binding reaction premix. The DNA-protein complexes and unbound probes were resolved by electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel (37.5:1 polyacrylamide, 0.5X TBE, and 2.5% glycerol) for 3-4 h at 190V. Gels were dried and probes detected by autoradiography.

Determination of putative transcription factor binding sites (TFBSs) conserved between human and mouse. Sequence corresponding to 3 kb upstream and 0.5 kb downstream of the transcriptional start site from human and mouse (Genbank database) were submitted to ConSite (Sandelin, A et al. 2004) to find putative TFBSs conserved between the 2 species. Orca method (implemented in ConSite) was used for alignment of sequences, analysis was done for all individual TFs, and default settings were used for conservation cutoff (variable), window size (50) and TF score threshold (80%).

Results

Generation of ETV6-inducible cell clones. To understand the function of ETV6, we wanted to identify genes targeted by this transcription factor. Our strategy was to generate ETV6-inducible cell systems and to perform global expression analysis using DNA microarrays to detect changes in response to the expression of ETV6 in a time-dependent manner. Toward this aim, HeLa cells carrying the vector of the Tet-On system already integrated in their genome (see Materials and Methods) were transfected with the second vector either empty (pTRE2hyg) or containing the ETV6 cDNA sequence (pTRE2hyg/ETV6). Hygromycin resistant clones were grown and their ability to induce ETV6 at the protein level was evaluated by Western blot (Fig 1A). We characterized several ETV6-inducible clones (data not shown), but only the clone ETV6-56 was selected for further work because of its strong induction and low ETV6 levels when not induced (Fig. 1A).

Identification of ETV6-modulated genes. HeLa clones ETV6-56 and V1 (vector alone, clone 1) were plated and grown in the presence of doxycycline. Cells were harvested at 0h, 4h, 8h, 12h, 24h and 48h post-induction. Inductions were performed in three independent experiments. Proteins from total cell lysates were isolated and induction of the ETV6 protein was evaluated by immunoblot (Fig. 1B). Expression level was found to increase in function of time in ETV6-56 clone, starting at 4h, whereas there was no such increase in V1 clone. The corresponding total RNA was used to generate labeled targets and then hybridized to Affymetrix HG-U133A chips (> 22,000 probes). RNA from the time points, 0h, 4h, 12h, and 48h, each in triplicate, was selected for microarray hybridizations. Resulting hybridization signals were mean scale-normalized, assuming that the total signal for each sample should be approximately the same. ETV6 mRNA was up-regulated approximately 6-fold after induction as determined by the microarray analysis (Fig 1C). A stepwise analysis strategy was used to identify probes being modulated in an ETV6-dependent manner (Fig 2A): 1) ANOVA statistical test was used to identify probes modulated significantly between time points and consistently in three independent experiments. Probes with a p-value ≤ 0.005 were retained. 2) Probes being modulated 2-fold or more were selected to decrease the probability to select false positives. 3) Fold modulation values of ETV6-56 and V1 clones were compared with T-test to eliminate probes not modulated in an ETV6-dependent manner but rather by the doxycycline treatment. Probes with p-values ≤ 0.05 were retained. 4) Fold modulation of the remaining probes were then plotted considering ETV6-56 vs V1 values. Probes that still visually appeared to be highly modulated in the vector alone control compared to the experimental samples were discarded (red dots in Fig 2B). This series of filters allowed the identification of 96 ETV6-modulated probes corresponding to 87 non-redundant genes, including 62 down-regulated and 25 up-regulated ones. These genes fall into many different categories such as cellular adhesion/cellular matrix, cell growth/proliferation, apoptosis and angiogenesis (Fig 3) that are known to be involved in cancer. The 87 modulated genes are listed in table 3 (see supplementary materials).

Validation of ETV6-modulated genes by real-time quantitative RT-PCR.

Real-time quantitative RT-PCR was used as an alternative approach to validate the microarrays data. We selected 13 genes for validation based on their documented association to cancer or a pathway related to this disease (Table 4). For most genes, results were similar with both methods but sometimes showed differences in amplitude (Table 4)(Fig. 4 in supplementary materials). All the investigated genes were significantly modulated as determined by ANOVA (data not shown). T-tests were performed with fold modulation data of ETV6-56 and V1 clones to eliminate genes that did not seem likely to be modulated in an ETV6-dependent manner. Genes with p-values ≤ 0.05 were given the call "validated" unless the modulation in the V1 clone was also very high as in the case of KLF4 (3.6 fold modulation in experimental samples vs 3 fold in control). Based on these criteria, 10 out of the 13 (77%) genes investigated were found to be specifically modulated by ETV6 (table 4). If one assumes that the concordance observed with these 13 genes can be extrapolated to the whole 87 genes list, then 67 genes (77%) would be expected to be truly modulated in an ETV6-dependent manner.

Electromobility shift assays (EMSAs). The ETV6-modulated genes identified in this study could be either direct or indirect targets of ETV6. To address this issue, the proximal promoter regions of the 10 validated candidate ETV6-modulated genes were screened for their ability to bind ETV6 or any other nuclear proteins by EMSAs. To delineate the effect of the presence of ETV6 on the DNA-protein band patterns, we used nuclear extracts from 5 cell types expressing ETV6 differentially: HeLa/Tet-On/V1, HeLa/Tet-On/ETV6-56, non-induced or induced for 4 h as well as the leukemia pre-B ALL cell lines 697 and REH that are expressing and not expressing ETV6, respectively (Table 5). One to three EBS-containing consensus sequences per gene were selected for EMSA (see Table 2, supplementary materials) based on the following criteria: 1) the sequence was already known to bind an ETS TF; 2) the EBS was conserved between human and mouse, as determined by ConSite (phylogenetic footprinting approach; see Materials and Methods); 3) the EBS was part of a region reported to have an impact on the transcriptional activity of the gene as determined by deletion

mapping assays; or 4) was in close proximity to a family of TFs known to cooperate with ETS factors (e.g. Pax TFs; (Verger, A and Duterrque-Coquillaud, M 2002). A control sequence known to bind ETV6, probe EBS (Poirel, H et al. 1997) was used as a positive control. Unexpectedly, the pattern of bands obtained with the EBS probe did not allow the identification of a band whose presence was consistent with the expression pattern of ETV6, neither at long (Fig 5A) nor at shorter exposure times (not shown). It is possible that the band corresponding to an ETV6-containing complex was hidden by another more abundant ETS-containing complex(s) because there are as many as 40 members in this family of TFs. Nevertheless, the EBS probe was used as a positive control for binding conditions. Table 5 summarizes the results obtained with EMSA. Most probes bound nuclear proteins specifically in the four nuclear extracts as the addition of 100X excess of cold oligos competed with the probes for the binding proteins (Table 5; Fig 5B). Some DNA-protein complexes were dependent on the ETS core sequence as oligos mutated in the core sequence did not compete with the wild type probe for the complexes (Table 5; Fig 5B). We also observed complexes that were not dependent on the ETS core sequence as mutated oligos were able to displace the wild type probe (Table 5; Fig 5C). The protein(s) of these complexes presumably interact with the probes at nucleotides outside of the ETS core sequence. If it is so, these putative TF binding sites (TFBSs) should be conserved in the mutant oligos. We used MatInspector (Quandt, K et al. 1995) to detect putative TFBSs that would be conserved in the wild type as well as in the mutant oligo sequences. Five of the 13 probes that showed an ETS core-independent shift were found to contain other predicted TFBSs conserved in both, the wild type and mutant oligos: a STAT binding site in IL18-1126-F; RBPJK site in PTGS2-163-178-187-F; PAX2 and WHN sites in SPHK1-621-F; a TEF_HLF site in TP53-279-F; and CAAT and AML3 sites in TP53-1671-F. Note that none of these predicted TFBS are shared between the corresponding ds-oligos. Competition experiments with the EBS ds-oligos was performed because it has been shown to bind a variety of ETS proteins (Bosselut, R et al. 1993). AKR1C3-1213, PTGS2-163-178-187 and VEGF-911 probes were competed by the EBS ds-oligo for binding to proteins from pre-B-ALL cells, suggesting that a member(s) of the ETS family of TF likely binds to these probes (Table 5; Fig 5D). In HeLa nuclear extracts, none of the probes tested

were competed by EBS. Considering that if ETV6 binds to any of the investigated probes, a difference in the pattern of bands is expected according to the cell-specific expression status we looked for such a difference between ETV6-induced or not induced HeLa cell extracts and between 697 and REH. No differential shift pattern was observed in HeLa cells. In pre-B ALL extracts, probes IL18-1150-1172, LUM-401, PHLDA1+399, TP53-2004 and VEGF+354 probes were associated to a shift observed only or predominantly in 697 as compared to REH (Table 5; Figs 5B, C and E). The LUM-401 shift is dependent on the ETS core sequence but is not competed by the EBS oligo, a pattern very often observed in this study (Table 5) suggesting that some of the targets may carry a ETV6 binding site different from the EBS consensus. Differential shifts observed with PHLDA1+399, TP53-2004 and VEGF+354 probes are associated with a band pattern virtually identical. PHLDA1+399 pattern is shown in Fig 5C: the lower molecular weight band of a doublet present in 697 is faint or absent in REH. The opposite situation was also observed, REH extracts differentially shifted AKR1C3-1213 and VEGF-911 probes in a very similar pattern (e.g. AKR1C3; Fig. 5D). Also of note, IL18-1150-1172 lower shifts correlated with the expression of ETV6 (Fig. 5E). Since the association of differential shifts with the expression status of ETV6 does not readily mean that ETV6 is present in the complexes, we tested two concentrations of 4 different ETV6 antibodies in supershift assays with the control probe EBS but did not observe any supershift or displacement of band (not shown). However as discussed above, EBS might not be a suitable positive control.

Assessment of the involvement of these ETV6-modulated genes in leukemia cells. RNA expression of the 10 candidate genes as well as that of ETV6 was evaluated in up to 15 childhood pre-B ALLs by real-time quantitative RT-PCR. A summary of the results as well as clinical and molecular features are given in Table 6 (see supplementary materials). Note that PCR was designed to be specific to ETV6 and did not detect ETV6-AML1 expression. Because leukemia samples cannot be considered a homogeneous pool of leukemia cells, we selected patients with more than 80% blasts. This could explain the detection of residual ETV6 expression signal in samples known not to contain any functional allele of ETV6

(Table 6). The expression of 5 of the 10 studied genes, IL18, LUM, PTGER4, TP53 and SPHK1, was found to be significantly correlated with that of ETV6 (Fig 6A). PTGS2/COX2 also tended to correlate with the ETV6 expression although significance was not reached (Table 7). Linear regression analyses showed a very high determination coefficient (r^2) of 0.89 with an associated p-value of 10^{-7} (Fig 6B). LUM, AKR1C1 and TP53 also showed significant results in regression analysis (ANOVA p-value ≤ 0.05) although their determination coefficient were modest with 0.37, 0.36 and 0.32 respectively. Expression of the 10 genes was also analyzed for association with other molecular as well as clinical features (Table 7). Interestingly, the expression of AKR1C3, an enzyme known to catalyze steroid hormone modifications, correlated with gender, being generally higher in males. The expression of AKR1C1, closely related functionally to AKR1C3, was associated with the grade. LUM, which is involved in extra-cellular contacts, was correlated with white blood cell count (WBC). We previously assessed the presence of LOH at locus 12p12-13 and the presence of the translocation t(12;21) in the studied patients (Baccichet, A and Sinnett, D 1997; Montpetit, A et al. 2004). As the presence of a 12p12-13 LOH is closely related to the expression of ETV6 ((Montpetit, A et al. 2004), it was not surprising to find that the genes whose expression is correlated with ETV6 expression were also correlated with the LOH status (Table 7). The only exceptions were PTGS2 that was significantly correlated with the LOH status, whereas PTGER4 correlation almost reached significance (Table 7). Translocation t(12;21) is also correlated with ETV6 expression (Montpetit et al., 2004) but only PTGER4 and LUM were correlated with it (Table 7).

Discussion

We and others recently provided evidence that ETV6 is the most probable TSG candidate in the chromosome 12p12-13 region (Fenrick, R et al. 2000; Rompaey, LV et al. 2000; Irvin, BJ et al. 2003; Sakurai, T et al. 2003; Montpetit, A et al. 2004). ETV6, a member of the ets family of TFs, has been shown to act as a transcriptional repressor although very few gene targets are known so far. The present study aimed to better understand the function of ETV6 and the impact of its

inactivation in leukemia by identifying genes modulated by it at the transcription level. Taking advantage of an inducible system and the microarray technology, we report the identification of novel ETV6-modulated genes. The modulation of 10 of these genes, AKR1C1, AKR1C3, IL18, LUM, PHLDA1, PTGER4, PTGS2, SPHK1, TP53 AND VEGF, was validated by real-time quantitative RT-PCR. We have shown that the corresponding promoter regions contain putative TFs of the ETS family that may actually bind nuclear proteins. Finally, the expression analysis of preB-ALL patients revealed that the expression of IL18, PHLDA1, PTGER4, SPHK1 and TP53 was indeed significantly correlated with that of ETV6 levels. Interestingly, the expression of some genes also correlated with clinical and other molecular features.

In microarray experiments, there are as many data outputs as there are possible analytical designs and there is no unique perfect design. By applying stringent analytical filters, we ended up with 87 non-redundant genes, including 62 that were down-regulated. This observation is not surprising because of the known transcriptional repressing activity of ETV6, which has been shown to recruit many co-repressors including HDAC3, mSin3A, NcoR and SMRT (Chakrabarti, SR and Nucifora, G 1999; Wang, L and Hiebert, SW 2001; Kuwata, T et al. 2002). However, there is still no strong evidence that ETV6 directly activates gene transcription, although two genes, IL10 and IL4, have been reported to be up-regulated by its over-expression (Sakurai, T et al. 2003). Interestingly, ETV6 can interact with the histone acetyltransferase (HAT) Tip60 (Nordentoft, I and Jorgensen, P 2003), which is generally associated with transcriptional activation but, surprisingly, the over-expression of Tip60 further increased the ability of ETV6 to repress the activity of an artificial promoter in a reporter assay. The association of ETV6 to this HAT raises the question as whether, in certain contexts, ETV6 could activate transcription through this interaction. Note that other ETS members, for example Net and Elk-1 have the capacity to either activate or repress transcription depending on the signalling context (Mavrothalassitis, G and Ghysdael, J 2000; Yang, SH et al. 2001). It is also possible that the ETV6-up-regulated genes found in this study were, in part or totally, indirectly modulated.

We showed both by microarrays and real-time quantitative RT-PCR that 10 out of 13 genes were modulated (77%). If this is extrapolated to the whole microarray gene list, then up to 67/87 genes are expected to be ETV6-modulated as well. Considering its ubiquitous expression, ETV6 may have a pleiotropic activity; according to our results, ETV6 induction seems to modulate genes associated with many different categories instead of converging on a few ones. Many of these categories are, albeit not exclusively, associated with cancer: cell adhesion/cellular matrix, cell growth/proliferation, apoptosis and angiogenesis. Previous studies have suggested the involvement of ETV6 in these pathways and the modulated genes reported here may help to generate hypotheses aiming to understand the molecular mechanisms by which ETV6 may participate in these processes. According to the microarray data, nine modulated genes were classified in the cell adhesion/cellular matrix category, which was the most important one in terms of number of genes (see table 3). Of these genes, the expression of LUM and PHLDA1 was validated by quantitative RT-PCR. ETV6 has already been shown to be implicated in cell adhesion/cellular matrix. In the NIH 3T3 cell line, ETV6 can repress the transcription of the stromelysin/MMP3 (Fenrick, R et al. 2000), a gene coding for a member of the matrix metalloproteinases that are known to be involved in the breakdown of extracellular matrix and thus playing a role in tumour invasion and metastasis (review in (Johansson, N et al. 2000)). Unfortunately, the expression of the endogenous MMP3 was near the background signal in our HeLa cell system thus limiting the detection of any ETV6 repression. ETV6 is also responsible for reported aggregation phenotypes *in vitro* which are likely to be attributable to protein(s) of the cell adhesion/cellular matrix category (Van Rompaey, L et al. 1999; Fenrick, R et al. 2000; Rompaey, LV et al. 2000). The over-expression of ETV6 in Ras-transformed NIH 3T3 cells highly reduced invasion and completely inhibited metastasis as compared to controls when injected into nude mice (Fenrick, R et al. 2000).

Another important gene category was cell growth/proliferation with six ETV6-modulated genes. Previous reports suggested that ETV6 is indeed involved in cellular growth/proliferation inhibition. In mouse embryo fibroblasts (MEF), transfection of ETV6 slowed growth and increased the fraction of cells in G0/G1

(Rompaey, LV et al. 2000). In Ras-transformed NIH 3T3 cells, ETV6 slowed growth (Fenrick, R et al. 2000), reduced the capacity of colony formation in soft agar (Fenrick, R et al. 2000; Rompaey, LV et al. 2000) and retarded growth of tumours in mice graft experiments (Rompaey, LV et al. 2000). In the myelogenous leukemia cell line K562, growth was also retarded by the transfection of ETV6 (Sakurai, T et al. 2003). Likewise, ETV6 stable transfectants of the pre-B ALL cell line REH showed a reduced growth rate compared to non-transfected cells (Boily, G et al. 2003).

Five of the identified genes are related to the apoptosis pathway. Actual evidence of the action of ETV6 on apoptosis is that it can increase and decrease it, depending on the cell context. ETV6 knock-out mice present an excess of apoptosis of mesenchymal and neural cells (Wang, LC et al. 1997) and hematopoietic stem cells survival is dependent on ETV6 (Hock, H et al. 2004), suggesting an anti-apoptotic activity of ETV6. On the other hand, ETV6 can repress the transcription of the anti-apoptotic protein BCL-X_L and induces apoptosis (Irvin, BJ et al. 2003).

Five genes of the angiogenesis pathways were identified in our study. ETV6 has previously been proposed to play a role in angiogenesis. ETV6 null mice present defective yolk sac angiogenesis (Wang, LC et al. 1997). When ETV6 is over-expressed in NIH 3T3-UCLA, vessel-shape aggregates are formed, a phenomenon that, according to the authors, could be related to physiological vessel formation (Van Rompaey, L et al. 2002).

To identify DNA regions that could be bound by ETV6, we screened by EMSAs the promoter regions predicted to bind putative ETS TFs. Although we were not able to clearly show that ETV6 binds to selected regulatory regions of the 10 validated genes, promoter regions of the AKR1C3, IL18, LUM, PTGER4, PTGS2, TP53 and VEGF bound nuclear proteins in an ETS core-dependent manner.

We found that the expression levels of IL18, LUM, PTGER4, SPHK1 and TP53 were positively correlated with that of ETV6 in a group of pre-B ALL patients. Of note, with the exception of SPHK1, the observed modulation in leukemia samples was in the opposite direction than the one observed in HeLa cells. It is possible that ETV6 bind in the regulatory region of these genes but that it interacts with different co-factors depending on the cell type resulting in differential expression. An example of this hypothetical mechanism is depicted by the HOX-PBX heterodimer which can function as an activator or a repressor through differential interactions with co-factors, depending on intra-cellular signals (Saleh, M et al. 2000). What could be the impact of an inactivation of ETV6 in leukemia considering a modulation of these five genes by ETV6? There is an abundant literature showing that IL18 has an *in vivo* anti-tumour activity, against hematopoietic tumour cells (Akamatsu, S et al. 2002; Yamashita, K et al. 2002; Zhang, B et al. 2004) as well as in many different types of solid tumour cells (Coughlin, CM et al. 1998; Tan, J et al. 1998; Osaki, T et al. 1999; Oshikawa, K et al. 1999; Ju, DW et al. 2000; Tasaki, K et al. 2000; Ju, DW et al. 2001; Kishida, T et al. 2001; Wang, Q et al. 2001; Liu, Y et al. 2002; Baxevanis, CN et al. 2003). The observed effects are mediated, at least in part, by its action on the activation of NK cells and/or cytotoxic T lymphocytes (CTL) (Tan, J et al. 1998; Osaki, T et al. 1999; Oshikawa, K et al. 1999; Akamatsu, S et al. 2002; Liu, Y et al. 2002; Zhang, B et al. 2004). IL18 can also induce apoptosis in the myelomonocytic cell line KG-1 *in vitro* (Ohtsuki, T et al. 1997), suggesting that a paracrine effect could also account for the anti-tumour property. Inhibition of angiogenesis could also account for the anti-tumour effect in solid tumours (Coughlin, CM et al. 1998). In pre-B ALL cells that have lost ETV6, IL18 expression is significantly lower, which could influence the disease progression by decreasing the anti-tumour activity of the immune system mediated by IL18.

LUM, a member of the keratan sulphate proteoglycan family, is a major component of the cornea and is widely distributed in interstitial connective tissues (Chakravarti, S 2002). Although, to our knowledge, there is no work reported yet on LUM related to leukemia, its over-expression has been associated with other cancers, including colorectal cancer (Lu, YP et al. 2002), pancreatic cancer (Ping

Lu, Y et al. 2002) as well as cervical cancer cells (Naito, Z et al. 2002). It appears that in the case of pancreatic cancer and cervical cancer cells, surrounding fibroblasts also expressed higher levels of the gene (Naito, Z et al. 2002; Ping Lu, Y et al. 2002). In breast cancer, the tumor cells do not show higher expression but LUM is present at higher levels in the stroma adjacent to the tumors (Leygue, E et al. 1998), which is associated with higher tumor grade, lower estrogen receptor levels in the tumor, and younger age of the patients (Leygue, E et al. 1998). On the other hand, functional evidence suggests an opposite effect of LUM. Work using fibroblasts from Lum null mice shows an increased proliferation and decreased apoptosis (Vij, N et al. 2004). Moreover, LUM transfection into the melanoma cell line B16F1 reduces its ability to form colony in agarose gel, to invade matrigel and to form tumor *in vivo* (Vuillermoz, B et al. 2004).

PTGER4 is one of the receptors mediating cellular response to prostaglandin E type. The inhibitory effect of the prostaglandin E₂ (PGE₂) on immature B lymphocytes has been substantially documented. Injections of the PGE₂ analog 16,16-dimethyl PGE₂ suppress lymphopoiesis in mice, preferentially that of B cell precursors (Shimozato, T and Kincade, PW 1999). Moreover, immature B lymphocyte precursor cells and the pro-B cell line F10 underwent apoptosis when the analog was added to their culture medium (Shimozato, T and Kincade, PW 1999). Such a response can be mediated by EP₂/Ptger2, and cAMP analogs (Fedyk, ER et al. 1996; Shimozato, T and Kincade, PW 1999) suggesting that Ptger4 could have the same effect since it is also coupled to a G-protein activating the production of cAMP. A study showing apoptosis of immature and mature unstimulated lymphocytes in response to PGE₂ showed a c-Myc expression increase correlated with the PGE₂ dose (Pica, F et al. 1996). Growth inhibition and apoptosis of some B lymphoma lines were also reported in response to PGE₂ or analogs (Phipps, RP et al. 1989; Brown, DM et al. 1992). T-lymphocytes can also undergo apoptosis and growth inhibition in response to PGE₂ (Mastino, A et al. 1992; Hendricks, A et al. 2000). In the present study, we have shown that the expression of PTGER4 was highly correlated with that of ETV6 in pre-B leukemias. In light of all the above studies, we hypothesize that the loss of ETV6 in pre-B cells results in a decreased expression of PTGER4 at the

cell surface and in a desensitization to the physiological PGE₂-mediated growth inhibition and pro-apoptosis signal, events that would ultimately contribute to leukemia.

SPHK1 is a lipid kinase catalyzing the phosphorylation of sphingosine to sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P is a lipid mediator acting both, on membrane-bound G-protein-coupled receptors (S1P₁ to S1P₅), modulating functions like angiogenesis and cell migration, and inside the cell as a second messenger, generally promoting growth and inhibiting apoptosis. (reviewed in (Spiegel, S and Kolesnick, R 2002; Hla, T 2004). Induced apoptosis in some leukemia cell lines was reported to be inhibited by S1P (Cuvillier, O et al. 1998; Van Brocklyn, JR et al. 1998; Cuvillier, O and Levade, T 2001). Surprisingly, S1P can also inhibit growth of T lymphocytes and this response possibly implicates cell surface receptors (Brinkmann, V et al. 2002; Jin, Y et al. 2003). S1P and its derivatives also induce lymphopenia in animals secondary to an increased sequestration of lymphocytes in the lymph nodes (Mandala, S et al. 2002; Xie, JH et al. 2003). To our knowledge, the effects of S1P specifically on pre-B lymphocytes have not been studied. Considering what is known so far, SPHK1 increases the production of S1P, which may either 1) increase proliferation and inhibit apoptosis, like it is seen in most cell types, or 2) inhibit cell proliferation, as it was observed for T cells. In pre-B ALL, the loss of ETV6 reduces SPHK1 expression and presumably the S1P production and thus may counteract leukemogenesis according to the first scenario or, in the second scenario, promote leukemogenesis.

TP53 is a well-known tumor suppressor gene involved in many functions including control of cell cycle, apoptosis and DNA repair. Although mutations in TP53 is prevalent in more than 50% of solid tumors, it is relatively rare in hematological malignancies with about 14% (Krug, U et al. 2002) and even lower in both adult and childhood ALL with less than 5% of patients presenting a mutation (Gump, J et al. 2001). However, other events may alter the TP53 pathway, such as the over-expression of MDM2, a protein destabilizing TP53, that was observed in childhood ALL (Marks, DI et al. 1997; Zhou, M et al. 2000).

The expression analysis in pre-B ALL cells showed a correlation between the expression of AKR1C3 and the gender, males showing a higher expression. It is not known whether this gene is differentially expressed according to the gender in normal hematopoietic cells. We also observed a correlation between AKR1C1 and the grade of the disease, expression being lower in grade IV patients. It is known that AKR1C1 can modify sexual steroid hormones, a process that regulates the availability of the latter to activate their receptors. However, because patients of our cohort are children aged between 2 and 10 years, these data cannot be easily explained by differences in sexual hormone levels.

In conclusion, *in vitro* inducible system and microarray analyses allowed us to identify putative ETV6-modulated genes and expression studies in patients suggest that 5 of these genes might be regulated by ETV6 in childhood pre-B ALL. Further studies will be needed to determine if these genes are direct targets of ETV6 and to address the functional impact of the deregulation of these genes in leukemia when ETV6 is inactivated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Patrick Beaulieu for the conception and creation of bio-informatics tools used for the microarrays analyses and Mathieu Larivière for assistance in the EMSAa interpretations. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research CIHR (grant number MOP-14108). DS is a scholar of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). GB received studentships from the FRSQ, the Programme de Biologie Moléculaire of the University of Montreal and the Toronto Dominion Bank (Faculté des Études Supérieures of the University of Montreal).

REFERENCES

- Aissani, B, C Bonan, A Baccichet and D Sinnett (1999). Childhood acute lymphoblastic leukemia: is there a tumor suppressor gene in chromosome 12p12.3? Leuk Lymphoma **34**(3-4): 231-9.
- Aissani, B and D Sinnett (1999). Fine physical and transcript mapping of a 1.8 Mb region spanning the locus for childhood acute lymphoblastic leukemia on chromosome 12p12. 3. Gene **240**(2): 297-305.
- Akamatsu, S, N Arai, T Hanaya, S Arai, T Tanimoto, M Fujii, K Kohno, MJ Micallef, M Ikeda and M Kurimoto (2002). Antitumor activity of interleukin-18 against the murine T-cell leukemia/lymphoma EL-4 in syngeneic mice. J Immunother **25 Suppl 1**: S28-34.
- Baccichet, A and D Sinnett (1997). Frequent deletion of chromosome 12p12.3 in children with acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol **99**(1): 107-14.
- Baens, M, I Wlodarska, A Corveleyn, I Hoornaert, A Hagemeyer and P Marynen (1999). A physical, transcript, and deletion map of chromosome region 12p12.3 flanked by ETV6 and CDKN1B: hypermethylation of the LRP6 CpG island in two leukemia patients with hemizygous del(12p). Genomics **56**(1): 40-50.
- Baxevanis, CN, AD Gritzapis and M Papamichail (2003). In vivo antitumor activity of NKT cells activated by the combination of IL-12 and IL-18. J Immunol **171**(6): 2953-9.
- Boily, G, J Larose and D Sinnett (2003). Functional study of the putative tumor suppressor gene ETV6 (TEL) using conditional expression models. Oncogenomics 2003, Phoenix.

- Bosselut, R, J Levin, E Adjadj and J Ghysdael (1993). A single amino-acid substitution in the Ets domain alters core DNA binding specificity of Ets1 to that of the related transcription factors Elf1 and E74. Nucleic Acids Res **21**(22): 5184-91.
- Brinkmann, V, MD Davis, CE Heise, R Albert, S Cottens, R Hof, C Bruns, E Prieschl, T Baumruker, P Hiestand, CA Foster, M Zollinger and KR Lynch (2002). The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. J Biol Chem **277**(24): 21453-7.
- Brown, DM, GL Warner, JE Ales-Martinez, DW Scott and RP Phipps (1992). Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. Clin Immunol Immunopathol **63**(3): 221-9.
- Chakrabarti, SR and G Nucifora (1999). The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. Biochem Biophys Res Commun **264**(3): 871-7.
- Chakravarti, S (2002). Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. Glycoconj J **19**(4-5): 287-93.
- Coughlin, CM, KE Salhany, M Wysocka, E Aruga, H Kurzawa, AE Chang, CA Hunter, JC Fox, G Trinchieri and WM Lee (1998). Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. J Clin Invest **101**(6): 1441-52.
- Cuvillier, O and T Levade (2001). Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. Blood **98**(9): 2828-36.
- Cuvillier, O, DS Rosenthal, ME Smulson and S Spiegel (1998). Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose)

polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. J Biol Chem **273**(5): 2910-6.

Dignam, JD, RM Lebovitz and RG Roeder (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res **11**(5): 1475-89.

Fears, S, M Gavin, DE Zhang, C Hetherington, Y Ben-David, JD Rowley and G Nucifora (1997). Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1949-54.

Fedyk, ER, JM Ripper, DM Brown and RP Phipps (1996). A molecular analysis of PGE receptor (EP) expression on normal and transformed B lymphocytes: coexpression of EP1, EP2, EP3beta and EP4. Mol Immunol **33**(1): 33-45.

Fenrick, R, JM Amann, B Lutterbach, L Wang, JJ Westendorf, JR Downing and SW Hiebert (1999). Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. Mol Cell Biol **19**(10): 6566-74.

Fenrick, R, L Wang, J Nip, JM Amann, RJ Rooney, J Walker-Daniels, HC Crawford, DL Hulboy, MS Kinch, LM Matrisian and SW Hiebert (2000). TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. Mol Cell Biol **20**(16): 5828-39.

Grover, J, CY Liu, WW Kao and PJ Roughley (2000). Analysis of the human lumican gene promoter. J Biol Chem **275**(52): 40967-73.

Gump, J, L McGavran, Q Wei and SP Hunger (2001). Analysis of TP53 mutations in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol **23**(7): 416-9.

- Guo, B, A Godzik and JC Reed (2001). Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. J Biol Chem **276**(4): 2780-5.
- Hendricks, A, W Leibold, V Kaefer and HJ Schuberth (2000). Prostaglandin E2 is variably induced by bacterial superantigens in bovine mononuclear cells and has a regulatory role for the T cell proliferative response. Immunobiology **201**(5): 493-505.
- Hla, T (2004). Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. Semin Cell Dev Biol **15**(5): 513-20.
- Hock, H, E Meade, S Medeiros, JW Schindler, PJ Valk, Y Fujiwara and SH Orkin (2004). Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. Genes Dev **18**(19): 2336-41.
- Howe, LR, HC Crawford, K Subbaramaiah, JA Hassell, AJ Dannenberg and AM Brown (2001). PEA3 is up-regulated in response to Wnt1 and activates the expression of cyclooxygenase-2. J Biol Chem **276**(23): 20108-15.
- Irvin, BJ, LD Wood, L Wang, R Fenrick, CG Sansam, G Packham, M Kinch, E Yang and SW Hiebert (2003). TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL. J Biol Chem **278**(47): 46378-86.
- Jin, Y, E Knudsen, L Wang, Y Bryceson, B Damaj, S Gessani and AA Maghazachi (2003). Sphingosine 1-phosphate is a novel inhibitor of T-cell proliferation. Blood **101**(12): 4909-15.
- Johansson, N, M Ahonen and VM Kahari (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion. Cell Mol Life Sci **57**(1): 5-15.

- Ju, DW, Q Tao, G Lou, M Bai, L He, Y Yang and X Cao (2001). Interleukin 18 transfection enhances antitumor immunity induced by dendritic cell-tumor cell conjugates. Cancer Res **61**(9): 3735-40.
- Ju, DW, Y Yang, Q Tao, WG Song, L He, G Chen, S Gu, CC Ting and X Cao (2000). Interleukin-18 gene transfer increases antitumor effects of suicide gene therapy through efficient induction of antitumor immunity. Gene Ther **7**(19): 1672-9.
- Kibel, AS, D Freije, WB Isaacs and GS Bova (1999). Deletion mapping at 12p12-13 in metastatic prostate cancer. Genes Chromosomes Cancer **25**(3): 270-6.
- Kishida, T, H Asada, E Satoh, S Tanaka, M Shinya, H Hirai, M Iwai, H Tahara, J Imanishi and O Mazda (2001). In vivo electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice. Gene Ther **8**(16): 1234-40.
- Krug, U, A Ganser and HP Koeffler (2002). Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. Oncogene **21**(21): 3475-95.
- Kuwata, T, C Gongora, Y Kanno, K Sakaguchi, T Tamura, T Kanno, V Basrur, R Martinez, E Appella, T Golub and K Ozato (2002). Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. Mol Cell Biol **22**(21): 7439-48.
- Kwiatkowski, BA, LS Bastian, TR Bauer, Jr., S Tsai, AG Zielinska-Kwiatkowska and DD Hickstein (1998). The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. J Biol Chem **273**(28): 17525-30.

- Leygue, E, L Snell, H Dotzlaw, K Hole, T Hiller-Hitchcock, PJ Roughley, PH Watson and LC Murphy (1998). Expression of lumican in human breast carcinoma. Cancer Res **58**(7): 1348-52.
- Liu, Y, GL Borchert and JM Phang (2004). Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells. J Biol Chem **279**(18): 18694-700.
- Liu, Y, H Huang, A Saxena and J Xiang (2002). Intratumoral coinjection of two adenoviral vectors expressing functional interleukin-18 and inducible protein-10, respectively, synergizes to facilitate regression of established tumors. Cancer Gene Ther **9**(6): 533-42.
- Livak, KJ and TD Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods **25**(4): 402-8.
- Lopez, RG, C Carron, C Oury, P Gardellin, O Bernard and J Ghysdael (1999). TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. J Biol Chem **274**(42): 30132-8.
- Lu, YP, T Ishiwata, K Kawahara, M Watanabe, Z Naito, Y Moriyama, Y Sugisaki and G Asano (2002). Expression of lumican in human colorectal cancer cells. Pathol Int **52**(8): 519-26.
- Mandala, S, R Hajdu, J Bergstrom, E Quackenbush, J Xie, J Milligan, R Thornton, GJ Shei, D Card, C Keohane, M Rosenbach, J Hale, CL Lynch, K Rupprecht, W Parsons and H Rosen (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. Science **296**(5566): 346-9.

- Marks, DI, BW Kurz, MP Link, E Ng, JJ Shuster, SJ Lauer, D Carroll, I Brodsky and DS Haines (1997). Altered expression of p53 and mdm-2 proteins at diagnosis is associated with early treatment failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol **15**(3): 1158-62.
- Mastino, A, M Piacentini, S Grelli, C Favalli, F Autuori, L Tentori, S Oliverio and E Garaci (1992). Induction of apoptosis in thymocytes by prostaglandin E2 in vivo. Dev Immunol **2**(4): 263-71.
- Masuda, K, H Shima, M Watanabe and K Kikuchi (2001). MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. J Biol Chem **276**(42): 39002-11.
- Mavrothalassitis, G and J Ghysdael (2000). Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. Oncogene **19**(55): 6524-32.
- Meier-Noorden, M, S Flindt, U Kalinke and T Hinz (2004). A CpG-rich bidirectional promoter induces the T-cell death-associated gene 51 and downregulates an inversely oriented transcript during early T-cell activation. Gene **338**(2): 197-207.
- Montpetit, A, G Boily and D Sinnett (2002). A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus. Eur J Hum Genet **10**(1): 62-71.
- Montpetit, A, J Larose, G Boily, S Langlois, N Trudel and D Sinnett (2004). Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia. Leukemia **18**(9): 1499-504.
- Naito, Z, T Ishiwata, G Kurban, K Teduka, Y Kawamoto, K Kawahara and Y Sugisaki (2002). Expression and accumulation of lumican protein in uterine

cervical cancer cells at the periphery of cancer nests. Int J Oncol **20**(5): 943-8.

Nordentoft, I and P Jorgensen (2003). The acetyltransferase 60 kDa trans-acting regulatory protein of HIV type 1-interacting protein (Tip60) interacts with the translocation E26 transforming-specific leukaemia gene (TEL) and functions as a transcriptional co-repressor. Biochem J **374**(Pt 1): 165-73.

Ohtsuki, T, MJ Micallef, K Kohno, T Tanimoto, M Ikeda and M Kurimoto (1997). Interleukin 18 enhances Fas ligand expression and induces apoptosis in Fas-expressing human myelomonocytic KG-1 cells. Anticancer Res **17**(5A): 3253-8.

Osaki, T, W Hashimoto, A Gambotto, H Okamura, PD Robbins, M Kurimoto, MT Lotze and H Tahara (1999). Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). Gene Ther **6**(5): 808-15.

Oshikawa, K, F Shi, AL Rakhmievich, PM Sondel, DM Mahvi and NS Yang (1999). Synergistic inhibition of tumor growth in a murine mammary adenocarcinoma model by combinational gene therapy using IL-12, pro-IL-18, and IL-1beta converting enzyme cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13351-6.

Phipps, RP, D Lee, V Schad and GL Warner (1989). E-series prostaglandins are potent growth inhibitors for some B lymphomas. Eur J Immunol **19**(6): 995-1001.

Pica, F, O Franzese, C D'Onofrio, E Bonmassar, C Favalli and E Garaci (1996). Prostaglandin E2 induces apoptosis in resting immature and mature human

lymphocytes: a c-Myc-dependent and Bcl-2-independent associated pathway. J Pharmacol Exp Ther **277**(3): 1793-800.

Ping Lu, Y, T Ishiwata and G Asano (2002). Lumican expression in alpha cells of islets in pancreas and pancreatic cancer cells. J Pathol **196**(3): 324-30.

Poirel, H, V Lacronique, M Mauchauffe, M Le Coniat, E Raffoux, MT Daniel, P Erickson, H Drabkin, RA MacLeod, HG Drexler, J Ghysdael, R Berger and OA Bernard (1998). Analysis of TEL proteins in human leukemias. Oncogene **16**(22): 2895-903.

Poirel, H, C Oury, C Carron, E Duprez, Y Laabi, A Tsapis, SP Romana, M Mauchauffe, M Le Coniat, R Berger, J Ghysdael and OA Bernard (1997). The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. Oncogene **14**(3): 349-57.

Quandt, K, K Frech, H Karas, E Wingender and T Werner (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucleic Acids Res **23**(23): 4878-84.

Romana, SP, M Le Coniat, H Poirel, P Marynen, O Bernard and R Berger (1996). Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21). Leukemia **10**(1): 167-70.

Rompaey, LV, M Potter, C Adams and G Grosveld (2000). Tel induces a G1 arrest and suppresses Ras-induced transformation. Oncogene **19**(46): 5244-50.

Sakurai, T, T Yamada, F Kihara-Negishi, S Teramoto, Y Sato, T Izawa and T Oikawa (2003). Effects of overexpression of the Ets family transcription factor TEL on cell growth and differentiation of K562 cells. Int J Oncol **22**(6): 1327-33.

- Saleh, M, I Rambaldi, XJ Yang and MS Featherstone (2000). Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. Mol Cell Biol **20**(22): 8623-33.
- Sandelin, A, WW Wasserman and B Lenhard (2004). ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W249-52.
- Shimozato, T and PW Kincade (1999). Prostaglandin E(2) and stem cell factor can deliver opposing signals to B lymphocyte precursors. Cell Immunol **198**(1): 21-9.
- Spiegel, S and R Kolesnick (2002). Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. Leukemia **16**(9): 1596-602.
- Stegmaier, K, S Pendse, GF Barker, P Bray-Ward, DC Ward, KT Montgomery, KS Krauter, C Reynolds, J Sklar, M Donnelly and et al. (1995). Frequent loss of heterozygosity at the TEL gene locus in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Blood **86**(1): 38-44.
- Stegmaier, K, S Takeuchi, TR Golub, SK Bohlander, CR Bartram and HP Koeffler (1996). Mutational analysis of the candidate tumor suppressor genes TEL and KIP1 in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res **56**(6): 1413-7.
- Takeuchi, S, CR Bartram, CW Miller, A Reiter, T Seriu, M Zimmermann, M Schrappe, N Mori, J Slater, I Miyoshi and HP Koeffler (1996). Acute lymphoblastic leukemia of childhood: identification of two distinct regions of deletion on the short arm of chromosome 12 in the region of TEL and KIP1. Blood **87**(8): 3368-74.

- Tan, J, BE Crucian, AE Chang, E Aruga, A Aruga, SE Dovhey, K Tanigawa and H Yu (1998). Interferon-gamma-inducing factor elicits antitumor immunity in association with interferon-gamma production. J Immunother **21(1)**: 48-55.
- Tanoue, T, T Yamamoto, R Maeda and E Nishida (2001). A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. J Biol Chem **276(28)**: 26629-39.
- Tasaki, K, Y Yoshida, T Maeda, M Miyauchi, K Kawamura, K Takenaga, H Yamamoto, T Kouzu, T Asano, T Ochiai, S Sakiyama and M Tagawa (2000). Protective immunity is induced in murine colon carcinoma cells by the expression of interleukin-12 or interleukin-18, which activate type 1 helper T cells. Cancer Gene Ther **7(2)**: 247-54.
- Van Brocklyn, JR, MJ Lee, R Menzeleev, A Olivera, L Edsall, O Cuvillier, DM Thomas, PJ Coopman, S Thangada, CH Liu, T Hla and S Spiegel (1998). Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. J Cell Biol **142(1)**: 229-40.
- Van Rompaey, L, W Dou, A Buijs and G Grosveld (1999). Tel, a frequent target of leukemic translocations, induces cellular aggregation and influences expression of extracellular matrix components. Neoplasia **1(6)**: 526-36.
- Van Rompaey, L, E Holland and G Grosveld (2002). TEL Induces Aggregation in Transformed Cells and Induces Tube Formation in NIH3T3-UCLA Cells. Biochem Biophys Res Commun **291(4)**: 820-8.
- Venanzoni, MC, LR Robinson, DR Hodge, I Kola and A Seth (1996). ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction. Oncogene **12(6)**: 1199-204.

- Verger, A and M Duterque-Coquillaud (2002). When Ets transcription factors meet their partners. Bioessays **24**(4): 362-70.
- Vij, N, L Roberts, S Joyce and S Chakravarti (2004). Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea. Exp Eye Res **78**(5): 957-71.
- Vuillermoz, B, A Khoruzhenko, MF D'Onofrio, L Ramont, L Venteo, C Perreau, F Antonicelli, FX Maquart and Y Wegrowski (2004). The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. Exp Cell Res **296**(2): 294-306.
- Wang, L and SW Hiebert (2001). TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. Oncogene **20**(28): 3716-25.
- Wang, LC, F Kuo, Y Fujiwara, DG Gilliland, TR Golub and SH Orkin (1997). Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. Embo J **16**(14): 4374-83.
- Wang, Q, H Yu, DW Ju, L He, JP Pan, DJ Xia, LH Zhang and X Cao (2001). Intratumoral IL-18 gene transfer improves therapeutic efficacy of antibody-targeted superantigen in established murine melanoma. Gene Ther **8**(7): 542-50.
- Xie, JH, N Nomura, SL Koprak, EJ Quackenbush, MJ Forrest and H Rosen (2003). Sphingosine-1-phosphate receptor agonism impairs the efficiency of the local immune response by altering trafficking of naive and antigen-activated CD4+ T cells. J Immunol **170**(7): 3662-70.
- Yamashita, K, T Iwasaki, T Tsujimura, A Sugihara, N Yamada, H Ueda, H Okamura, H Futani, S Maruo and N Terada (2002). Interleukin-18 inhibits

lodging and subsequent growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow. Oncol Rep **9**(6): 1237-44.

Yang, SH, E Vickers, A Brehm, T Kouzarides and AD Sharrocks (2001). Temporal recruitment of the mSin3A-histone deacetylase corepressor complex to the ETS domain transcription factor Elk-1. Mol Cell Biol **21**(8): 2802-14.

Zhang, B, KF Wu, YM Lin, XT Ma, Q Rao, GG Zheng, ZY Cao, G Li and YH Song (2004). Gene transfer of pro-IL-18 and IL-1beta converting enzyme cDNA induces potent antitumor effects in L1210 cells. Leukemia **18**(4): 817-25.

Zhou, M, L Gu, TC Abshire, A Homans, AL Billett, AM Yeager and HW Findley (2000). Incidence and prognostic significance of MDM2 oncoprotein overexpression in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia **14**(1): 61-7.

Supplementary materials

Table 1. Amplimers used for Real-time Quantitative RT-PCR.

Gene Symbol	Froward Primer ¹	Reverse Primer ¹
AKR1C1	CTAGTGACAGAAATGGATTTCGAAATAT	GCAGAATCAATATGGCGGAAG
AKR1C3	ATTTGGCACCTATGCACCTC	GGAACCCAGCTTCTATTGCT
ANXA4	CTCGTTCATCAAGGGTGACA	CCTCCTGTCCTTCTGGGATT
ETV6	TGAACCACATCATGGTCTCTG	CGTAATCCCAAAGCAGTCTACA
IL18	TCAACTCTCTCCTGTGAGAACAA	TCCTGGGACACTTCTCTGAAA
KLF4	CCCACACAGGTGAGAAACCT	CCCCGTGTGTTTACGGTAGT
LUM	TGGAGGTCAATCAACTTGAGAA	ACGCAAATGCTTGATCTTGG
PHLDA1	GGCAAGACAAGGTTTTGAGG	GCGGAGAGACTGTTTTGCTT
PTGER4	CTGGTGGTGCTCATCTGCT	CTGACTTCTCGCTCCAAACTT
PTGS2	TGTCTTGACATCCAGATCACATT	GCTGCTTTTTACCTTTGACAC
RRAS	CAGCGAGACACACAAGCTG	GTCCTCAATAGTGGGGTCGT
SPHK1	TGAACCATTATGCTGGCTATG	GTGCAGAGACAGCAGGTTCA
TP53	CAGTCAGATCCTAGCGTCGAG	TCAAATCATCCATTGCTTGG
VEGF	CTTGCCTTGCTGCTCTACCT	GTGATGATTCTGCCCTCCTC
GAPD	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

¹: Annealing temperature was 62 °C for all amplification systems.

Supplementary materials

Table 2. Sequence of the double-stranded oligos used for EMSA.

Gene Symbol	Oligo Id ¹	Forward sequence ²	Justification ³ (ref.)
N/A	EBS-F	ATAAACAGGAAAGTGG	(Poirel, H et al. 1997)
	mEBS-F	ATAAACACCAAGTGG	
AKR1C1	AKR1C1-1176-F	GAGCCACTCCAGAAATAAATAAGT	C
	mAKR1C1-1176-F	GAGCCACTCCCCAAATAAATAAGT	
AKR1C3	AKR1C3-1213-F	TGCACGTCTCTTCCCCTAATCTCT	E
	mAKR1C3-1213-F	TGCACGTCTCTTGGCCTAATCTCT	
IL18	IL18-1103-F	TATGACTTCCCGAAATGAAAACCC	C
	mIL18-1103-F	TATGACTTCCCCTAATGAAAACCC	
	IL18-1177-1155-F	CACCAAGCACTTCCAGCCACCCTGCCACAGACTTCCTTTGTAATCA	D
	mIL18-1177-1155-FDP	CACCAAGCACTTGGAGCCACCCTGCCACAGACTTGGTTTGT AATCA	
LUM	LUM-375-F	CATTTGCGTTTTCTGAAATTATT	B (Grover, J et al. 2000), C
	mLUM-375-F	CATTTGCGTTTTGGTGAATTATT	
	LUM-401-F	AGGGATTCAATTCCTCTGAGTCTG	B (Grover, J et al. 2000)
	mLUM-401-F	AGGGATTCAATTTGGTCTGAGTCTG	
PHLDA1	PHLDA1+238-F	GAGCCGCCTTTTCCGCTGGGTGTC	B (Meier-Noorden, M et al. 2004), C
	mPHLDA1+238-F	GAGCCGCCTTTTGGGCTGGGTGTC	
	PHLDA1+399-F	GCTGTCCCTCTGCCGGGACCCAGA	C
	mPHLDA1+399-F	GCTGTCCCTCTGGTGGGACCCAGA	
PTGER4	PTGER4+36-F	CAGCCCGAGAGGAAGATGAACAGC	C
	mPTGER4+36-F	CAGCCCGAGACCAAGATGAACAGC	
	PTGER4-381-F	CCCGCGGACAGGAGGTTCAAGAAA	E
	mPTGER4-381-F	CCCGCGGACACCAGGTTCAAGAAA	
PTGS2	PTGS2-397-F	TTCTGGAGAGGAAGCCAAGTGTC	-
	mPTGS2-397-F	TTCTGGAGACCAAGCCAAGTGTC	
	PTGS2-163-178-187-F	TTGGGGCAGCTTCTGGGTTCCGATTTTCTCATTTCCGTGGGTA AAAA	B (Howe, LR et al. 2001; Liu, Y et al. 2004)
	mPTGS2-163-178-187-FDMP	TTGGGGCAGCTTGGTGGGTTTGGGATTTTCTCATTTGGGTGGTA AAAA	
SPHK1	SPHK1-1407-F	TCACCTTCCCGGAACGCGCTCGGG	C, E
	mSPHK1-1407-F	TCACCTTCCCTCAACGCGCTCGGG	
	SPHK1-621-F	TGCAGCGTCGGGAAGTAAAAATA	C, E
	mSPHK1-621-F	TGCAGCGTCGCCAAGTAAAAATA	
TP53	TP53-279-271-F	GTGATATTACGGAAGCCTTCTAAAAAATGA	A (Venanzoni, MC et al. 1996), D
	mTP53-279-271-FDP	GTGATATTACCAAAGCCTTGGTAAAAAATGA	
	TP53-1671-F	ACTCTGACCAGGAACCACTGAGAA	C
	mTP53-1671-F	ACTCTGACCACCAACCACTGAGAA	
	TP53-2004-F	TCAAGATGCAGGAACCGTCAGGAG	C
	mTP53-2004-F	TCAAGATGCACCAACCGTCAGGAG	
VEGF	VEGF-911-F	ACCACACAGCTTCCCGTTCTCAGC	C
	mVEGF-911-F	ACCACACAGCTTGGCGTTCTCAGC	
	VEGF+354-F	GAGAAGTCGAGGAAGAGAGAGACG	C
	mVEGF+354-F	GAGAAGTCGACCAAGAGAGAGACG	

N/A: not applicable. ¹ m: mutant sequence; number: position of core sequence relative to the transcription initiation site (reference: NCBI genome browser). ² Reverse sequence is complementary; Bold sequence: ETS core consensus site; Underlined sequence: ETS core consensus with introduced mutations. ³: A: verified EBS by gel shift/supershift or mutation analyses; B: located in a regulatory region as determined by deletion mapping; C: EBS conserved between human and mouse (ConSite); D: two predicted EBS in proximity; E: located near a predicted PAX binding site as determined with MatInspector.

Supplementary materials

Table 3. Putative ETV6 modulated genes listed by category.

Class	Gene symbol	Affy. probe	fold modul. ¹	F-test
ABC transporter	ABCC3	208161_s_at	-6,58	8,70E-04
angiogenesis	DTR	222076_at	-3,35	9,18E-04
	IL18	206295_at	-2,62	3,84E-04
	NUDT6	220183_s_at	-2,76	3,83E-03
	SPHK1	219257_s_at	3,20	1,10E-05
	VEGF	210512_s_at	3,71	6,71E-05
apoptosis	IL18	206295_at	-2,62	3,84E-04
	PHLDA1	217996_at	2,38	9,31E-07
	PHLDA1	217997_at	2,43	5,54E-06
	SOX4	201418_s_at	2,10	9,21E-04
	SPHK1	219257_s_at	3,20	1,10E-05
	TP53	201746_at	-2,17	8,25E-05
Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase	CAMKK2	210787_s_at	-4,61	4,31E-03
cell adhesion/cellular matrix	FLRT3	219250_s_at	-3,01	9,73E-04
	KRT17	205157_s_at	4,19	1,73E-04
	KRT17	212236_x_at	2,89	3,06E-05
	IL18	206295_at	-2,62	3,84E-04
	LIM2	220519_s_at	-3,54	1,91E-03
	LUM	201744_s_at	-2,58	6,12E-05
	NINJ2	219594_at	-2,20	1,37E-03
	PHLDA1	217996_at	2,38	9,31E-07
	PHLDA1	217997_at	2,43	5,54E-06
	PTPRF	200635_s_at	2,24	9,70E-06
	RRAS	212647_at	-2,56	9,69E-04
cell growth/proliferation	DTR	222076_at	-3,35	9,18E-04
	FHL1	214505_s_at	-2,05	2,03E-04
	KLF4	221841_s_at	3,49	1,36E-05
	NUDT6	220183_s_at	-2,76	3,83E-03
	RRAS	212647_at	-2,56	9,69E-04
	SPHK1	219257_s_at	3,20	1,10E-05
	TP53	201746_at	-2,17	8,25E-05
cell morphology/cytoskeleton	PHLDA1	217996_at	2,38	9,31E-07
	PHLDA1	217997_at	2,43	5,54E-06
cholesterol metabolism	DHCR7	201791_s_at	-2,19	3,68E-05
	FDFT1	208647_at	-2,13	1,25E-07
	FDFT1	210950_s_at	-2,53	6,49E-07
	HMGCS1	205822_s_at	-2,84	3,93E-04
	HMGCS1	221750_at	-3,01	1,72E-04
	IDI1	204615_x_at	-2,36	3,40E-06
	IDI1	208881_x_at	-2,23	2,53E-06
	LDLR	202067_s_at	-5,80	6,11E-04
	SC4MOL	209146_at	-3,48	1,12E-04
	SQLE	213577_at	-2,20	4,70E-04
DNA repair	TP53	201746_at	-2,17	8,25E-05
	TREX1	205875_s_at	-2,17	4,04E-04
glucose metabolism	G6PC	206952_at	7,17	3,28E-04
	G6PD	202275_at	-2,35	3,01E-06
heat shock protein activity	DNAJB1	200666_s_at	2,10	4,53E-06
	HSPA1A	200799_at	2,70	2,13E-06
	HSPA1A	200800_s_at	4,19	1,47E-05
	HSPA1B	202581_at	2,71	1,10E-04
hormone metabolism	AKR1C1	209699_x_at	-4,28	3,78E-05
	AKR1C1	211653_x_at	-5,08	2,84E-05
	AKR1C3	209160_at	-5,17	2,68E-06
	HSD17B7	220081_x_at	-2,05	3,15E-03
immune response	C3	217767_at	-2,50	4,51E-04
	CXCL2	209774_x_at	2,49	9,07E-04
	IL18	206295_at	-2,62	3,84E-04
	OASL	210797_s_at	-2,18	1,52E-03
	PTGER4	204897_at	-2,09	3,68E-04
	PTGS2	204748_at	3,34	1,48E-05
	SPHK1	219257_s_at	3,20	1,10E-05
Intra-cellular transport	APBA1	206679_at	-5,14	4,29E-03
	SEC14L1	202083_s_at	-2,48	1,13E-03

Table 3 (continued)

Class	Gene symbol	Affy. probe	fold modul.	F-test	
ion transport	CLIC3	219529_at	-5,74	2,31E-05	
	KCNAB2	211791_s_at	-3,04	2,79E-04	
	KCTD7	213474_at	-4,66	5,93E-04	
	PKD2L1	221061_at	4,31	3,10E-03	
	SLC12A3	208354_s_at	-25,51	1,77E-05	
	SLC12A3	215274_at	-2,73	1,18E-04	
	SLC38A6	214830_at	-2,48	4,01E-04	
lipid metabolism	SLC7A4	214406_s_at	2,09	3,56E-04	
	CROT	204573_at	-2,26	1,84E-03	
	HMGCS1	205822_s_at	-2,84	3,93E-04	
	HMGCS1	221750_at	-3,01	1,72E-04	
	LPIN1	212274_at	-3,41	1,08E-03	
macrophage scavenger receptor	PECR	221142_s_at	-2,58	7,50E-04	
	MSR1	214770_at	-11,54	4,34E-03	
muscle-related	FHL1	214505_s_at	-2,05	2,03E-04	
	MYL9	201058_s_at	-4,23	3,62E-04	
neuropeptide receptor activity	GPR147	221387_at	2,59	1,69E-04	
phosphatase activity	PPP2R2B	213849_s_at	-2,66	3,48E-03	
	PPP3CC	207000_s_at	-2,04	8,99E-04	
	IMPA2	203126_at	-2,49	9,91E-06	
phosphatidylinositol pathway	ANXA4	201301_s_at	-2,96	9,60E-05	
phospholipase inhibitor activity	ANXA4	201302_at	-2,10	1,65E-03	
	AKR1C3	209160_at	-5,17	2,68E-06	
prostaglandin pathway-related	PTGER4	204897_at	-2,09	3,68E-04	
	PTGS2	204748_at	3,34	1,48E-05	
	SOX4	201418_s_at	2,10	9,21E-04	
	MTRF1	219822_at	-5,26	6,72E-04	
protein biosynthesis	CHST3	209834_at	3,46	3,78E-03	
protein modification	CIRBP	200810_s_at	2,37	1,84E-04	
response to temperature change transcription	CRSP2	217120_s_at	-2,04	1,50E-03	
	FOXD1	206307_s_at	2,36	5,46E-04	
	GABPB2	204618_s_at	2,31	3,32E-03	
	KLF4	221841_s_at	3,49	1,36E-05	
	SOX4	201418_s_at	2,10	9,21E-04	
	TP53	201746_at	-2,17	8,25E-05	
	ZHX2	203556_at	2,70	2,99E-04	
	ZNF297B	204182_s_at	-3,53	1,44E-03	
	ZNF81	215901_at	-5,57	1,89E-03	
	ubiquitination pathway	SMURF1	212668_at	-6,03	1,67E-03
	unknown	ASB9	205673_s_at	-2,23	4,22E-05
		C11orf8	205413_at	-2,69	5,25E-04
		C9orf38	208077_at	3,73	2,76E-03
		DKFZP586A0522	207761_s_at	-3,92	2,03E-05
EST1051		215545_at	-2,06	2,24E-03	
EST1383		216189_at	-3,36	1,94E-03	
EST2140		221878_at	-4,35	1,00E-05	
EST635		214110_s_at	-3,81	6,79E-04	
GABARAPL1		211458_s_at	-2,81	4,57E-03	
KBTBD4		218569_s_at	-2,91	1,42E-04	
MGC4504		219270_at	15,15	9,22E-07	
MGC4809		221879_at	-5,72	3,78E-06	
PLAC8		219014_at	-2,04	2,52E-04	
PP2447		221807_s_at	2,50	1,33E-03	
THEM2		204565_at	-2,48	2,53E-07	
TMEFF1		205122_at	2,08	2,33E-03	
TRIM16		204341_at	-2,53	2,07E-04	
TTC15		203122_at	-3,21	4,70E-03	

Genes may be part of more than one category. Categories were arbitrarily defined based on LocusLink (now Gene) summaries and Gene Ontology terms. *Negative numbers: down-regulation; positive numbers: up-regulation.

Table 4. Validation of candidate ETV6-modulated genes by real-time quantitative RT-PCR.

Gene Symbol	Gene Name	Microarrays fold modul. ¹	Function	Real-time quantitative RT-PCR	
				Fold modul. ¹	T-test p-value ² Validation call ³
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member 3	-4,68	Member of the aldo-keto reductase family. Catalyzes steroid hormone modifications.	-10.77	0.01 V
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member 2	-5,17	Member of the aldo-keto reductase family. Catalyzes steroid hormone modifications.	-5.03	0.007 V
ANXA4	annexin A4	-2,53	Phospholipase A2 inhibitor.	-1,73	0.54 NV
IL18	interleukin 18	-2,62	Pro-inflammatory cytokine. Induces expression of IFN-gamma and enhances NK cells and T cells cytotoxic activity.	-2.06	0.024 V
KLF4	kruppel-like factor 4	3,49	Transcription factor involved in the control of cell cycle checkpoints.	3.38	0.026 NV ⁴
LUM	lumican	-2,58	Member of the keratan sulphate proteoglycan family. Widely distributed in connective tissues.	-2.98	0.048 V
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	2,48	Protein with pleckstrin homology-like domain involved in cell morphology, cell adhesion, and apoptosis.	2.89	0.034 V
PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	-2,09	Receptor of prostaglandins type E. Prostaglandin E2 (PGE2) Inhibits growth and has a pro-apoptotic effect on immature B cells.	-2.18	0.01 V
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	3,34	Inducible cyclooxygenase. Involved in the prostaglandins synthesis.	4.24	0.034 V
RRAS	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	-2,56	Protein with oncogenic activity. Is involved in cell migration, formation of focal adhesions and cell shape changes.	-1.27	0.18 NV
SPHK1	sphingosine kinase 1	3,20	Catalyzes the phosphorylation of sphingosine to sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P is a lipid mediator acting both outside and inside cells. Is involved in cellular migration, cellular growth and apoptosis.	6.20	0.004 V
TP53	tumor protein p53	-2,17	TP53 is inactivated in more than 50% of cancers. It is involved in cell growth, apoptosis and DNA repair.	-3.01	0.0005 V
VEGF	vascular endothelial growth factor	3,71	Receptor tyrosine kinase. Pro-angiogenic factor.	2.67	0.02 V

¹Negative number: down-regulation; positive numbers: upregulation. ²Indicated p-values assumed homogeneity of variance. ³V: validated;

NV: not validated. ⁴A call NV was given to this gene because it was found to be also highly expressed in V1 clone.

Table 5. Summary of electromobility shift assay performed on putative ETV6 binding sites.

Probe features →	Binds specifically no protein		Binds proteins only with low specificity		Binds proteins with high specificity		Binds proteins in an ETS core sequence-dependent manner		Binds proteins in an ETS core sequence-independent manner		Binding competed by EBS oligo		Binds proteins differentially with ETV6 express.			
	E-0H	E-4H	697	REH	E-0H	E-4H	697	REH	E-0H	E-4H	697	REH	E-0H	E-4H	697	REH
Probes ↓ Cells ² →	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
AKR1C1-1176	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
AKR1C3-1213					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
IL18-1126					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
IL18-1150-1172					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
LUM-375	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
LUM-401					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PHLDA1+238	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PHLDA1+399					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PTGER4+36					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PTGER4-381					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PTGS2-163-178-187					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PTGS2-397					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SPHK1-1407	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SPHK1-621					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TP53-1671					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TP53-2004					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TP53-279-271					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
VEGF+354					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
VEGF-911					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

¹Refer to table 2 for details. ²E-0H: HeLa/ETV6-56 not induced with doxycycline; E-4H: HeLa/ETV6-56 induced with doxycycline for 4 hours (ETV6 induction). X: feature was observed with the corresponding probe and cell line nuclear extract. Observed features in the same row do not necessarily apply to the same band(s).

Supplementary materials

Table 6. Clinical and molecular data of pre B ALL patients and summary of ETV6-modulated gene expression in their pre-B ALL cells.

Sample ¹	gender	grade	risk	WBC (x 10 ⁹ cells/ml)	12p12-13 LOH†(12;21)	ETV6	AKR1C1	AKR1C3	LUM	PTGER4	TP-53	VEGF	PTGS2	PHLDA1	IL18	SPHK1	
34	M	III	High	<50	+	-	231	nd	nd	321	328	100	nd	14	24	91	100
83	M	IV	Standard	<50	-	-	100	47	139	100	86	70	96	940	27	146	89
381	F	IV	High	<50	-	-	111	32	11	165	121	61	22	74	12	22	56
384	M	III	Standard	<50	-	-	480	400	98	335	636	168	33	111	42	123	141
387	F	IV	High	<50	-	-	128	nd	nd	508	100	152	nd	32	267	701	103
388	M	III	Standard	<50	-	-	103	152	102	100	176	114	84	71	19	34	129
389	M	IV	High	>50	-	-	186	15	47	46	145	104	164	233	100	1075	75
397	F	IV	Standard	<50	-	-	116	nd	nd	77	267	166	nd	1660	454	100	347
392	M	III	Standard	<50	+	+	3	121	39	29	56	95	134	18	57	15	45
400	M	III	High	>50	+	+	2	79	164	21	14	71	242	47	564	8	71
410	F	III	High	>50	+	+	2	53	17	11	49	55	232	100	19	33	31
411	F	III	Standard	<50	-	+	82	nd	nd	120	176	143	nd	4991	136	604	348
413	F	IV	Standard	<50	-	+	27	nd	nd	133	40	113	nd	433	226	109	111
416	M	III	High	<50	+	+	7	138	150	63	51	92	104	205	143	131	66
420	M	III	High	>50	+	+	2	194	214	44	23	73	53	32	164	15	118
B.M.	nd	-	-	-	nd	nd	43	832	120	285	283	20	256	1250	103	951	nd
697	M	-	-	-	nd	nd	47	5	68	0	24	68	154	nd	nd	nd	nd
REH	F	-	-	-	nd	+	0	0	46	0	38	110	122	nd	nd	nd	nd

†: numbers 34 to 420 are pre-B ALL patients' identification number. B.M.: normal bone marrow. 697 and REH are pre-B ALL cell lines.

WBC: white blood cell counts; LOH: loss of heterozygosity; nd: not determined. Expression values shown below the gene symbols were scaled so that the median value was given the arbitrary value of 100 units.

Table 7. Association analyses of ETV6-modulated gene candidate expression with clinical and molecular parameters in pre-B ALL patients.

Parameters	ETV6	AKR1C1AKR1C3	LUM	PTGER4	TP-53	VEGF	PTGS2	PHLDA1	IL18	SPHK1
ETV6 expression [†]	na	0,5476	0,4206	0,0013	0,0047	0,1508	0,1645	0,5135	0,0280	0,0400
Gender	0,9546	0,2667	0,0444	0,3884	1,0454	0,6889	0,1810	0,6889	0,6070	0,6889
Grade	0,1810	0,0167	0,3833	0,2721	0,8639	0,7756	0,1447	0,6070	0,1135	0,9546
Risk	0,6943	0,3524	0,9143	0,5358	0,2319	0,0721	0,4762	0,0939	0,9551	0,6126
WBC	0,1040	0,6095	0,6095	0,0059	0,0557	0,1040	0,1143	0,5714	0,2799	0,2799
LOH	0,0256	0,5476	0,4206	0,0256	0,0663	0,0496	0,1508	0,0256	0,8639	0,0256
t(12;21)	0,0003	0,5476	0,4206	0,0289	0,0037	0,2319	0,1508	0,9551	0,2319	0,1893

[†]: ETV6 expression call was based on samples with LOH+ at locus 12p12-13 and t(12;21)+ as they do

not have any functional ETV6; the detected expression is presumed to be that of non-leukemia contaminating cells.

Values <10 units were considered “not expressed” and ≥10 were given the call “expressed”.

Numbers in the table are p-values obtained from Mann-Whitney non-parametric test. Bold: p-values ≤ 0.05.

WBC: white blood cell counts; LOH: loss of heterozygosity.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. ETV6-inducible HeLa cell lines and time course induction for microarray experiments. A) ETV6 protein expression before (-) and after (+) its induction by the addition of doxycycline (DOX) in the culture medium. Western blots on whole cell extracts from representative inducible clones (#6, 7, 41 and 56) with an ETV6 antibody. B) Induction of ETV6 expression by the addition of doxycycline to the culture medium of V1 (vector alone) and ETV6-56 cell clones. Western blot on whole cell extracts from V1 and ETV6-56 clones isolated at different time points post-induction (0h, 4h, 8h, 12h, 24h and 48h). C). ETV6 expression in V1 and in ETV6-56 cell clones at different time points post-induction with doxycycline as determined by microarray hybridization from 3 different experiments. p60 and p50 represents two ETV6 isoforms.

Figure 2. Stepwise statistical analytical procedure to identify ETV6-modulated genes from microarrays data. A) Description of the analytical filters applied to identify ETV6-modulated genes (see text for details). B) Fold modulation of the genes that came out of the statistical analysis in V1 and ETV6-56 clones. Each dot represents one particular gene plotted on two axes, X-axis for fold modulation in V1 and Y-axis for fold modulation in ETV6-56. Fold modulation is the ratio of the highest (up-regulation) or lowest (down-regulation) value of the time course over the value at 0h. Vertical red lines depict the 2-fold modulation limit in V1 under (down-regulation) or over (up-regulation) which genes show a high modulation in V1 and in the same direction as in ETV6-56. Modulation of genes plotted beyond these limits is not likely to be specific to the induction of ETV6. The diagonal red line depicts a region where modulation is the same in V1 and ETV6-56. Modulation of genes plotted close to this line is likely not to be specific to the induction of ETV6.

Figure 3. Numbers of ETV6-modulated genes in various categories. ETV6-modulated genes were classified by categories based on information available in

Locus Link, Gene, Gene Ontology terms, and on the published literature. Categories containing more than 2 genes are shown and the number of genes in each category is plotted. The "Other" category shows the number of genes that were classified in categories containing less than 3 genes.

Supplementary materials.

Figure 4. Representative ETV6-modulated gene patterns over time.

Expression modulation results over time for genes PTGS2 (up-regulated) and LUM (down-regulated) were obtained by microarrays hybridization and Q RT-PCR in V1 and ETV6-56 clones. Q RT-PCR results come from at least two independent experiments.

Figure 5. Representative results of electromobility shift assays (EMSA).

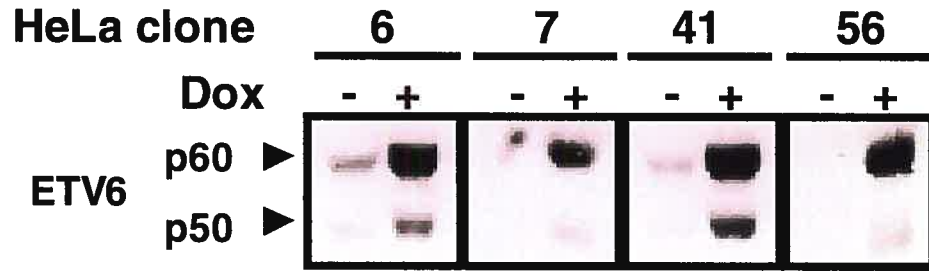
Representative results of EMSA performed with the EBS consensus (A), LUM-401 (B), PHLDA1+399 (C), AKR1C1-1213 (D) or IL18-1150 (E) probes in the indicated nuclear extracts (V1 and ETV6-56 not induced (0H); ETV6-56 4H hours after induction; 697 and Reh cells. The arrows in (C) point to a band doublet that shows differential intensities depending on the cell line.

Figure 6. Expressions of IL18, LUM, PTGER4, TP53 and SPHK1 correlate with that of ETV6 in pre-B leukemia samples.

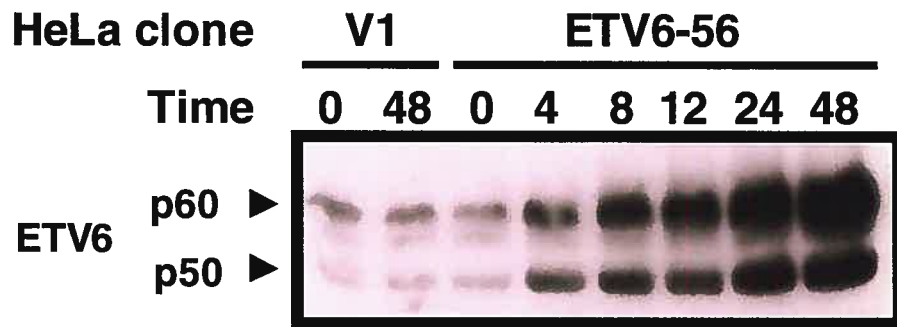
A) Expression of the 10 validated genes as well as that of ETV6 was evaluated by real-time quantitative RT-PCR in pre-B leukemia samples. Relative expression levels (median value of all samples=100) of the indicated genes were plotted in boxplots by groups according to their ETV6 expression status. Squares in the boxes represents the 50th percentile (median), whereas the lower and upper limits of the boxes represent the 25th and 75th percentile, respectively. The lower and upper vertical lines outside of boxes represent the lowest and highest expression values, respectively, lying within the range of 1.5 times the interquartile distance (IQD) (box height) from the boundaries of the boxes. Values with expression distance between 1.5 and 3 times the IQD lower or higher than the boxes (outliers) are depicted by circles and values with expression distance of more than 3 times the IQD lower or higher than the boxes (extremes) are depicted by asterisks. Expression values were

compared between groups (ETV6 expression status) using the Mann-Whitney non-parametric test (p-values shown in the right upper corner of boxplots). Expressions of IL18, LUM, PTGER4, TP53 and SPHK1 showed a direct correlation with that of ETV6. B) Scatter plot of PTGER4 vs ETV6 expression. Each dot represents the expression of one sample and the line represent the calculated trend. Linear regression analysis was performed for all the validated genes. Coefficient of determination (r^2), correlation coefficient (r) and p-value are indicated for PTGER4.

A



B



C

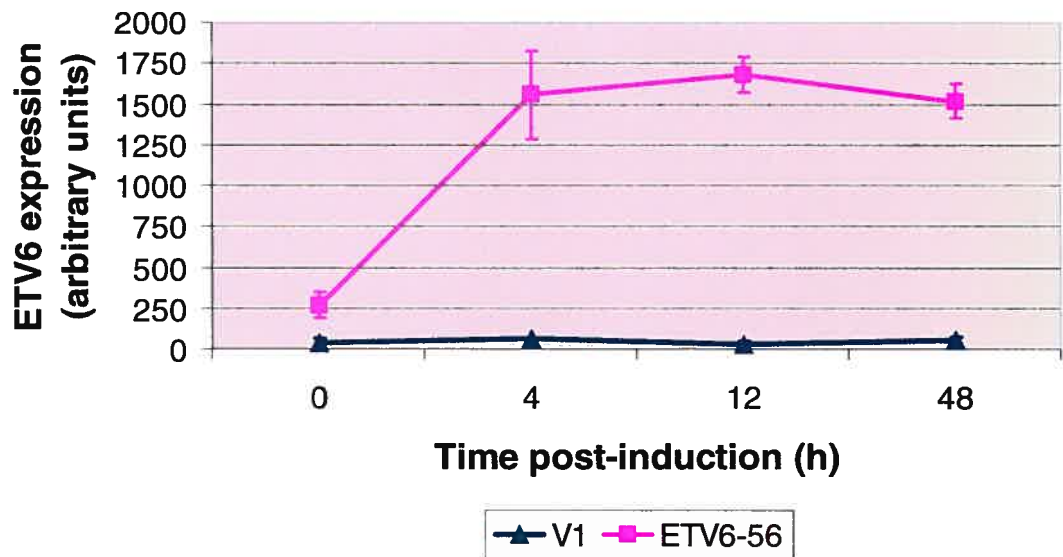


Figure 1

A

**Input: MAS5 mean-scale normalized
microarray data, 22 215 probes**

22 215 probes

**ANOVA on ETV6 data: Keep
probes modulated with time ($p \leq 0.005$)**

818 probes

**Fold modulation:
Keep probes modulated 2X or more**

195 probes

**T-test ETV6 vs vector data: Keep
probes differentially modulated ($p \leq 0.05$)**

102 probes

**Visual discard of probes still presenting
high modulation in control**

Output: 96 probes corresponding to 87 distinct genes

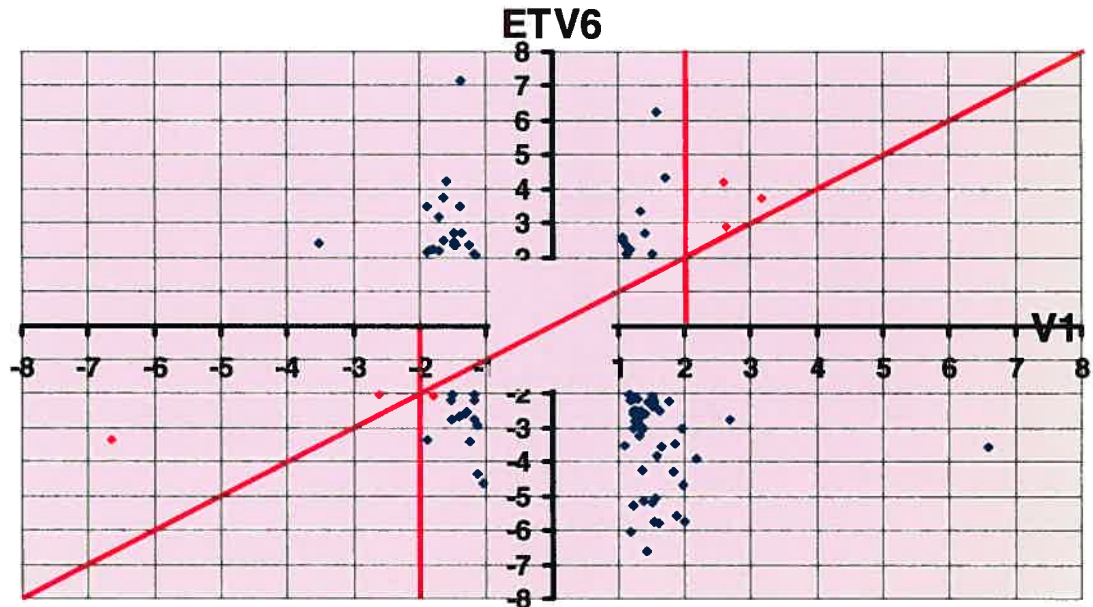
B

Figure 2

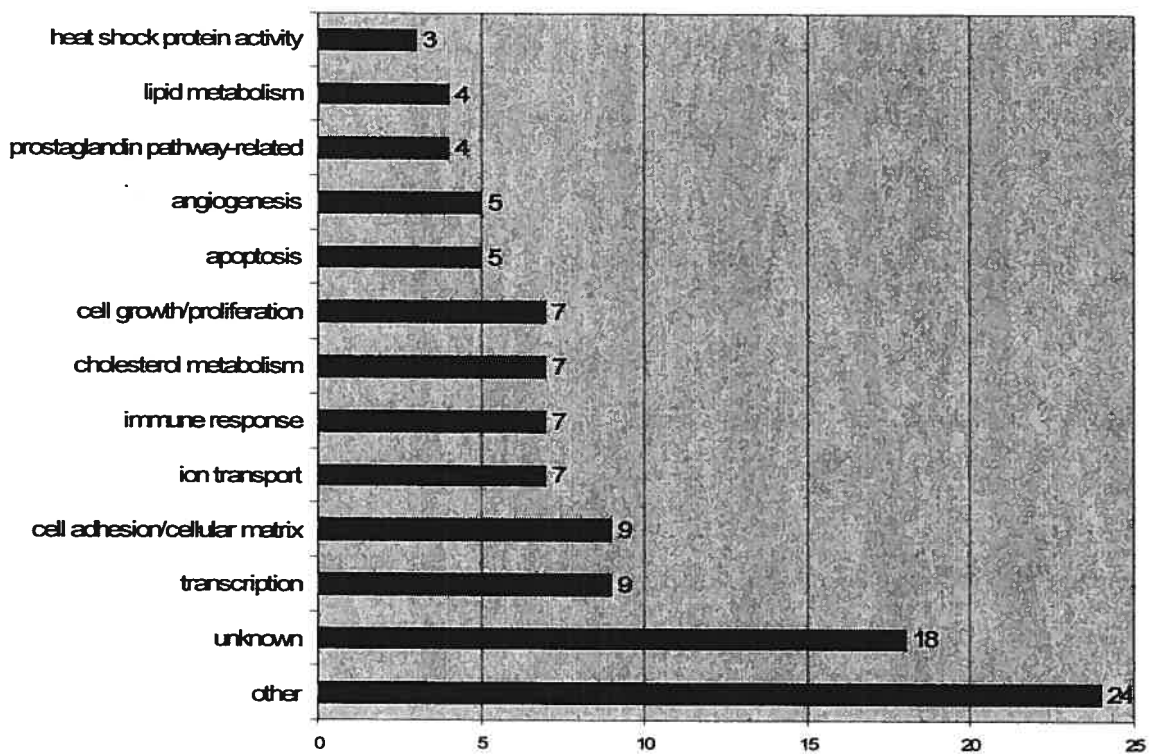


Figure 3

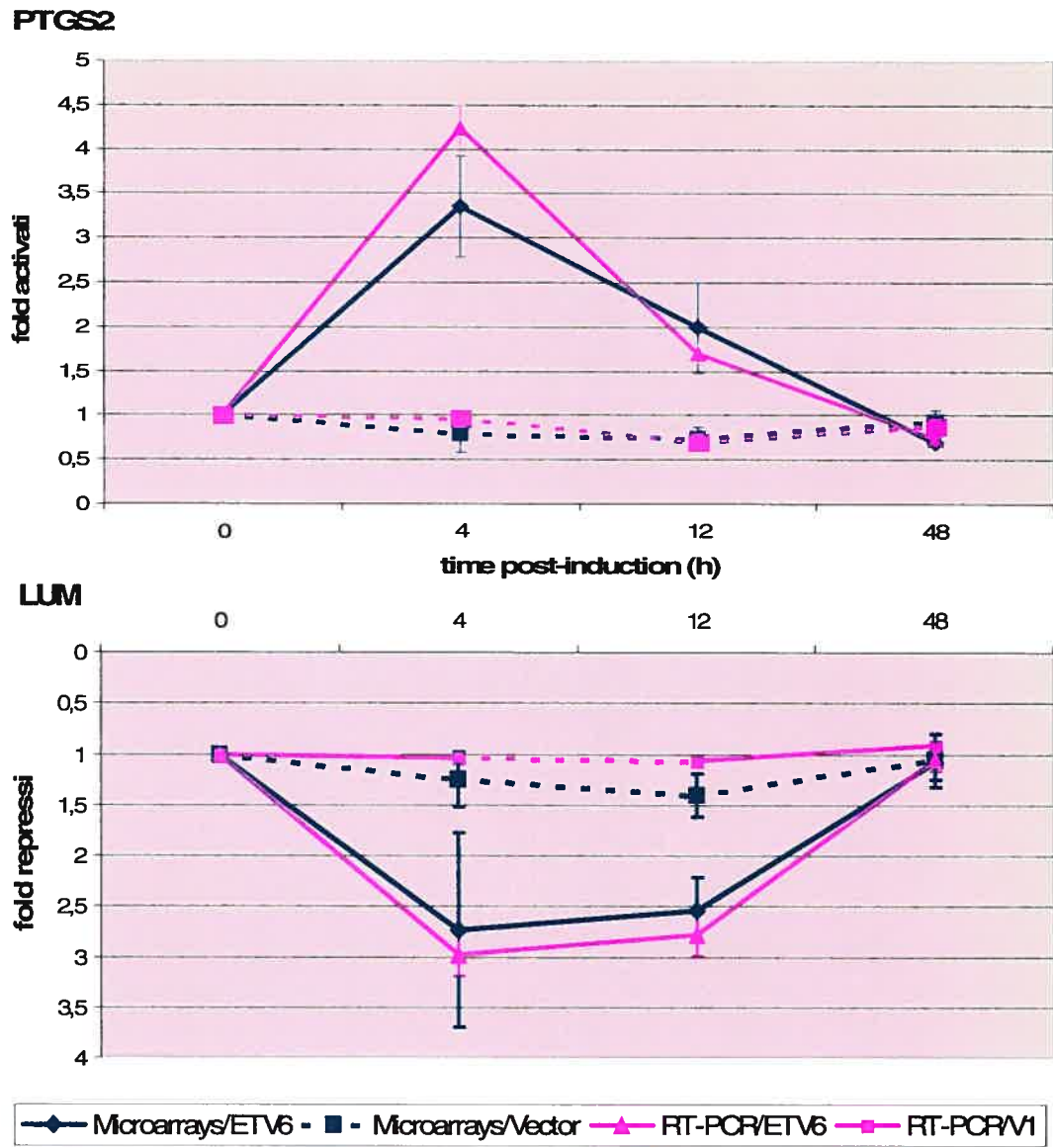


Figure 4

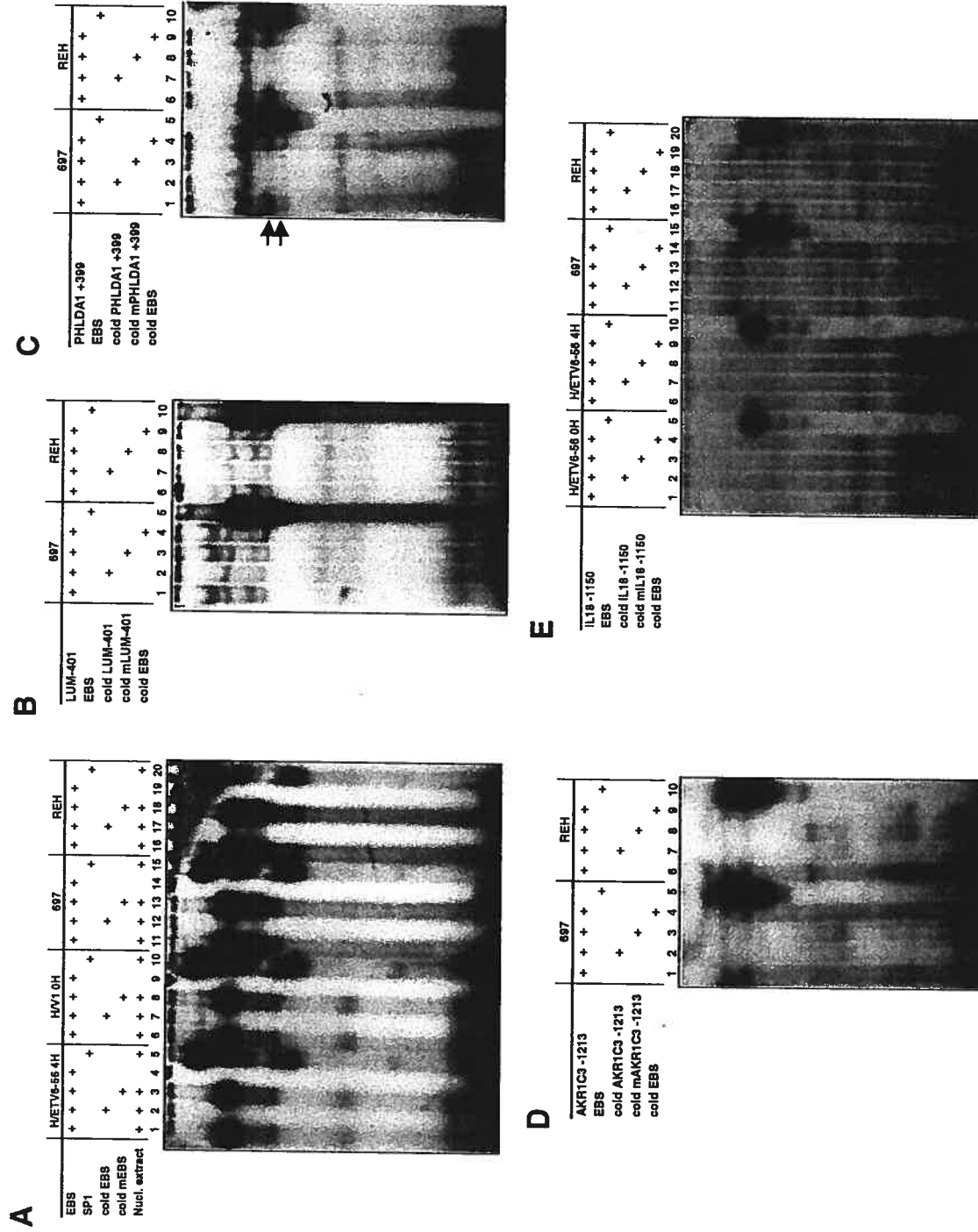
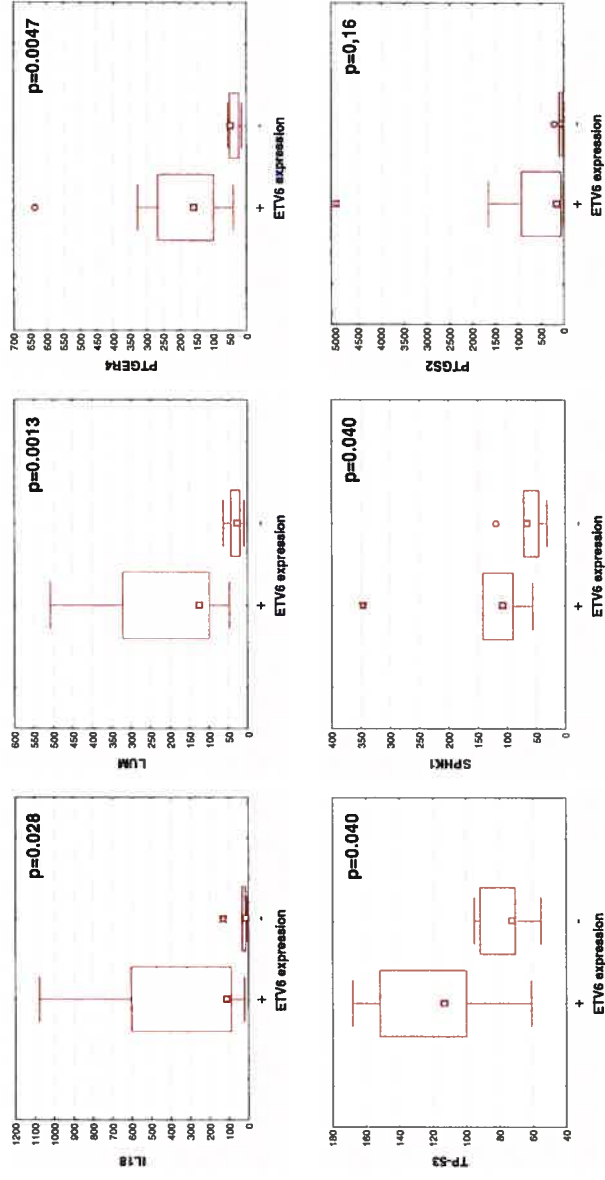


Figure 5

A



B

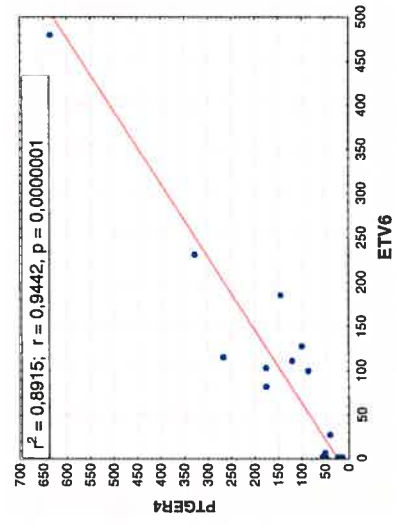


Figure 6

2.5 Étude des connexions entre les gènes modulés par ETV6

Introduction à l'article

Les travaux présentés à la section 2.4 ont identifié 87 gènes modulés par ETV6 selon différents profils dans le temps. Nous avons émis l'hypothèse que les gènes modulés selon un profil similaire partagent des caractéristiques fonctionnelles et moléculaires. Un certain nombre de questions ont été posées dans la présente étude. Les gènes modulés selon un profil similaire : 1) partagent-ils des caractéristiques biologiques communes? 2) présentent-ils des similarités de séquence au niveau de leur promoteur? 3) partagent-ils des éléments cis prédits communs? Y a-t-il des éléments cis prédits qui sont davantage représentés dans le promoteur des gènes modulés par ETV6? Plusieurs outils bio-informatiques ont été utilisés pour regrouper (clustering) les gènes selon différentes approches, notamment la base de données de termes biologiques descriptifs de Gene Ontology, le programme d'alignement de séquence Dialign et le programme de recherche d'éléments cis conservés au cours de l'évolution ConSite. Les regroupements générés à partir des données recueillies par ces différents outils ont été comparés aux regroupements effectués selon l'expression. Nous avons montré que plusieurs gènes, qui étaient regroupés selon les différentes approches décrites, l'étaient aussi selon leur profil d'expression suggérant des critères selon lesquels certains gènes sont co-modulés. Nous avons également montré que des éléments prédits liant des facteurs de transcription de la famille NF-kB étaient sous-représentés dans les promoteurs des gènes modulés par ETV6. P. Beaulieu a programmé des outils bio-informatiques permettant d'utiliser certains outils disponibles sur le web de façon automatique ainsi que des outils de requêtes automatiques, de données, de bases de données publiques et d'organisation de données. Pour ma part, j'ai conçu et effectué toutes les analyses bio-informatiques, en plus de rédiger le manuscrit. D. Sinnett a participé à la conception de l'étude, a supervisé le projet et a participé à la rédaction du manuscrit. Le manuscrit a été soumis à « BMC Bioinformatics ».

Connections between ETV6-modulated genes: an association study

¹Gino Boily, ¹Patrick Beaulieu, ^{1,2}Daniel Sinnett[§]

¹Division of Hemato-oncology, Charles-Bruneau Cancer Center, Research Center, Sainte-Justine Hospital; ²Department of Pediatrics, University of Montreal

[§]Corresponding author

Email addresses:

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Abstract

Background

Accumulating genetic and functional evidence points to ETV6 as being the most probable tumour suppressor gene targeted by the deletions of chromosome 12p12-13 that are observed in various cancers, particularly childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia. We recently reported a list of 87 genes modulated by ETV6, a ubiquitously expressed transcription factor of the ETS family with very few known targeted genes. These ETV6-modulated genes can be divided in a number of groups based on their expression pattern in a timely manner. We asked the question whether genes presenting a similar profile of modulation also share biological features, promoter sequence similarity and/or, transcription factor binding sites (TFBSs).

Results

Using an exploratory approach based on hierarchical clustering expression data, Gene Ontology (GO) terms, sequence similarity or evolutionary conserved putative TFBSs, we found that many genes presenting similar expression profile also share biological features and/or conserved predicted TFBSs but rarely present detectable promoter sequence similarity. These findings suggest that genes sharing similar expression profile are often associated with related functions and also support the combinatorial hypothesis of gene regulation, which propose that combinations of TFs act together on co-regulated genes' regulatory regions. In addition, we compared the proportion of genes presenting any conserved predicted TFBSs of the JASPAR database in the promoter of genes from three gene lists: 1) ETV6-modulated genes, 2) ETV6-non-modulated genes and 3) ETS-regulated genes. We found that the NF- κ B, c-REL and p65 TFBSs, all binding TFs of the REL class, are under-represented in ETV6-modulated genes compared to ETV6-non-modulated genes, whereas Broad-complex 1 tended to be over-represented. NF-Y and Chop/cEBP were over-represented in the promoter of ETV6-modulated genes compared to ETS-regulated genes taken as a whole.

Conclusions

These analyses will help to direct further studies intending to understand the role of ETV6 as a transcriptional regulator and to construct the ETV6-regulating network.

Background

Transcription is one of the main levels of gene expression regulation. Amongst the actors involved in this process, transcription factors (TFs) are trans-elements regulating the rate of transcription of particular genes by binding to cis-acting elements known as transcription factor binding sites (TFBSs). They are thought to act as “bridges” between DNA regulatory regions of target genes and the effectors of the processes involved in transcription. However, the whole repertoire of genes targeted by a TF is not necessarily modulated at the same time or in the same direction. For instance, depending on the cell context, interactions between TFs and their partners will be more or less favourable to modulation of particular genes resulting in specific functional consequences (Alvarez, M et al. 2003).

The mechanisms underlying the co-regulation of subsets of genes are still largely elusive. It is currently thought that particular TFs act together in different combinations and that, depending on these combinations, they coordinately regulate particular groups of genes (e.g. (Nishio, Y et al. 1993; Christoffels, VM et al. 1998)). It is also suggested that combinations of TFs can be found as modules in the promoter of co-regulated genes (Klingenhoff, A et al. 2002). Based on our actual understanding of transcription, it can be hypothesized that some TFs act together in the regulatory region of a limited group of genes leading to the co-regulation of them and eventually, will affect biological processes at the cell, tissue and organism level. If this holds true, one could expect that co-regulated genes will share common features in their promoter.

Since the activities and capacity of interaction of a TF are somewhat limited to its physical and chemical features, it is intuitively expected that its resulting effect will functionally converge on relatively few cellular processes. The combinatorial use of microarray data and Gene Ontology (GO) descriptive biological terms (Ashburner, M et al. 2000) is a suitable approach to provide insights into functions of gene products and has been used in several studies (e.g. (Abba, MC et al. 2005; Patil, MA et al. 2005)). However, it is still not known if genes with similar expression profiles are necessarily associated to similar biological features. If so, one could expect that co-regulated genes will share GO terms.

ETV6 is a TF of the ETS family that is inactivated in childhood pre-B acute lymphoblastic leukemias (Kim, DH et al. 1996; Cave, H et al. 1997; Montpetit, A et al. 2002; Montpetit, A et al. 2004). We have recently identified 87 putative ETV6-modulated genes using an inducible cell system and microarrays in a time course study (Boily, G et al. 2005). Although it is not yet known if these genes are all directly targeted by ETV6, their expression intensity changed upon one stimulus, the induction of ETV6. These genes can be clustered in a number of groups based on the similarity of their expression profiles. What are the mechanisms responsible for the modulation of certain genes in the same amplitude or pattern in time is an interesting question that still remains to be answered. To better understand these mechanisms, we used the ETV6-modulated gene list along with computer-based tools such as ConSite, Dialign and clustering methods to address the following questions. Do genes with similar modulation profiles share: 1) biological features? 2) sequence similarity in their promoter? and/or 3) TFBS in their promoter? We also asked whether some TFBSs are over- or under-represented in ETV6-modulated compared to ETV6 -non-modulated and ETS-regulated genes.

Results

Taking advantage of an ETV6 inducible system and of microarray analysis, we recently reported a list of 87 genes modulated in time (0h, 4h, 12h and 48h)

after the induction of ETV6 (Boily, G et al. 2005). These genes can be clustered in a number of groups based on their modulation profiles. To better understand the mechanisms responsible for the observed co-modulation of ETV6-modulated genes, we assessed whether genes with similar expression modulation, both in amplitude or in pattern, share common features. We addressed this question by performing association studies using a three-step gene clustering strategy depicted in figure 1, which is based on the assumption that genes with similar profiles might share biological features (GO terms), conserved TFBSs and/or promoter sequence similarity. In other words, these relationships should be revealed as co-clusters.

First, we grouped the genes based on their expression modulation over time. We chose hierarchical clustering (HC) over methods such as K-means clustering, because the resulting grouping is exact. In other words the same tree will be obtained over and over if the analysis is repeated with the same data. The resulting expression trees were divided into expression groups, based on visual distances between nodes, and a colour code was assigned to each group (figure 2). Three different distance metrics were used to build the trees, each of them reflecting a conceptually different type of co-modulation (see Materials and Methods). Note that, depending on the distance metrics used, the shape of the tree and genes within groups may be very different (figure 2). To determine whether any of these expression groups share biological features we used Gene Ontology (GO) terms, which is probably the best currently available system to group genes under biological features. The GO project is a collaborative effort that describes gene products into three organizing principles according to their associated biological processes, cellular components and molecular functions (Ashburner, M et al. 2000). To group ETV6-modulated genes based on their biological features, we built binary matrices with the ETV6-modulated genes and GO terms of the 1, 2 or all 3 organizing principles (see Materials and Methods). These matrices were then used for hierarchical clustering, resulting in trees where genes sharing GO terms were closer together (figure 3). To determine whether genes with similar expression profiles share common biological features, GO term trees were compared to expression groups (see figure 2) by assigning an expression group

colour to every gene in the GO term trees (figure 3). Using the Fisher's exact test, we statistically determined whether expression groups were over-represented in any node of the GO term trees (colour) than expected by chance (significant associations are depicted at the bottom of figure 3). Most branches of the GO terms tree are associated with particular expression groups (depicted by the colour codes), suggesting that genes sharing biological features are often co-modulated in similar profiles.

In addition, we also built trees with terms corresponding to each of the GO organizing principles (molecular function, biological process and cell component) taken independently or in combination two by two. A summary of the resulting significant associations are listed in Table 1. Of note, molecular function GO terms based clustering gave rise to fewer associations than the other organizing principles (Table 1). Certain genes often co-clustered together with GO terms and expression. To visualize which genes most frequently co-clustered together, we built a binary matrix with genes as a component and association groups by GO terms as the other component (every group in table 1). This matrix was then used to build a hierarchical tree where genes with both similar expression pattern and biological features were closer in the tree (figure 4A). This tree clearly shows that many genes always co-clustered together: MGC4809, ANXA4 and MYL9; IL18 and C3; VEGF and CXCL2; PPP3CC and NUDT6; ZNF297B and TP53; ZNF81 and ZHX2; NINJ2 and FLRT3; SOX4 and FOXD1 and PHLDA1 and CIRBP. Other genes were never part of any association like C9orf38, FHL1 and IMPA2 for example (figure 4A). Overall, this tree suggests that genes close together in the hierarchy may be co-modulated by ETV6 and participate in related biological features/functions.

To determine the nature of the GO terms responsible for the co-clustering of genes by expression, we selected only the terms related to at least 2 genes in every association groups (table 1). Figure 4B presents the terms involved in the associations by frequency of occurrence. Some terms refer to more general

meaning like “nucleus”, “integral to membrane” or “microsome”, whereas other terms have more specific descriptive value like “cholesterol biosynthesis”, “calcium ion binding” or “immune response”. This analysis suggests that these terms refer to biological concepts linked to the observed expression co-modulation. In an independent analysis we selected the GO terms of the genes that were never part of any association despite the fact that they were shared by a certain number of genes. The following GO terms are those that were shared by at least 2 genes: hydrolase activity (8 genes), signal transduction (6 genes), magnesium ion binding (5 genes), membrane fraction (4 genes), neurogenesis (3 genes), cell differentiation (3 genes), muscle development (3 genes), molecular function unknown (2 genes), biological process unknown (2 genes), extracellular matrix (2 genes), mitochondrion (2 genes) and intracellular signalling cascade (2 genes). This suggests that these terms refer to biological concepts that are less likely to be linked to co-modulation.

To assess whether genes with similar expression profiles share promoter sequences we clustered ETV6-modulated genes according to their promoter sequence (1 kb upstream of exon 1) similarities using the alignment tool Dialign (Morgenstern, B et al. 1998), and then compared this Dialign tree with expression groups obtained in figure 2. Considering the same rationale than above, if co-modulated genes share sequence similarity in their promoter, certain expression groups (colour codes) will be over-represented in a Dialign branch. One large branch was over-represented in genes of the purple group of HP 0h-48h expression clustering (figure 5). Other associations implicating smaller branches and a smaller number of genes were also found (figure 5). Overall, this analysis suggests that a very limited number of co-modulated genes show extended promoter sequence similarity, at least as detected by our approach.

Next we wanted to test the possibility that ETV6-modulated genes share common TFBSs. Because the short and degenerate nature of TFBSs leads to the prediction of high rate of false positive putative binding sites (Wasserman, WW and

Sandelin, A 2004), we applied a phylogenetic footprinting approach that is based on the premise that functionally important elements should be conserved between species or otherwise lost with evolution (reviewed in (Zhang, Z and Gerstein, M 2003)). Toward this goal we chose the software ConSite (Sandelin, A et al. 2004) to identify putative TFBSs conserved between human and mouse. These data were used to build a binary matrix and hierarchical tree, and again, this tree was compared to expression groups depicted in figure 2. As in most GO term trees, almost every branch of the ConSite tree was significantly associated to an expression group (figure 6A). This supports the idea that co-modulation of genes may indeed result from the presence of shared TFBSs in their regulatory region. To identify putative TFBSs that could be responsible for the observed correlations with expression and to potentially identify putative ETV6 transcriptional partners in modulation, we examined the binary table that gave rise to the ConSite tree and selected TFBSs that were detected in the promoter of at least 2 genes of every association group (see figure 6B). Some TFBSs were frequently observed, notably Sox-5, Snail, SQUA, c-FOS, bZIP910 and most interestingly E74A, a known ETS TFBS, which provide a validation of this approach.

Finally, we determined without consideration of expression profiles, whether predicted TFBSs were preferentially associated with promoters of ETV6-modulated genes ETV6 compared to ETV6-non-modulated genes and genes known to be regulated by other human members of the ETS family. All conserved predicted TFBSs in the promoters of the 66 studied ETV6-modulated genes, 100 ETV6-non-modulated genes and 67 ETS-regulated genes were retrieved using ConSite (see Materials and Methods for details). The number of genes containing every TFBS in each gene list was calculated and the proportion of genes containing at least one TFBS was compared between groups using the Fisher's exact test. CF2-II as well as TFs from the NF-kB family (c-REL, NF-kB and p65) were significantly under-represented in the ETV6-modulated group compared to the ETV6-non-modulated genes (Table 2, figure 7). NF-kB and p65 were also under-represented in ETV6-modulated vs ETS-regulated genes. Although we observed an under-representation of Thing1-E47 and RREB-1 in ETV6-modulated genes as compared to ETV6-non-

regulated genes, statistical significance was not reached (Table 2, figure 7). Thing1-E47 trend to be over-represented holds also true for ETS members in general (table 2, figure 7). As compared to ETS-regulated genes, the proportion of ETV6-modulated genes containing Chop-cEBP and NF-Y was higher (table 2, figure 7). Surprisingly, E74A, a TFBS binding ETS TFs, showed a tendency to be under-represented in the ETV6-modulated group compared to ETV6-non-modulated group (table 2, figure 7). However, note that, as opposed to what one could expect, E74A was not over-represented in validated ETS-regulated genes either (table 2, figure 7). Also of interest, the abundance of genes containing the 2 other ETS TFBSs present in the JASPAR database, NRF-2 and SAP-1, were not significantly different in either group (table 2).

Discussion

To better understand the impact of ETV6 alterations in leukemogenesis we need to initiate the construction of the ETV6-related gene regulation networks. Toward this goal, we recently identified 87 ETV6-modulated genes using an approach combining the use of an ETV6-inducible system and microarrays analyses (Boily et al. 2005, submitted). Here, using these putative ETV6 targets we performed *in silico* analyses to assess whether genes with similar expression profiles also share other biological or promoter features. We combined the use of three different methods of clustering to group genes according to their expression because different distance metrics reflect different concepts (Draghici, S 2003). This has been a suitable strategy since, of all the hierarchical trees that were compared to the expression groups, some showed significant associations with either of the three expression groupings, thus revealing closer associations to a more definite type of co-modulation.

We examined whether genes modulated in similar profiles by ETV6 share common biological features based on the expectation that co-regulated genes might encode functionally related proteins (e.g. E2Fs during cell cycle;(Blais, A and

Dynlacht, BD 2004)). Although genes sharing biological features do not all show the same expression profile, we found that many genes closely related by biological features shared a similar expression profile more often than expected by chance. This suggests that ETV6 might indeed regulate genes involved in particular functions. Although this approach was limited by the existing annotation of genes based on GO terms, some of these terms were informative and may bring clues to the functions of ETV6. Of note the term "cell adhesion", a process in which ETV6 is known to participate was identified. On the other hand, other terms such as cholesterol biosynthesis, steroid biosynthesis and isoprenoid biosynthesis or immune system have never been associated before to ETV6.

The combinatorial hypothesis of gene transcription regulation is the basis of many approaches to understand regulation. This was well illustrated in a study performed in *S. cerevisiae* to decipher regulatory networks by searching for combinations of TFBSs in the promoter of genes and by evaluating the overall similarity of expression profile of genes containing any given combination (Pilpel, Y et al. 2001). Different approaches have been developed to find modules of TFs in the promoter of different genes that could be responsible for their regulation (Klingenhoff, A et al. 2002). However, characterization of functional TFBSs is still far from being exhaustive because most studies rely on predictions. Recently, it has been proposed that phylogenetic footprinting might be a suitable approach to decrease false positive predictions while keeping most true ones (Lenhard, B et al. 2003). Using this approach we identified genes presenting similar TFBSs in their promoter region and sharing similar expression profiles thus supporting the combinatorial hypothesis. Taken together these observations support the notion that genes sharing a similar profile of modulation in a particular context can be involved in related biological functions. This is in agreement with the idea that particular combinations of TFs act together on regulatory regions of genes to modulate them in a similar profile. In other words, TFs would bind their respective binding sites in the regulatory region of genes that would then be modulated in a similar way. The common TFBSs would have been conserved through evolution, which would assure the co-regulation of the genes in given biological pathways or

molecular mechanisms thus allowing association between co-modulation and biological features.

Interestingly, TFBSs of AML1 and of two Sox family members, Sox-5 and SOX17, were found in the promoter of genes that shared expression profiles. AML1 was previously shown to interact and to regulate transcription together with members of the ETS family of TFs (Ito, Y 1999; Lacorazza, HD and Nimer, SD 2003). There are also evidence that ETS TFs can cooperate with Sox4 and Sox2 to regulate transcription (McCracken, S et al. 1997; Haremaki, T et al. 2003). In addition, we found that three conserved TFBSs of the REL class, p65, c-REL and NF-kappaB, were under-represented in the promoter of the ETV6-modulated genes relative to ETV6-non-modulated genes. NF-kappaB and c-REL were also under-represented in ETV6-modulated genes compared to ETS-regulated genes. The meaning of this finding is not clear but it suggests that ETV6-modulated genes are in general less subject to NF-kB regulation. NF-kB family of TFs are involved in numerous molecular functions including inhibition of apoptosis, proliferation, cell adhesion and angiogenesis (Baldwin, AS 2001). Chop-cEBP and NF-Y were over-represented in ETV6-modulated genes compared to ETS-regulated genes, and the TFBS Broad-complex 1 showed a tendency to be over-represented in ETV6-modulated genes compared to ETV6-non-modulated genes. Chop/Gadd153 participate in endoplasmic reticulum stress and cell growth arrest (Oyadomari, S and Mori, M 2004). It can heterodimerize with C/EBP and represses its binding to common class sites but bind as a heterodimer on other binding sites (Ubeda, M et al. 1996). NF-Y is a CAAT binding TFs that act on a wide range of promoters (Mantovani, R 1998). Broad-complex 1 is a Drosophila TFs involved in the tissue-specific response to ecdysone (von Kalm, L et al. 1994). These data warrant further studies of the ETV6-modulated gene promoters to delineate the ETV6-related regulation network.

Conclusions

We found that gene expression profiles were often associated with biological features and conserved TFBSs but poorly associated to promoter sequence similarity. In this regard we observed that some TFBSs are under-represented in the promoter region of ETV6-modulated genes, notably those of the NF- κ B family, and that other TFBSs, like Chop-cEBP and NFY, are over-represented in ETV6-modulated genes compared to ETS-regulated genes as a whole. This study reveals some biological features that may be functionally relevant to understand the function of ETV6 and that TFBSs might act in combination with ETV6 to participate in co-modulation of genes.

Methods

Gene lists

The ETV6-modulated gene list was generated from a global expression analysis performed at different time points (0h, 4h, 12h, and 48h) following induction of ETV6 in HeLa cells (Boily, G et al. 2005). The use of stringent filters allowed us to find 87 ETV6-modulated genes (Boily, G et al. 2005). These genes and expression data are the basis of the computer-based analyses in this paper. Two other gene lists were used for comparative analyses. First, ETV6-non-modulated genes are a random selection of 100 genes from our microarrays analysis with no association with ETV6 state of expression (ANOVA p-values > 0.5): ALDH1A2, AOC3, AP1G2, ATP6M, B4GALT1, C8orf1, CACNA2D3, CACNB2, CENPF, COL14A1, CYP2A6, DAB2, DACH, DC12, DCN, DJ462O23.2, DKFZP547E1, E1B-AP5, E2F1, EEF1B2, EMK1, ERPROT213-21, EST1109, EST1355, EST1953, EST205, EST2121, EST2198, EST29, EST677, EST744, EST886, EST988, F2RL2, FEM1B, FLJ12847, FLJ13842, FLJ20087, FLJ20552, FOSL2, FSP-2, G7C, GAB1, GPM6B, GPR57, HAIK1, HNRPH1, HNRPU, HOXD12, HRMT1L3, IGHM, IL24, ITGB5, KCNC4, KIAA0130, KIAA0136, KIAA0450, KIAA0685, KIAA0737, KIAA0863, KIAA0931, KIAA1025, LOC51622, MADH5, MCCC2, MEF2C, MGC14258, MGC19595, MGC2650, MGC2668, MRPL42, NESP55, NR2E3, OSBPL2, PPP2R5C, PRO2714, PRSS8, RABGGTB, RAI15, RAPSN, RBBP9, RGS14, RPA2, SCAND2, SDR1, SET, SFRS4,

SLC25A12, SLC35A3, SNX10, STAT2, TM4SF4, TNXB, TRIM14, TRIP3, TUBA1, UCP1, VASA, XPNPEP2, YWHAZ. Second, ETS-regulated genes are a random selection of human ETS TFs target genes listed in (Sementchenko, VI and Watson, DK 2000): BTK, CCND1, CD79B, CD8A, CDC2, CDH5, CSF2RA, DEFA1, DEFA3, EGR1, ENO3, ERBB2, ERF, F3, F9, FCER1A, FES, FLI1, FLT1, GP1BA, GP5, GP9, HBP17, ICAM1, IGJ, IL1B, IL2RB, IL3, IL3RA, IL5, IL8RA, ITGA4, ITGAL, ITGB2, ITGB4, LCK, LCP1, MAGEA1, MCL1, MMP1, MMP3, MSR1, MYB, NCF1, NEFL, NFKB1, NUDT6, PLAU, PPBP, PRF1, PRKCH, PSEN1, RPL32, SCYA5, SCYA7, SERPINB5, SFRS5, SPI1, SPRR1A, SPRR2A, TBP, TGFBR2, TIMP1, TNC, TNFRSF6, VIM, VWF.

Clustering by gene expression data

Hierarchical clustering of ETV6-modulated genes based on expression data was done using three different methods, each one providing different conceptual information (Draghici, S 2003). The first method used data at 0h, 4h, 12h and 48h and Pearson correlation distances; the second method used the same data but Euclidean distances; whereas the third one considered data at 0h and 4h only, with Euclidean distances. With the first method, genes modulated in the same direction under a similar pattern over time are grouped together whereas in the second method, genes modulated in similar intensities over time, but not necessarily in the same direction, are clustered closer to each other. The third method allowed us to consider mostly early modulation events. Genes were assigned to groups based on their proximity in the trees and a colour code was assigned to each group. Most groups were obviously discriminated because their node was separated enough from other nodes to allow unambiguous grouping but in some cases, closely related sub-branches were considered both separated and together in the analyses and different colour codes were assigned to these larger nodes. All clustering were performed with the GeneLinker Gold software version 4.0 (Improved Outcomes Software, Inverary, ON, Canada).

Clustering by Gene Ontology (GO) terms .

For all genes studied, GO terms corresponding to various organizing principles (molecular function, biological process and cell component), were retrieved from the GO database (Ashburner, M et al. 2000). Binary matrices were built with genes as one component and GO terms from 1, 2 or 3 organizing principles as the other component. The value 1 was given when a term was assigned to a gene and 0 when it was not. These matrices were used for hierarchical clustering with Pearson correlation distances so that the more particular genes were sharing GO terms, the closer they were in the hierarchical tree. All clustering were performed with the GeneLinker Gold software version 4.0 (Improved Outcomes Software, Inverary, ON, Canada).

Clustering by and evolutionary conserved putative transcription factor binding site (TFBS).

For TFBSs hierarchical trees, sequence corresponding to 3 kb upstream and 0.5 kb downstream of the transcriptional start site from mouse and human (Genbank database) were submitted to ConSite (mordor.cgb.ki.se/cgi-bin/CONSITE/consite) (Sandelin, A et al. 2004) to find putative TFBSs conserved between both species. Orca method (implemented in ConSite) was used for alignment of sequences, analysis was done for all individual TFs, and default settings were used for conservation cutoff (variable), window size (50) and TF score threshold (80%). A binary matrix was built with genes as one component and all the retrieved TFBSs as the other component. The value 1 was given when a conserved predicted TFBS was found in the particular gene and 0 when it was not. This matrix was used for hierarchical clustering with Pearson correlation distances so that the more particular genes shared conserved putative TFBSs, the closer they were in the hierarchical tree. All clustering were performed with the GeneLinker Gold software version 4.0 (Improved Outcomes Software, Inverary, ON, Canada).

Promoter sequence similarity clustering

When data was available in GenBank, up to one kb of sequence upstream of exon 1 of the ETV6-modulated genes was submitted to Dialign (Morgenstern, B et al. 1998) for promoter sequence alignment. Dialign (www.genomatix.de/) has the option to give back coordinates, which were used to build a hierarchical tree by using the Phylip program (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).

Representation of conserved predicted TFBSs in ETV6-modulated genes

The proportion of genes presenting any TFBSs in the 5' region (3 kb upstream and 0.5 kb downstream of the transcriptional start site) of the ETV6-modulated gene list was compared to that of ETV6-non-modulated and ETS-regulated gene lists. All putative TFBSs of the 5' region conserved between mouse and human were retrieved for all genes of the 3 gene lists using ConSite as mentioned above (see *Clustering by GO and by conserved TFBS*). The proportion of genes presenting every particular TFBS that were found by ConSite was calculated for the three gene lists and compared statistically in a pairwise manner (Fisher's exact test).

Authors' contributions

GB conceived and designed the study, performed all the clustering and grouping analyses and drafted the manuscript; PB conceived and programmed tools to automatically retrieve data from public databases; DS participated in the conception and supervision of the study and helped to draft the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research CIHR (grant number MOP-14108). DS is a scholar of the Fonds de Recherche en

Santé du Québec (FRSQ). DS holds the François-Karl Viau research chair in pediatric oncogenomics. GB received studentships from the FRSQ, the Programme de Biologie Moléculaire of the University of Montreal and the Toronto Dominion Bank (Faculté des Études Supérieures of the University of Montreal).

References

- Abba, MC, Y Hu, H Sun, JA Drake, S Gaddis, K Baggerly, A Sahin and CM Aldaz (2005). Gene expression signature of estrogen receptor alpha status in breast cancer. BMC Genomics **6**(1): 37.
- Alvarez, M, SJ Rhodes and JP Bidwell (2003). Context-dependent transcription: all politics is local. Gene **313**: 43-57.
- Ashburner, M, CA Ball, JA Blake, D Botstein, H Butler, JM Cherry, AP Davis, K Dolinski, SS Dwight, JT Eppig, MA Harris, DP Hill, L Issel-Tarver, A Kasarskis, S Lewis, JC Matese, JE Richardson, M Ringwald, GM Rubin and G Sherlock (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet **25**(1): 25-9.
- Baldwin, AS (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. J Clin Invest **107**(3): 241-6.
- Blais, A and BD Dynlacht (2004). Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. Curr Opin Genet Dev **14**(5): 527-32.
- Boily, G, J Larose, P Beaulieu, S Langlois and D Sinnett (2005). Identification of transcripts modulated by ETV6, a putative tumor suppressor gene associated to childhood leukemia. Blood (**submitted**).
- Cave, H, V Cacheux, S Raynaud, G Brunie, M Bakkus, P Cochaux, C Preudhomme, JL Lai, E Vilmer and B Grandchamp (1997). ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. Leukemia **11**(9): 1459-64.
- Christoffels, VM, T Grange, KH Kaestner, TJ Cole, GJ Darlington, CM Croniger and WH Lamers (1998). Glucocorticoid receptor, C/EBP, HNF3, and protein kinase A coordinately activate the glucocorticoid response unit of the carbamoylphosphate synthetase I gene. Mol Cell Biol **18**(11): 6305-15.
- Draghici, S (2003). Data analysis tools for DNA microarrays. London, New-York, Boca Raton.
- Haremaki, T, Y Tanaka, I Hongo, M Yuge and H Okamoto (2003). Integration of multiple signal transducing pathways on Fgf response elements of the *Xenopus* caudal homologue Xcad3. Development **130**(20): 4907-17.

- Ito, Y (1999). Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. Genes Cells **4**(12): 685-96.
- Kim, DH, RL Moldwin, C Vignon, SK Bohlander, Y Suto, L Giordano, R Gupta, S Fears, G Nucifora and JD Rowley (1996). TEL-AML1 translocations with TEL and CDKN2 inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines. Blood **88**(3): 785-94.
- Klingenhoff, A, K Frech and T Werner (2002). Regulatory modules shared within gene classes as well as across gene classes can be detected by the same in silico approach. In Silico Biol **2**(1): S17-26.
- Lacorazza, HD and SD Nimer (2003). The emerging role of the myeloid Elf-1 like transcription factor in hematopoiesis. Blood Cells Mol Dis **31**(3): 342-50.
- Lenhard, B, A Sandelin, L Mendoza, P Engstrom, N Jareborg and WW Wasserman (2003). Identification of conserved regulatory elements by comparative genome analysis. J Biol **2**(2): 13.
- Mantovani, R (1998). A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. Nucleic Acids Res **26**(5): 1135-43.
- McCracken, S, CS Kim, Y Xu, M Minden and NG Miyamoto (1997). An alternative pathway for expression of p56lck from type I promoter transcripts in colon carcinoma. Oncogene **15**(24): 2929-37.
- Montpetit, A, G Boily and D Sinnett (2002). A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus. Eur.J.Hum.Genet. **10**(1): 62-71.
- Montpetit, A, J Larose, G Boily, S Langlois, N Trudel and D Sinnett (2004). Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia. Leukemia **18**(9): 1499-504.
- Morgenstern, B, K Frech, A Dress and T Werner (1998). DIALIGN: finding local similarities by multiple sequence alignment. Bioinformatics **14**(3): 290-4.
- Nishio, Y, H Isshiki, T Kishimoto and S Akira (1993). A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. Mol Cell Biol **13**(3): 1854-62.

- Oyadomari, S and M Mori (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ **11**(4): 381-9.
- Patil, MA, MS Chua, KH Pan, R Lin, CJ Lih, ST Cheung, C Ho, R Li, ST Fan, SN Cohen, X Chen and S So (2005). An integrated data analysis approach to characterize genes highly expressed in hepatocellular carcinoma. Oncogene **24**(23): 3737-47.
- Pilpel, Y, P Sudarsanam and GM Church (2001). Identifying regulatory networks by combinatorial analysis of promoter elements. Nat Genet **29**(2): 153-9.
- Sandelin, A, WW Wasserman and B Lenhard (2004). ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W249-52.
- Sementchenko, VI and DK Watson (2000). Ets target genes: past, present and future. Oncogene **19**(55): 6533-48.
- Ubeda, M, XZ Wang, H Zinzner, I Wu, JF Habener and D Ron (1996). Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. Mol Cell Biol **16**(4): 1479-89.
- von Kalm, L, K Crossgrove, D Von Seggern, GM Guild and SK Beckendorf (1994). The Broad-Complex directly controls a tissue-specific response to the steroid hormone ecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. Embo J **13**(15): 3505-16.
- Wasserman, WW and A Sandelin (2004). Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. Nat Rev Genet **5**(4): 276-87.
- Zhang, Z and M Gerstein (2003). Of mice and men: phylogenetic footprinting aids the discovery of regulatory elements. J Biol **2**(2): 11.

Table 1. Summary of significant associations found between expression and GO term trees.

Hier. Clust. Pearson 0H-48H		Hier. Clust. Euclid. 0H-48H		Hier. Clust. Euclid. 0H-4H	
Genes	Associated terms	Genes	Associated terms	Genes	Associated terms
All GO terms					
CIRBP	-transcription factor activity	ABCC3	-ATP bonding	AKR1C1	-transferase activity
FOXD1	-regulation of transcription	ANXA4	-intracellular	HMGCS1	-cytoplasm
GABPB2	DNA-dependent	CAMKK2	-golgi apparatus	OASL	
KLF4	-nucleus	G6PC	-calcium ion binding	CLIC3	-signal transduction
PHLDA1		GPR147	-integral to membrane	PPP2R2B	-chloride transport
PTGS2		KCNAB2	-transport	SLC12A3	-ion transport
SOX4		LIM2	-transporter activity		-membrane fraction
ABCC3	-immune response	MGC4809			
AKR1C1	-ATP binding	MYL9			
AKR1C3	-intracellular	PKD2L1			
ANXA4	-transferase activity	SEC14L1			
CAMKK2	-calcium ion binding	SLC7A4			
CROT	-lipid metabolism	TMEFF1			
DHCR7	-cytoplasm	APBA1	-cell adhesion		
FDFT1	-trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-	FLRT3	-protein binding		
G6PD	diol dehydrogenase	KBTBD4	-integral to plasma membrane		
HMGCS1	-aldo-keto reductase activity	LDLR	-receptor activity		
HSD17B7	-electron transporter activity	MSR1	-lipid transporter activity		
IDI1	-binding	NINJ2			
KCNAB2	-fatty acid metabolism	PTPRF			
MGC4809	-metabolism				
MYL9	-sterol biosynthesis				
OASL	-peroxisome				
PECR	-endoplasmic reticulum				
PTGER4	-integral to membrane				
SC4MOL	-steroid biosynthesis				
SEC14L1	-oxidoreductase activity				
SQLE	-isoprenoid biosynthesis				
	-cholesterol biosynthesis				
	-magnesium ion binding				
	-transport				
	-transporter activity				
	-microsome				
GO molecular function terms					
FOXD1	-protein binding	ANXA4	-calcium ion binding	ANXA4	-calcium ion binding
GABPB2	-zinc ion binding	LDLR		LDLR	
KLF4	-transcription factor activity	MGC4809		MGC4809	
PTPRF		MYL9		MYL9	
SOX4		PKD2L1		PKD2L1	
GO biological process terms					
DNAJB1	-response to unfolded proteins	FOXD1	-regulation of transcription,	FOXD1	-regulation of transcription,
HSPA1B	-protein folding	SOX4	DNA-dependent	SOX4	DNA-dependent
FOXD1	-regulation of transcription,	AKR1C3	-isoprenoid biosynthesis	DHCR7	-cholesterol biosynthesis
GABPB2	DNA-dependent	FDFT1	-cholesterol biosynthesis	HMGCS1	
SOX4		IDI1		C3	-immune response
ABCC3	-transport	C11orf8	-neurogenesis	IL18	-G-protein coupled receptor
CROT	-sterol biosynthesis	FLRT3	-cell adhesion	OASL	protein signaling
HSD17B7	-fatty acid metabolism	NINJ2		PTGER4	
PECR	-metabolism	C3	-immune response		
SC4MOL		IL18	-G-protein coupled receptor		
SEC14L1		OASL	protein signaling		
SOX4		PTGER4			
AKR1C3	-lipid metabolism				
DHCR7	-isoprenoid biosynthesis				
FDFT1	-cholesterol biosynthesis				
HMGCS1					
IDI1					
LDLR					
GO cell component terms					
CIRBP	-nucleus	ABCC3	-integral to plasma membrane	ABCC3	-nucleus
FOXD1		DTR	-membrane fraction	DTR	
GABPB2		FLRT3		FLRT3	
KLF4		LDLR		LDLR	
PHLDA1		NINJ2		NINJ2	
PTGS2		NINJ2		NINJ2	
PTPRF		SLC12A3		SLC12A3	
SOX4					

Table 1. (Continued)

Hier. Clust. Pearson 0H-48H		Hier. Clust. Euclid. 0H-48H		Hier. Clust. Euclid. 0H-4H	
Genes	Associated terms	Genes	Associated terms	Genes	Associated terms
GO cell component terms (Continued)					
CAMKK2 SEC14L1 SMURF	-intracellular	DHCR7 SC4MOL AKR1C1 HMGCS1 OASL VEGF CXCL2	-endoplasmic reticulum -integral to membrane -cytoplasm -soluble fraction	G6PC GPR147 SLC7A4 TMEFF1 HMGCS1 OASL C3 IL18 VEGF CXCL2 SMURF1 CAMKK2	-integral to membrane -cytoplasm -extracellular -soluble fraction -intracellular
GO molecular function + biological process terms					
DNAJB1 HSPA1B ASB9 DHCR7 FDFT1 G6PD HSD17B7 IDI1 SC4MOL SQLE FOXD1 GABPB2 KLF4 PTPRF SOX4	-response to unfolded protein -protein folding -isoprenoid biosynthesis -cholesterol biosynthesis -magnesium ion binding -steroid biosynthesis -oxidoreductase activity -metabolism -sterol biosynthesis -transcription factor activity -regulation of transcription, DNA-dependent -protein binding	CROT HMGCS1 OASL ABCC3 G6PC SEC14L1 SLC7A4 CLIC3 PPP2R2B SLC12A3 FDFT1 IDI1 DHCR7 G6PD SC4MOL ANXA4 LDLR LPIN1 MGC4809 MYL9 PKD2L1 SMURF1 ABPA1 CRSP2 FLRT3 FOXD1 KBTBD4 MSR1 NINJ2 PTPRF SOX4 TP53 ZHX2 ZNF297B ZNF81 C3 IL18 PTGER4	-transferase activity -transport -transporter activity -signal transduction -chloride transport -ion transport -isoprenoid biosynthesis -cholesterol biosynthesis -magnesium ion binding -oxidoreductase activity -molecular function unknown -calcium ion binding -zinc ion binding -transcription factor activity -regulation of transcription, DNA-dependent -cell adhesion -protein binding -neurogenesis -DNA binding -receptor activity -immune response -G-protein coupled receptor protein signaling	FDFT1 G6PD IDI1 SC4MOL FOXD1 SOX4 C3 IL18 PTGER4	-isoprenoid biosynthesis -cholesterol biosynthesis -magnesium ion binding -oxidoreductase activity -transcription factor activity -regulation of transcription, DNA-dependent -immune response -G-protein coupled receptor protein signaling
GO molecular function + cell component terms					
CIRBP FOXD1 KLF4 PHLDA1 PTGS2 SOX4	-nucleus -transcription factor activity	CIRBP PHLDA1	-nucleus	CIRBP PHLDA1	-nucleus

Table 1. (Continued)

Hier. Clust. Pearson 0H-48H		Hier. Clust. Euclid. 0H-48H		Hier. Clust. Euclid. 0H-4H	
Genes	Associated terms	Genes	Associated terms	Genes	Associated terms
GO molecular function + cell component terms (Continued)					
NUDT6 PPP3CC	-hydrolase activity	FOXD1 SOX4	-nucleus -transcription factor activity	ZNF81 ZHX2	-nucleus -zinc ion binding -transcription factor activity
GPR147 TMEFF1 LIM2 SLC7A4	-integral to membrane	DTR MSR1	-integral to plasma membrane -receptor activity	FOXD1 SOX4	-nucleus -transcription factor activity
DHCR7 FDFT1 HSD17B7 SC4MOL	-endoplasmic reticulum -integral to membrane -oxidoreductase activity	GPR147 LIM2 SLC7A4 TMEFF1	-integral to membrane	NUDT6 PPP3CC	-hydrolase activity
SEC14L1 SMURF1	-intracellular	ANXA4 CAMKK2 LDLR MGC4809 MYL9 PKD2L1	-calcium ion binding	DTR MSR1	-integral to plasma membrane -receptor activity
				HMGCS1 OASL	-transferase activity -cytoplasm
				C3	-extracellular
				IL18	
				GPR147 LIM2 SLC7A4 TMEFF1	-integral to membrane
				ANXA4 CAMKK2 LDLR MGC4809 MYL9 PKD2L1	-calcium ion binding
GO biological process + cell component terms					
CIRBP FOXD1 GABPB2 PHLDA1 SOX4	-nucleus -regulation of transcription, DNA-dependent	CIRBP PHLDA1	-nucleus	CIRBP PHLDA1	-nucleus
DNAJB1 HSPA1B	-response to unfolded protein -protein folding -nucleus	CLIC3 SLC12A3	-chloride transport -ion transport -membrane fraction	CLIC3 CRSP2 FLRT3	-chloride transport -ion transport -membrane fraction
DHCR7 FDFT1 HSD17B7 SC4MOL	-metabolism -endoplasmic reticulum -integral to membrane -steroid biosynthesis -cholesterol biosynthesis	C11orf8 FLRT3 NINJ2	-neurogenesis -cell adhesion -integral to plasma membrane	HSPA1B LPIN1 NINJ2 SLC12A3 TREX1	-nucleus -cell adhesion -integral to plasma membrane
CHST3 PKD2L1	-integral to membrane				
GPR147 LIM2	-integral to membrane				
CAMKK2 SEC14L1 SMURF1	-intracellular				

Table 2 - Proportion of genes in ETV6-modulated, ETV6-non-modulated and ETS-regulated groups containing any particular conserved predicted TFBS in their promoter.

Conserved cis-element (ConSite)	Number of genes (%)			Fisher's exact test p-value		
	ETV6+	ETV6-	ETS+	ETV6+ vs ETV6-	ETV6+ vs ETS+	ETV6- vs ETS+
E74 ¹	29 (44)	58 (58)	34 (51)	0.08	0.49	0.43
Broad-complex 1	13 (20)	9 (9)	9 (13)	0.061	0.36	0.45
CF2-II	2 (3)	14 (14)	8 (12)	0.029	0.1	0.82
Chop-cEBP	9 (14)	11 (11)	2 (3)	0.47	0.03	0.078
c-REL	9 (14)	28 (28)	14 (21)	0.036	0.36	0.36
Hen-1	4 (6)	12 (12)	2 (3)	0.28	0.44	0.047
HFH-1	5 (8)	16 (16)	3 (4)	0.15	0.49	0.025
NF-kappaB	4 (6)	18 (18)	15 (22)	0.034	0.012	0.55
NF-Y	13 (20)	14 (14)	5 (7)	0.39	0.045	0.22
p65	2 (3)	16 (16)	10 (15)	0.0095	0.03	1.00
RREB-1	0 (0)	5 (5)	1 (1)	0.076	1.00	0.4
Thing1-E47	19 (29)	44 (44)	16 (24)	0.052	0.56	0.0087
NRF-2 ¹	5 (8)	13 (13)	9 (13)	0.31	0.40	1.0
SAP-1 ¹	7 (11)	11 (11)	12 (18)	1.0	0.32	0.25

¹: Member of the ETS family of transcription factors. ETV6+: ETV6-modulated genes, ETV6-: ETV6-non-modulated genes, ETS+: ETS-modulated genes. Bold: p-value < 0.1, grey-shaded: p-value ≤ 0.05.

Figures

Figure 1 - Schematic representation of the three-step clustering strategy.

Step 1: ETV6-modulated genes are clustered according to their expression profiles in time. Step 2: The same genes were clustered based on their biological features using GO terms, the promoter sequence similarity using Dialign or the predicted human-mouse conserved TFBSs found in the corresponding promoters using ConSite. Step 3: Expression groups obtained in step 1 are statistically tested for over-representation in any branches of either tree generated in step 2.

Figure 2 - Hierarchical clustering of ETV6-modulated genes by expression profiles.

ETV6-modulated genes clustered based on their expression at 0h, 4h, 12h and 48h (A and B) or 0h and 4h (C) after induction of ETV6 (Boily, G et al. 2005). Clusterings were performed using either Pearson correlation distances (A) or Euclidean distances (B and C). Pearson correlation distance is a metric considering pattern over intensity whereas the Euclidean distance considers intensity over pattern. The trees were divided in groups based on the distance between branches and a colour was assigned to every gene according to its own group (colour below gene symbols). When individual groups were relatively closer together, another colour was assigned to the node of their branch (coloured squares on the tree) and these groups were considered individually and altogether in the analyses.

Figure 3 - Hierarchical clustering of ETV6-modulated genes according to GO terms and associations with expression groups

Colour codes below gene symbols identify the corresponding hierarchical clustering expression group observed by: 1) Pearson (HP) correlation distances at 0h, 4h, 12h and 48h (HP 0h-48h); 2) Euclidean (HE) distances at 0h, 4h, 12h and 48h (HE 0h-48h) and; 3) Euclidean distances at 0h and 4h (HE 0h-4h) (see figure

2). Expression groups are shown in several rows to represent all the possible group divisions: for each expression clustering, bottom row shows the colours of all individual groups; in rows above, closely related clusters grouped together under the colour of the new node (see figure 2). Values at the bottom are Fisher's exact test p-values applicable for the node pointed by the arrow right above the square and the expression clustering method indicated on the left (numbers). The colour assigned to the p-value indicates the group over-represented in the branch. The yellow rectangles contour the genes that are part of nodes where a significant over-representation is observed.

Figure 4 - Co-clustering of genes by expression and GO terms and frequency of occurrence of terms involved in the associations

A. All associations between expression and GO terms (table 1) were used to build a hierarchical tree in which the more genes co-cluster together, the closer they are in the tree. B. Terms involved in the associations (table 1) were counted and plotted by frequency of occurrence.

Figure 5 - Hierarchical clustering of ETV6-modulated genes by promoter sequence similarity and associations with expression groups

ETV6-modulated genes were clustered based on their promoter sequence similarity using Dialign. Dialign offers the possibility to generate coordinates for subsequent building of a hierarchical tree. This tree was built using the program Phylip. Colour codes below the gene symbols identify the expression group of the corresponding gene as follows: 1) hierarchical clustering, Pearson correlation distances, data 0h, 4h, 12h and 48h (HP 0h-48h), 2) hierarchical clustering, Euclidean distances, data 0h, 4h, 12h and 48h (HE 0h-48h) and 3) hierarchical clustering, Euclidean distances, data 0h and 4h (HE 0h-4h) (see figure 2). Expression groups are shown in several rows to represent all the possible group divisions presented in figure 1: for each expression clustering, bottom row shows the colours of all individual groups; in rows above, closely related clusters grouped together under the colour of the new node (see figure 2). Values below the tree are

Fisher's exact test p-values applicable for the node pointed by the arrow right above the square and the expression clustering method indicated on the left (numbers). The colour assigned to the p-value indicates the group over-represented in the branch. The yellow rectangles contour the gene colours that are part of nodes where a significant over-representation is observed.

Figure 6 - Hierarchical clustering of ETV6-modulated genes by conserved putative TFBSs found in their promoter and associations with expression groups

ETV6-modulated genes were clustered based on the putative TFBSs found in their promoter that were conserved between human and mouse using ConSite. Colours below the gene symbols identify the expression group of the corresponding gene as follows: 1) hierarchical clustering, Pearson correlation distances, data 0h, 4h, 12h and 48h (HP 0h-48h), 2) hierarchical clustering, Euclidean distances, data 0h, 4h, 12h and 48h (HE 0h-48h) and 3) hierarchical clustering, Euclidean distances, data 0h and 4h (HE 0h-4h) (see figure 2). Expression groups are shown in several rows to represent all the possible group divisions presented in figure 1: for each expression clustering, bottom row shows the colours of all individual groups; in rows above, closely related clusters grouped together under the colour of the new node (see figure 2). Values below the tree are Fisher's exact test p-values applicable for the node pointed by the arrow right above the square and the expression clustering method indicated on the left (numbers). The colour assigned to the p-value indicates the group over-represented in the branch. The yellow rectangles contour the gene colours that are part of nodes where a significant over-representation is observed.

Figure 7 - Relative over/under-representation of conserved putative TFBSs in ETV6-modulated, ETV6-non-modulated and ETS-regulated genes

Each points of the triangle represent one of the studied gene lists, ETV6-modulated genes (ETV6+), ETV6-non-modulated genes (ETV6-) and ETS-regulated genes (ETS+). Each side of the triangle is divided in two halves, each

closer to one of the two adjacent angles. TFBSs are indicated in the half closer to the gene list in which it is over-represented relative to the gene list closer to the other half. TFBSs in squares are significantly over/under-represented in the gene list and underlined TFBSs show a tendency but do not reach the significance threshold ($0.05 < p \leq 0.1$; see table 2).

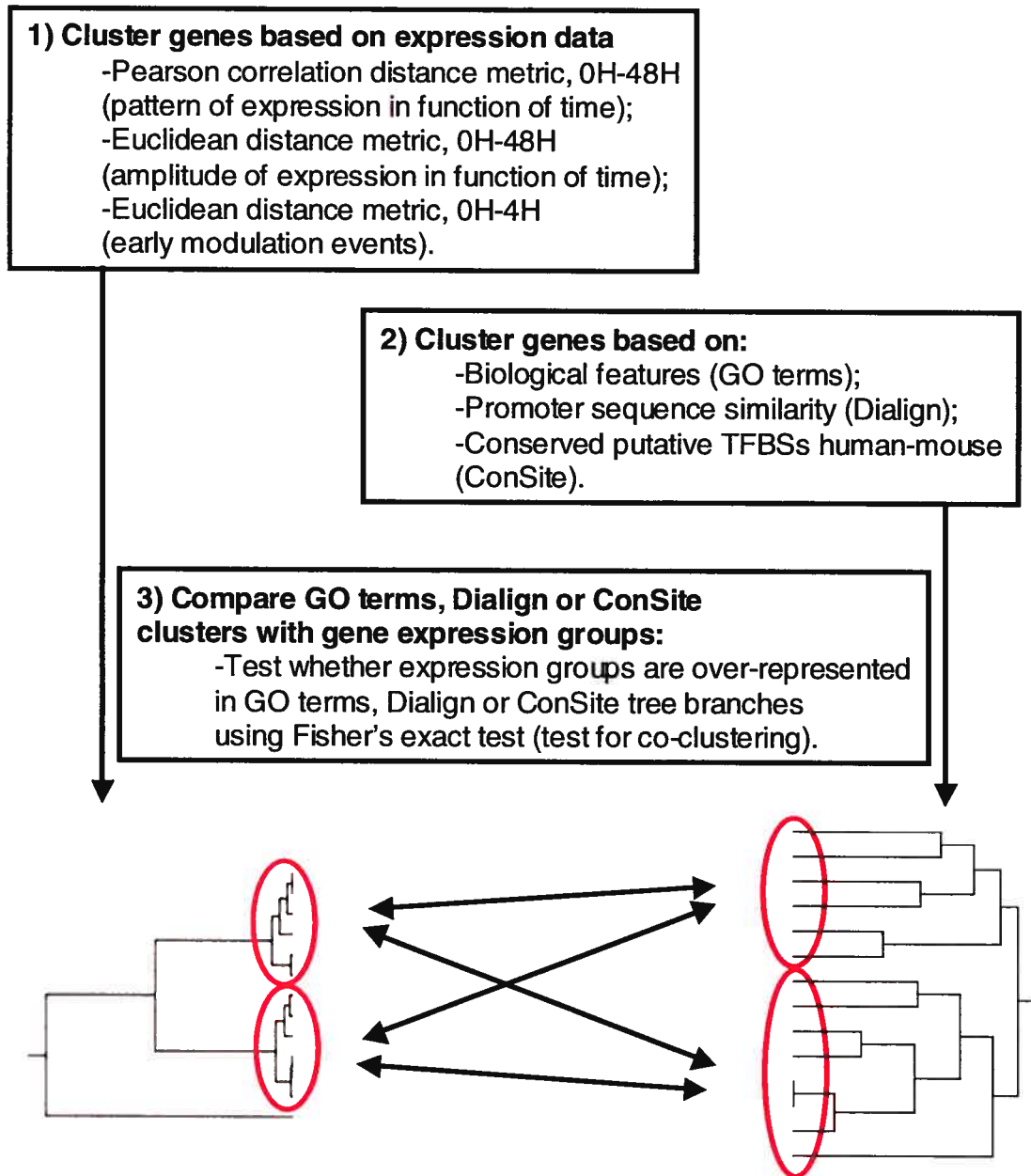


Figure 1

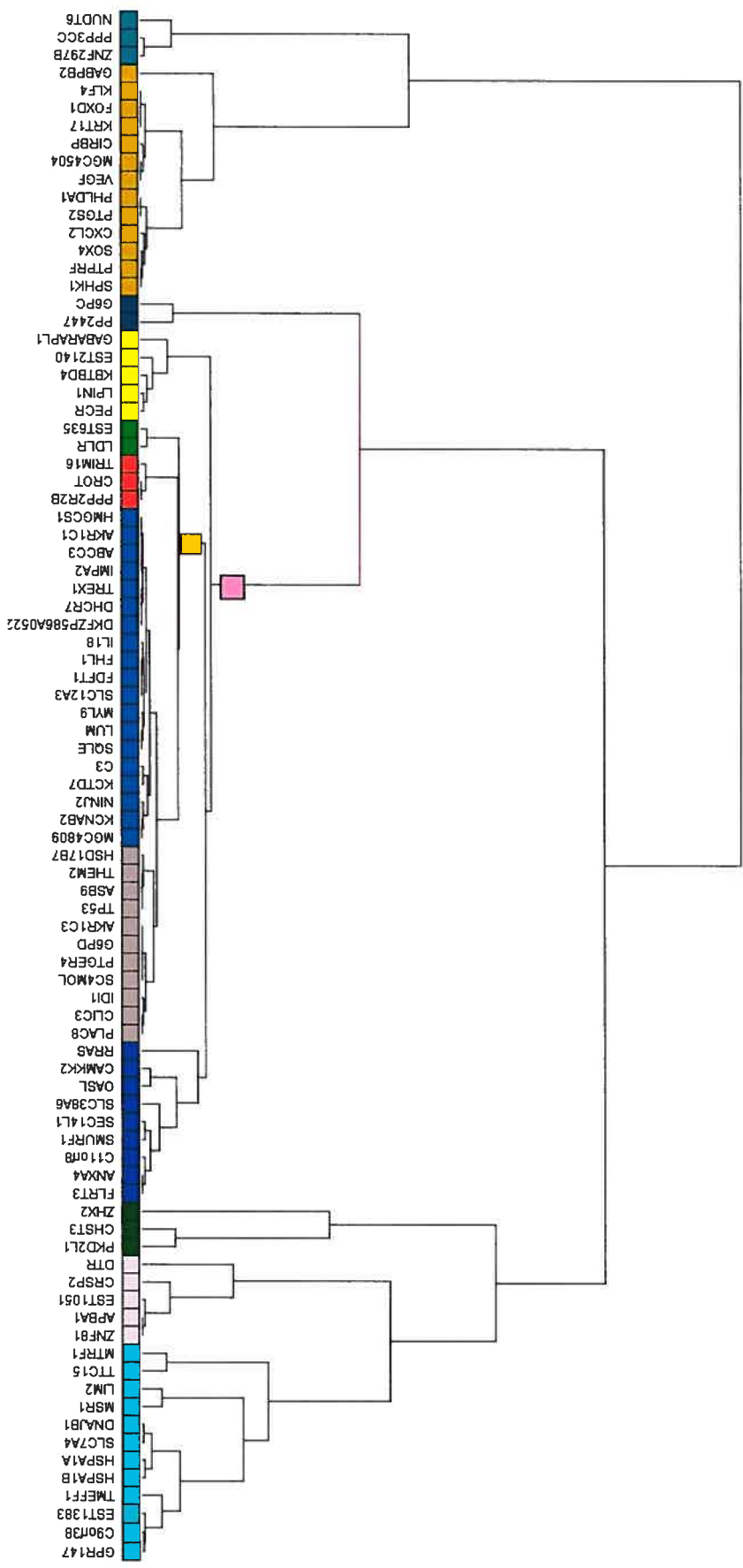


Figure 2A

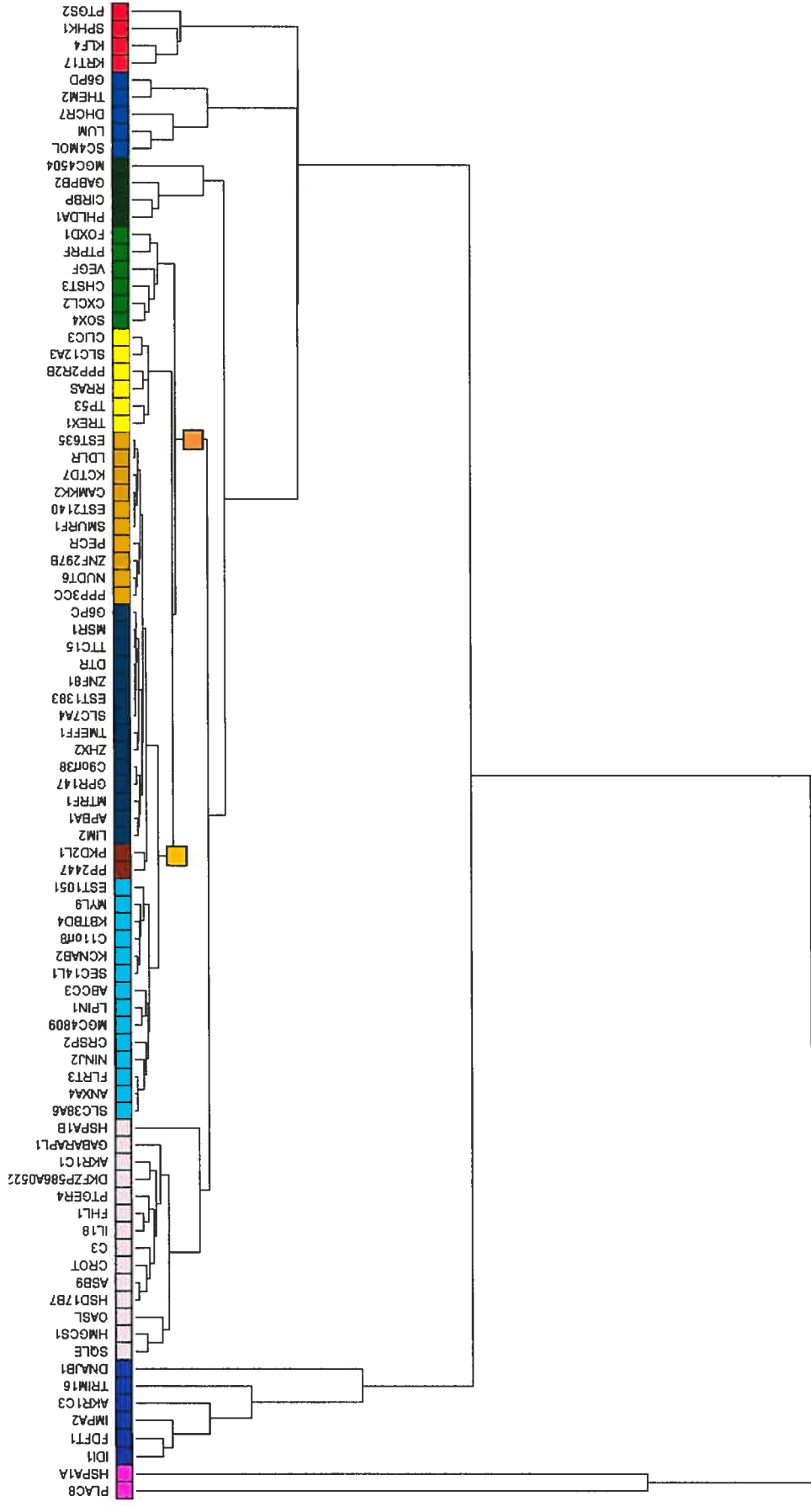


Figure 2B

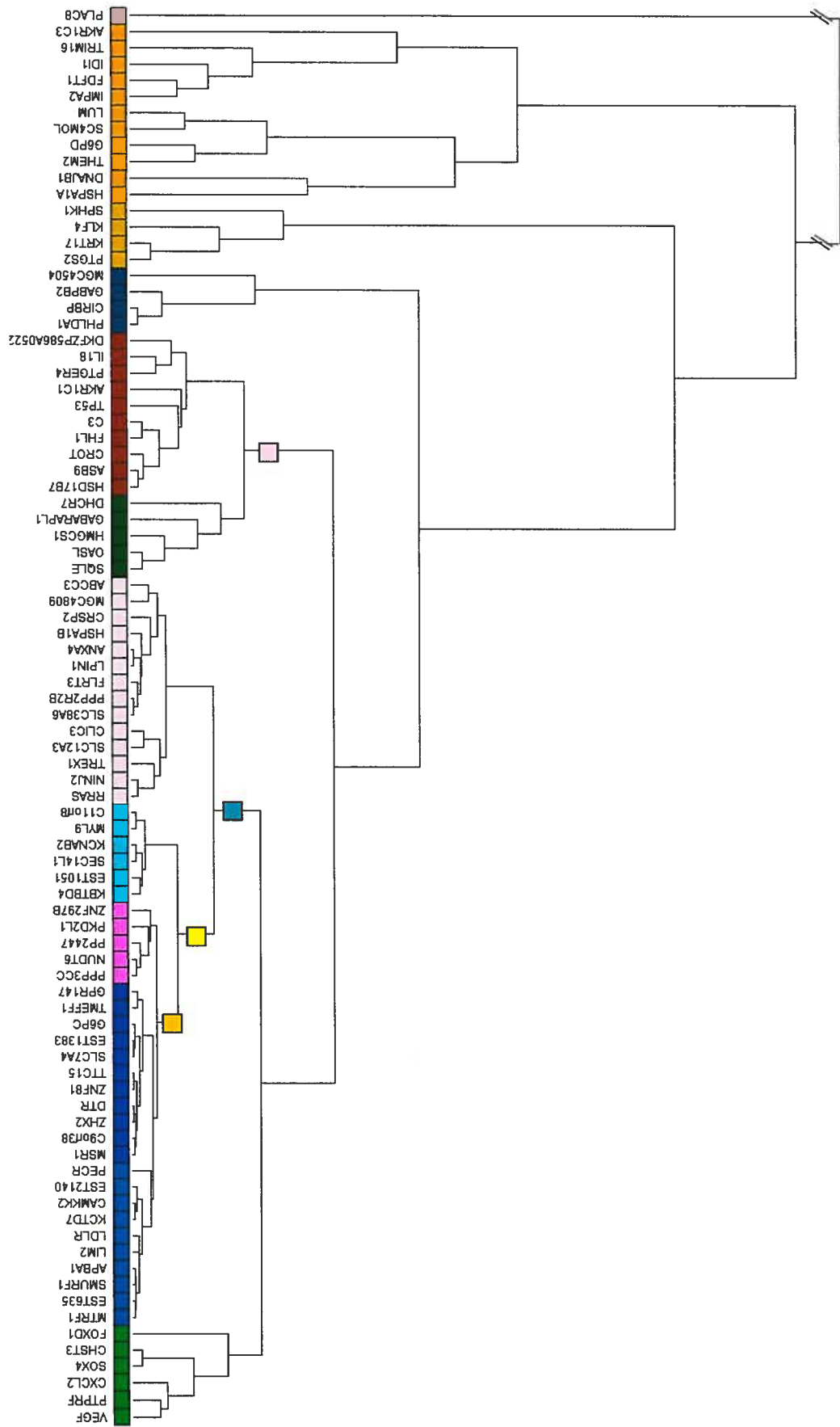


Figure 2C

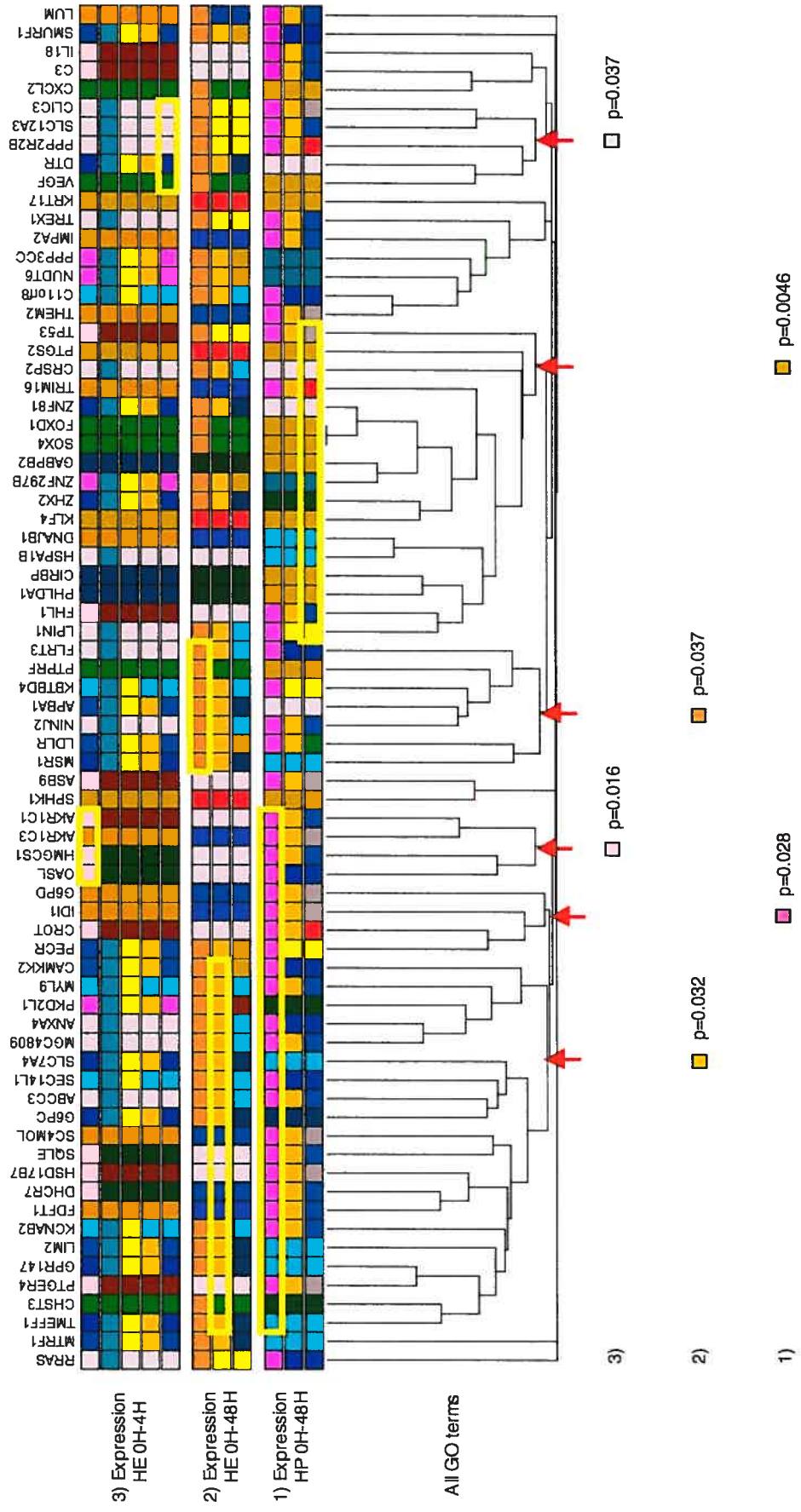
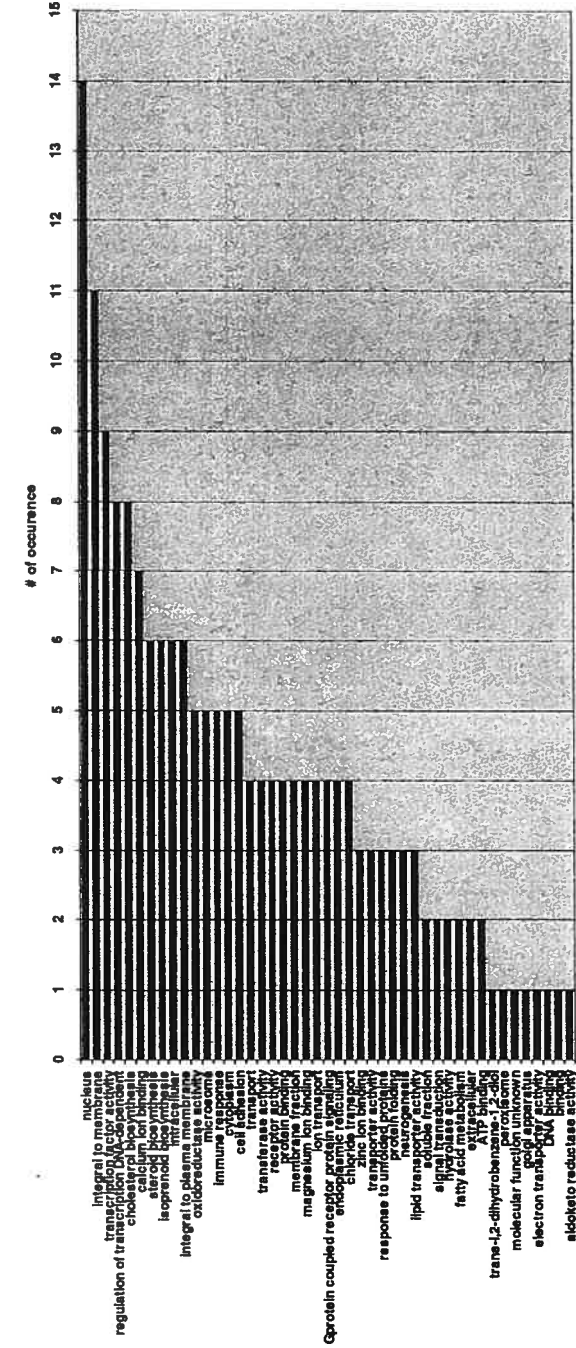
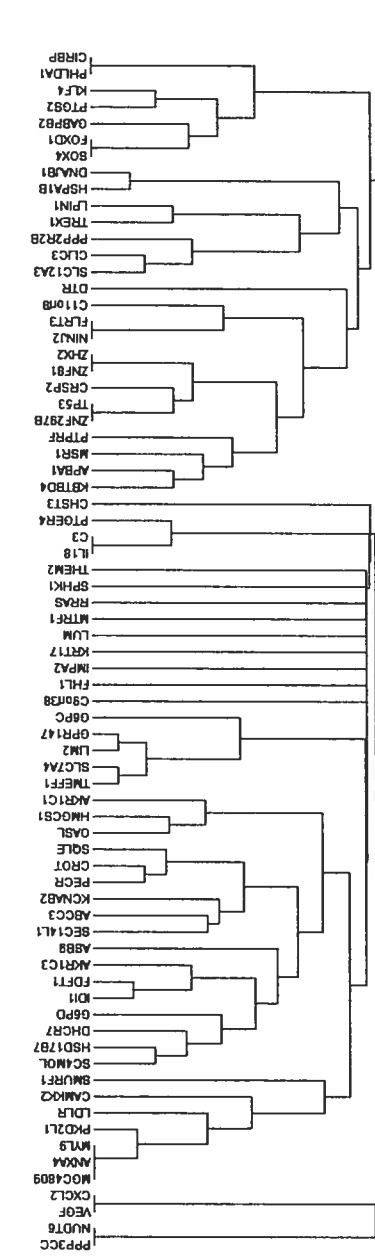


Figure 3



A

B

Figure 4

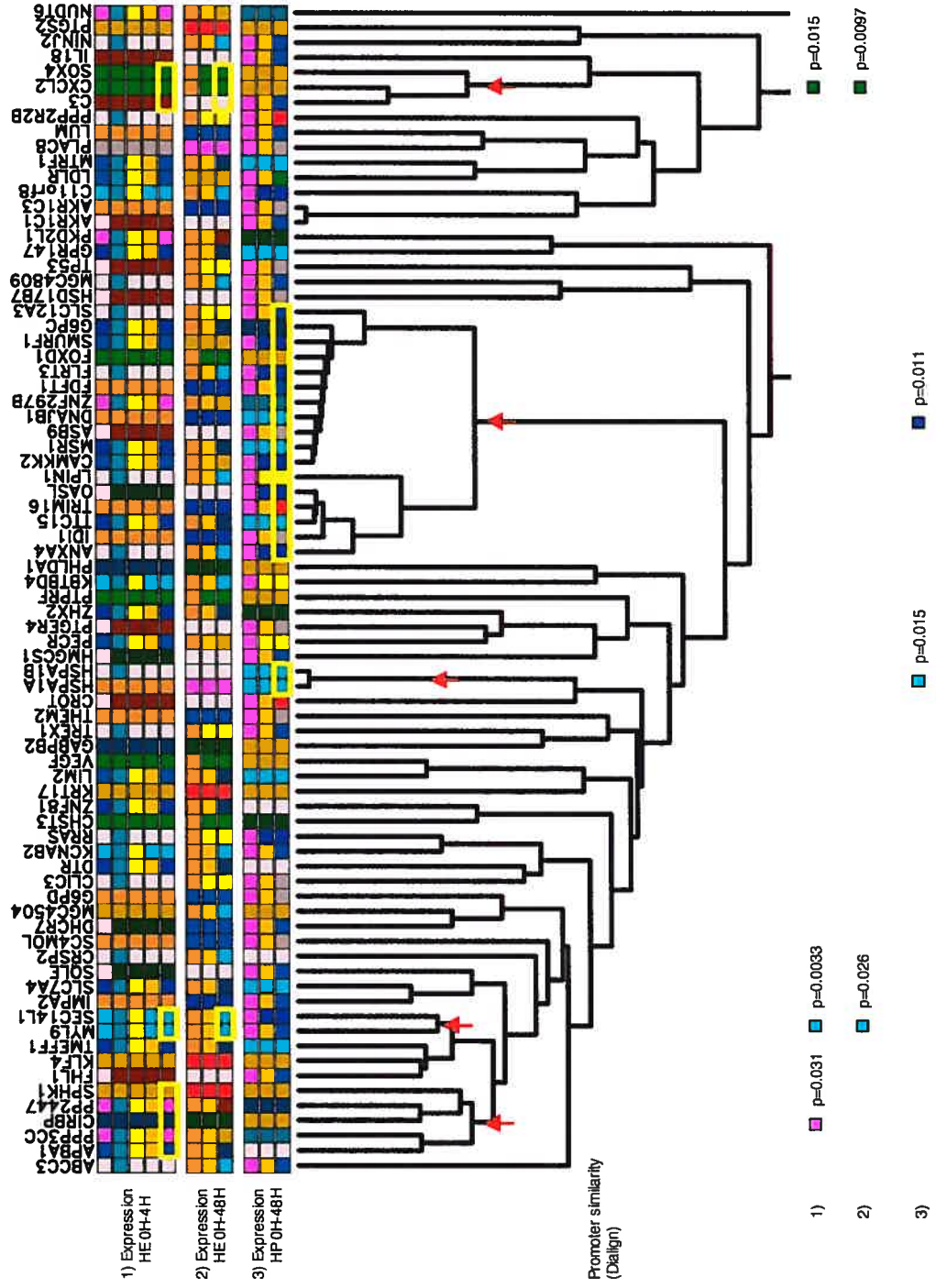


Figure 5

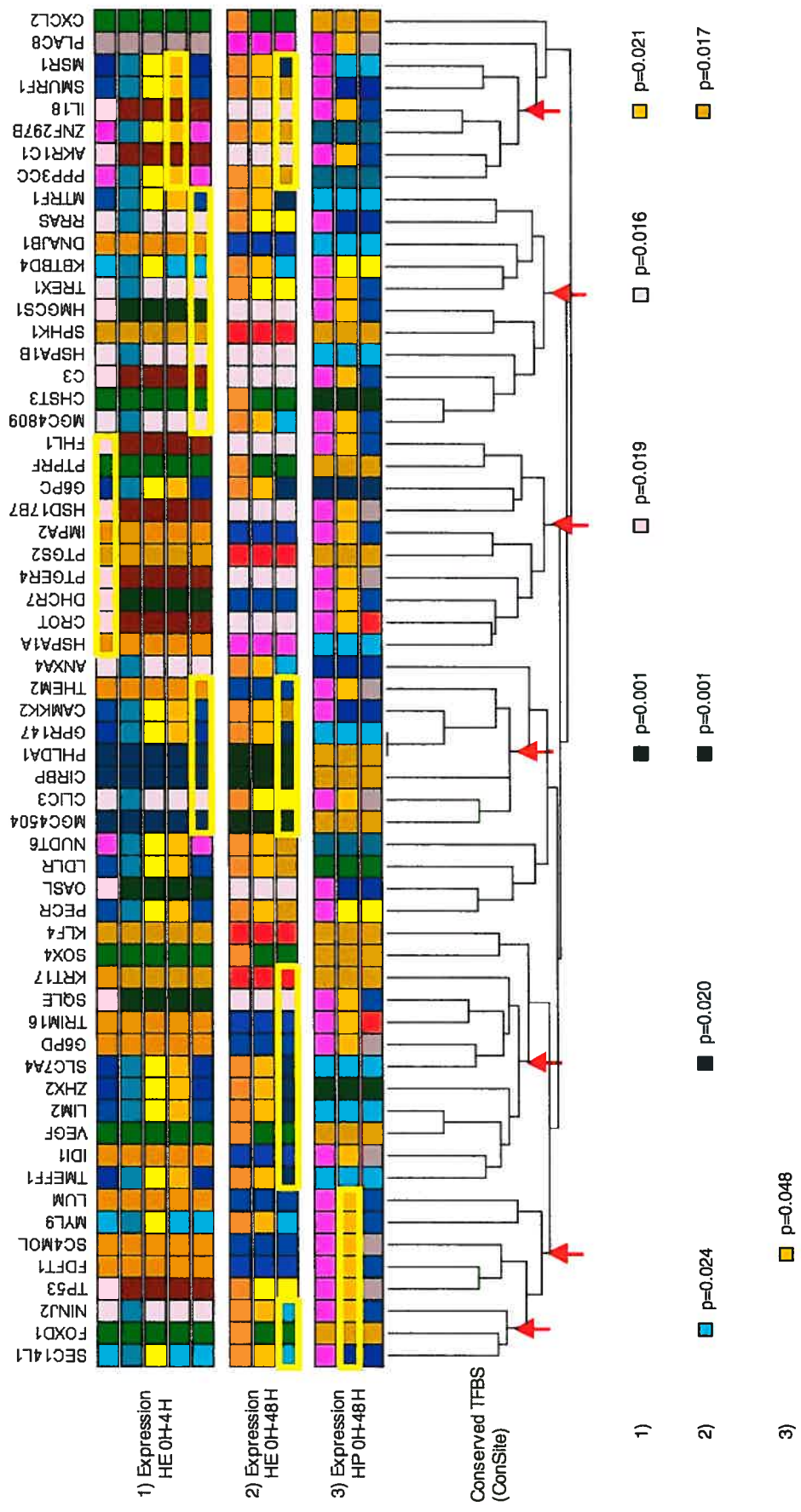


Figure 6A

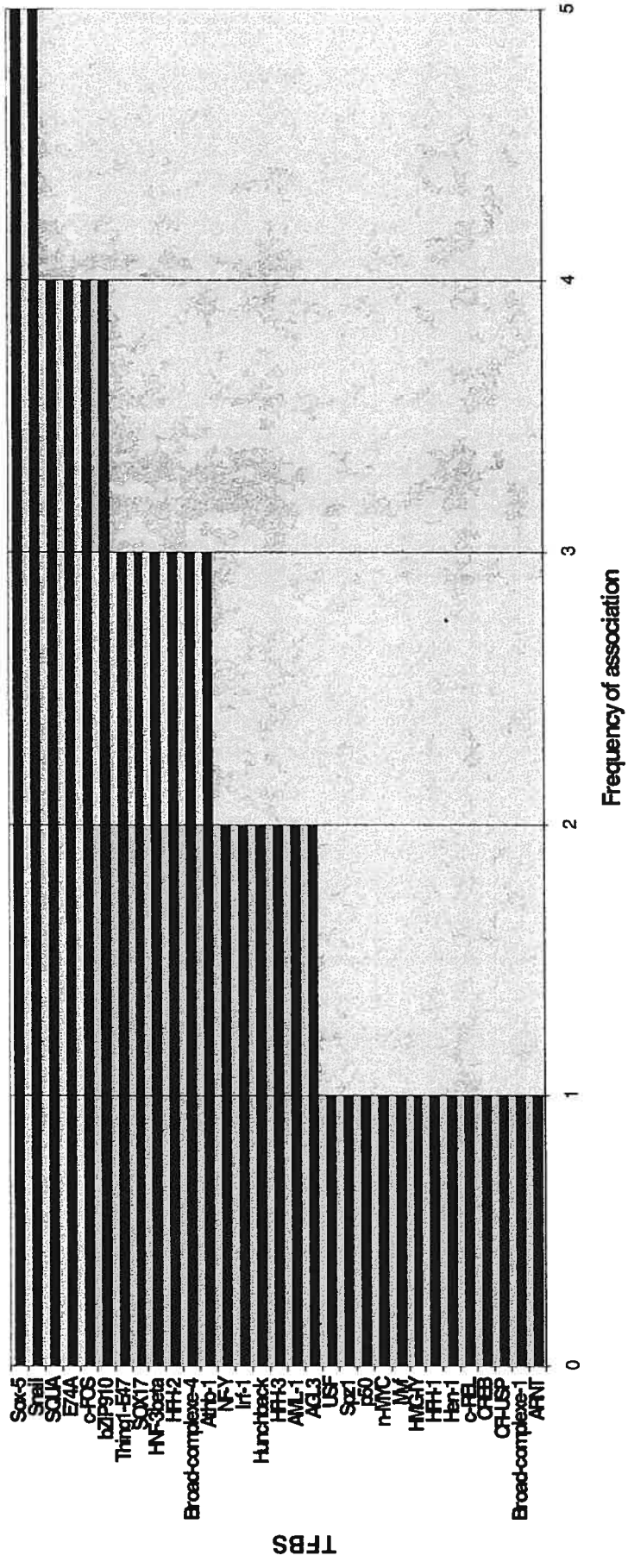


Figure 6B

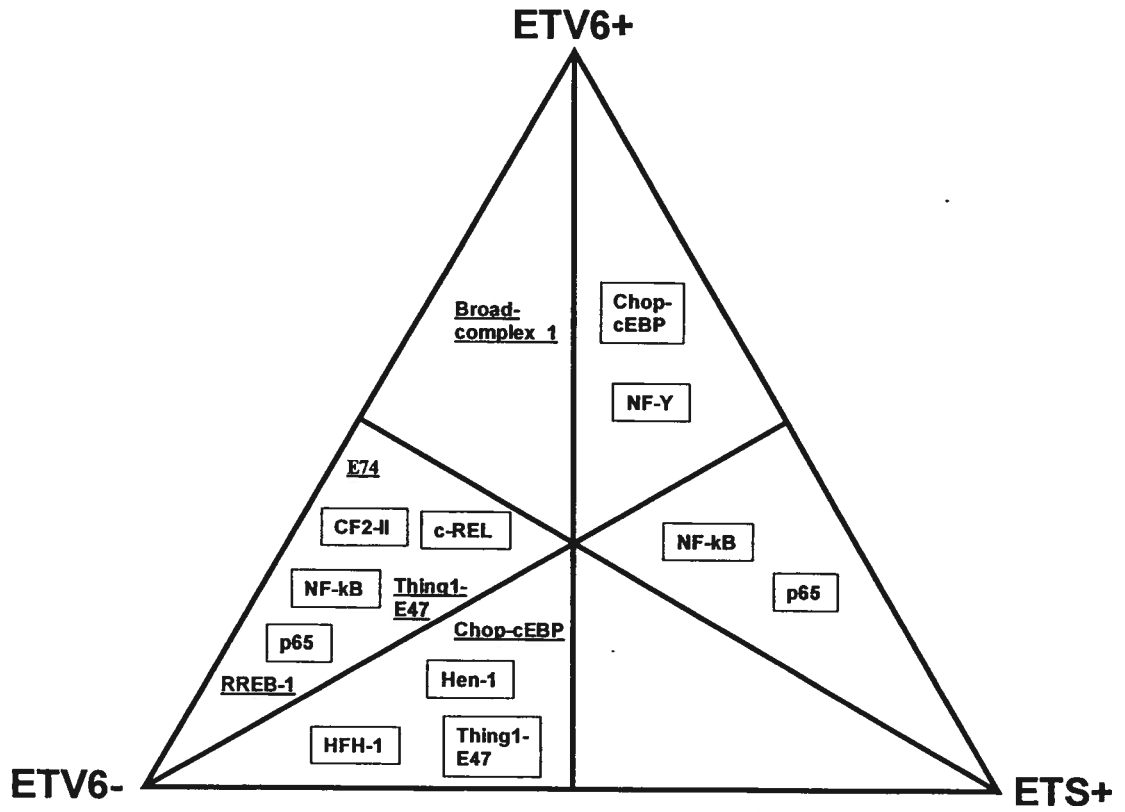


Figure 7

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

Le principal objectif de ce travail était de comprendre l'impact de la délétion récurrente du locus 12p12-13 sur le développement et/ou la progression de la leucémie de l'enfant. Pour ce faire, il fallait identifier les gènes présents dans la région critique, déterminer quel était le GST le plus probable et tenter de comprendre son rôle afin d'élaborer des hypothèses mécanistiques menant au développement et/ou à la progression de la leucémie. La construction des cartes génétique et physique et la publication de la séquence de la région critique dans le cadre du projet du génome humain ont été des étapes essentielles pour entreprendre la cartographie des transcrits. Au moment d'initier ce travail, seulement 2 gènes, ETV6 et LRP6, étaient localisés dans la région. Les gènes MKP7 et BCL-G se sont ajoutés par la suite. Notre travail a permis l'identification de trois nouveaux gènes, LOH12CR1-3, et la caractérisation de nouvelles isoformes de MKP7 et BCL-G. Notre travail sur la recherche de mutations somatiques dans les régions codantes des gènes de la région et de leur expression a permis de confirmer ETV6 comme étant le GST candidat impliqué dans la leucémie, plus particulièrement la LLA de type pré-B de l'enfant. Nous avons ajouté aux évidences fonctionnelles que ETV6 semblait agir comme suppresseur de tumeur en montrant, pour la première fois dans un système cellulaire de LLA, que ETV6 pouvait ralentir la croissance de ce type cellulaire. L'élaboration de clones cellulaires dans lesquels ETV6 pouvait être induit à la doxycycline et les études de microarrays ont permis l'identification de 87 gènes modulés par ETV6. Parmi les 10 gènes dont la modulation a été validée par une seconde méthode, la moitié avait une expression corrélée avec celle de ETV6 dans les patients LLA pré-B. Ceci constitue une validation importante de notre approche et suggère de nouvelles hypothèses quant à l'impact fonctionnel de l'absence de ETV6 dans les leucémies. L'analyse de régions régulatrices par des EMSA a permis d'identifier des régions liant vraisemblablement des TFs de la famille ETS. À l'aide de nos données de microarrays et de différentes approches bio-informatiques, nous avons montré des associations entre le profil de modulation de certains gènes et des caractéristiques biologiques ou des TFBS

conservés dans les promoteurs. Les sections qui suivent discuteront de l'essentiel de chacun de ces points.

3.1 ETV6 est le GST candidat du locus 12p12-13 impliqué dans la LLA de type pré-B

Nous avons identifié trois nouveaux gènes dans la région 12p12-13, LOH12CR1-3, et mis en évidence de nouvelles isoformes d'ARNm des gènes BCL-G et MKP7. La recherche d'homologie au niveau des séquences traduites des gènes LOH12CR1-3 ne permet malheureusement pas de spéculer sur le rôle des produits de ces gènes. Pour ce qui est de BCL-G, on peut présumer que l'isoforme moyenne (BCL-G_M), nouvellement mise en évidence, se comporte fonctionnellement de façon similaire à l'isoforme courte (BCL-G_S) puisque les deux protéines contiennent le domaine d'homologie BH3 seulement, contrairement à la forme longue (BCL-G_L) qui possède les domaines d'homologie BH2 et BH3. Il est donc attendu que BCL-G_M ait une activité pro-apoptotique ayant un pouvoir similaire à BCL-G_S mais supérieur à BCL-G_L (Guo, B et al. 2001). Cependant, son expression a été observée seulement dans les testicules. La nouvelle isoforme de MKP7, dont le quatrième exon est exclu (figure 2 section 2.1), pourrait présenter une activité modifiée par rapport à l'isoforme complète puisque la protéine résultante possède un domaine d'homologie cdc25 (CH2) et un domaine d'ancrage aux MAPK en moins (Masuda, K et al. 2001; Masuda, K et al. 2003).

Sept gènes sont donc présents dans la région et sont tous considérés comme candidats GST de par leur localisation. Cependant, parce que la fonction des gènes LOH12CR1, -2 et -3 est inconnue et que celle de LRP6 ne semble pas concorder avec ce qu'on s'attend d'une protéine ayant un rôle suppresseur de tumeur (voir sections 1.4 et 2.1), nous considérons ces quatre gènes comme moins intéressants dans le contexte de cette étude. À l'opposé, ETV6, BCL-G et MKP7, de par leur fonction, sont des candidats plus intéressants (voir section 1.4 et 2.1). Selon l'hypothèse « two hits », un GST doit être inactivé au niveau de ses deux allèles pour que son effet suppresseur de tumeur soit perdu et qu'il y ait

promotion du cancer. C'est pourquoi des mutations somatiques ont été recherchées dans la séquence codante de l'allèle résiduel des gènes de la région. Aucune mutation somatique n'a été détectée, ce qui nous a mené à poser l'hypothèse que l'inactivation était possiblement d'origine épigénétique. Toujours en se basant sur l'hypothèse « two-hits », l'étude d'expression transcriptionnelle a identifié 2 gènes, ETV6 et BCL-G, dont l'expression était absente dans la majorité des patients présentant une délétion. Alors que les patients ne présentant aucune délétion en 12p12-13 exprimaient tous un niveau élevé de ETV6, la majorité des cas présentant une délétion (7/8) n'exprimaient plus le gène. Puisque tous les cas n'exprimant pas ETV6 présentaient aussi une translocation t(12;21) sur l'allèle résiduel, la délétion et la translocation semblent être les deux événements d'inactivation chez la majorité des cas. Parmi les deux patients présentant une translocation t(12;21) sans délétion en 12p12-13, un seul présentait un niveau très bas de ETV6 (#413; tableau 5 « supplementary materials » section 2.2), suggérant l'implication d'un mécanisme d'inactivation alternatif. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait avoir à notre disposition plus de patients présentant un seul des deux événements, soit la délétion ou la translocation. À cet effet, une étude a démontré que les LLA présentant une translocation t(12;21), mais pas de délétion, exprimaient peu ou pas l'ARNm de ETV6, suggérant que l'abolition de l'expression de ETV6 est un événement critique dans les LLA présentant une telle translocation (Patel, N et al. 2003). En ce qui concerne BCL-G, le fait que 7 des 8 patients LLA présentant une délétion au locus 12p12-13 n'expriment pas ce gène fait de lui un excellent candidat suppresseur de tumeur. Cependant, en considérant que plus de la moitié des LLA ne présentant pas de délétion (8/14) n'expriment pas ce gène non plus (tableau 5 « supplementary materials section 2.2) et que l'expression moyenne de ceux qui l'expriment est extrêmement faible (delta Ct = 13,1 par rapport à GAPDH), on arrive à la conclusion que la délétion n'entraîne pas la perte de l'expression de BCL-G dans la plupart des cas, puisqu'il est vraisemblablement peu ou pas du tout exprimé dans la lignée pré-B. Alors, malgré le fait que BCL-G ne peut être éliminé comme gène candidat, il nous semble improbable qu'il soit le GST dont l'inactivation promeut le développement de la LLA dans les cas de délétion.

L'observation que d'autres types de leucémie ainsi que des tumeurs solides présentent aussi une délétion en 12p12-13 suggère que le GST dans la région est commun à ces néoplasies. Cependant, la translocation t(12;21) qui entraîne l'inactivation de ETV6 dans la plupart des LLA pré-B n'est pas retrouvée dans ces cancers. De plus, la recherche de mutations somatiques dans des LLA (Stegmaier, K et al. 1996), des cancers de la prostate (Kibel, AS et al. 2002) et des carcinomes ovariens (Hatta, Y et al. 1997), n'ont pu mettre en évidence une telle source d'inactivation. C'est d'ailleurs cette observation qui laissait envisager qu'un autre gène de la région agit comme GST. Or, très peu d'études d'expression ont été réalisées pour investiguer l'hypothèse d'une perte d'expression de ETV6. Une seule a été menée et conclut que l'expression de ETV6 est diminuée dans une proportion significative de cancers de la prostate (Latil, A et al. 2001), suggérant que ETV6 pourrait aussi agir comme suppresseur dans les tumeurs solides présentant une délétion. Il est aussi possible que d'autres GST soient présents dans la région et que les gènes inactivés ne soient pas les mêmes dépendamment des formes tumorales.

Il existe des exemples de gènes dont les propriétés suppresseurs de tumeur ne s'exercent plus dès qu'un seul allèle est perdu. Ce type d'inactivation réfère au concept d'haplo-insuffisance et dans ce cas, l'hypothèse « two-hit » ne s'applique pas (Santarosa, M et Ashworth, A 2004). Conceptuellement, on parle d'haplo-insuffisance lorsque le seuil nécessaire au maintien du phénotype « normal », n'est pas atteint malgré le fait qu'une dose du gène soit encore exprimée. En ce sens, notre étude d'expression dans les LLA pré-B montre que ETV6 et BCL-G pourraient certainement atteindre le seuil de l'haplo-insuffisance puisqu'ils ne sont plus du tout exprimés. LOH12CR1, LOH12CR2 et MKP7, dont le niveau d'expression médian se situe autour de 50 % dans les LLA présentant une délétion par rapport à celles n'en présentant pas, pourraient aussi être haplo-insuffisants. Cependant, les gènes LRP6 et LOH12CR1, qui présentent une expression relativement peu diminuée dans les LLA avec délétion, n'apparaissent pas à première vue comme ayant le profil de gènes haplo-insuffisants. MKP7 inhibe plusieurs phénotypes tumoraux des cellules Rat.1 transformées avec BCR-ABL (voir section 1.3) (Hoornaert, I et al. 2003). Il est donc envisageable que ce gène

soit haplo-insuffisant dans les LLA mais il n'y a cependant pas encore d'évidence fonctionnelle montrant que l'expression d'une seule dose puisse promouvoir la leucémie. Il est intéressant de souligner que p27/CDKN1B est reconnu comme étant un GST haplo-insuffisant (Santarosa, M et Ashworth, A 2004) et que ce gène est délété dans une certaine proportion des cas de délétion en 12p12-13. Les LLA pré-B délétées expriment ce gène à un niveau médian légèrement supérieur à 50 % par rapport aux LLA non-délétées. Dans le cas de ETV6, certaines évidences suggèrent qu'une inactivation partielle pourrait être suffisante pour promouvoir la LLA. ETV6 est en effet la cible de plus de 40 translocations et, bien que le mécanisme oncogénique de plusieurs des protéines chimériques résultantes soit connu, ces chimères ne semblent pas toujours avoir des propriétés oncogéniques et les translocations ne résultent pas toujours en l'expression de protéine de fusion (Cools, J et al. 2002). Un mécanisme commun d'haplo-insuffisance relié à ETV6 pourrait prévaloir dans tous ces cas. Il a été montré que TEL2 et certaines isoformes de ETV6 pouvaient antagoniser l'activité de ETV6 (Kawagoe, H et al. 2004; Sasaki, K et al. 2004). Il peut donc être envisagé que lorsque ces formes d'inhibition sont présentes dans la cellule, la perte d'un allèle de ETV6 entraîne une représentation stoichiométrique trop faible de ce dernier pour qu'il puisse exercer son effet suppresseur de tumeur. Le fait qu'il existe des sujets présentant une translocation t(12;21) sans développer la maladie tend par contre à rejeter l'hypothèse que ETV6 réponde au concept d'haplo-insuffisance. Ceci n'élimine toutefois pas complètement cette possibilité puisque l'expression de ETV6 peut être variable selon les individus (voir section 2.2 et 2.3 article 2). Une étude d'expression de ETV6 dans les sujets présentant l'une des translocations affectant ETV6 pourrait tester la validité de cette hypothèse.

Si on considère le concept d'haplo-insuffisance, MKP7 et p27/CDKN1B deviennent également des candidats intéressants de par leur fonction. Mais nous considérons que ETV6 est le GST candidat ciblé par les altérations du chromosome 12p12-13 pour plusieurs raisons. L'utilisation de polymorphismes génétiques, mis en évidence par notre étude de mutations, a permis de montrer que seul le marqueur D12S98 est délété dans tous les cas, et donc que la région située entre les marqueurs D12S89 et BCL-G-3 est la plus petite région commune

de délétion, ce qui réduit les candidats à ETV6 et BCL-G seulement (figure 1 section 2.2). En assumant que la région n'est touchée que par une seule délétion contiguë, on peut estimer à partir du tableau 4 (« supplementary materials » section 2.2) que dans 4 cas sur 15 (27 %), la délétion ne touche pas MKP7 et que dans 5 cas sur 13 (38 %), elle ne touche pas p27/CDKN1B. Du point de vue de l'expression, notre étude suggère que le candidat GST le plus probable est ETV6. Fonctionnellement, l'activité suppresseur de tumeur de ETV6 a été observée dans plusieurs systèmes cellulaires (voir section 1.3) et nous avons montré que dans une lignée de LLA pré-B, ETV6 inhibe la croissance (figure 13). Pour toutes ces raisons, nous concluons que : 1) ETV6 est inactivé dans la majorité des cas de LLA pré-B par la délétion en 12p12-13 et la translocation t(12;21); 2) cette inactivation est le principal événement conférant un avantage de promotion de la LLA dans les cas présentant une délétion; 3) la perte d'expression de ETV6 chez les patients présentant une translocation t(12;21) sans délétion pourrait constituer un mécanisme alternatif d'inactivation; 4) l'expression de la protéine ETV6-AML1 peut possiblement être un événement supplémentaire promouvant en soi le cancer; 5) la perte de MKP7 et/ou de p27/CDKN1B, parfois observée dans ces leucémies, pourrait constituer un avantage de croissance additionnel.

3.2 Gènes modulés par ETV6 et leur impact sur la LLA

Pour comprendre comment la perte de ETV6 peut conduire à la promotion de la LLA, nous avons entrepris d'identifier des gènes dont l'expression est modulée par ce facteur de transcription. Nous avons opté pour des transfectants stables inductibles (système Tet-On) pour ETV6 à partir de cellules HeLa, qui se prêtent bien à ce type de stratégie. Le transcriptome de cellules induites avec la doxycycline a été comparé à celui de cellules non-induites ainsi qu'à celui de cellules contrôles contenant le vecteur seul, traitées ou non avec la doxycycline. Une analyse utilisant des critères stringents a permis d'identifier 87 gènes modulés par ETV6 incluant 62 régulés à la baisse et 25 à la hausse. À l'aide d'une seconde méthode, le RT-PCR quantitatif, nous avons évalué 13 gènes dont 10 se sont aussi avérés être modulés (77 %). L'extrapolation de cette validation à

l'ensemble des gènes suggère qu'environ 67 des 87 gènes identifiés sont effectivement modulés. Notre étude porte maintenant à 108, le nombre de gènes rapportés comme étant modulé par ETV6 (tableau IX).

L'un des principaux problèmes rencontrés dans l'identification de gènes modulés avec la stratégie choisie est la variabilité. La variabilité peut être responsable de l'identification de faux positifs (problème de spécificité) et de l'incapacité de détecter de vrais positifs (problème de sensibilité). L'avantage d'utiliser un système inductible est principalement de diminuer certaines sources de variabilités comme celle entre les individus, entre les échantillons (en clinique) ou encore entre des clones de transfectants stables. Le génotype des cellules comparées est exactement le même dans toutes les conditions étudiées. L'utilisation de contrôles appropriés fait en sorte d'éliminer les variations reliées à l'agent d'induction comme la doxycycline. Le principal avantage de diminuer la variabilité est de gagner plus de pouvoir statistique pour détecter les variations dues à l'induction elle-même. De plus, l'utilisation de cellules en culture permet de répéter les expériences et ainsi d'augmenter encore davantage le pouvoir statistique. Le principal inconvénient que l'on rencontre en utilisant un système en culture est que les cellules étudiées ne se comportent pas exactement comme des cellules faisant partie d'un organisme. C'est pourquoi, après avoir identifié des gènes dans notre système *in vitro*, nous avons décidé de tester la pertinence des modulations *in vivo*, c'est-à-dire dans les LLA de patients.

La principale contribution de notre étude d'expression globale est de proposer des voies fonctionnelles potentiellement régulées par ETV6 et de suggérer des gènes cibles du TF ETV6. Notre étude nous renseigne sur des fonctions potentielles de ETV6 d'un point de vue global, sur des voies plus particulièrement reliées au cancer ainsi que sur des mécanismes par lesquels ETV6 pourraient agir comme suppresseur de tumeur spécifiquement dans la LLA pré-B.

Tableau IX. Sommaires des gènes potentiellement modulés par ETV6

Gènes				Référence
↓MCSFR				(Fears, S et al. 1997)
↓GPIb				(Kwiatkowski, BA et al. 1998)
↓GPIX				
↓Col1a1	↑CD44	↑Entactin		(Van Rompaey, L et al. 1999)
↓SLPI	↑Col3a1	↑Fibronectin		
	↑Smad5			
↓MMP3				(Fenrick, R et al. 2000)
↓BCL-X _L				(Irvin, BJ et al. 2003)
↓Cdc37 homologue	↓Midkine	↑IL10		(Sakurai, T et al. 2003)
↓CDK4	↓PAR4	↑IL4		
↓D4-GDI	↓RHOG			
↓FAS ligand	↓RHO GDI α			
↓Ki-67	↓TRADD			
↓ABCC3	↓KCTD7	↑C9orf38	↑MGC4504	(Boily, G et al. 2005)
↓AKR1C1	↓LDLR	↑CHST3	↑PHLDA1	
↓AKR1C3	↓LIM2	↑CIRBP	↑PKD2L1	
↓APBA1	↓LPIN1	↑CXCL2	↑PP2447	
↓ASB9	↓LUM	↑DNAJB1	↑PTGS2	
↓C11orf8	↓MGC4809	↑FOX D1	↑PTPRF	
↓C3	↓MSR1	↑G6PC	↑SLC7A4	
↓CAMKK2	↓MTRF1	↑GABPB2	↑SOX4	
↓CLIC3	↓MYL9	↑GPR147	↑SPHK1	
↓CROT	↓NINJ2	↑HSPA1A	↑TMEFF1	
↓CRSP2	↓NUDT6	↑HSPA1B	↑VEGF	
↓DHCR7	↓OASL	↑KRT17	↑ZHX2	
↓DKFZP586A0522	↓PECR			
↓DTR	↓PLAC8			
↓EST1051	↓PPP2R2B			
↓EST1383	↓PPP3CC			
↓EST2140	↓PTGER4			
↓EST635	↓SC4MOL			
↓FDFT1	↓SEC14L1			
↓FHL1	↓SLC12A3			
↓FLRT3	↓SLC38A6			
↓G6PD	↓SMURF1			
↓GABARAPL1	↓SQLE			
↓HMGCS1	↓THEM2			
↓HSD17B7	↓TP53			
↓IDI1	↓TREX1			
↓IL18	↓TRIM16			
↓IMPA2	↓TTC15			
↓KBTBD4	↓ZNF297B			
↓KCNAB2	↓ZNF81			

↓ : modulé à la baisse. ↑ : module à la hausse.

La classification de gènes modulés en catégories suggère que ETV6 possède une action pléiotropique. Certaines catégories réfèrent à des phénotypes qui ont déjà été rapportés dans la littérature : angiogenèse, apoptose, adhésion cellulaire/matrice extracellulaire et croissance/prolifération cellulaire. Rappelons que les souris mutantes homozygotes pour le gène ETV6 meurent durant le développement foetal et présentent un défaut d'angiogenèse au niveau du sac vitellin (Wang, LC et al. 1997). Il a été observé que ETV6 induisait une agrégation des cellules NIH3T3-UCLA en forme de tubes qui, selon les auteurs, s'apparente à la formation physiologique de vaisseaux (Van Rompaey, L et al. 2002). Quant à l'apoptose, l'action de ETV6 semble dépendre du contexte. Les souris mutantes présentent un excès d'apoptose dans les cellules neurales et mésenchymateuses et semblent donc avoir un effet anti-apoptotique dans ce contexte (Wang, LC et al. 1997). Une autre observation va dans le même sens et rapporte que, chez la souris, les cellules souches hématopoïétiques adultes ont besoin de ETV6 pour leur survie (Hock, H et al. 2004). Par contre, ETV6 peut réprimer BCL-X_L, une protéine anti-apoptotique dont le gène est une cible bien établie de ETV6 (Irvin, BJ et al. 2003). La catégorie de notre étude qui contient le plus grand nombre de gènes est l'adhésion cellulaire/matrice extracellulaire. En plus d'induire l'agrégation en forme de tube dans les NIH3T3-UCLA (Van Rompaey, L et al. 2002), ETV6 induit aussi une autre forme d'agrégation dans les NIH3T3 transformées avec Ras, un phénotype qui est dépendant de métalloprotéinases (Fenrick, R et al. 2000). Le fait que ETV6 inhibe la capacité d'invasion et de former des métastases de cellules NIH3T3 transformées, lorsqu'injectées dans des souris nues, suggère également un rôle dans les voies reliées à l'adhésion cellulaire/matrice extracellulaire (Rompaey, LV et al. 2000). Quelques études ont aussi montré le rôle de ETV6 dans le ralentissement de la croissance, dans des MEF (Rompaey, LV et al. 2000), dans des NIH3T3 transformées avec Ras (Fenrick, R et al. 2000; Rompaey, LV et al. 2000) ainsi que dans des cellules d'origine hématopoïétiques (figure 13) (Sakurai, T et al. 2003). Notre étude propose des candidats par lesquels ETV6 pourrait moduler certains de ces phénotypes (tableau 3 « supplementary materials » section 2.4).

Plusieurs catégories ayant ressorties dans notre étude semblent reliées à des voies nouvellement associées à ETV6. Sept gènes réprimés sont impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Le cholestérol est une molécule structurale de base importante pour la synthèse de certains messagers chimiques hydrophobes comme les prostaglandines et les hormones stéroïdiennes. À cet effet, l'expression de deux gènes du métabolisme des prostaglandines a été validée, soit celle de PTGER4 et PTGS2. Il n'est cependant toujours pas clair par quel phénotype pourrait se traduire la modulation de ces gènes par ETV6 puisque les effets des prostaglandines sont multiples et très différents selon les tissus. La modulation des gènes AKR1C1 et AKR1C3 a aussi été confirmée dans notre étude. Les produits de ces gènes sont des enzymes ayant une très forte homologie entre elles (isozymes) qui modifient des hormones stéroïdiennes et régulent ainsi l'accès à leur récepteur (Bauman, DR et al. 2004). Il est intéressant de noter que l'expression de AKR1C3 est corrélée significativement avec le sexe dans les patients LLA et celle d'AKR1C1 avec le grade de la maladie. Il n'est pas connu si l'expression de AKR1C3 corrèle aussi avec le sexe dans les cellules hématopoïétiques normales ou si ceci est observé seulement dans la maladie. Il est également difficile de spéculer sur la corrélation entre l'expression de AKR1C1 et le grade puisqu'il y a encore peu ou pas d'étude documentant un lien mécanistique des hormones stéroïdiennes dans la LLA, de surcroît dans la LLA de l'enfant. La corrélation entre l'expression de AKR1C3 et le grade suggère que la dissémination de cellules leucémiques pourrait impliquer un mécanisme d'origine hormonal qui pourrait être régulé par ce gène. Plusieurs gènes dans la catégorie réponse immunitaire étaient aussi modulés par ETV6, notamment IL18, PTGER4, PTGS2 et SPHK1. Plusieurs gènes impliqués dans le transport d'ions ont été identifiés dans notre étude, mais trop peu d'études ont été rapportées pour être en mesure de spéculer sur l'impact de ces modulations. Plusieurs TFs semblent être la cible de ETV6, il faut donc garder en tête que parmi les gènes identifiés comme étant modulés par ETV6, certains pourraient être des cibles directes de ces TFs et non pas celles de ETV6. Ces données de modulation pourraient d'ailleurs être un bon départ pour la construction d'un réseau de régulation lié à ETV6. À notre connaissance, il n'y a cependant aucune donnée nous permettant d'attribuer

l'expression de l'un des gènes modulés identifiés à la modulation de l'un de ces TFs.

Certaines des catégories font partie de voies fonctionnelles reliées au cancer, soit l'adhésion/matrice cellulaire, la croissance/prolifération cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse. Ces voies occupent une place particulière dans le concept des habiletés acquises du cancer. La figure 14 fait le lien entre ces catégories, les gènes modulés de notre étude et les habiletés acquises du cancer qui pourraient potentiellement être ciblées. Cette figure indique que les gènes modulés par ETV6 qui font partie de ces catégories peuvent potentiellement affecter toutes les habiletés acquises du cancer. Ces gènes sont donc d'un intérêt particulier dans l'étude de l'implication de ETV6 dans les cancers en général. Notons que la modulation de plusieurs de ceux-ci a été validée par RT-PCR quantitatif. Afin de mieux conceptualiser l'impact de la modulation de gènes sur un phénotype tumoral, on a souvent tendance en oncologie à simplifier la réalité en classant les gènes selon deux pôles conceptuellement opposés : les suppresseurs de tumeur et les oncogènes. Bien que l'on sache que la situation est beaucoup plus complexe dans la réalité, ceci a tout de même l'avantage de mieux structurer notre compréhension puis de générer des hypothèses qui devront éventuellement être vérifiées par la suite. Nous avons donc tenté de séparer les gènes de la figure 14 selon ces deux pôles selon les données disponibles dans la littérature directement ou par inférence. Cette tentative est donc hautement spéculative et doit être considérée avec prudence. La figure 14 indique que, parmi les 15 gènes reliés à des fonctions associées au cancer, 4 gènes sont modulés dans la direction qui concorde avec l'hypothèse que ETV6 est suppresseur de tumeur (FLRT3, PTPRF, DTR et SOX4), que 6 gènes sont modulés en sens contraire à cette hypothèse (IL18, FHL1, NUDT6, SPHK1, TP53 et VEGF), que 2 gènes ont un rôle ambigu dans les cancers (KRT17, LUM et PHLDA1) et que 2 gènes n'ont pas de rôle connu en oncologie (LIM2 et NINJ2). Chacune des catégories est associée à des gènes concordant et non-concordant avec l'hypothèse que ETV6 est suppresseur de tumeur. Le texte qui suit expliquera brièvement en quoi la modulation de ces gènes concorde ou non avec cette hypothèse.

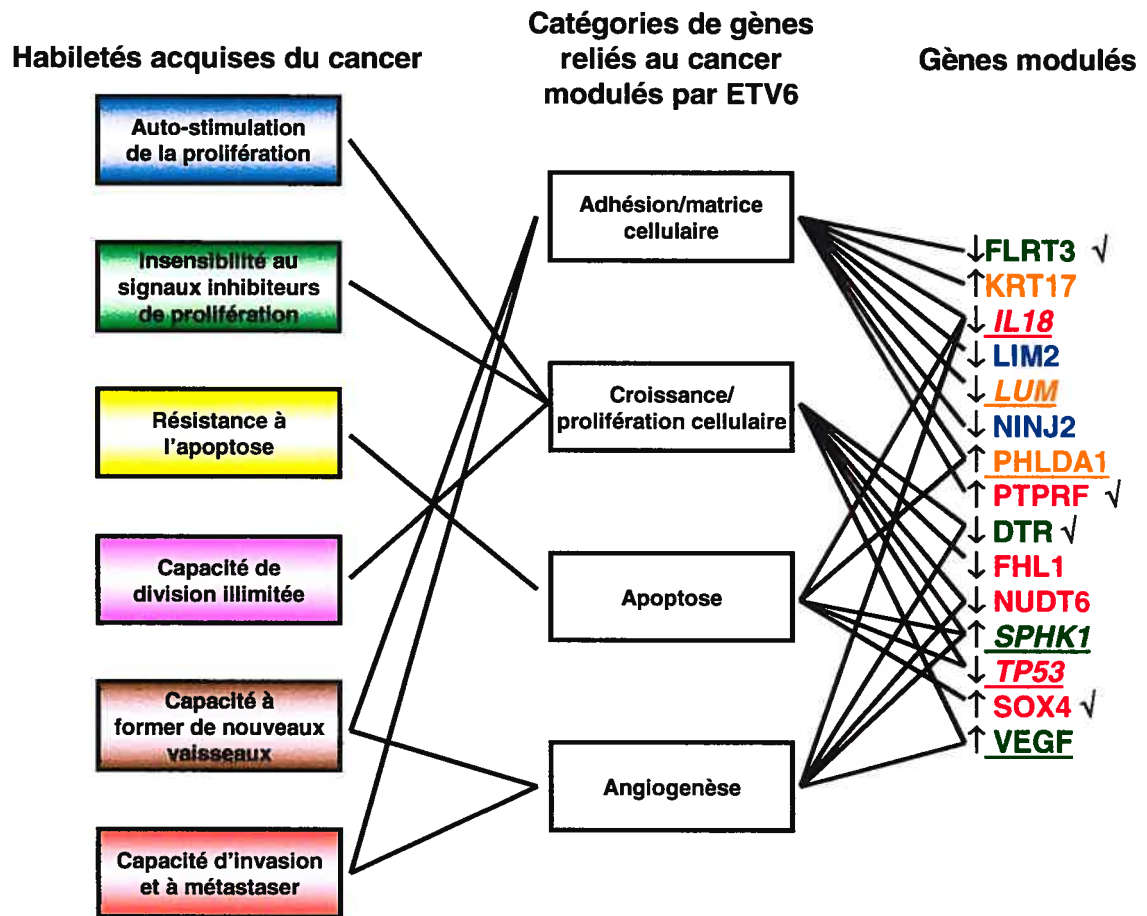


Figure 14. Relation entre les gènes identifiés comme étant modulés par ETV6 qui sont reliés au cancer, les catégories fonctionnelles dans lesquelles les gènes peuvent être classifiés et les habiletés acquises du cancer.

Les lignes tracent les liens entre les différents éléments, gènes, catégories et habiletés acquises du cancer. Les gènes soulignés sont ceux qui ont été validés par RT-PCR quantitatif et les gènes en italiques sont ceux corrélés avec l'expression de ETV6 dans les LLA de patients. Les flèches à la gauche des gènes indiquent la direction de la modulation du gène en question dans les cellules HeLa : ↑ : modulation à la hausse; ↓ : modulation à la baisse. La couleur des gènes indique leur classification selon leur rôle en oncologie : vert : pôle oncogène; rouge : pôle suppresseur de tumeurs; orange : classification ambiguë; bleu : rôle inconnu en oncologie. Les gènes marqués d'un crochet (à leur droite) sont ceux dont la direction de modulation concorde avec l'hypothèse que ETV6 est suppresseur de tumeur. Voir texte pour plus de détails.

ETV6 pourrait réguler la signalisation de la voie FGF via FLRT3, PTPRF et NUDT6. Chez *Xenopus Laevis*, FLRT3 est une protéine d'adhésion qui peut lier les récepteurs de FGFR1 et FGFR4a et moduler leur signalisation via la MAPK ERK (Bottcher, RT *et al.* 2004). Si FLRT3 stimule aussi la voie FGFR-MAPK chez l'humain, il est possible qu'il puisse aussi réguler la croissance de cellules cancéreuses ainsi que l'angiogenèse. PTPRF est pour sa part un phosphatase qui inhiberait la signalisation de MAPK par la signalisation de la voie FGF (Weng, LP *et al.* 1999; Wang, X *et al.* 2000). D'autre part, une étude montre que PTPRF induirait l'apoptose en déphosphorylant p130Cas, une molécule qui régulerait la survie liée à l'adhésion cellulaire (Weng, LP *et al.* 1999). On peut alors spéculer que ETV6 pourrait agir comme suppresseur de tumeur en régulant FLRT3 à la baisse et PTPRF à la hausse. Il est intéressant de mentionner que le gène NUDT6 code pour différentes isoformes d'ARNm antisens de FGF2 (Murphy, PR et Knee, RS 1994; Gagnon, ML *et al.* 1999) et qui semblent réguler à la baisse la traduction de ce dernier (Li, AW et Murphy, PR 2000). De plus, des évidences suggèrent que l'activité du promoteur de cet antisens pourrait dépendre d'un TFBS ETS (Gagnon, ML *et al.* 1999). Ces données concordent avec l'idée que ETV6 pourrait réguler NUDT6 et ainsi affecter la traduction de l'ARNm de FGF2. On peut donc penser que ETV6 aurait un rôle ambigu dans la régulation de FGF puisque d'une part, il diminuerait la signalisation de récepteurs de FGF via la régulation à la baisse de FLRT3 et à la hausse de PTPRF tout en favorisant la traduction de l'ARNm de FGF2 via la régulation à la baisse de NUDT6.

DTR, un membre de la famille EGF, est une protéine de surface cellulaire qui peut être clivée et être libérée sous forme soluble. Or, la forme soluble de DTR semble être située du côté du « pôle oncogène » puisque sa sur-expression dans la lignée de cancer de la vessie EJ entraîne une augmentation de la croissance et de la capacité à former des colonies (Ongusaha, PP *et al.* 2004). DTR soluble induit l'expression et l'activité des métalloprotéinases MMP9 et MMP3 (Ongusaha, PP *et al.* 2004). L'injection de cellules cancéreuses sur-exprimant le DTR soluble dans des souris nues entraîne la formation de tumeurs qui développent une plus grande densité de néo-vaisseaux sanguins (Ongusaha, PP *et al.* 2004). DTR est aussi différenciellement exprimé (sur-exprimé) dans les cancers gastriques

(Murayama, Y *et al.* 2002). Ces données suggèrent que ETV6 pourrait avoir un effet suppresseur de tumeur en réprimant DTR.

SOX4 est un facteur de transcription qui peut être induit par plusieurs agents pro-apoptotiques dans les cellules Hep3B et HepG2 et sa sur-expression peut aussi induire l'apoptose dans ces cellules (Ahn, SG *et al.* 2002). ETV6 pourrait donc avoir un effet suppresseur de tumeur en induisant SOX4.

Des évidences suggèrent que FHL1 est une protéine impliquée dans la différenciation et la croissance des muscles squelettiques (McGrath, MJ *et al.* 2003). FHL1 pourrait aussi être un suppresseur de tumeur agissant en aval de SRC et CAS qui bloquerait spécifiquement la croissance indépendante de l'ancrage à un substrat et la migration cellulaire (Shen, Y *et al.* 2006). D'après cette fonction, l'inhibition de FHL1 secondaire à l'induction de ETV6 va à l'encontre de l'hypothèse que ETV6 est suppresseur de tumeur.

Comme nous l'avons vu à la section 1.2.4.5, VEGF est un facteur de croissance beaucoup étudié pour son rôle comme stimulateur d'angiogenèse (Hicklin, DJ et Ellis, LM 2005) et la direction de sa modulation secondaire à l'induction de ETV6 est aussi opposée à la prédiction puisque nos données suggèrent que ETV6 module VEGF à la hausse. Par contre, ceci n'est pas contraire avec le fait que les souris mutantes pour ETV6 présentent des une angiogenèse défectueuse dans le sac vitellin (Wang, LC *et al.* 1997). De plus, la sur-expression de ETV6 dans des NIH3T3-UCLA semble induire une agrégation cellulaire prenant la forme de vaisseaux (Van Rompaey, L *et al.* 2002). Ces observations sont concordantes avec l'hypothèse que ETV6 pourrait être impiqué dans l'angiogenèse en modulant VEGF à la hausse. Les autres gènes modulés en sens apparamment contraire à cette hypothèse et dont nous n'avons pas encore discuté sont IL18, SPHK1 et TP53. Puisque l'expression de ces gènes corrèle avec celle de ETV6 dans les LLA des patients, nous discuterons de ceux-ci en détails dans la partie traitant des ces corrélations, dans les pages qui suivent.

Il y a aussi des gènes dont, selon la littérature, le rôle dans le cancer est encore ambigu, soit KRT17, PHLDA1 et LUM. Pour ce qui est de KRT17, on rapporte que des cellules épithéliales mammaires normales en culture expriment KRT17 en abondance alors que durant le processus d'immortalisation puis de transformation, son expression chute d'environ 10 fois, suggérant que la baisse d'expression de KRT17 pourrait servir de marqueur pour identifier des cellules cancéreuses ou pré-cancéreuses (Trask, DK *et al.* 1990). D'autre part, on rapporte que l'expression de KRT17 peut servir, en combinaison avec KRT5, de marqueur pour identifier des carcinomes du sein présentant un mauvais pronostic (van de Rijn, M *et al.* 2002). Cette contradiction apparente pourrait s'expliquer par le fait que l'expression de KRT17 a été évaluée dans des lignées cellulaires en culture versus des tissus cancéreux. Une autre explication pourrait être que l'expression de KRT17 est généralement régulé à la baisse dans les tumeurs mais que la persistance de son expression contribue à un mauvais pronostic. Dans le cas de PHLDA1, son expression est détectée dans les naevi et elle diminue progressivement dans les mélanomes primaires puis dans les métastases, suggérant un effet suppresseur de tumeur (Neef, R *et al.* 2002). En fait, la sur-expression de PHLDA1 dans la lignée cellulaire de mélanome Mel Rif ou dans des 293 inhibe leur croissance, les sensibilise à l'apoptose et diminue leur capacité à former des colonies (Neef, R *et al.* 2002). D'autre part, il a été montré qu'IGF1 peut induire l'expression de PHLDA1 dans des fibroblastes et que cette expression est nécessaire à la capacité de d'IGF1 d'inhiber l'apoptose en situation de déprivation de sérum (Toyoshima, Y *et al.* 2004). Pour ce qui est de LUM, dont l'expression est corrélée à celle de ETV6 dans LLA, nous en discuterons aussi en détail dans les pages qui suivent.

Parmi les 10 gènes dont la modulation a été confirmée dans les cellules HeLa, l'expression de 5 d'entre eux a été corrélée avec celle de ETV6 dans les patients LLA. Le fait que les gènes présentant une corrélation avec ETV6 dans les patients LLA aient aussi été identifiés comme étant modulés après l'induction de ETV6 dans le modèle HeLa et ce, par deux méthodes, augmente la probabilité que la corrélation dans les patients présente un lien de cause à effet, c'est-à-dire que ETV6 module l'expression de ces gènes dans la LLA. Ceci valide en quelque

sorte le choix du modèle HeLa. Le fait que ETV6 soit exprimé dans pratiquement tous les tissus pouvait au départ suggérer que la protéine remplit des fonctions communes à plusieurs types cellulaires, d'où la possibilité d'identifier des gènes modulés dans un type cellulaire modèle différent de celui du sujet de l'étude. Il semble toutefois également probable que ETV6 joue un rôle dans la différenciation hématopoïétique, du moins dans certaines lignées myéloïdes (Kwiatkowski, BA et al. 2000; Sakurai, T et al. 2003) et donc, qu'il puisse remplir des fonctions plus spécifiques à certains types cellulaires. Si tel était le cas pour la différenciation lymphoïde, l'identification de gènes impliqués dans ce processus n'aurait vraisemblablement pu être possible avec notre modèle HeLa. Notons également que 5 gènes parmi les 10 validés dans les cellules HeLa ne présentaient pas de corrélation avec ETV6 dans les LLA de patients. Ceci est vraisemblablement attribuable aux différences entre les types cellulaires, les HeLa étant des cellules épithéliales alors que les LLA sont de nature hématopoïétique. S'il est probable que ETV6 puisse jouer un rôle particulier dans le programme hématopoïétique, il est tout aussi vraisemblable qu'il puisse avoir des fonctions plus spécifiques aux cellules épithéliales. Sur la base de cette prémisse, il semble logique que l'expression de certains gènes modulés dans les cellules HeLa ne corrèle pas avec celle de ETV6 dans les LLA de patients. On peut donc conclure que le système inductible dans les cellules HeLa nous a permis d'augmenter notre capacité de détection de gènes modulés par ETV6, que l'information recueillie semble être pertinente, du moins en partie, dans le contexte de l'étude de la LLA mais par contre, que les gènes susceptibles d'être modulés spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques ne pouvaient ressortir comme étant modulés dans les HeLa et qu'un certain nombre de gènes modulés spécifiquement dans les cellules HeLa ne présentent pas de liens évident avec ETV6 dans les LLA. Une étude comparative des partenaires interagissant avec ETV6 dans les cellules HeLa et LLA serait d'un grand intérêt puisqu'elle permettrait vraisemblablement de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'expression différentielle de certains gènes dans ces types cellulaires.

Il est intéressant de souligner que le sens de la modulation liée à ETV6 dans les LLA semble être opposé pour tous ces gènes à celui observé dans les

HeLa sauf pour SPHK1. Ceci peut s'expliquer par une liaison différentielle de co-facteurs de transcription par ETV6 selon le type cellulaire. Ce type de régulation est observé dans le cas de l'hétérodimère HOX-PBX qui agit comme activateur ou inhibiteur via une interaction différentielle avec des co-facteurs, dépendamment de la signalisation intra-cellulaire (Saleh, M et al. 2000). ETV6 peut lier les co-facteurs de transcription HDAC3 (Wang, L et Hiebert, SW 2001; Kuwata, T *et al.* 2002), SMRT (Chakrabarti, SR et Nucifora, G 1999), NcoR (Guidez, F *et al.* 2000; Wang, L et Hiebert, SW 2001), mSin3A (Chakrabarti, SR *et al.* 1999; Fenrick, R *et al.* 1999; Wang, L et Hiebert, SW 2001), tous reliés à la répression transcriptionnelle, et TIP60 (Nordentoft, I et Jorgensen, P 2003), une acétylase d'histones normalement reliée à l'activation transcriptionnelle mais rapportée comme ayant un rôle de co-répresseur dans le cas de ETV6. Bien que la plupart des gènes rapportés comme étant modulés par ETV6 étaient réprimés par ce dernier, les gènes entactin, Smad5, Col3a1, CD44 et fibronectine (Van Rompaey, L et al. 1999), puis IL4 et IL10 (Sakurai, T et al. 2003) étaient pour leur part activés. Il est donc possible que ETV6 puisse aussi agir comme activateur de transcription et que TIP60 puisse avoir un rôle clé en agissant, tantôt comme co-activateur via son activité acétylase, tantôt comme co-répresseur de façon indépendante à cette activité.

L'identification de 5 gènes, IL18, LUM, PTGER4, SPHK1 et TP53, dont l'expression est directement corrélée avec celle de ETV6 dans les LLA pré-B, nous permet d'avancer des hypothèses sur l'impact de l'inactivation de ETV6 observée chez les patients atteints de cette maladie. IL18 est une cytokine pro-inflammatoire qui agit sur plusieurs fonctions, dont l'immunité innée et acquise, et qui pourrait être impliquée dans certaines maladies auto-immunes (Gracie, JA et al. 2003). Cette cytokine a été découverte comme étant un facteur sérique induit par des endotoxines qui stimulent la production d'interféron gamma par les splénocytes (Nakamura, K et al. 1989). L'IL18 est produite sous forme de proprotéine (pro-IL18), une forme inactive, et est activée par un clivage protéolytique effectué par « IL1 β -converting enzyme » (ICE) (Ghayur, T et al. 1997; Gu, Y et al. 1997). Plusieurs types cellulaires expriment l'IL18 mais la sécrétion n'est pas toujours observée et donc l'expression n'est pas toujours un signe d'activité

(Gracie, JA et al. 2003). Par exemple, les lymphocytes B naïfs, ceux des centres germinaux et les lymphocytes B mémoires expriment tous l'IL18 mais une sécrétion est observée seulement dans les lymphocytes B naïfs et ceux des centres germinaux (Airoldi, I et al. 2004). Cependant, il n'est pas connu si les lymphocytes pré-B expriment normalement de l'IL18. Cette cytokine possède un effet anti-tumoral largement documenté envers les néoplasies d'origine hématopoïétiques (Akamatsu, S et al. 2002; Yamashita, K et al. 2002; Zhang, B et al. 2004) et les tumeurs solides (Coughlin, CM et al. 1998; Tan, J et al. 1998; Osaki, T et al. 1999; Oshikawa, K et al. 1999; Ju, DW et al. 2000; Tasaki, K et al. 2000; Ju, DW et al. 2001; Kishida, T et al. 2001; Wang, Q et al. 2001; Liu, Y et al. 2002; Baxevanis, CN et al. 2003). Cet effet serait médié par l'activation des cellules « natural killer » (NK) et/ou des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (Tan, J et al. 1998; Osaki, T et al. 1999; Oshikawa, K et al. 1999; Akamatsu, S et al. 2002; Liu, Y et al. 2002; Zhang, B et al. 2004). IL18 induit l'apoptose de la lignée cellulaire de leucémie myélomonocytaire KG-1 par une augmentation de l'expression de Fas ligand (Ohtsuki, T et al. 1997), ce qui suggère qu'un effet paracrine et/ou autocrine pourrait s'appliquer également. IL18 pourrait aussi avoir un effet anti-angiogénique dans les tumeurs (Coughlin, CM et al. 1998). Notre étude a montré que les LLA pré-B de patients chez qui ETV6 était inactivé présentaient une expression réduite de IL18 par rapport à celles exprimant ETV6. Puisque la LLA est généralement d'origine clonale, il semble improbable que la production de IL18 dans la cellule de LLA d'origine exprimant ETV6 puisse avoir un quelconque rôle dans l'effet anti-tumoral de l'IL18 puisque la production à cette étape ne serait pas significativement augmentée. On peut par contre envisager que, à mesure que les cellules LLA augmentent en proportion, elles puissent contribuer à diminuer leur propre progression dû à une augmentation de la production d'IL18 et possiblement en stimulant les cellules NK et CTL (figure 15). La perte de ETV6 et la réduction de l'expression d'IL18 pourraient donc permettre une progression plus rapide des cellules de LLA. Cette hypothèse, suggérant que des cellules tumorales exprimant IL18 puissent avoir un effet auto-inhibiteur, est appuyée par le fait que lorsque des cellules tumorales transfectées avec le cDNA de l'IL18 sont injectées dans des souris syngéniques ou SCID, leur progression est grandement retardée par rapport aux cellules non-transfectées, un effet dépendant

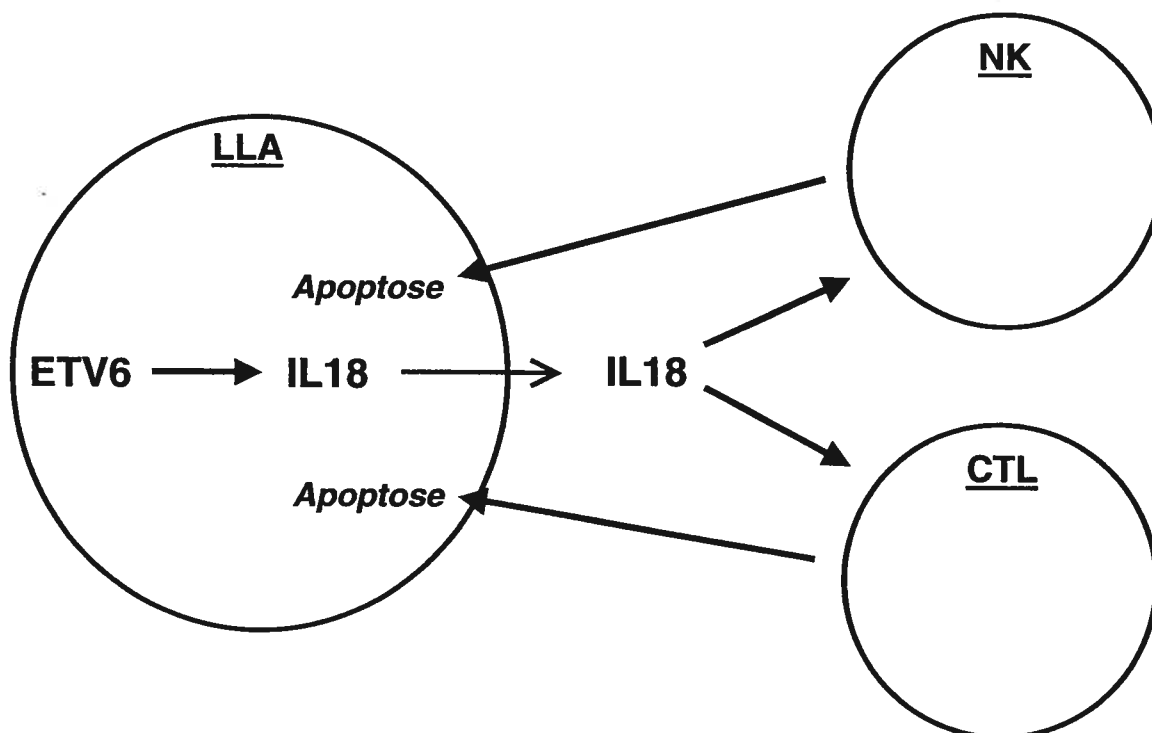


Figure 15. Mécanisme hypothétique de l'action de ETV6 sur les cellules de LLA via IL18.

Dans les LLA, ETV6 active l'expression de IL18, qui est sécrété hors de la cellule. IL18 stimule l'activité cytolytique des cellules NK et/ou le lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les cellules NK et CTL activent l'apoptose des cellules LLA. Lorsqu'il y a inactivation de ETV6, il y a diminution de l'expression de IL18 et diminution de l'activité cytolytique anti-tumorale des cellules NK et/ou CTL. Flèches à pointe pleine : activation; flèche à pointe ouverte : sécrétion. Voir le texte pour plus de détails.

de la quantité de production d'IL18 et médié par l'interféron gamma (Coughlin, CM et al. 1998). Cet effet, combiné à d'autres mécanismes, pourrait éventuellement faire une différence dans la lutte contre la maladie. Afin de déterminer si la perte de ETV6 peut accélérer la progression tumorale des cellules LLA, il faudrait d'abord vérifier, à l'aide d'une lignée cellulaire de LLA n'exprimant pas ETV6 comme Reh, si la réintroduction de ETV6 augmente non seulement l'expression de l'IL18 mais aussi sa production et sa sécrétion. Si tel était le cas, on pourrait ensuite comparer la tumorigénicité de cette lignée exprimant ETV6 par rapport à la lignée contrôle dans des souris nues. Il serait ensuite possible de vérifier si l'éventuelle diminution de la tumorigénicité par ETV6 est médiée par IL18 en injectant dans les souris de la IL18 « binding protein » (IL18BP) recombinante, qui inactive fonctionnellement IL18 (Plitz, T et al. 2003).

LUM, une protéoglycane à kératan sulfate, est un constituant majeur de la cornée et est présent dans le tissu conjonctif un peu partout dans l'organisme (Chakravarti, S 2002). Le produit de ce gène jouerait un rôle dans l'alignement et l'espacement des fibres de collagène. La sur-expression de LUM a été associée à plusieurs types de cancer soit, les cancers du colon (Lu, YP et al. 2002), du pancréas (Ping Lu, Y et al. 2002) et du col de l'utérus (Naito, Z et al. 2002). On a aussi observé que, dans les cas des cancers pancréatiques et du col de l'utérus, les fibroblastes environnants des cellules cancéreuses exprimaient aussi fortement LUM (Naito, Z et al. 2002; Ping Lu, Y et al. 2002). Dans les cellules tumorales de cancers du sein, bien qu'on ne note pas une sur-expression de LUM, une expression dans le stroma environnant est observée et cette expression est associée à des cancers de grades plus élevés, des taux d'expression de récepteurs d'estrogène moins élevés dans les cellules cancéreuses et à un plus jeune âge des patientes (Leygue, E et al. 1998). À l'opposé, des fibroblastes de souris mutées pour le gène Lum présentent un taux de prolifération plus élevé et une apoptose réduite (Vij, N et al. 2004). De même, la sur-expression de LUM dans la lignée de mélanome B16F1 réduit sa capacité à former des colonies en agar mou et la capacité d'invasion dans du matrigel (Vuillermoz, B et al. 2004). L'effet de LUM est donc en apparence contradictoire selon le modèle biologique et le fait que son rôle dans les lymphocytes ne soit pas connu complique

l'interprétation de nos résultats. Toutefois, il semble probable que, faisant partie de la catégorie adhésion/matrice cellulaire, LUM puisse agir dans la capacité des cellules de LLA à infiltrer des organes. Nous avons fait référence en introduction au cas d'une jeune femme chez qui on a constaté l'infiltration dans un de ses ovaires de cellules de LLA clonalement reliées aux cellules d'une LLA contractée 12 ans plus tôt (Ly-Sunnaram, B et al. 2005). Contrairement à la tumeur initiale, les cellules infiltrantes présentaient une inactivation de ETV6, suggérant que la perte de ETV6 favoriserait l'infiltration (figure 16). LUM pourrait aussi jouer un rôle dans la croissance des cellules de LLA (figure 16) puisque notre étude a montré que l'expression plus faible de LUM est corrélée à des comptes de leucocytes plus élevés chez les patients. Expérimentalement, certaines lignées cellulaires de leucémie ont la capacité d'infiltrer divers organes (Ohsugi, T et al. 2005). Une lignée cellulaire de leucémie n'exprimant pas ETV6 pourrait être utilisée pour tester ces hypothèses. Après avoir confirmé que la transfection de ETV6 entraîne une augmentation de la protéine LUM, le taux de croissance et la capacité d'infiltration du modèle cellulaire pourrait être testée en injectant des cellules transfectées avec ETV6 ou non dans des souris syngéniques ou SCID. Si l'expression de ETV6 entraînait une diminution de la capacité d'infiltration, on pourrait vérifier que l'effet dépend de LUM en inhibant son expression par « RNA interference » (RNAi) ou par la génération de clones stables produisant un « short hairpin RNA » (shRNA) dirigé contre LUM. Si LUM était responsable de la diminution d'infiltration par l'expression de ETV6, cet effet serait inhibé dans les cellules compromises dans l'expression de LUM, malgré l'expression de ETV6.

PTGER4 est l'un des quatre récepteurs qui médient la réponse aux prostaglandines de type E (PGE). C'est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Sa stimulation entraîne une augmentation de l'AMPc intra-cellulaire (Narumiya, S et al. 1999). PGE₂, qui est la prostaglandine E que l'on retrouve naturellement dans l'organisme, est impliqué dans diverses fonctions incluant la régulation de la tension artérielle, la fermeture du *ductus arteriosus*, la sensibilité à la douleur, la fièvre et l'inflammation (Murakami, M et Kudo, I 2004). La PGE₂ a également des effets sur le cancer qui peuvent être très différents selon le type cellulaire. Des modèles murins de

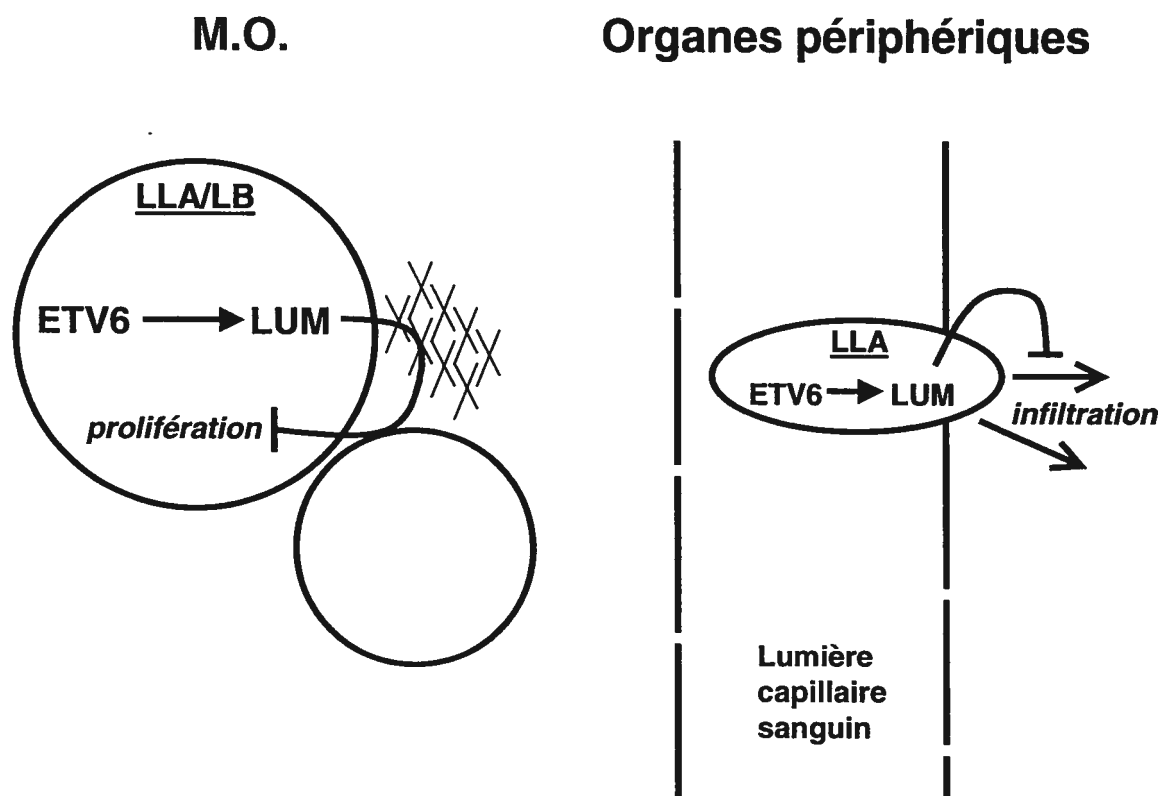


Figure 16. Mécanisme hypothétique de l'action de ETV6 sur les cellules LLA et/ou Lymphocytes pré-B (LB) via LUM.

Dans les LLA, ETV6 active l'expression de LUM qui agit de deux façons. Dans la moëlle osseuse (M.O.), LUM inhibe la prolifération cellulaire des LLA et/ou des LB, possiblement en modulant les interactions cellules-cellules et/ou cellules-matrice. LUM inhibe aussi l'infiltration dans des organes périphériques de cellules de LLA via les vaisseaux sanguins. Lorsqu'il y a inactivation de ETV6, l'expression de LUM diminue, ce qui favorise la croissance des cellules LLA et/ou LB et favorise l'infiltration de cellules LLA dans les organes périphériques. Flèches à pointe pleine : activation; lignes se terminant par une autre ligne à angle droit : inhibition; flèche à pointe ouverte : infiltration. Voir le texte pour plus de détails.

cancers intestinaux montrent que l'absence de PTGER4 réduit la formation de foyers aberrants de cryptes induits par l'azoxyméthane ainsi qu'une forte diminution de polypes intestinaux dans le modèle APCmin, suggérant un effet promoteur de l'oncogenèse (Mutoh, M et al. 2002). Dans des lignées cellulaires de carcinomes gastriques, la stimulation de PTGER4 inhibe la croissance cellulaire, suggérant au contraire un effet inhibiteur de tumeur (Mutoh, M et al. 2002). Sur les lymphocytes B immatures, PGE₂ a généralement un effet inhibiteur. L'injection de l'analogue de PGE₂, 16,16-diméthyl PGE₂ inhibe la lymphopoïèse dans les souris, préférentiellement celle des précurseurs B (Shimozato, T et Kincade, PW 1999). De plus, lorsque des lymphocytes B immatures ou la lignée cellulaire pro-B F10 sont cultivés *in vitro*, l'ajout de cet analogue au milieu induit l'apoptose (Shimozato, T et Kincade, PW 1999). Les auteurs ont montré que cette réponse peut être médiée par PTGER2/EP2 ou par des analogues d'AMPc (Shimozato, T et Kincade, PW 1999), ce qui suggère que PTGER4 pourrait aussi avoir le même effet puisqu'il présente une forte homologie avec PTGER2 et qu'il entraîne également une augmentation intracellulaire d'AMPc (Narumiya, S et al. 1999). Une autre étude a montré que le traitement de lymphocytes immatures ou matures non-stimulés avec la PGE₂ induit une apoptose ainsi qu'une augmentation de l'expression de c-Myc, suggérant que l'apoptose pourrait être médiée par ce dernier (Pica, F et al. 1996). Dans certaines lignées de lymphomes de type B, PGE₂ ou des analogues induisent une inhibition de croissance et une augmentation de l'apoptose (Phipps, RP et al. 1989; Brown, DM et al. 1992). Le même effet est aussi observé avec des lymphocytes T (Mastino, A et al. 1992; Hendricks, A et al. 2000). Notre étude suggère que, dans les LLA pré-B, l'inactivation de ETV6 entraîne une réduction de l'expression de PTGER4. Nous proposons que PTGER4 joue un rôle dans la sensibilisation des lymphocytes B immatures à l'apoptose et que lorsque ETV6 est inactivé dans les lymphocytes pré-B, la réduction de l'expression de PTGER4 ait pour effet de rendre les cellules plus résistantes à l'apoptose, ce qui favorise le développement et/ou la progression de la LLA (figure 17). Afin de tester cette hypothèse, une lignée cellulaire sensible à la PGE₂, comme la lignée F10 mentionnée plus tôt, pourrait être utilisée. Après avoir vérifié que l'expression de PTGER4 augmente avec la sur-expression de ETV6, les cellules, transfectées ou non avec ETV6, pourraient

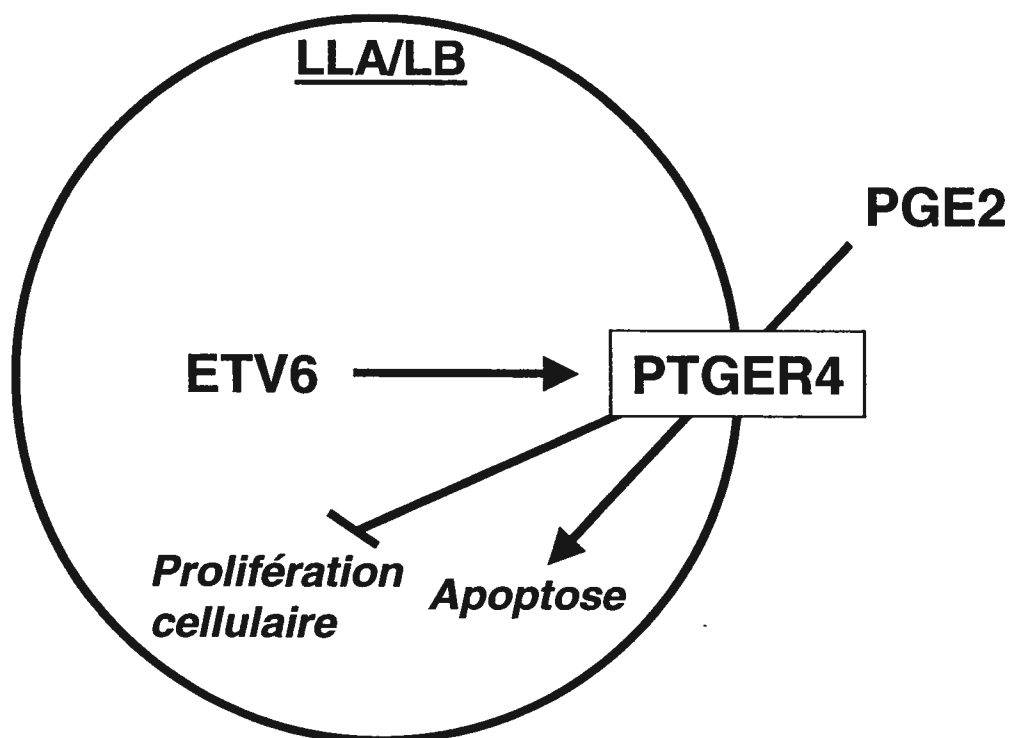


Figure 17. Mécanisme hypothétique de l'action de ETV6 sur les cellules LLA et/ou lymphocytes pré-B (LB) via PTGER4.

ETV6 active l'expression de PTGER4 dans les LLA. La PGE₂ inhibe la prolifération et induit l'apoptose des lymphocytes pré-B (LB) et des cellules de LLA en agissant via son récepteur PTGER4. Lorsqu'il y a inactivation de ETV6, l'expression de PTGER4 diminue, ce qui désensibilise les cellules de LLA et les LB à l'apoptose et favorise leur prolifération. Flèches à pointe pleine : activation; lignes se terminant par une autre ligne à angle droit : inhibition. Voir le texte pour plus de détails.

être traitées avec de la PGE₂ et/ou un analogue spécifique à PTGER4 (ONO-AE1-329; (Mutoh, M et al. 2002)) afin de déterminer si la voie ETV6-PTGER4 sensibilise les cellules à l'apoptose. Cette expérience pourrait aussi être reproduite *in vivo* en injectant des souris SCID avec des transfectants stables de ETV6 ou des cellules contrôles et en les traitant avec de la PGE₂ et/ou des agonistes de PTGER4.

SPHK1 est une enzyme catalysant la phosphorylation de la sphingosine en sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P est un médiateur lipidique aux fonctions extrêmement diverses. S1P peut agir à l'intérieur de la cellule en participant à la régulation de la mobilisation du calcium, en stimulant la croissance cellulaire et en inhibant l'apoptose. Il peut également agir à l'extérieur de la cellule via l'un des cinq récepteurs de surface couplés à des protéines G (S1PR₁ à S1PR₅) en régulant, négativement ou positivement selon le récepteur stimulé, la migration cellulaire et l'angiogenèse (Spiegel, S et Kolesnick, R 2002). S1P a différents effets dans les cellules hématopoïétiques. L'induction de l'apoptose dans certaines lignées cellulaires hématopoïétiques est inhibée par S1P (Cuvillier, O *et al.* 1998; Van Brocklyn, JR *et al.* 1998; Cuvillier, O et Levade, T 2001), suggérant que l'expression de SPHK1 pourrait avoir un effet oncogénique. Par contre, S1P peut aussi inhiber la croissance de lymphocytes T par une voie impliquant possiblement un récepteur de surface (Jin, Y et al. 2003), ce qui suggère un effet inhibiteur de tumeur. S1P induit aussi une lymphopénie chez la souris et le rat secondaire à la séquestration des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (Mandala, S et al. 2002; Xie, JH et al. 2003). Considérant que les effets de S1P sont très variables d'un type cellulaire à l'autre et que ces effets sont inconnus sur les lymphocytes pré-B, il est difficile de prédire quel serait l'effet d'une diminution d'expression de SPHK1 suite à l'inactivation de ETV6. Si la perte de ETV6 dans la LLA pré-B est véritablement un événement favorisant le développement et/ou la progression du cancer, il est probable que S1P ait un rôle d'inhibiteur de croissance dans ce type cellulaire, tout comme sur les lymphocytes T (figure 18). Pour vérifier cette hypothèse, le type cellulaire utilisé devrait être aussi près que possible des lymphocytes pré-B ou de cellules LLA pré-B. Le taux de croissance de lignées cellulaires pré-B ou de cellules LLA pré-B en culture primaire

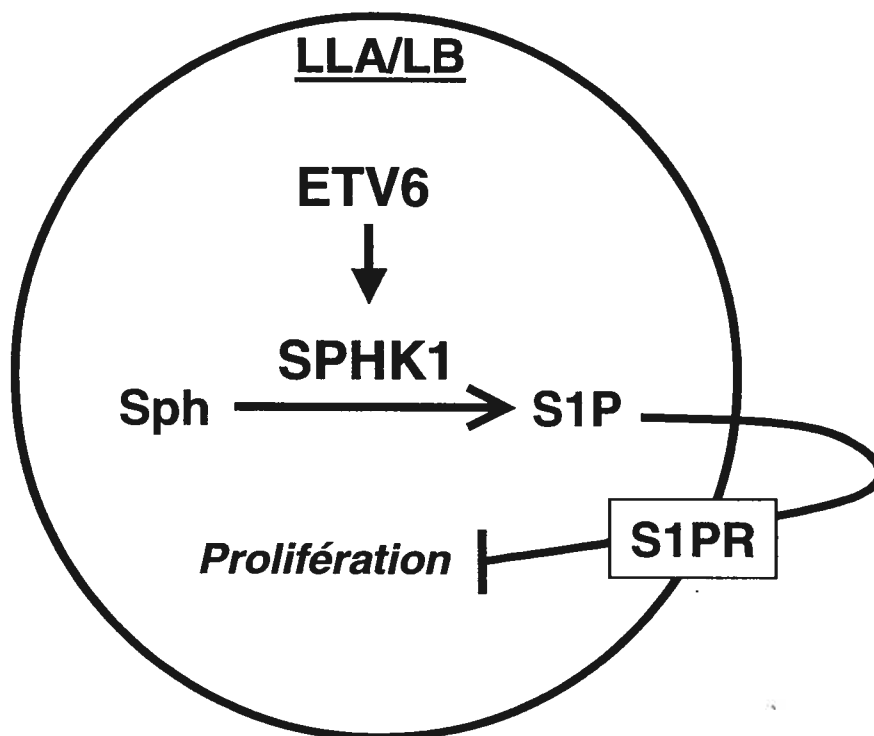


Figure 18. Mécanisme hypothétique de l'action de ETV6 sur les cellules LLA et/ou les lymphocytes pré-B (LB) via SPHK1.

Dans les LLA, ETV6 active l'expression de SPHK1, une enzyme qui catalyse la phosphorylation de la sphingosine (Sph) en sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P agit sur l'un de ses récepteurs à la surface (S1PR) de la cellule et inhibe la prolifération des cellules de LLA et/ou des LB. Lorsqu'il y a inactivation de ETV6, l'expression de SPHK1 diminue et la concentration de S1P diminue, ce qui favorise la croissance des cellules de LLA et/ou des LB. Flèches à pointe pleine : activation; lignes se terminant par une autre ligne à angle droit : inhibition; flèche à pointe ouverte : réaction de phosphorylation. Voir le texte pour plus de détails.

(Herrera, L et al. 2000) pourrait par exemple être évalué après traitement avec de la S1P. Si on constatait une inhibition de croissance par S1P, il faudrait ensuite confirmer que la sur-expression de ETV6 dans ces cellules augmente l'expression de SPHK1 et si possible, son activité.

Comme nous l'avons vu en introduction, p53, le produit du gène TP53, agit comme suppresseur de tumeur d'une multitude de façons. Il est impliqué dans la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Il prévient donc l'acquisition de la majorité des habiletés du cancer, soit l'auto-stimulation de la prolifération, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération, la résistance à l'apoptose et la capacité illimitée de division. De plus, il joue un rôle dans le maintien de la stabilité génomique, qui peut avoir un effet accélérateur sur le développement et la progression du cancer s'il est déficient. Nos résultats suggèrent que la perte de ETV6 entraînerait la diminution de l'expression de TP53, ce qui favoriserait l'acquisition de ces multiples avantages dans le développement et la progression de la LLA pré-B (figure 19). La perte de ETV6 associée à une délétion homozygote du locus de $p14^{ARF}/p15^{INK4B}/p16^{INK4}$ pourrait avoir un effet de synergie dans l'inactivation de p53 puisque la perte de $p14^{ARF}$, un inhibiteur de MDM2, entraîne la déstabilisation de p53. Due aux multiples mécanismes de régulation de p53, la sélection d'un modèle cellulaire pour évaluer une action suppresseur de tumeur de ETV6 via p53 devrait être faite avec le plus grand soin afin de s'assurer que rien n'entrave l'activité de p53 dans le modèle. Dans un premier temps, tel que proposé pour les autres cibles potentielles de ETV6, il faudrait vérifier si une sur-expression de ETV6 entraîne une augmentation de l'expression de TP53 dans des cellules de leucémie. On pourrait ensuite tester si un éventuel phénotype suppresseur de tumeur induit par la sur-expression de ETV6 est aboli lorsque TP53 est inactivé par une méthode comme le RNAi.

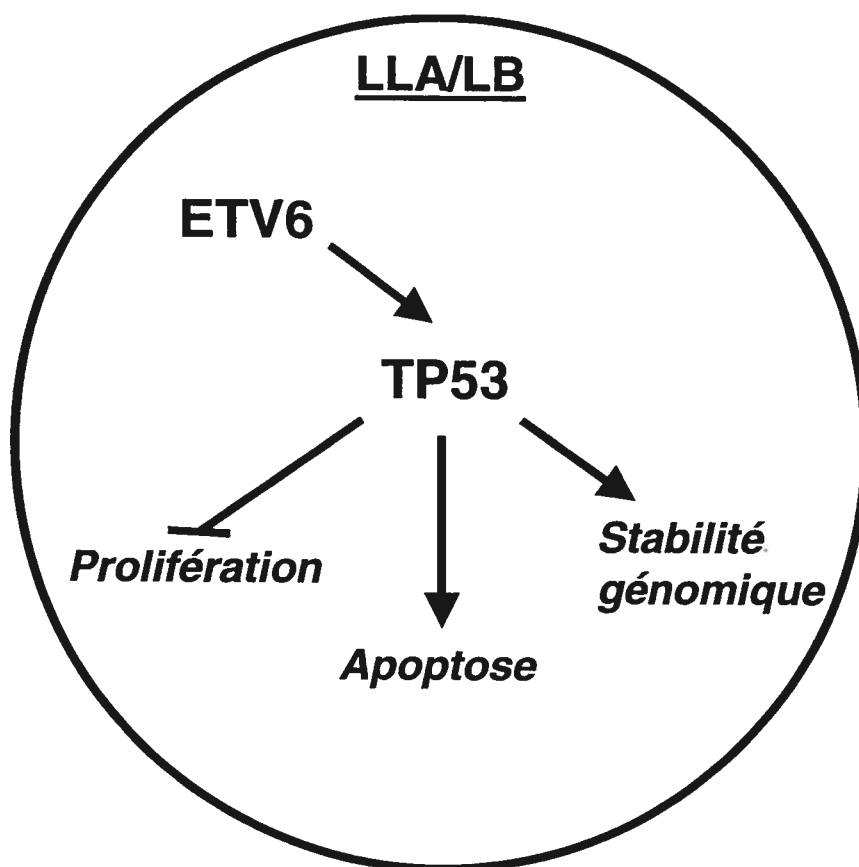


Figure 19. Mécanisme hypothétique de l'action de ETV6 sur les cellules LLA et/ou les lymphocytes pré-B (LB) via TP53.

ETV6 active l'expression de TP53 dans les LLA. Dans les LLA et les LB, p53, le produit génique de TP53, agit comme un frein à la prolifération, sensibilise à l'apoptose et participe au maintien de la stabilité du génome. Lorsqu'il y a inactivation de ETV6, l'expression de TP53 diminue, ce qui favorise la prolifération cellulaire, désensibilise à l'apoptose et favorise l'instabilité génomique. Flèches à pointe pleine : activation; lignes se terminant par une autre ligne à angle droit : inhibition. Voir le texte pour plus de détails.

3.3 Identification d'éléments de la famille ETS dans la région promotrice de gènes modulés par ETV6

La modulation des gènes suite à l'induction de ETV6 peut être due à la liaison directe de ETV6 au niveau de leur promoteur, mais il est aussi possible que des intermédiaires soient interposés entre ETV6 et ces gènes, c'est-à-dire qu'un gène régulé directement par ETV6 soit responsable de la modulation d'un autre gène qui a été identifié par notre étude de microarrays. Du point de vue pathophysiologique de la leucémie, le fait que la modulation soit directe ou non est d'un intérêt relatif puisque le phénotype qui en résulte devrait être le même dans les deux cas. Cependant, du point de vue de la compréhension mécanistique, il est d'un grand intérêt de connaître laquelle des deux situations prévaut. Classiquement, les études de *footprinting* sont utilisées pour identifier des régions promotrices sur lesquelles une protéine nucléaire s'assoit et les études de retard sur gel (EMSA) permettent de confirmer une telle liaison dans une région précise donnée en plus de renseigner sur la nature de la liaison. L'utilisation séquentielle de ces méthodes est par contre laborieuse, particulièrement si on veut étudier plusieurs gènes, comme cela était notre cas dans la présente étude. C'est pour cette raison que nous avons décidé, dans un premier temps, de remplacer les études de *footprinting* classiques par des approches alternatives susceptibles de nous indiquer quelles régions pourraient lier ETV6 avec plus de probabilité, et dans un deuxième temps, de confirmer si les éléments ETS identifiés pouvaient lier une protéine nucléaire par EMSA. Afin d'identifier des régions susceptibles de lier ETV6, nous nous sommes basés sur des critères qui semblaient indiquer qu'un élément ETS (« ETS-binding site » : EBS) en particulier avait plus de chance de médier une modulation par ETV6, soit des EBS ayant été rapportés comme étant liés par d'autres TF ETS, des EBS conservés entre l'homme et la souris (approche de « phylogenetic footprinting »), un EBS présent dans une région nécessaire à l'activité d'un gène, ou un EBS situé à proximité de TFBS connus pour lier un autre TF agissant parfois comme partenaire avec des ETS (tableau 2 « supplementary materials » section 2.4). Parmi les 10 gènes validés par RT-PCR quantitatif, seulement TP53 était connu pour être régulé par un autre TF ETS et le EBS

impliqué dans cette régulation avait été identifié (Venanzoni, MC et al. 1996). La plupart des autres EBS furent sélectionnés en fonction de leur conservation entre l'homme et la souris. Contrairement aux simples prédictions de la présence de TFBS selon un consensus, qui est connu pour détecter un très grand nombre de faux positifs, il a été montré que la méthode de « phylogenetic footprinting » permet d'éliminer la plupart des fausses prédictions tout en conservant la plupart de celles qui sont vraies (Lenhard, B et al. 2003). La capacité de liaison de ces TFBS à lier des protéines nucléaires a été testée à l'aide d'EMSA. Comme aucun des quatre anticorps anti-ETV6 dont nous disposions ne permettait de détecter ETV6 dans un complexe retardé (étude de super-shift), il n'était pas possible de déterminer si les EBS testés pouvaient lier ETV6 ou non. En effet, les anticorps anti-ETV6 ont souvent constitué un problème au cours de nos travaux. Un seul anticorps nous a donné de bons résultats, et ce en immunobuvardage de type western, c'était celui dont nous a fait don le Dr Olivier Bernard (utilisé pour tous les immunobuvardages de type western au chapitre 2). Après épuisement, le Dr Bernard nous a envoyé un autre échantillon d'anti-sérum qui ne fonctionnait pas aussi bien que le premier. Pour ce qui est des anticorps commerciaux vendu par Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), aucun n'a donné de signal satisfaisant. Il n'est donc pas surprenant pour nous que ces anticorps n'aient pas permis une utilisation en surper-shift. Nous espérons que l'induction de l'expression de ETV6 permettrait d'identifier des liaisons ADN-protéines différentielles mais cela n'a pas été le cas, même avec la sonde contrôle positif. Il est possible que les conditions utilisées n'aient pas été optimales pour la liaison de ETV6 malgré le fait qu'elles aient été suffisamment bonnes pour permettre la liaison d'autres protéines nucléaires. Puisque la sonde contrôle positif peut potentiellement lier plusieurs autres TF de la famille ETS, un bon contrôle positif pour la liaison de ETV6 n'aurait pu être confirmé que par l'utilisation d'un bon anticorps en super-shift. Il n'a donc pu être possible dans le cadre de cette étude de montrer que les régions sélectionnées pouvaient lier ETV6. Les études de compétitions avec des oligos de même séquence que la sonde mais mutés au niveau de l'EBS a permis d'identifier des régions dont la liaison de protéines nucléaires dépendait de ce consensus ETS, suggérant la liaison d'un TF de cette famille et possiblement celle de ETV6. Les régions identifiées sont situées dans le promoteur des gènes AKR1C3, IL18,

LUM, PTGER4, PTGS2, TP53 et VEGF. Il faut toutefois noter que la liaison de certaines de ces régions au niveau du consensus ETS n'était pas toujours compétitionnée par l'oligo contrôle EBS, capable de lier des ETS. Ceci pourrait s'expliquer par une affinité différentielle entre les sondes et l'oligo EBS dû aux différences de séquence du consensus central (« core sequence ») et/ou des nucléotides voisins. Afin d'étudier plus amplement l'implication des TFBS sélectionnés dans la modulation éventuelle de ETV6 dans une étude future, l'utilisation d'extraits nucléaires contenant un ETV6 fusionné à un épitope-tag serait un bon moyen pour contourner l'absence d'un bon anticorps contre ETV6 en étude de super-shift puisque de bons anticorps contre différents épitopes sont disponibles commercialement. L'utilisation de la méthode d'immunoprécipitation de chromatine serait également un bon moyen d'investiguer la liaison de ETV6 à ces régions.

3.4 Analyse des connexions entre les gènes modulés par ETV6

Une étude de microarrays évaluant les changements globaux du transcriptome d'une population de cellules dans des conditions définies procure une mine d'information. Ces informations renferment potentiellement des réponses à une multitude de questions et le principal défi suite à ce type d'étude réside dans l'élaboration de stratégies capables d'obtenir des réponses à ces questions. La compréhension des mécanismes de l'expression génique est un intérêt majeur de notre laboratoire depuis plusieurs années, nous avons donc tenté de pousser plus loin l'analyse de nos données de microarrays. Notre étude nous a permis d'identifier 87 gènes modulés suite à l'induction de ETV6. En assumant que la modulation de ces gènes n'est pas aléatoire, nous avons proposé que des gènes présentant un profil d'expression similaire puissent partager certaines caractéristiques biologiques, des similarités de séquence et/ou des TFBS communs au niveau de leur promoteur. Nous avons mis en évidence que certains profils de modulation étaient associés à des caractéristiques biologiques et à la présence de TFBS conservés dans les promoteurs de ces gènes.

L'introduction de gènes modulés faux positifs dans un ensemble de données est de nature à limiter le pouvoir statistique. Nous savons maintenant que parmi les 87 gènes modulés, certains n'ont pu être confirmés par une seconde méthode. Considérant que toute méthode a ses limites, nous ne pouvons affirmer avec certitude que les gènes dont la modulation a été détectée avec une seule des deux méthodes sont des faux positifs. Nous les considérons par contre comme étant moins probablement de vrais positifs. Comme les études de microarrays génèrent beaucoup de données, il est rare qu'une validation systématique soit entreprise sur tous les gènes identifiés comme étant modulés. C'est pour cette raison que pour nos études d'association, nous avons gardé l'ensemble des 87 gènes, simulant ainsi une situation plus typique.

L'étude des mécanismes moléculaires nous montre que l'acquisition de certains phénotypes est assurée par la coordination de la régulation et/ou de l'activité d'un certain nombre de protéines. Il est alors intuitivement attendu que des gènes co-modulés selon des conditions déterminées codent pour des protéines reliées d'un point de vue fonctionnel. Typiquement, les études de microarrays arrivent à montrer qu'un nombre limité de gènes modulés fait partie de mêmes voies moléculaires, mais ne semble pas, à première vue, présenter de liens fonctionnels évidents. Nous avons émis l'hypothèse que les gènes présentant des profils d'expression similaires peuvent aussi partager des caractéristiques biologiques communes. En regroupant les gènes selon leur profil de modulation et selon leurs caractéristiques biologiques, basées sur les termes de la base de données de Gene Ontology (GO), nous avons montré que certains gènes étaient regroupés à la fois selon ces deux critères et qu'il était statistiquement improbable que ces associations aient été obtenues uniquement par hasard, confirmant ainsi notre hypothèse. Bien qu'il faille souligner que les gènes présentant un profil de modulation similaire ne possèdent pas nécessairement tous des caractéristiques biologiques similaires, des gènes ayant un profil de modulation similaire étaient toutefois associés à la plupart des branches des arbres GO. L'ensemble de données utilisées pour décrire les caractéristiques biologiques des gènes vient de la base de données GO qui, bien qu'elle représente la meilleure option pour le moment pour décrire les produits

géniques sur une base relativement objective, est incomplète d'un point de vue descriptif. Notre approche nous a malgré tout permis de relever un certain nombre d'associations. L'examen de ces associations suggère que certaines caractéristiques biologiques sont plus souvent associées aux profils d'expression alors que d'autres ne présentent jamais de lien (figure 4B section 2.5). La figure 4A de la section 2.5 montre que certains gènes sont plus souvent associés ensemble, ce qui indique qu'en plus de partager un profil de modulation similaire, ils partagent aussi des caractéristiques biologiques communes. L'examen de termes GO communs de ces gènes souvent associés (tableau 1 section 2.5) suggère que ces gènes pourraient être co-modulés afin de répondre à un « besoin » biologique relié à ces termes.

La régulation de l'expression transcriptionnelle dépend de séquences régulatrices dont font partie les promoteurs. Nous avons proposé que les gènes présentant un profil de modulation similaire présentent aussi des similarités de séquence et/ou partagent des TFBS au niveau de leur promoteur. Nous avons détecté très peu d'associations entre les profils de modulation et la similarité de séquence au niveau des promoteurs. Par contre, plusieurs associations entre les profils de modulation et la présence de mêmes TFBS conservés ont été observées. Bien que les gènes présentant un profil de modulation similaire ne partagent pas tous nécessairement les mêmes TFBS conservés, des gènes ayant un profil de modulation similaire étaient sur-représentés dans pratiquement toutes les branches de l'arbre TFBS conservées (ConSite). Le fait que peu d'associations aient été détectées entre les profils de modulation et la similarité de séquence des promoteurs peut s'expliquer par le fait que les promoteurs sont liés par des TF au niveau d'éléments en *cis*, ce qui fait que la plupart des nucléotides d'un promoteur ne sont pas impliqués dans des interactions spécifiques avec des TF et donc que leur mutation au cours de l'évolution présente possiblement moins d'impact et soit plus probablement fixée. La recherche de similarité d'éléments *cis*, ou TFBS, est une méthode ayant l'avantage de se concentrer sur des séquences plus discrètes et non de longues séquences. Par contre, un problème avec cette approche est que les séquences des TFBS sont courtes et dégénérées alors la probabilité de rencontrer une séquence similaire à un TFBS répertorié

seulement par chance est assez élevée. Ceci fait donc en sorte que plusieurs séquences détectées s'avèrent être de faux positifs (Lenhard, B et al. 2003). De plus, la caractérisation de TFBS au niveau du promoteur de la plupart des gènes étant relativement peu avancée, notre capacité à identifier les sites fonctionnellement significatifs pour une analyse comme la nôtre est limitée. C'est pourquoi nous avons décidé de considérer les TFBS conservés entre la souris et l'homme pour notre analyse, ceci dans le but de nous débarrasser de la plupart des TFBS sans signification fonctionnelle (faux positifs) et de garder la plupart de ceux qui sont impliqués dans la régulation (Lenhard, B et al. 2003). Notre approche, en plus de suggérer que des TFBS conservés sont parfois observés dans le promoteur de gènes présentant un profil d'expression similaire, propose des TFBS qui pourraient expliquer cette co-modulation.

Puisque le lien entre les séquences régulatrices d'un gène et la machinerie effectrice de transcription est assuré par les TF et que ceux-ci lient ces séquences au niveau de séquences spécifiques, il est concevable que les promoteurs présentant des TFBS similaires puissent potentiellement être modulés selon un profil d'expression similaire, tel que suggéré par notre étude. Cependant, un lien mécanistique entre la similarité de profils de modulation et la similarité de caractéristiques biologiques est moins évident. Puisque les caractéristiques biologiques sont déterminées par les domaines protéiques codés dans les gènes, nous proposons que la co-modulation de gènes présentant des caractéristiques biologiques similaires puisse s'expliquer par le fait que les séquences codant pour ces domaines sont en liaison génétique avec des sites régulateurs en *cis* dans les promoteurs. Selon le principe de Sturtevant (Griffiths, AJF et al. 1996), si cette hypothèse est vraie, on peut s'attendre à ce que les séquences d'ADN codant pour les domaines protéiques reliés aux caractéristiques biologiques soient plus souvent situées en 5' des gènes dans les cas d'association fréquente avec les profils de modulation puisque la fréquence de liaison décroît avec la distance physique sur un chromosome.

Afin de déterminer quels TF pouvaient possiblement agir en collaboration avec ETV6, nous avons effectué une analyse *in silico* basée sur les gènes de trois

listes. La première étant constituée de gènes modulés par ETV6 identifiés dans notre étude de microarrays, la seconde est une liste de 100 gènes sélectionnés au hasard parmi les gènes non-modulés par ETV6, tel que déterminé par notre étude de microarrays, et la troisième était une liste de gènes connus pour être régulés par des TF ETS sélectionnés au hasard parmi la liste publiée par Sementchenko et Watson (Sementchenko, VI et Watson, DK 2000). Après avoir relevé tous les TFBS conservés dans le promoteur de ces gènes avec l'outil Consite (Sandelin, A et al. 2004b), nous avons comparé la proportion de gènes de chacune des listes présentant au moins une fois chacun des TFBS de la base de données JASPAR (Sandelin, A et al. 2004a). Nous avons montré que des TFBS de la classe REL, p65, c-REL et NF-kB, étaient sous-représentés dans le promoteur des gènes modulés par ETV6 par rapport à ceux non-modulés par celui-ci. NF-kB et c-REL étaient aussi sous-représentés dans le promoteur des gènes modulés par ETV6 par rapport aux gènes régulés par des ETS. Ceci suggère que les gènes modulés par ETV6 subissent peu l'effet régulateur de NF-kB. Il est difficile de spéculer quelle pourrait être la signification de ce résultat puisque NF-kB régule l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans un très grand nombre de processus dont l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'adhésion cellulaire et l'angiogenèse (Baldwin, AS 2001). Il est intéressant de constater que ETV6 a des liens documentés avec chacun de ces processus alors que, de façon contradictoire, nos résultats suggèrent que ETV6 et NF-kB sont moins sujets à agir ensemble. La plus simple explication de ceci pourrait être que les deux TF agissent sur des processus communs mais au niveau de gènes différents qui pourraient possiblement avoir des effets antagonistes sur ces processus. Les TFBS Chop-cEBP et NF-Y étaient sur-représentés dans le promoteur des gènes modulés par ETV6 par rapport aux gènes régulés par des ETS et Broad-complex 1 présentait une tendance à être sur-représenté dans les gènes modulés par ETV6 par rapport à ceux qui ne le sont pas. Puisque Chop-cEBP présente aussi une tendance à être sur-représenté dans les gènes régulés par des ETS par rapport aux gènes non-modulés par ETV6, ce TFBS présente un intérêt qui concerne davantage l'étude des ETS autres que ETV6. Quant à NF-Y, un TF liant des boîtes CAATT et donc qui lie un large éventail de promoteurs, nos résultats suggèrent qu'il s'associerait plus fréquemment à ETV6 qu'aux ETS en général. La

catégorie la plus intéressante pour identifier un TF collaborant possiblement à la régulation génique par ETV6 est celle des TF sur-représentés dans le promoteur des gènes modulés par ETV6 par rapport à ceux qui ne le sont pas. Un seul TF a été relevé dans cette catégorie et c'est Broad-Complex 1. Le rôle régulateur du TF liant ce TFBS (qui porte le même nom) est peu documenté. Il est connu comme étant un TF impliqué dans la réponse tissu-spécifique à l'ecdysone chez la drosophile (von Kalm, L et al. 1994). Ceci ne permet pas de spéculer sur une possible collaboration avec ETV6. ConSite utilise JASPAR, une base de données ne contenant que des TFBS bien caractérisés (Sandelin, A et al. 2004a). Par contre, celle-ci contient relativement peu de matrices, avec un total de 111, par rapport à la base Transfac par exemple qui en contient 762 (<http://www.biobase.de/pages/products/statistics.html#transfac>). Il y a donc lieu de penser que plusieurs matrices n'ont pu être évaluées par notre approche. Transfac ne comporte aucun outil permettant de trouver des TFBS conservés. C'est donc dire que les outils actuels sont encore limitants dans ce type d'analyse. Ceci étant dit, la caractérisation plus approfondie de la régulation des gènes modulés par ETV6 nous permettra d'évaluer la pertinence de nos résultats et de ce type d'analyse.

3.5 Conclusions et orientations futures

Au moment de commencer les travaux de cette thèse, on savait que la région chromosomique 12p12-13 présentait des délétions hémizygotiques récurrentes dans approximativement 30 % des leucémies de type pré-B, suggérant la présence d'un GST dans la région de délétion commune. Notre objectif était de d'identifier le(s) GST dans la région critique et de mieux comprendre l'impact de son inactivation dans les leucémies. Nous avons identifié de nouveaux gènes dans cette région et contribués à la caractérisation de nouvelles isoformes de transcrits de certains autres gènes qui ont été mis en évidence entre-temps. Nous avons évalué si ces 7 gènes candidats étaient inactivés dans les patients leucémiques en recherchant des mutations somatiques et en menant une étude d'expression. Aucune mutation somatique n'a été détectée et seulement le gène

ETV6 était inactivé au niveau de son expression. Selon l'hypothèse « two-hits » des GST, ETV6 devenait alors le candidat GST dans la région la plus probablement impliquée dans la leucémie de l'enfant. De plus, les polymorphismes trouvés ont permis de réduire la région critique contenant seulement les gènes BCL-G et ETV6. Ce dernier étant un facteur de transcription, nous avons voulu identifier des gènes dont l'expression était modulée par celui-ci. Nous avons généré des clones cellulaires inductibles permettant l'induction de ce gène et avons évalué l'expression globale de ces cellules à différents temps après l'induction de ETV6 à l'aide de microarrays. Une analyse stringente des résultats de cette expérience nous a permis d'identifier 87 gènes modulés par ETV6. Ces gènes indiquent que ETV6 a une action pléiotropique et font partie de catégories déjà associées à ETV6, soit l'apoptose, la croissance/prolifération cellulaire, l'adhésion/matrice cellulaire et l'angiogenèse, ainsi qu'à d'autres catégories incluant la réponse immunitaire, le métabolisme du cholestérol et celui des lipides. L'identification de ces gènes suggère maintenant des cibles par lesquelles ETV6 agit sur ces voies cellulaires. Nous avons confirmé la modulation de l'expression de 10/13 gènes par RT-PCR quantitatif. Afin de déterminer si ces gènes étaient potentiellement des cibles directes de ETV6, nous avons évalué 1-3 régions promotrices de ces gènes contenant des EBS pour leur capacité à lier des facteurs nucléaires. Nous avons montré que des régions situées dans le promoteur des gènes AKR1C3, IL18, LUM, PTGER4, PTGS2, TP53 et VEGF liaient des facteurs nucléaires de façon dépendante aux EBS évalués. Afin de déterminer si les gènes validés par RT-PCR quantitatif pouvaient éventuellement être modulés par ETV6 dans les leucémies de patients, nous avons évalué leur expression ainsi que celle de ETV6 dans les leucémies et avons montré que l'expression des gènes IL18, LUM, PTGER4, SPHK1 et TP53 était directement corrélée avec celle de ETV6, suggérant que celui-ci régule leur expression dans les leucémies de patients et proposant des hypothèses sur les mécanismes par lesquels ETV6 pourrait agir comme GST. Nos données de microarrays nous ont aussi permis de montrer que des gènes présentant un profil de modulation similaire partageaient parfois des caractéristiques fonctionnelles et des TFBS conservés au niveau de leur promoteur. Notre méthode d'analyse pourrait s'avérer utile pour orienter nos

recherches futures en proposant des voies sur lesquelles agissent les gènes modulés par ETV6 et des TFBS impliqués dans la régulation de ces gènes.

Cette étude ouvre la porte à trois principales orientations pour de futures recherches : 1) la validation d'autres gènes modulés dans les cellules HeLa ainsi que dans les patients LLA; 2) la caractérisation des mécanismes de régulation par ETV6 des gènes modulés et 3) la caractérisation fonctionnelle des gènes dont l'expression est corrélée avec celle de ETV6 dans les patients afin de mieux comprendre quel est l'impact de l'inactivation de ETV6 dans le développement et/ou la progression de la maladie. Pour la première orientation, nous proposons que le travail de validation par RT-PCR quantitatif se poursuive avec les cellules HeLa afin de confirmer, dans un premier temps, les observations de notre étude de microarrays, puis dans les patients leucémiques afin d'évaluer la possibilité d'une régulation des gènes modulés par ETV6 dans la maladie qui nous intéresse. L'objectif de la deuxième orientation serait de confirmer la modulation des gènes en sous-clonant le promoteur de ces gènes devant un gène rapporteur de type luciférase et en testant l'expression de ce rapporteur en fonction du statut d'expression de ETV6. Un autre objectif serait de déterminer si ETV6 lie directement le promoteur des gènes modulés. Cet objectif pourrait être atteint en utilisant l'essai d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et/ou en utilisant des essais EMSA en super-shift. Les deux méthodes devraient utiliser une construction exprimant ETV6 en fusion avec un tag-épitope afin de pouvoir utiliser de bons anticorps, nécessaires pour la réalisation des deux stratégies. On remarque d'ailleurs dans la littérature que les immunoprécipitations sont généralement effectuées via un tag fusionné à ETV6. Les résultats de EMSA présentés dans cette thèse pourraient servir de point de départ pour tester la liaison de ETV6 au niveau des TFBS liant des protéines nucléaires de façon dépendante à un EBS. La troisième orientation est celle qui permettrait éventuellement de comprendre le rôle de ETV6 et des gènes qu'il module d'une façon plus fonctionnelle dans le contexte de la leucémie. Nous avons déjà élaboré dans le détail des stratégies pour aborder cette question dans la section 3.2. De façon générale, l'idée serait d'utiliser des modèles de lignée cellulaire de leucémie et de tester les phénotypes hypothétiques élaborés plus tôt dans la discussion à

l'aide d'études de sur-expression et de répression des gènes modulés en utilisant la transfection, le RNAi et des inhibiteurs lorsque c'est possible. Idéalement, les études devraient comporter un volet *in vitro* et *in vivo*, dans un animal modèle (se référer à la section 3.2). Pour ce type d'étude, le principal obstacle serait l'efficacité de transfection des constructions puisqu'elle est en général assez mauvaise dans les cellules hématopoïétiques. L'utilisation de vecteurs rétroviraux semble être une méthode légèrement plus efficace que les méthodes traditionnelles (Yang, G et al. 2005). Devant cette inefficacité, il est clair qu'il serait préférable de travailler avec des transfectants stables plutôt que transitoires. Par contre, ceci peut aussi être un problème puisque l'expression des clones isolés est souvent très faible (voir figure 13A). Il a été montré que dans certains types cellulaires, l'intégration de transgènes résultait très souvent en une inactivation de celui-ci (Schmidt-Kastner, PK et al. 1996). Il a été montré également que la co-transfection d'une construction comportant une portion génique exprimée composée d'exons et d'introns et ayant une taille minimale de 12kb, entraînait l'intégration d'un plus grand nombre de copies des plasmides co-tranfectés, un meilleur taux d'expression par copie intégrée ainsi qu'une expression stable dans le temps (McBurney, MW et al. 1998). Cette approche mériterait certainement qu'on s'y attarde devant le constat que l'impact de l'expression d'un gène dans un type cellulaire est parfois tout autre dans un autre type cellulaire. La co-transfection d'une construction exprimant un gène permettant le tri des cellules transfectées, par exemple, le gène GFP pour un tri par « fluorescent-activated cell sorting » (FACS), pourrait aussi être une solution pour travailler avec une population exprimant transitoirement le gène désiré. Il va sans dire que l'utilisation d'inhibiteur, lorsque c'est possible, par exemple de l'IL18BP pour inhiber IL18, serait préférable à toute méthode nécessitant la transfection.

RÉFÉRENCES

- Agence de santé publique du Canada (1997)
- Ahlbom, A, N Day, M Feychting, E Roman, J Skinner, J Dockerty, M Linet, M McBride, J Michaelis, JH Olsen, T Tynes et PK Verkasalo (2000). A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer* **83**(5): 692-8.
- Ahn, SG, HS Kim, SW Jeong, BE Kim, H Rhim, JY Shim, JW Kim, JH Lee et IK Kim (2002). Sox-4 is a positive regulator of Hep3B and HepG2 cells' apoptosis induced by prostaglandin (PG)A(2) and delta(12)-PGJ(2). *Exp Mol Med* **34**(3): 243-9.
- Airoldi, I, L Raffaghello, C Cocco, R Guglielmino, S Roncella, F Fedeli, C Gambini et V Pistoia (2004). Heterogeneous expression of interleukin-18 and its receptor in B-cell lymphoproliferative disorders deriving from naive, germinal center, and memory B lymphocytes. *Clin Cancer Res* **10**(1 Pt 1): 144-54.
- Aissani, B, C Bonan, A Baccichet et D Sinnett (1999). Childhood acute lymphoblastic leukemia: is there a tumor suppressor gene in chromosome 12p12.3? *Leuk Lymphoma* **34**(3-4): 231-9.
- Aissani, B et D Sinnett (1999). Fine physical and transcript mapping of a 1.8 Mb region spanning the locus for childhood acute lymphoblastic leukemia on chromosome 12p12. 3. *Gene* **240**(2): 297-305.
- Akamatsu, S, N Arai, T Hanaya, S Arai, T Tanimoto, M Fujii, K Kohno, MJ Micallef, M Ikeda et M Kurimoto (2002). Antitumor activity of interleukin-18 against the murine T-cell leukemia/lymphoma EL-4 in syngeneic mice. *J Immunother* **25 Suppl 1**: S28-34.
- Alcorta, DA, Y Xiong, D Phelps, G Hannon, D Beach et JC Barrett (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13742-7.
- American Cancer Society (2005). Cancer Facts and Figures 2005. Atlanta, American Cancer Society.
- Andreasson, P, J Schwaller, E Anastasiadou, J Aster et DG Gilliland (2001). The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genet Cytogenet* **130**(2): 93-104.
- Antonyak, MA, DK Moscatello et AJ Wong (1998). Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase by a mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **273**(5): 2817-22.
- Arai, H, K Maki, K Waga, K Sasaki, Y Nakamura, Y Imai, M Kurokawa, H Hirai et K Mitani (2002). Functional regulation of TEL by p38-induced phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **299**(1): 116-25.
- Baccichet, A, SK Qualman et D Sinnett (1997). Allelic loss in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* **21**(9): 817-23.
- Baccichet, A et D Sinnett (1997). Frequent deletion of chromosome 12p12.3 in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **99**(1): 107-14.

- Baens, M, P Peeters, C Guo, J Aerssens et P Marynen (1996). Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6. *Genome Res* **6**(5): 404-13.
- Baens, M, I Wlodarska, A Corveleyn, I Hoornaert, A Hagemeyer et P Marynen (1999). A physical, transcript, and deletion map of chromosome region 12p12.3 flanked by ETV6 and CDKN1B: hypermethylation of the LRP6 CpG island in two leukemia patients with hemizygous del(12p). *Genomics* **56**(1): 40-50.
- Baldwin, AS (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* **107**(3): 241-6.
- Balmain, A et IB Pragnell (1983). Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature* **303**(5912): 72-4.
- Barak, Y, T Juven, R Haffner et M Oren (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J* **12**(2): 461-8.
- Bartel, FO, T Higuchi et DD Spyropoulos (2000). Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors. *Oncogene* **19**(55): 6443-54.
- Bauman, DR, S Steckelbroeck et TM Penning (2004). The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action. *Drug News Perspect* **17**(9): 563-78.
- Baxevanis, CN, AD Gritzapis et M Papamichail (2003). In vivo antitumor activity of NKT cells activated by the combination of IL-12 and IL-18. *J Immunol* **171**(6): 2953-9.
- Ben-David, Y, EB Giddens, K Letwin et A Bernstein (1991). Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. *Genes Dev* **5**(6): 908-18.
- Berger, R, A Bernheim, M Le Coniat, D Vecchione, A Pacot, MT Daniel et G Flandrin (1986). Abnormalities of the short arm of chromosome 12 in acute nonlymphocytic leukemia and dysmyelopoietic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* **19**(3-4): 281-9.
- Bernardin, F, Y Yang, R Cleaves, M Zahurak, L Cheng, CI Civin et AD Friedman (2002). TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res* **62**(14): 3904-8.
- Blair, DG et M Athanasiou (2000). Ets and retroviruses - transduction and activation of members of the Ets oncogene family in viral oncogenesis. *Oncogene* **19**(55): 6472-81.
- Boccuni, P, D MacGrogan, JM Scandura et SD Nimer (2003). The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6). *J Biol Chem* **278**(17): 15412-20.
- Bodnar, AG, M Ouellette, M Frolkis, SE Holt, CP Chiu, GB Morin, CB Harley, JW Shay, S Lichtsteiner et WE Wright (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**(5349): 349-52.
- Boily, G, J Larose, P Beaulieu, S Langlois et D Sinnett (2005). Identification of transcripts modulated by ETV6, a putative tumor suppressor gene associated to childhood leukemia. **manuscript in preparation.**
- Bond, JA, MF Haughton, JM Rowson, PJ Smith, V Gire, D Wynford-Thomas et FS Wyllie (1999). Control of replicative life span in human cells: barriers to

- clonal expansion intermediate between M1 senescence and M2 crisis. *Mol Cell Biol* **19**(4): 3103-14.
- Bottcher, RT, N Pollet, H Delius et C Niehrs (2004). The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling. *Nat Cell Biol* **6**(1): 38-44.
- Bright, RK, CD Vocke, MR Emmert-Buck, PH Duray, D Solomon, P Fetsch, JS Rhim, WM Linehan et SL Topalian (1997). Generation and genetic characterization of immortal human prostate epithelial cell lines derived from primary cancer specimens. *Cancer Res* **57**(5): 995-1002.
- Brown, DM, GL Warner, JE Ales-Martinez, DW Scott et RP Phipps (1992). Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* **63**(3): 221-9.
- Bryan, TM, A Englezou, L Dalla-Pozza, MA Dunham et RR Reddel (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* **3**(11): 1271-4.
- Bryan, TM, A Englezou, J Gupta, S Bacchetti et RR Reddel (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J* **14**(17): 4240-8.
- Calero Moreno, TM, G Gustafsson, S Garwicz, D Grander, GK Jonmundsson, BM Frost, A Makiperna, O Rasool, ER Savolainen, K Schmiegelow, S Soderhall, K Vetteranta, F Wesenberg, S Einhorn et M Heyman (2002). Deletion of the Ink4-locus (the p16ink4a, p14ARF and p15ink4b genes) predicts relapse in children with ALL treated according to the Nordic protocols NOPHO-86 and NOPHO-92. *Leukemia* **16**(10): 2037-45.
- Cave, H, V Cacheux, S Raynaud, G Brunie, M Bakkus, P Cochaux, C Preudhomme, JL Lai, E Vilmer et B Grandchamp (1997). ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* **11**(9): 1459-64.
- Cayuela, JM, A Madani, L Sanhes, MH Stern et F Sigaux (1996). Multiple tumor-suppressor gene 1 inactivation is the most frequent genetic alteration in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **87**(6): 2180-6.
- Chakrabarti, SR et G Nucifora (1999). The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun* **264**(3): 871-7.
- Chakrabarti, SR, R Sood, S Ganguly, S Bohlander, Z Shen et G Nucifora (1999). Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7467-72.
- Chakrabarti, SR, R Sood, S Nandi et G Nucifora (2000). Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13281-5.
- Chakravarti, S (2002). Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj J* **19**(4-5): 287-93.
- Chambers, AF, IC MacDonald, EE Schmidt, S Koop, VL Morris, R Khokha et AC Groom (1995). Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev* **14**(4): 279-301.
- Chan, LC, YL Kwong, HW Liu, CP Lee, KW Lie et AY Chan (1992). Deletion 12p in de novo acute myeloid leukemia. An association with early progenitor cell. *Cancer Genet Cytogenet* **62**(1): 47-9.

- Christofori, G et H Semb (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* **24**(2): 73-6.
- Colby-Graham, MF et C Chordas (2003). The childhood leukemias. *J Pediatr Nurs* **18**(2): 87-95.
- Cools, J, N Mentens, MD Odero, P Peeters, I Wlodarska, M Delforge, A Hagemeyer et P Marynen (2002). Evidence for position effects as a variant ETV6-mediated leukemogenic mechanism in myeloid leukemias with a t(4;12)(q11-q12;p13) or t(5;12)(q31;p13). *Blood* **99**(5): 1776-84.
- Costa, C, R Soares et F Schmitt (2004). Angiogenesis: now and then. *Apmis* **112**(7-8): 402-12.
- Coughlin, CM, KE Salhany, M Wysocka, E Aruga, H Kurzawa, AE Chang, CA Hunter, JC Fox, G Trinchieri et WM Lee (1998). Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* **101**(6): 1441-52.
- Counter, CM, AA Avilion, CE LeFeuvre, NG Stewart, CW Greider, CB Harley et S Bacchetti (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* **11**(5): 1921-9.
- Counter, CM, FM Botelho, P Wang, CB Harley et S Bacchetti (1994). Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* **68**(5): 3410-4.
- Cuvillier, O et T Levade (2001). Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood* **98**(9): 2828-36.
- Cuvillier, O, DS Rosenthal, ME Smulson et S Spiegel (1998). Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem* **273**(5): 2910-6.
- Datto, MB, PP Hu, TF Kowalik, J Yingling et XF Wang (1997). The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol* **17**(4): 2030-7.
- DePinho, RA (2000). The age of cancer. *Nature* **408**(6809): 248-54.
- Desterro, JM, J Thomson et RT Hay (1997). Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* **417**(3): 297-300.
- Dickson, MA, WC Hahn, Y Ino, V Ronfard, JY Wu, RA Weinberg, DN Louis, FP Li et JG Rheinwald (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* **20**(4): 1436-47.
- Dimri, GP, X Lee, G Basile, M Acosta, G Scott, C Roskelley, EE Medrano, M Linskens, I Rubelj, O Pereira-Smith et et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-7.
- Draper, G, T Vincent, ME Kroll et J Swanson (2005). Childhood cancer in relation to distance from high voltage power lines in England and Wales: a case-control study. *Bmj* **330**(7503): 1290.
- Engers, R et HE Gabbert (2000). Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* **126**(12): 682-92.

- Fears, S, M Gavin, DE Zhang, C Hetherington, Y Ben-David, JD Rowley et G Nucifora (1997). Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1949-54.
- Fenrick, R, JM Amann, B Lutterbach, L Wang, JJ Westendorf, JR Downing et SW Hiebert (1999). Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* **19**(10): 6566-74.
- Fenrick, R, L Wang, J Nip, JM Amann, RJ Rooney, J Walker-Daniels, HC Crawford, DL Hulboy, MS Kinch, LM Matrisian et SW Hiebert (2000). TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. *Mol Cell Biol* **20**(16): 5828-39.
- Ferrando, AA et AT Look (2003). Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* **40**(4): 274-80.
- Fidler, IJ (2002). Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* **12**(2): 89-96.
- Fischer, M, M Schwieger, S Horn, B Niebuhr, A Ford, S Roscher, U Bergholz, M Greaves, J Lohler et C Stocking (2005). Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene*.
- Fogar, P, D Basso, C Pasquali, M De Paoli, C Sperti, G Roveroni, S Pedrazzoli et M Plebani (1997). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res* **17**(2B): 1227-30.
- Foley, KP et RN Eisenman (1999). Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mxi1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. *Biochim Biophys Acta* **1423**(3): M37-47.
- Foster, SA et DA Galloway (1996). Human papillomavirus type 16 E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary epithelial cells. *Oncogene* **12**(8): 1773-9.
- Gagnon, ML, GK Moy et M Klagsbrun (1999). Characterization of the promoter for the human antisense fibroblast growth factor-2 gene; regulation by Ets in Jurkat T cells. *J Cell Biochem* **72**(4): 492-506.
- Ghayur, T, S Banerjee, M Hugunin, D Butler, L Herzog, A Carter, L Quintal, L Sekut, R Talanian, M Paskind, W Wong, R Kamen, D Tracey et H Allen (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* **386**(6625): 619-23.
- Golub, TR, GF Barker, SK Bohlander, SW Hiebert, DC Ward, P Bray-Ward, E Morgan, SC Raimondi, JD Rowley et DG Gilliland (1995). Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 4917-21.
- Gracie, JA, SE Robertson et IB McInnes (2003). Interleukin-18. *J Leukoc Biol* **73**(2): 213-24.
- Grady, WM, LL Myeroff, SE Swinler, A Rajput, S Thiagalingam, JD Lutterbaugh, A Neumann, MG Brattain, J Chang, SJ Kim, KW Kinzler, B Vogelstein, JK Willson et S Markowitz (1999). Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* **59**(2): 320-4.
- Greenberg, RA, L Chin, A Femino, KH Lee, GJ Gottlieb, RH Singer, CW Greider et RA DePinho (1999). Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a(delta2/3) cancer-prone mouse. *Cell* **97**(4): 515-25.

- Griffiths, AJF, JH Miller, DT Suzuki, RC Lewontin et WM Gelbart (1996). Genetic Analysis. New York, W.H. Freeman and Company.
- Gu, Y, K Kuida, H Tsutsui, G Ku, K Hsiao, MA Fleming, N Hayashi, K Higashino, H Okamura, K Nakanishi, M Kurimoto, T Tanimoto, RA Flavell, V Sato, MW Harding, DJ Livingston et MS Su (1997). Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* **275**(5297): 206-9.
- Guidez, F, K Petrie, AM Ford, H Lu, CA Bennett, A MacGregor, J Hannemann, Y Ito, J Ghysdael, M Greaves, LM Wiedemann et A Zelent (2000). Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood* **96**(7): 2557-61.
- Gump, J, L McGavran, Q Wei et SP Hunger (2001). Analysis of TP53 mutations in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* **23**(7): 416-9.
- Gunji, H, K Waga, F Nakamura, K Maki, K Sasaki, Y Nakamura et K Mitani (2004). TEL/AML1 shows dominant-negative effects over TEL as well as AML1. *Biochem Biophys Res Commun* **322**(2): 623-30.
- Guo, B, A Godzik et JC Reed (2001). Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* **276**(4): 2780-5.
- Gustafsson, B et O Stal (1998). Overexpression of MDM2 in acute childhood lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* **15**(6): 519-26.
- Hahn, WC (2002). Immortalization and transformation of human cells. *Mol Cells* **13**(3): 351-61.
- Hahn, WC, CM Counter, AS Lundberg, RL Beijersbergen, MW Brooks et RA Weinberg (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**(6743): 464-8.
- Hahn, WC et RA Weinberg (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* **347**(20): 1593-603.
- Hanahan, D et RA Weinberg (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hannon, GJ et D Beach (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**(6494): 257-61.
- Hara, E, R Smith, D Parry, H Tahara, S Stone et G Peters (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* **16**(3): 859-67.
- Harris, MB, JJ Shuster, A Carroll, AT Look, MJ Borowitz, WM Crist, R Nitschke, J Pullen, CP Steuber et VJ Land (1992). Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* **79**(12): 3316-24.
- Harrison, CJ (2000). The genetics of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* **13**(3): 427-39.
- Harrison, CJ (2001a). Acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **14**(3): 593-607.
- Harrison, CJ (2001b). The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev* **15**(1): 49-59.

- Harvey, DM et AJ Levine (1991). p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev* 5(12B): 2375-85.
- Hatta, Y, S Takeuchi, J Yokota et HP Koeffler (1997). Ovarian cancer has frequent loss of heterozygosity at chromosome 12p12.3-13.1 (region of TEL and Kip1 loci) and chromosome 12q23-ter: evidence for two new tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 75(9): 1256-62.
- Hayflick, L (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37: 614-36.
- Heerema, NA, DC Arthur, H Sather, V Albo, J Feusner, BJ Lange, PG Steinherz, P Zeltzer, D Hammond et GH Reaman (1994). Cytogenetic features of infants less than 12 months of age at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: impact of the 11q23 breakpoint on outcome: a report of the Childrens Cancer Group. *Blood* 83(8): 2274-84.
- Heerema, NA, JB Nachman, HN Sather, MG Sensel, MK Lee, R Hutchinson, BJ Lange, PG Steinherz, B Bostrom, PS Gaynon et F Uckun (1999). Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group. *Blood* 94(12): 4036-45.
- Heerema, NA, HN Sather, MG Sensel, T Zhang, RJ Hutchinson, JB Nachman, BJ Lange, PG Steinherz, BC Bostrom, GH Reaman, PS Gaynon et FM Uckun (2000). Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol* 18(9): 1876-87.
- Hendricks, A, W Leibold, V Kaefer et HJ Schuberth (2000). Prostaglandin E2 is variably induced by bacterial superantigens in bovine mononuclear cells and has a regulatory role for the T cell proliferative response. *Immunobiology* 201(5): 493-505.
- Hernandez-Boussard, T, P Rodriguez-Tome, R Montesano et P Hainaut (1999). IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines. International Agency for Research on Cancer. *Hum Mutat* 14(1): 1-8.
- Herrera, L, RA Farah, VA Pellegrini, DB Aquino, ES Sandler, GR Buchanan et ES Vitetta (2000). Immunotoxins against CD19 and CD22 are effective in killing precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells in vitro. *Leukemia* 14(5): 853-8.
- Hicklin, DJ et LM Ellis (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23(5): 1011-27.
- Hiebert, SW, W Sun, JN Davis, T Golub, S Shurtleff, A Buijs, JR Downing, G Grosveld, MF Roussel, DG Gilliland, N Lenny et S Meyers (1996). The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol* 16(4): 1349-55.
- Hjalgrim, LL, K Rostgaard, H Hjalgrim, T Westergaard, H Thomassen, E Forestier, G Gustafsson, J Kristinsson, M Melbye et K Schmiegelow (2004). Birth weight and risk for childhood leukemia in Denmark, Sweden, Norway, and Iceland. *J Natl Cancer Inst* 96(20): 1549-56.
- Hock, H, E Meade, S Medeiros, JW Schindler, PJ Valk, Y Fujiwara et SH Orkin (2004). Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* 18(19): 2336-41.

- Hoornaert, I, P Marynen, J Goris, R Sciot et M Baens (2003). MAPK phosphatase DUSP16/MKP-7, a candidate tumor suppressor for chromosome region 12p12-13, reduces BCR-ABL-induced transformation. *Oncogene* **22**(49): 7728-36.
- Infante-Rivard, C, D Labuda, M Krajcinovic et D Sinnett (1999). Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. *Epidemiology* **10**(5): 481-7.
- Iravani, M, R Dhat et CM Price (1997). Methylation of the multi tumor suppressor gene-2 (MTS2, CDKN1, p15INK4B) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* **15**(21): 2609-14.
- Irvin, BJ, LD Wood, L Wang, R Fenrick, CG Sansam, G Packham, M Kinch, E Yang et SW Hiebert (2003). TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL. *J Biol Chem* **278**(47): 46378-86.
- Jackson, JF, J Boyett, J Pullen, B Brock, R Patterson, V Land, M Borowitz, D Head et W Crist (1990). Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphocytic leukemia correlates with extra chromosome 6. A Pediatric Oncology Group study. *Cancer* **66**(6): 1183-9.
- Jin, Y, E Knudsen, L Wang, Y Bryceson, B Damaj, S Gessani et AA Maghazachi (2003). Sphingosine 1-phosphate is a novel inhibitor of T-cell proliferation. *Blood* **101**(12): 4909-15.
- Jousset, C, C Carron, A Boureux, CT Quang, C Oury, I Dusanter-Fourt, M Charon, J Levin, O Bernard et J Ghysdael (1997). A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *Embo J* **16**(1): 69-82.
- Ju, DW, Q Tao, G Lou, M Bai, L He, Y Yang et X Cao (2001). Interleukin 18 transfection enhances antitumor immunity induced by dendritic cell-tumor cell conjugates. *Cancer Res* **61**(9): 3735-40.
- Ju, DW, Y Yang, Q Tao, WG Song, L He, G Chen, S Gu, CC Ting et X Cao (2000). Interleukin-18 gene transfer increases antitumor effects of suicide gene therapy through efficient induction of antitumor immunity. *Gene Ther* **7**(19): 1672-9.
- Kamijo, T, F Zindy, MF Roussel, DE Quelle, JR Downing, RA Ashmun, G Grosveld et CJ Sherr (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**(5): 649-59.
- Kannan, K, N Kaminski, G Rechavi, J Jakob-Hirsch, N Amariglio et D Givol (2001). DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* **20**(26): 3449-55.
- Karlseder, J, D Broccoli, Y Dai, S Hardy et T de Lange (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* **283**(5406): 1321-5.
- Kawagoe, H, M Potter, J Ellis et GC Grosveld (2004). TEL2, an ETS factor expressed in human leukemia, regulates monocytic differentiation of U937 Cells and blocks the inhibitory effect of TEL1 on ras-induced cellular transformation. *Cancer Res* **64**(17): 6091-100.
- Keely, PJ, JK Westwick, IP Whitehead, CJ Der et LV Parise (1997). Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* **390**(6660): 632-6.

- Kibel, AS, DA Faith, GS Bova et WB Isaacs (2002). Mutational analysis of ETV6 in prostate carcinoma. *Prostate* **52**(4): 305-10.
- Kibel, AS, D Freije, WB Isaacs et GS Bova (1999). Deletion mapping at 12p12-13 in metastatic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **25**(3): 270-6.
- Kim, DH, RL Moldwin, C Vignon, SK Bohlander, Y Suto, L Giordano, R Gupta, S Fears, G Nucifora et JD Rowley (1996). TEL-AML1 translocations with TEL and CDKN2 inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* **88**(3): 785-94.
- Kim, NW, MA Piatyszek, KR Prowse, CB Harley, MD West, PL Ho, GM Coviello, WE Wright, SL Weinrich et JW Shay (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**(5193): 2011-5.
- Kishida, T, H Asada, E Satoh, S Tanaka, M Shinya, H Hirai, M Iwai, H Tahara, J Imanishi et O Mazda (2001). In vivo electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice. *Gene Ther* **8**(16): 1234-40.
- Kiyono, T, SA Foster, JI Koop, JK McDougall, DA Galloway et AJ Klingelutz (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**(6706): 84-8.
- Klamt, C (1993). The Drosophila gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* **117**(1): 163-76.
- Knudson, AG, Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(4): 820-3.
- Krajcinovic, M, D Labuda et D Sinnett (2001). Childhood acute lymphoblastic leukemia: genetic determinants of susceptibility and disease outcome. *Rev Environ Health* **16**(4): 263-79.
- Krug, U, A Ganser et HP Koeffler (2002). Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **21**(21): 3475-95.
- Kufe, D, R Pollock, R Weichselbaum, R Bast, T Gansler, J Holland et E Frei (2003). *Holland Frei Cancer Medicine* 6. Hamilton, BC Decker.
- Kuwata, T, C Gongora, Y Kanno, K Sakaguchi, T Tamura, T Kanno, V Basrur, R Martinez, E Appella, T Golub et K Ozato (2002). Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. *Mol Cell Biol* **22**(21): 7439-48.
- Kwiatkowski, BA, LS Bastian, TR Bauer, Jr., S Tsai, AG Zielinska-Kwiatkowska et DD Hickstein (1998). The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* **273**(28): 17525-30.
- Kwiatkowski, BA, AG Zielinska-Kwiatkowska, TR Bauer, Jr. et DD Hickstein (2000). The ETS family member Tel antagonizes the Fli-1 phenotype in hematopoietic cells. *Blood Cells Mol Dis* **26**(1): 84-90.
- Lai, ZC, M Fetchko et Y Li (1997). Repression of Drosophila photoreceptor cell fate through cooperative action of two transcriptional repressors Yan and Tramtrack. *Genetics* **147**(3): 1131-7.
- Land, H, LF Parada et RA Weinberg (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**(5927): 596-602.

- Latil, A, M Guerard, P Berthon et O Cussenot (2001). 12p12-13 deletion in prostate tumors and quantitative expression of CDKN1B and ETV6 candidate genes. *Genes Chromosomes Cancer* **31**(2): 199-200.
- Laudet, V, C Hanni, D Stehelin et M Duterque-Coquillaud (1999). Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* **18**(6): 1351-9.
- Lenhard, B, A Sandelin, L Mendoza, P Engstrom, N Jareborg et WW Wasserman (2003). Identification of conserved regulatory elements by comparative genome analysis. *J Biol* **2**(2): 13.
- Lewis, TS, PS Shapiro et NG Ahn (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**: 49-139.
- Leygue, E, L Snell, H Dotzlaw, K Hole, T Hiller-Hitchcock, PJ Roughley, PH Watson et LC Murphy (1998). Expression of lumican in human breast carcinoma. *Cancer Res* **58**(7): 1348-52.
- Li, AW et PR Murphy (2000). Expression of alternatively spliced FGF-2 antisense RNA transcripts in the central nervous system: regulation of FGF-2 mRNA translation. *Mol Cell Endocrinol* **170**(1-2): 233-42.
- Li, S, RL Ilaria, Jr., RP Million, GQ Daley et RA Van Etten (1999). The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med* **189**(9): 1399-412.
- Li, Y, W Lu, X He, AL Schwartz et G Bu (2004). LRP6 expression promotes cancer cell proliferation and tumorigenesis by altering beta-catenin subcellular distribution. *Oncogene* **23**(56): 9129-35.
- Liu, X, P Yue, FR Khuri et SY Sun (2004). p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res* **64**(15): 5078-83.
- Liu, Y, H Huang, A Saxena et J Xiang (2002). Intratumoral coinjection of two adenoviral vectors expressing functional interleukin-18 and inducible protein-10, respectively, synergizes to facilitate regression of established tumors. *Cancer Gene Ther* **9**(6): 533-42.
- Lopez, RG, C Carron et J Ghysdael (2003). v-SRC specifically regulates the nucleo-cytoplasmic delocalization of the major isoform of TEL (ETV6). *J Biol Chem* **278**(42): 41316-25.
- Lopez, RG, C Carron, C Oury, P Gardellin, O Bernard et J Ghysdael (1999). TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* **274**(42): 30132-8.
- Lu, YP, T Ishiwata, K Kawahara, M Watanabe, Z Naito, Y Moriyama, Y Sugisaki et G Asano (2002). Expression of lumican in human colorectal cancer cells. *Pathol Int* **52**(8): 519-26.
- Lundberg, AS, SH Randell, SA Stewart, B Elenbaas, KA Hartwell, MW Brooks, MD Fleming, JC Olsen, SW Miller, RA Weinberg et WC Hahn (2002). immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene* **21**(29): 4577-86.
- Ly-Sunnaram, B, C Henry, V Gandemer, FL Mee, F Burtin, M Blayau, JM Cayuela, M Oster, P Clech, M Rambeau, C Marie, C Pampin, C Edan, EL Gall et JE Goasguen (2005). Late ovarian relapse of TEL/AML1 positive ALL confirming that TEL deletion is a secondary event in leukemogenesis. *Leuk Res* **29**(9): 1089-94.

- MacLachlan, TK et WS El-Deiry (2002). Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9492-7.
- Mandala, S, R Hajdu, J Bergstrom, E Quackenbush, J Xie, J Milligan, R Thornton, GJ Shei, D Card, C Keohane, M Rosenbach, J Hale, CL Lynch, K Rupprecht, W Parsons et H Rosen (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* **296**(5566): 346-9.
- Mastino, A, M Piacentini, S Grelli, C Favalli, F Autuori, L Tentori, S Oliverio et E Garaci (1992). Induction of apoptosis in thymocytes by prostaglandin E2 in vivo. *Dev Immunol* **2**(4): 263-71.
- Masuda, K, H Shima, C Katagiri et K Kikuchi (2003). Activation of ERK induces phosphorylation of MAPK phosphatase-7, a JNK specific phosphatase, at Ser-446. *J Biol Chem* **278**(34): 32448-56.
- Masuda, K, H Shima, M Watanabe et K Kikuchi (2001). MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. *J Biol Chem* **276**(42): 39002-11.
- Mavrothalassitis, G et J Ghysdael (2000). Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene* **19**(55): 6524-32.
- McBurney, MW, X Yang, K Jardine et M Cormier (1998). A role for RNA processing in regulating expression from transfected genes. *Somat Cell Mol Genet* **24**(4): 203-15.
- McGrath, MJ, CA Mitchell, ID Coghill, PA Robinson et S Brown (2003). Skeletal muscle LIM protein 1 (SLIM1/FHL1) induces alpha 5 beta 1-integrin-dependent myocyte elongation. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**(6): C1513-26.
- McLean, TW, S Ringold, D Neuberg, K Stegmaier, R Tantravahi, J Ritz, HP Koeffler, S Takeuchi, JW Janssen, T Seriu, CR Bartram, SE Sallan, DG Gilliland et TR Golub (1996). TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **88**(11): 4252-8.
- Miyashita, T et JC Reed (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**(2): 293-9.
- Momand, J, D Jung, S Wilczynski et J Niland (1998). The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* **26**(15): 3453-9.
- Monni, O, K Franssila, H Joensuu et S Knuutila (1999). BCL2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* **34**(1-2): 45-52.
- Montpetit, A, G Boily et D Sinnett (2002). A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus. *Eur J Hum Genet* **10**(1): 62-71.
- Montpetit, A, J Larose, G Boily, S Langlois, N Trudel et D Sinnett (2004). Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **18**(9): 1499-504.
- Moreau-Gachelin, F, A Tavitian et P Tambourin (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* **331**(6153): 277-80.
- Mori, H, SM Colman, Z Xiao, AM Ford, LE Healy, C Donaldson, JM Hows, C Navarrete et M Greaves (2002). Chromosome translocations and covert

- leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8242-7.
- Moroni, MC, ES Hickman, E Lazzerini Denchi, G Caprara, E Colli, F Cecconi, H Muller et K Helin (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* **3**(6): 552-8.
- Mu, XC, L Staiano-Coico et PJ Higgins (1998). Increased transcription and modified growth state-dependent expression of the plasminogen activator inhibitor type-1 gene characterize the senescent phenotype in human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol* **174**(1): 90-8.
- Muller, M, S Wilder, D Bannasch, D Israeli, K Lehibach, M Li-Weber, SL Friedman, PR Galle, W Stremmel, M Oren et PH Krammer (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* **188**(11): 2033-45.
- Murakami, M et I Kudo (2004). Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* **43**(1): 3-35.
- Murayama, Y, J Miyagawa, Y Shinomura, S Kanayama, K Isozaki, K Yamamori, H Mizuno, S Ishiguro, T Kiyohara, Y Miyazaki, N Taniguchi, S Higashiyama et Y Matsuzawa (2002). Significance of the association between heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and CD9 in human gastric cancer. *Int J Cancer* **98**(4): 505-13.
- Murphy, PR et RS Knee (1994). Identification and characterization of an antisense RNA transcript (gfg) from the human basic fibroblast growth factor gene. *Mol Endocrinol* **8**(7): 852-9.
- Mutoh, M, K Watanabe, T Kitamura, Y Shoji, M Takahashi, T Kawamori, K Tani, M Kobayashi, T Maruyama, K Kobayashi, S Ohuchida, Y Sugimoto, S Narumiya, T Sugimura et K Wakabayashi (2002). Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res* **62**(1): 28-32.
- Naito, Z, T Ishiwata, G Kurban, K Teduka, Y Kawamoto, K Kawahara et Y Sugisaki (2002). Expression and accumulation of lumican protein in uterine cervical cancer cells at the periphery of cancer nests. *Int J Oncol* **20**(5): 943-8.
- Nakamura, K, H Okamura, M Wada, K Nagata et T Tamura (1989). Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun* **57**(2): 590-5.
- Nakao, M, S Yokota, S Horiike, M Taniwaki, K Kashima, Y Sonoda, S Koizumi, Y Takaue, T Matsushita, T Fujimoto et S Misawa (1996). Detection and quantification of TEL/AML1 fusion transcripts by polymerase chain reaction in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **10**(9): 1463-70.
- Narumiya, S, Y Sugimoto et F Ushikubi (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* **79**(4): 1193-226.
- Neef, R, MA Kuske, E Prols et JP Johnson (2002). Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. *Cancer Res* **62**(20): 5920-9.
- Newbold, RF et RW Overell (1983). Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene. *Nature* **304**(5927): 648-51.

- Newbold, RF, RW Overell et JR Connell (1982). Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. *Nature* **299**(5884): 633-5.
- Noda, A, Y Ning, SF Venable, OM Pereira-Smith et JR Smith (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* **211**(1): 90-8.
- Nordentoft, I et P Jorgensen (2003). The acetyltransferase 60 kDa trans-acting regulatory protein of HIV type 1-interacting protein (Tip60) interacts with the translocation E26 transforming-specific leukaemia gene (TEL) and functions as a transcriptional co-repressor. *Biochem J* **374**(Pt 1): 165-73.
- Nyberg, P, L Xie et R Kalluri (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* **65**(10): 3967-79.
- Ohsugi, T, R Horie, T Kumasaka, A Ishida, T Ishida, K Yamaguchi, T Watanabe, K Umezawa et T Urano (2005). In vivo antitumor activity of the NF-kappaB inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin in a mouse model of adult T-cell leukemia. *Carcinogenesis* **26**(8): 1382-8.
- Ohtsuki, T, MJ Micallef, K Kohno, T Tanimoto, M Ikeda et M Kurimoto (1997). Interleukin 18 enhances Fas ligand expression and induces apoptosis in Fas-expressing human myelomonocytic KG-1 cells. *Anticancer Res* **17**(5A): 3253-8.
- Oikawa, T (2004). ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* **95**(8): 626-33.
- Ongusaha, PP, JC Kwak, AJ Zwible, S Macip, S Higashiyama, N Taniguchi, L Fang et SW Lee (2004). HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res* **64**(15): 5283-90.
- Osaki, T, W Hashimoto, A Gambotto, H Okamura, PD Robbins, M Kurimoto, MT Lotze et H Tahara (1999). Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). *Gene Ther* **6**(5): 808-15.
- Oshikawa, K, F Shi, AL Rakhmievich, PM Sondel, DM Mahvi et NS Yang (1999). Synergistic inhibition of tumor growth in a murine mammary adenocarcinoma model by combinational gene therapy using IL-12, pro-IL-18, and IL-1beta converting enzyme cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13351-6.
- Paget, S (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**(2): 98-101.
- Patel, N, LK Goff, T Clark, AM Ford, N Foot, D Lillington, S Hing, K Pritchard-Jones, LK Jones et V Saha (2003). Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia. *Br J Haematol* **122**(1): 94-8.
- Pear, WS, JP Miller, L Xu, JC Pui, B Soffer, RC Quackenbush, AM Pendergast, R Bronson, JC Aster, ML Scott et D Baltimore (1998). Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* **92**(10): 3780-92.
- Pereira, R, CT Quang, I Lesault, H Dolznig, H Beug et J Ghysdael (1999). FLI-1 inhibits differentiation and induces proliferation of primary erythroblasts. *Oncogene* **18**(8): 1597-608.
- Perentesis, JP, S Bhatia, E Boyle, Y Shao, XO Shu, M Steinbuch, HN Sather, P Gaynon, W Kiffmeyer, J Envall-Fox et LL Robison (2004). RAS oncogene

- mutations and outcome of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **18**(4): 685-92.
- Perl, AK, U Dahl, P Wilgenbus, H Cremer, H Semb et G Christofori (1999). Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic beta tumor cells. *Nat Med* **5**(3): 286-91.
- Phipps, RP, D Lee, V Schad et GL Warner (1989). E-series prostaglandins are potent growth inhibitors for some B lymphomas. *Eur J Immunol* **19**(6): 995-1001.
- Pica, F, O Franzese, C D'Onofrio, E Bonmassar, C Favalli et E Garaci (1996). Prostaglandin E2 induces apoptosis in resting immature and mature human lymphocytes: a c-Myc-dependent and Bcl-2-independent associated pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **277**(3): 1793-800.
- Ping Lu, Y, T Ishiwata et G Asano (2002). Lumican expression in alpha cells of islets in pancreas and pancreatic cancer cells. *J Pathol* **196**(3): 324-30.
- Pinson, KI, J Brennan, S Monkley, BJ Avery et WC Skames (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**(6803): 535-8.
- Plitz, T, P Saint-Mezard, M Satho, S Herren, C Waltzinger, M de Carvalho Bittencourt, MH Kosco-Vilbois et Y Chvatchko (2003). IL-18 binding protein protects against contact hypersensitivity. *J Immunol* **171**(3): 1164-71.
- Poirel, H, V Lacronique, M Mauchauffe, M Le Coniat, E Raffoux, MT Daniel, P Erickson, H Drabkin, RA MacLeod, HG Drexler, J Ghysdael, R Berger et OA Bernard (1998). Analysis of TEL proteins in human leukemias. *Oncogene* **16**(22): 2895-903.
- Poirel, H, RG Lopez, V Lacronique, V Della Valle, M Mauchauffe, R Berger, J Ghysdael et OA Bernard (2000). Characterization of a novel ETS gene, TELB, encoding a protein structurally and functionally related to TEL. *Oncogene* **19**(41): 4802-6.
- Poirel, H, C Oury, C Carron, E Duprez, Y Laabi, A Tsapis, SP Romana, M Mauchauffe, M Le Coniat, R Berger, J Ghysdael et OA Bernard (1997). The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene* **14**(3): 349-57.
- Pui, CH (1992). Acute leukemias with the t(4;11)(q21;q23). *Leuk Lymphoma* **7**(3): 173-9.
- Pui, CH, DL Williams, SC Raimondi, GK Rivera, AT Look, RK Dodge, SL George, FG Behm, WM Crist et SB Murphy (1987). Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **70**(1): 247-53.
- Pulciani, S, E Santos, AV Lauver, LK Long, KC Robbins et M Barbacid (1982). Oncogenes in human tumor cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(9): 2845-9.
- Raimondi, SC, DL Williams, T Callihan, S Peiper, GK Rivera et SB Murphy (1986). Nonrandom involvement of the 12p12 breakpoint in chromosome abnormalities of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **68**(1): 69-75.
- Ray, JM et WG Stetler-Stevenson (1994). The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* **7**(11): 2062-72.

- Raynaud, S, H Cave, M Baens, C Bastard, V Cacheux, J Grosgeorge, C Guidal-Giroux, C Guo, E Vilmer, P Marynen et B Grandchamp (1996). The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **87**(7): 2891-9.
- Rebay, I et GM Rubin (1995). Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell* **81**(6): 857-66.
- Ren, R (2005). Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* **5**(3): 172-83.
- Reznikoff, CA, TR Yeager, CD Belair, E Savelieva, JA Puthenveetil et WM Stadler (1996). Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res* **56**(13): 2886-90.
- Robles, AI, NA Bemmels, AB Foraker et CC Harris (2001). APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* **61**(18): 6660-4.
- Rogge, R, PJ Green, J Urano, S Horn-Saban, M Mlodzik, BZ Shilo, V Hartenstein et U Banerjee (1995). The role of yan in mediating the choice between cell division and differentiation. *Development* **121**(12): 3947-58.
- Roman-Gomez, J, JA Castillejo, A Jimenez, MG Gonzalez, F Moreno, C Rodriguez Mdel, M Barrios, J Maldonado et A Torres (2002). 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **99**(7): 2291-6.
- Rompaey, LV, M Potter, C Adams et G Grosveld (2000). Tel induces a G1 arrest and suppresses Ras-induced transformation. *Oncogene* **19**(46): 5244-50.
- Ross, JS et JA Fletcher (1999). HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* **112**(1 Suppl 1): S53-67.
- Rubnitz, JE et WM Crist (1997). Molecular genetics of childhood cancer: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pediatrics* **100**(1): 101-8.
- Ruley, HE (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**(5927): 602-6.
- Sager, R, K Tanaka, CC Lau, Y Ebina et A Anisowicz (1983). Resistance of human cells to tumorigenesis induced by cloned transforming genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(24): 7601-5.
- Sakurai, T, T Yamada, F Kihara-Negishi, S Teramoto, Y Sato, T Izawa et T Oikawa (2003). Effects of overexpression of the Ets family transcription factor TEL on cell growth and differentiation of K562 cells. *Int J Oncol* **22**(6): 1327-33.
- Saleh, M, I Rambaldi, XJ Yang et MS Featherstone (2000). Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Mol Cell Biol* **20**(22): 8623-33.
- Sandelin, A, W Alkema, P Engstrom, WW Wasserman et B Lenhard (2004a). JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D91-4.

- Sandelin, A, WW Wasserman et B Lenhard (2004b). ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res* **32**(Web Server issue): W249-52.
- Sander, EE, S van Delft, JP ten Klooster, T Reid, RA van der Kammen, F Michiels et JG Collard (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* **143**(5): 1385-98.
- Santarosa, M et A Ashworth (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* **1654**(2): 105-22.
- Sasaki, K, Y Nakamura, K Maki, K Waga, F Nakamura, H Arai, Y Imai, H Hirai et K Mitani (2004). Functional analysis of a dominant-negative DeltaETS TEL/ETV6 isoform. *Biochem Biophys Res Commun* **317**(4): 1128-37.
- Schick, N, EJ Oakeley, NE Hynes et A Badache (2004). TEL/ETV6 is a signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)-induced repressor of Stat3 activity. *J Biol Chem* **279**(37): 38787-96.
- Schmidt-Kastner, PK, K Jardine, M Cormier et MW McBurney (1996). Genes transfected into embryonal carcinoma stem cells are both lost and inactivated at high frequency. *Somat Cell Mol Genet* **22**(5): 383-92.
- Scholz, H, J Deatrick, A Klaes et C Klambt (1993). Genetic dissection of pointed, a Drosophila gene encoding two ETS-related proteins. *Genetics* **135**(2): 455-68.
- Secker-Walker, LM, SD Lawler et RM Hardisty (1978). Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. *Br Med J* **2**(6151): 1529-30.
- Sellers, WR et WG Kaelin, Jr. (1997). Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* **15**(11): 3301-12.
- Sementchenko, VI et DK Watson (2000). Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* **19**(55): 6533-48.
- Sharpless, NE et RA DePinho (1999). The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* **9**(1): 22-30.
- Shay, JW et WE Wright (1989). Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res* **184**(1): 109-18.
- Sheikh, MS, TF Burns, Y Huang, GS Wu, S Amundson, KS Brooks, AJ Fornace, Jr. et WS el-Deiry (1998). p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* **58**(8): 1593-8.
- Shen, Y, Z Jia, RG Nagele, H Ichikawa et GS Goldberg (2006). SRC uses Cas to suppress Fhl1 in order to promote nonanchored growth and migration of tumor cells. *Cancer Res* **66**(3): 1543-52.
- Shih, C, BZ Shilo, MP Goldfarb, A Dannenberg et RA Weinberg (1979). Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(11): 5714-8.
- Shimozato, T et PW Kincade (1999). Prostaglandin E(2) and stem cell factor can deliver opposing signals to B lymphocyte precursors. *Cell Immunol* **198**(1): 21-9.

- Shirasaki, F, HA Makhluf, C LeRoy, DK Watson et M Trojanowska (1999). Ets transcription factors cooperate with Sp1 to activate the human tenascin-C promoter. *Oncogene* **18**(54): 7755-64.
- Shurtleff, SA, A Buijs, FG Behm, JE Rubnitz, SC Raimondi, ML Hancock, GC Chan, CH Pui, G Grosveld et JR Downing (1995). TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* **9**(12): 1985-9.
- Sinn, E, W Muller, P Pattengale, I Tepler, R Wallace et P Leder (1987). Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* **49**(4): 465-75.
- Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada (2005). Statistiques canadiennes sur le cancer 2005. Toronto, Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada.
- Spiegel, S et R Kolesnick (2002). Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia* **16**(9): 1596-602.
- Sporn, MB (1996). The war on cancer. *Lancet* **347**(9012): 1377-81.
- Stams, WA, ML den Boer, HB Beverloo, JP Meijerink, ER van Wering, GE Janka-Schaub et R Pieters (2005). Expression levels of TEL, AML1, and the fusion products TEL-AML1 and AML1-TEL versus drug sensitivity and clinical outcome in t(12;21)-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* **11**(8): 2974-80.
- Stegmaier, K, S Takeuchi, TR Golub, SK Bohlander, CR Bartram et HP Koeffler (1996). Mutational analysis of the candidate tumor suppressor genes TEL and KIP1 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* **56**(6): 1413-7.
- Stevenson, M et DJ Voisky (1986). Activated v-myc and v-ras oncogenes do not transform normal human lymphocytes. *Mol Cell Biol* **6**(10): 3410-7.
- Takeuchi, S, N Mori, M Koike, J Slater, S Park, CW Miller, I Miyoshi et HP Koeffler (1996). Frequent loss of heterozygosity in region of the KIP1 locus in non-small cell lung cancer: evidence for a new tumor suppressor gene on the short arm of chromosome 12. *Cancer Res* **56**(4): 738-40.
- Tamai, K, M Semenov, Y Kato, R Spokony, C Liu, Y Katsuyama, F Hess, JP Saint-Jeannet et X He (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**(6803): 530-5.
- Tamir, A, J Howard, RR Higgins, YJ Li, L Berger, E Zacksenhaus, M Reis et Y Ben-David (1999). Fli-1, an Ets-related transcription factor, regulates erythropoietin-induced erythroid proliferation and differentiation: evidence for direct transcriptional repression of the Rb gene during differentiation. *Mol Cell Biol* **19**(6): 4452-64.
- Tan, J, BE Crucian, AE Chang, E Aruga, A Aruga, SE Dovhey, K Tanigawa et H Yu (1998). Interferon-gamma-inducing factor elicits antitumor immunity in association with interferon-gamma production. *J Immunother* **21**(1): 48-55.
- Tanoue, T, T Yamamoto, R Maeda et E Nishida (2001). A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *J Biol Chem* **276**(28): 26629-39.
- Tasaki, K, Y Yoshida, T Maeda, M Miyauchi, K Kawamura, K Takenaga, H Yamamoto, T Kouzu, T Asano, T Ochiai, S Sakiyama et M Tagawa (2000).

- Protective immunity is induced in murine colon carcinoma cells by the expression of interleukin-12 or interleukin-18, which activate type 1 helper T cells. *Cancer Gene Ther* **7**(2): 247-54.
- Thandla, SP, JE Ploski, SZ Raza-Egilmez, PP Chhalliyil, AW Block, PJ de Jong et PD Aplan (1999). ETV6-AML1 translocation breakpoints cluster near a purine/pyrimidine repeat region in the ETV6 gene. *Blood* **93**(1): 293-9.
- Thomas, M, A Gessner, HP Vornlocher, P Hadwiger, J Greil et O Heidenreich (2005). Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood*.
- Thompson, TC, J Southgate, G Kitchener et H Land (1989). Multistage carcinogenesis induced by ras and myc oncogenes in a reconstituted organ. *Cell* **56**(6): 917-30.
- Tonini, T, F Rossi et PP Claudio (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* **22**(42): 6549-56.
- Toyoshima, Y, M Karas, S Yakar, J Dupont, H Lee et D LeRoith (2004). TDAG51 mediates the effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on cell survival. *J Biol Chem* **279**(24): 25898-904.
- Trask, DK, V Band, DA Zajchowski, P Yaswen, T Suh et R Sager (1990). Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6): 2319-23.
- Tsellou, E, C Troungos, M Moschovi, F Athanasiadou-Piperopoulou, S Polychronopoulou, H Kosmidis, M Kalmanti, A Hatzakis, N Dessypris, A Kalofoutis et E Petridou (2005). Hypermethylation of CpG islands in the promoter region of the p15INK4B gene in childhood acute leukaemia. *Eur J Cancer* **41**(4): 584-9.
- Tsuzuki, S, M Seto, M Greaves et T Enver (2004). Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8443-8.
- Uchida, H, JR Downing, Y Miyazaki, R Frank, J Zhang et SD Nimer (1999). Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 promoter. *Oncogene* **18**(4): 1015-22.
- Van Brocklyn, JR, MJ Lee, R Menzeleev, A Olivera, L Edsall, O Cuvillier, DM Thomas, PJ Coopman, S Thangada, CH Liu, T Hla et S Spiegel (1998). Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* **142**(1): 229-40.
- van de Rijn, M, CM Perou, R Tibshirani, P Haas, O Kallioniemi, J Kononen, J Torhorst, G Sauter, M Zuber, OR Kochli, F Mross, H Dieterich, R Seitz, D Ross, D Botstein et P Brown (2002). Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* **161**(6): 1991-6.
- Van Rompaey, L, W Dou, A Buijs et G Grosveld (1999). Tel, a frequent target of leukemic translocations, induces cellular aggregation and influences expression of extracellular matrix components. *Neoplasia* **1**(6): 526-36.
- Van Rompaey, L, E Holland et G Grosveld (2002). TEL Induces Aggregation in Transformed Cells and Induces Tube Formation in NIH3T3-UCLA Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **291**(4): 820-8.
- Varner, JA et DA Cheresh (1996). Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* **8**(5): 724-30.

- Vaziri, H et S Benchimol (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8(5): 279-82.
- Venanzoni, MC, LR Robinson, DR Hodge, I Kola et A Seth (1996). ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction. *Oncogene* 12(6): 1199-204.
- Vij, N, L Roberts, S Joyce et S Chakravarti (2004). Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea. *Exp Eye Res* 78(5): 957-71.
- Villanueva, A, C Garcia, AB Paules, M Vicente, M Megias, G Reyes, P de Villalonga, N Agell, F Lluís, O Bachs et G Capella (1998). Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 17(15): 1969-78.
- von Kalm, L, K Crossgrove, D Von Seggern, GM Guild et SK Beckendorf (1994). The Broad-Complex directly controls a tissue-specific response to the steroid hormone ecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Embo J* 13(15): 3505-16.
- Vuillermoz, B, A Khoruzhenko, MF D'Onofrio, L Ramont, L Venteo, C Perreau, F Antonicelli, FX Maquart et Y Wegrowski (2004). The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. *Exp Cell Res* 296(2): 294-306.
- Waga, K, Y Nakamura, K Maki, H Arai, T Yamagata, K Sasaki, M Kurokawa, H Hirai et K Mitani (2003). Leukemia-related transcription factor TEL accelerates differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Oncogene* 22(1): 59-68.
- Wang, L et SW Hiebert (2001). TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene* 20(28): 3716-25.
- Wang, LC, F Kuo, Y Fujiwara, DG Gilliland, TR Golub et SH Orkin (1997). Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *Embo J* 16(14): 4374-83.
- Wang, LC, W Swat, Y Fujiwara, L Davidson, J Visvader, F Kuo, FW Alt, DG Gilliland, TR Golub et SH Orkin (1998). The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 12(15): 2392-402.
- Wang, Q, H Yu, DW Ju, L He, JP Pan, DJ Xia, LH Zhang et X Cao (2001). Intratumoral IL-18 gene transfer improves therapeutic efficacy of antibody-targeted superantigen in established murine melanoma. *Gene Ther* 8(7): 542-50.
- Wang, X, N Adhikari, Q Li et JL Hall (2004). LDL receptor-related protein LRP6 regulates proliferation and survival through the Wnt cascade in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(6): H2376-83.
- Wang, X, LP Weng et Q Yu (2000). Specific inhibition of FGF-induced MAPK activation by the receptor-like protein tyrosine phosphatase LAR. *Oncogene* 19(19): 2346-53.
- Wehrli, M, ST Dougan, K Caldwell, L O'Keefe, S Schwartz, D Vaizel-Ohayon, E Schejter, A Tomlinson et S DiNardo (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407(6803): 527-30.

- Weng, LP, X Wang et Q Yu (1999). Transmembrane tyrosine phosphatase LAR induces apoptosis by dephosphorylating and destabilizing p130Cas. *Genes Cells* 4(3): 185-96.
- Whitelock, JM, AD Murdoch, RV Iozzo et PA Underwood (1996). The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 271(17): 10079-86.
- Wiemels, JL, FE Alexander, G Cazzaniga, A Biondi, SP Mayer et M Greaves (2000). Microclustering of TEL-AML1 translocation breakpoints in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 29(3): 219-28.
- Wiemels, JL et M Greaves (1999). Structure and possible mechanisms of TEL-AML1 gene fusions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 59(16): 4075-82.
- Wong, IH, MH Ng, DP Huang et JC Lee (2000). Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood* 95(6): 1942-9.
- Xie, JH, N Nomura, SL Koprak, EJ Quackenbush, MJ Forrest et H Rosen (2003). Sphingosine-1-phosphate receptor agonism impairs the efficiency of the local immune response by altering trafficking of naive and antigen-activated CD4+ T cells. *J Immunol* 170(7): 3662-70.
- Yamashita, K, T Iwasaki, T Tsujimura, A Sugihara, N Yamada, H Ueda, H Okamura, H Futani, S Maruo et N Terada (2002). Interleukin-18 inhibits lodging and subsequent growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow. *Oncol Rep* 9(6): 1237-44.
- Yang, G, Q Zhong, W Huang, J Reiser et P Schwarzenberger (2005). Retrovirus molecular conjugates: a versatile and efficient gene transfer vector system for primitive human hematopoietic progenitor cells. *Cancer Gene Ther*.
- Yang, J, E Chang, AM Cherry, CD Bangs, Y Oei, A Bodnar, A Bronstein, CP Chiu et GS Herron (1999). Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem* 274(37): 26141-8.
- Yu, J et L Zhang (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 331(3): 851-8.
- Zhang, B, KF Wu, YM Lin, XT Ma, Q Rao, GG Zheng, ZY Cao, G Li et YH Song (2004). Gene transfer of pro-IL-18 and IL-1beta converting enzyme cDNA induces potent antitumor effects in L1210 cells. *Leukemia* 18(4): 817-25.
- Zhang, X et R Ren (1998). Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 92(10): 3829-40.
- Zhou, M, L Gu, AM Yeager et HW Findley (1997). Incidence and clinical significance of CDKN2/MTS1/P16ink4A and MTS2/P15ink4B gene deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 14(2): 141-50.

**Annexe 1 : Autorisation des co-auteurs et des éditeurs
pour l'utilisation des articles inclus dans la thèse**

Manuscript #: [name of journal] (“the Journal”)

Title of the contribution: (“the Contribution”)

Author(s): (“the Authors”)

To: Nature Publishing Group (“NPG”), a division of Macmillan Publishers Ltd

1. In consideration of NPG agreeing to publish the Contribution the Authors grant to NPG for the full term of copyright in the Contribution and any extensions thereto, subject to clause 2 below, the exclusive licence (a) to publish, reproduce, distribute, display and store the Contribution in all forms, formats and media whether now known or hereafter developed (including without limitation in print, digital and electronic form) throughout the world, (b) to translate the Contribution into other languages, create adaptations, summaries or extracts of the Contribution or other derivative works based on the Contribution and exercise all of the rights set forth in (a) above in such translations, adaptations, summaries, extracts and derivative works and (c) to license others to do any or all of the above.
 - a) The Authors are the sole authors of and sole owners of the copyright in the Contribution. If the Contribution includes materials of others, the Authors have obtained the permission of the owners of the copyright in all such materials to enable them to grant the rights contained herein. Copies of all such permissions are attached to this licence.
 - b) All of the facts contained in the Contribution are true and accurate.
 - c) The Author who has signed this Agreement has full right, power and authority to enter into this Agreement on behalf of all of the Authors.
 - d) Nothing in the Contribution is obscene, defamatory, libelous, violates any right of privacy or infringes any intellectual property rights (including without limitation copyright, patent or trademark) or any other human, personal or other rights of any person or entity or is otherwise unlawful.
 - e) Nothing in the Contribution infringes any duty of confidentiality which any of the Authors may owe to anyone else or violates any contract, express or implied, of any of the Authors, and all of the institutions in which work recorded in the Contribution was carried out have authorised publication of the Contribution.
 2. Ownership of copyright remains with the Authors, and provided that, when reproducing the Contribution or extracts from it, the Authors acknowledge first and reference publication in the Journal, the Authors retain the following non-exclusive rights:
 - a) To reproduce the Contribution in whole or in part in any printed volume (book or thesis) of which they are the author(s).
 - b) They and any academic institution where they work at the time may reproduce the Contribution for the purpose of course teaching.
 - c) To post a copy of the Contribution as accepted for publication after peer review (in Word or Tex format) on the Authors own web site or institutional repository six months after publication of the printed edition of the Journal, provided that they also give a hyperlink from the Contribution to the Journals web site
 - d) To reuse figures or tables created by them and contained in the Contribution in other works created by them.
 3. The Authors warrant and represent that:
 4. The Authors authorise NPG to take such steps as it considers necessary at its own expense in the Authors' name and on their behalf if it believes that a third party is infringing or is likely to infringe copyright in the Contribution.
 5. The Authors hereby consent to the inclusion of electronic links from the Contribution to third-party material wherever it may be located.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of England without regard to the principles of conflicts of law. The parties hereto submit to the non-exclusive jurisdiction of the English courts

Signed for and on behalf of the Authors **Date**

Please print name

Address

Annexe 2 : Autorisation de réimpression des figures 9 et 10.

Dear Gino Boily,

Thank you for your request to use **Figure 1 from *Oncogene* 19(55): 6443-54 (2000) and Figure 2 from *Oncogene* 18(6): 1351-9 (1999)** in your thesis.

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

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
 2. Permission given for material in print is also automatically granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
 3. Permission granted for a first edition is also granted for second and subsequent editions and for editions in other languages.
 4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
 5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)
 6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:
Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
 7. Translations of up to a whole article do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:
Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
- We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

With best regards,

Jo Webber
Permissions Manager
Academic Journals Division
Nature Publishing Group
4 Crinan Street
London N1 9XW
UK
tel: +44 (0)20 7843 4613
fax: +44 (0)20 7843 4839



