



**HAL**  
open science

# Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R au cours de la différenciation érythroïde : implication de la voie de signalisation PI3-Kinase

Osman Breig

► **To cite this version:**

Osman Breig. Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R au cours de la différenciation érythroïde : implication de la voie de signalisation PI3- Kinase. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10029 . tel-00704480

**HAL Id: tel-00704480**

**<https://theses.hal.science/tel-00704480>**

Submitted on 5 Jun 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 29-2010

Année 2010

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ÉCOLE DOCTORALE

Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le (4 Février 2010)

par

***M. BREIG Osman***

TITRE :

**Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R au cours de la différenciation érythroïde :  
Implication de la voie de signalisation PI3-Kinase**

Directeur de thèse : Faouzi BAKLOUTI

JURY :

M. Hubert PINON	Président
Mme. Françoise Moreau-Gachelin	Rapporteur
Mme. Joëlle MARIE	Rapporteur
Mme. Marie-Christine LECOMTE	Examineur
M. Faouzi BAKLOUTI	Examineur

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

## **M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

## Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur **Faouzi BAKLOUTI** pour m'avoir donné l'opportunité de faire ma thèse dans son équipe et pour sa confiance.

Je remercie Mme. Françoise Moreau-Gachelin et Mme. Joëlle MARIE pour avoir acceptée d'être rapporteurs et de prendre du temps pour corriger mon manuscrit, et aux examinateurs M. Hubert PINON et Mme. Marie-Christine LECOMTE pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie tous les membres de l'équipe, les anciens et les nouveaux, **Madeleine MORINIERE** pour sa sympathie, sa disponibilité, ses encouragements et pour la correction de mon manuscrit, Alexandre DOUABLIN pour les discussions scientifiques, sa bonne humeur, **Landry GAYET** pour la bonne ambiance, sans oublier **Zeina Bash- IMAM**, Rand BLAYBEL et **Sandrine LARADI**.

Je remercie également les membres du CGMC pour les discussions, les conseils et pour le don de matériels, l'équipe de M. Guy MOUCHIROUD, l'équipe de M. François MORLE, M. Jean Jacques MADJAR et tous les jeunes du laboratoire.

Un grand merci pour Guillaume GIRAUD pour toutes ses aides précieuses, pour la bonne ambiance et pour les belles chansons de chaque matin.

Merci beaucoup à Samer KAYALI pour son humour, sa bonne humeur et pour toutes les pauses-café inoubliables.

Merci à tous les amis pour les bons moments et pour leurs encouragements : Hicham, Sawah, Walid, Jhony, Iyad, H.NAKHAL, M.ATIA et pour le groupe touristique (Mirna, Ghina, Rita, Sandra, Salim, Samer et Aya).

Je tiens à remercier toute ma famille, mon père, ma mère, mes frères et mes sœurs, pour toute l'éducation, pour l'encouragement et pour leur soutien.

**Merci a tous.**

«Un sourire coûte moins cher que l'électricité, mais donne autant de lumière» Abbé pierre.

# **Tables des matières**

Tables des matières .....	5
Listes des abréviations.....	4
Listes des figures et tableaux .....	9
Introduction.....	12
I- L'épissage.....	16
1. La maturation de l'ARN pré-messager.....	17
1.1. L'addition d'une coiffe en 5' .....	17
1.2. Le clivage et la polyadénylation de l'extrémité 3' .....	17
2. L'épissage .....	18
2.1. Jonctions intron/exon : Les sites d'épissage.....	18
2.2. La réaction d'épissage.....	19
2.3. Le spliceosome : machinerie d'épissage .....	19
2.3.1. Assemblage du spliceosome .....	20
2.3.2. Composition du spliceosome.....	21
3. L'auto-épissage.....	22
4. L'épissage alternatif.....	22
4.1. Conséquences de l'épissage alternatif .....	24
4.1.1. Introduction d'un codon stop.....	24
4.1.2. Modifications dans la structure de la protéine.....	25
5. Régulation de l'épissage .....	25
5.1. Les éléments cis.....	26
5.1.1. Les séquences exoniques régulatrices d'épissage (ESRs).....	26
5.1.2. Les séquences introniques régulatrices d'épissage (ISRs).....	27
5.2. Les facteurs agissant en trans .....	28
5.2.1. La famille des protéines SR.....	29
5.2.1.1. Généralités .....	29
5.2.1.2. Caractéristiques générales .....	29
5.2.1.3. Rôle du domaine RS.....	31
5.2.1.4. Rôle des protéines SR dans la régulation de l'épissage .....	31
5.2.1.5. Mécanismes d'activation de l'épissage par les protéines SR .....	32
5.2.1.6. Mécanismes d'inhibition de l'épissage par les protéines SR.....	33
5.2.1.7. Régulation des protéines SR.....	34
5.2.1.8. Protéines SR et transcription .....	36
5.2.1.9. Rôle des protéines SR dans le transport et la traduction de l'ARNm.....	36
5.2.2. La famille des protéines hnRNP .....	37
5.2.2.1. hnRNP A1 et hnRNP A2.....	38
5.2.2.2. PTB ou hnRNP I.....	38
5.2.2.3. Autres hnRNP .....	39
5.2.3. Antagonisme entre les protéines SR et les hnRNP .....	39
5.2.4. Autres facteurs agissant en trans.....	40
6. Epissage alternatif et maladies héréditaires .....	41
7. Epissage alternatif et cancer.....	42
8. Epissage alternatif et signalisation .....	43
II- L'érythropoïèse .....	45
1. L'érythropoïèse.....	46
2. Les différentes étapes de l'érythropoïèse.....	47
3. Les érythroleucémies murines de Friend .....	47
4. La régulation de l'érythropoïèse.....	49
L'érythropoïétine, régulateur des derniers stades de la différenciation érythrocytaire.....	49

5.	Activation de l'EPO-R et transduction du signal .....	50
6.	Les voies de signalisation érythrocytaires .....	51
6.1.	La voie de JAK2-STAT5 .....	51
6.2.	La voie Ras-Raf-MAP kinase.....	51
6.3.	La voie de la PI3K .....	52
6.4.	Inhibition de la transduction du signal érythrocytaire .....	52
7.	Les voies de transduction du signal dans les cellules érythroleucémiques de Friend (SFFV).....	53
7.1.	L'Epo-R est activé d'une façon constitutive dans les cellules érythroleucémiques de Friend .....	53
7.2.	Signalisation dans les cellules érythroleucémiques de Friend (SFFV).....	53
8.	Les facteurs de transcription érythrocytaires .....	55
8.1.	GATA-1.....	55
8.2.	Fli-1 .....	56
8.3.	TRIM10/HERF-1 .....	56
8.4.	Spi-1/PU.1 .....	57
8.4.1.	Structure de la protéine .....	57
8.4.2.	Expression de Spi-1/PU.1.....	58
8.4.3.	Régulation de l'expression de Spi-1/PU.1 .....	59
8.4.4.	Cibles et partenaires de Spi-1/PU.1 .....	59
8.4.5.	Rôle de Spi-1/PU.1 dans l'hématopoïèse normale .....	60
8.4.6.	Implication de Spi-1/PU.1 dans les érythroleucémies de Friend.....	61
8.4.7.	Inhibition de la différenciation par Spi-1/PU.1 .....	62
8.4.8.	Antagonisme fonctionnel entre Spi-1/PU.1 et GATA-1 .....	62
8.4.9.	Implication de Spi-1/PU.1 dans l'épissage.....	64
8.4.10.	La phosphorylation de Spi-1/PU.1.....	65
III-	La protéine 4.1R.....	67
1.	La protéine 4.1R : Membre de la famille des protéines 4.1 .....	68
1.1	La protéine 4.1G .....	69
1.2.	La protéine 4.1N .....	69
1.3	La protéine 4.1B .....	70
1.4	La protéine 4.1O .....	70
1.5.	La protéine 4.1R .....	70
2.	La protéine 4.1R.....	71
2.1	Gène 4.1R.....	71
2.2	L'épissage alternatif des ARNs pré-messager 4.1R et les différentes isoformes protéiques.....	71
3.	L'isoforme érythrocytaire de la protéine 4.1R : 4.1R80.....	73
3.1	Structure de la protéine .....	73
3.1.1.	Le domaine de 30kDa (FERM) .....	73
3.1.2.	Le domaine 16kDa.....	74
3.1.3.	Le domaine CTD.....	75
3.1.4.	Le domaine SAB.....	75
3.2.	Rôle de l'isoforme érythrocytaire de la protéine 4.1R : la protéine 4.1R80 .....	76
3.2.1	Organisation structurale de la membrane érythrocytaire .....	76
3.2.2	Rôle de la protéine 4.1R80 dans le maintien de la membrane érythrocytaire.....	77
3.2.3.	Les elliptocytoses héréditaires (HE) et la protéine 4.1R.....	77
4.	Rôle de la protéine 4.1R dans les cellules nucléées .....	78
5.	Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16 de la protéine 4.1R 80 kDa au cours de la différenciation érythroïde.....	80



5.1.	Les éléments <i>cis</i> qui régulent l'épissage de l'exon 16 .....	81
5.2.	Les facteurs agissant en <i>trans</i> régulant l'épissage de l'exon 16.....	82
5.2.1.	Fox-2/RBM9/HRNBP2 .....	82
5.2.2.	SF2/ASF .....	83
5.2.4.	HERF-1 .....	84
5.2.5.	hnRNPA/B.....	84
5.2.6.	Spi-1/PU.1 .....	85
IV-	Objectifs .....	86
V-	Résultats et discussion.....	88
I.	Implication de la voie de signalisation PI3K dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-messager 4.1R et dans la différenciation des cellules érythroleucémiques MEL.....	89
I.1.	Introduction.....	89
I.2.	Article: .....	92
	Subtle distinct regulations of late erythroid molecular events by PI3K/AKT-mediated activation of Spi-1/PU.1 oncogene autoregulation loop.....	92
I.3.	Conclusion .....	132
II.	Rôle de la protéine SRP40 dans la régulation de l'épissage de l'exon 16 du pré-messager 4.1R .....	138
II.1.1.	Analyse de l'expression protéique des facteurs d'épissage SR .....	138
II.1.2.	Surexpression de SRP40 dans les cellules MEL 745A .....	139
II.1.3.	L'expression en ARNm de Srp40 augmente au cours de la différenciation.....	140
II.1.4.	Cinétique de la diminution de l'expression de Srp40 au cours de la différenciation .....	141
II.1.5.	Srp40 est localisée dans le noyau lors de la différenciation érythroïde .....	142
II.1.6.	Srp40 active l'inclusion de l'exon 16 dans les cellules MEL 745A indépendamment de la différenciation.....	144
II.2.	Discussion.....	145
II.3.	Matériels et méthodes.....	147
II.3.1.	Culture cellulaire et induction de la différenciation.....	147
II.3.2.	Transfection et établissement des clones stables .....	147
II.3.3.	Construction du vecteur d'expression .....	148
II.3.4.	Extraction d'ARN et analyse par RT-PCR.....	148
II.3.5.	Extraction des protéines totales et Western blot .....	149
II.3.6.	Localisation cellulaire de la protéine de fusion EGFP .....	149
VI-	Conclusion générale et perspectives .....	151

# Listes des abréviations

- 4.1B : 4.1 cérébrale
- 4.1G : 4.1 Générale
- 4.1N : 4.1 Neuronale
- 4.1R : 4.1 érythrocytaire
- 4.1R135 : Isoforme de 135 kDa de la protéine 4.1R
- 4.1R80 : Isoforme de 80 kDa de la protéine 4.1R
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
- AML1 : Acute myeloid leukemia 1
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNi : ARN interférence
- ARNm : ARN messenger
- ASF/SF2 : Alternative splicing factor/Splicing Factor 2
- ATP : Adénine Tri-Phosphate
- ATPase : Adénine Tri-Phosphatase
- BFU-E: Burst- Forming-Unit Erythroid
- BFU-Meg : Burst-forming unit-megakaryocyte
- CaM : Calmoduline
- CBP : CREB-binding protein
- CELF : CUG-BP and ETR3-like factors
- CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- CFU-E : Colony-Forming Unit-Erythroid
- CFU-G : Colony-Forming Unit-Granulocyte
- CFU-M : Colony-Forming Unit-Macrophage
- Cis : cytokine inductible SH2 domain
- Clk/Sty : Cdc2-like kinases
- CLP : Common Lymphoid Progenitors
- CMP : Common Myeloid Progenitors
- CPAP : Centrosomal P4.1-associated protein
- CSH : Cellules Souche Hématopoïétique
- CTD: Carboxy-Terminal Domain
- DMSO : Dimethyl sulfoxide
- dNTP : deoxynucléotide triphosphates
- EDA : extra domain A

- EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein
- EKLF : Erythroid Kruppel-Like Factor
- eIF3 : facteur de traduction eucaryote 3
- Epo : Erythropoïétine
- EpoR : Erythropoietin-Receptor
- ERK : Extracellular-Regulated Kinase
- ERM : talin related proteins
- ESE : Exonic Splicing Enhancer
- ESR : Exonic Splicing Regulator
- ESS : Exonic Splicing Silencer
- Ets : E-twenty six
- FERM : Four.one protein, Ezrin, Radixin, Moesin
- Fli-1 : F-MuLV integration site 1
- F-MuLV : Friend Murine Leukemia Virus
- FOG-1 : Friend of GATA-1
- GAM : Goat Anti-Mouse
- GEMM : Colony Forming Unit Granulocyte/ Erythrocyte/ Megacaryocyte/  
Macrophage
- GFP : Green Fluorescent Protein
- GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
- GMP : Granulocyte/ Macrophage progenitor
- GMP : Guanine Mono-Phosphate
- GPC : Glycophorine C
- Grb2 : growth factor receptor-bound 2
- GTP : Guanine Tri-Phosphate
- GTPase : Guanine Tri-Phosphatase
- HE : Elliptocytose Hériditaire
- HERF-1 : Hematopoietic Ring Finger-1
- HMBA : Hexamethylene bisacetamide
- HMT : Histone Méthyl Transférase
- hnRNP : heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein
- IgG : Immunoglobulin G
- IL3 : Interleukine 3
- IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium

- ISE : Intronic Splicing Enhancer
- ISS : Intronic Splicing Silencer
- JAK2 : Janus-Activated Kinase 2
- STAT5 : Signal Transducer and Activator of Transcription 5
- PKC : Protein Kinase C
- Ras : Receiver Adjacent Signal
- KCC2 : co-transporteur cation-chlorure
- kDa : kilo Dalton
- KSRP : KH-type Splicing Regulatory Protein
- LMO2 : LIM domain only 2
- LSm : Like Sm
- LTR-CSH: Long Term Repopulating CSH
- MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
- MBD: Membrane Binding Domain
- M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor
- MDCK : Madin-Darby canine kidney
- MEK1 : MAP Kinase/ERK Kinase 1
- MEL : Mouse erythroleukemia
- MEP : Megacaryocyte/ Erythroid Progenitor
- MHC : Major Histocompatibility Complex
- NCAM : Molécule d'Adhésion des Cellules Neuronales
- NF-E2 : Nuclear Factor-Erythroid 2
- NMD: Nonsense-Mediated mRNA Decay
- Nova : Neuro-oncological ventral antigen
- NuMA: Nuclear mitotic apparatus
- ORF : Open Reading Frame
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PEST : Domaine riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine
- PI-(3,4,5)-P3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
- PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase
- PI-(4,5)-P2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
- Pip/IRF4 : PU.1 interacting partner/ interferon regulatory factor 4
- PS : PhosphatidylSérine
- PTB : Polypyrimidine Tract Binding Protein

- PTC : codon stop prématuré
- RB : Retinoblastoma
- RNPs : RiboNucleoProteins
- RRM : RNA Recognition Motif
- RRMH : RNA Recognition Motif Homologous
- RS : Arginine-Serine-Rich domain
- RT : Reverse Transcriptase
- SAB: Spectrin Actin Binding Domain
- SC35 : Spliceosome Component of 35 kDa
- SCF : Stem Cell Factor
- SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
- SFFV : Spleen Focus Forming Virus
- shRNA : small hairpin RNA
- siRNA : small interfering RNA
- snRNA : small nuclear RNA
- snRNPs : small nuclear RiboNucleoprotein Particles
- Spi-1 : SFFV integration site-1
- SR : serine-Arginine-rich
- SRPK : SR protein Kinase
- STR-CSH : Short Term Repopulating CSH
- TAD : Transactivation domain
- TLS : Translocated in liposarcoma
- U2AF : U2 snRNP auxiliary factor
- UsnRNPs: Uridine-rich small nuclear RiboNucleoProtéins
- UTR : UnTranslated Region

# Listes des figures et tableaux

**Figure 1** : L'addition d'une coiffe en 5'.

**Figure 2** : La polyadénylation.

**Figure 3** : Structure de l'intron.

**Figure 4** : Les deux réactions de transéstérification de l'épissage.

**Figure 5** : Représentation schématique des différentes étapes de l'assemblage du spliceosome.

**Figure 6** : Auto-épissage des introns du groupe II.

**Figure 7** : Auto-épissage des introns du groupe I.

**Figure 8** : L'épissage alternatif.

**Figure 9** : Les différents types d'épissage alternatif.

**Figure 10** : Eléments régulateurs de l'épissage de l'ARN pré-messager.

**Figure 11** : Activation de l'épissage par un ESE.

**Figure 12** : Inhibition de l'épissage par un ESS.

**Figure 13** : Inhibition de l'épissage par un ISS.

**Figure 14** : Représentation schématique des protéines SR.

**Figure 15** : Représentation schématique des protéines relatives aux SR.

**Figure 16** : Représentation schématique des protéines SR additionnelles.

**Figure 17** : Représentation schématique des autres protéines a domaine RS.

**Figure 18** : Activation de l'épissage par liaison directe des protéines SR sur un ESE.

**Figure 19** : Les protéines SR antagonisent l'effet des répresseurs pour activer l'épissage.

**Figure 20** : Activation du site 5' d'épissage par les protéines SR.

**Figure 21** : Intervention des protéines SR dans la régulation de l'épissage constitutif.

**Figure 22** : Régulation de l'épissage par les protéines SR indépendamment de l'exon.

**Figure 23** : Inhibition de l'épissage par compétition entre deux protéines SR.

**Figure 24** : Modèle proposé pour l'inhibition de l'épissage de l'exon 9 de l'ARN pré-messager CFTR par les protéines SR.

**Figure 25** : Schéma général de l'hématopoïèse.

**Figure 26** : Les différentes étapes de l'érythropoïèse.

**Figure 27** : Développement de l'érythroleucémie de Friend.

**Figure 28** : Représentation schématique de la structure d'un récepteur de l'érythropoïétine.

**Figure 29** : Représentation schématique de la voie de transduction de signal JAK-STAT.

**Figure 30** : Cascades des MAP Kinases activées par l'Epo.

**Figure 31** : Activation de la voie PI3K par l'Epo-R.

**Figure 32** : Modèle d'inhibition de la transduction du signal par SOCS.

**Figure 33** : Événements caractérisant les érythroleucémie de Friend



- Figure 34** : Représentation schématique de la structure primaire de Spi-1/PU.1.
- Figure 35** : Organisation des domaines des protéines de la famille 4.1.
- Figure 36** : Schéma représentatif du gène 4.1 et les isoformes tissus spécifiques.
- Figure 37** : Structure des isoformes 4.1R<sup>135</sup> et 4.1R<sup>80</sup>.
- Figure 38** : Représentation schématique des domaines structuraux de la protéine 4.1R.
- Figure 39** : Représentation schématique de la membrane du globule rouge.
- Figure 40** : Morphologie du globule rouge normale et pathologique.
- Figure 41** : L'épissage de l'exon 16 est hautement régulé en fonction du tissu et du stade de différenciation.
- Figure 42** : Représentation schématique des éléments *cis* et des facteurs *trans* impliqués dans la régulation de l'épissage de l'exon 16 de 4.1R.
- Figure 43** : Induction des cellules MEL.
- Figure 44** : Variation de l'expression des protéines SR au cours de la différenciation des cellules MEL 745A.
- Figure 45** : Surexpression d'EGFP-Srp40 dans les cellules MEL 745A.
- Figure 46** : Variation de l'expression en ARN de Srp40 et d'EGFP-Srp40.
- Figure 47** : Variation de l'expression des protéines SR avec le temps dans les cellules MEL 745A induites à la différenciation par le DMSO.
- Figure 48** : Visualisation en microscopie à fluorescence de la localisation cellulaire de la protéine de fusion EGFP-Srp40.
- Figure 49** : Effet de la surexpression de Srp40 sur l'épissage de l'exon 16 dans les cellules MEL 745A.

**Tableau 1** : Les principaux facteurs qui régulent la différenciation érythroïde.

# Introduction

Durant la différenciation érythroïde, le cytosquelette est le siège de changements très marqués. Ces changements confèrent au globule rouge mature flexibilité et déformabilité garantissant ainsi sa résistance à la circulation sanguine. La protéine 4.1R est un élément clé de cette architecture protéique, nécessaire à la stabilisation du complexe spectrine/actine, via son domaine interne de 10kDa (domaine SAB).

La déficience en protéine 4.1R se traduit par une anomalie morphologique du globule rouge, l'elliptocytose héréditaire 4.1R(-) (HE4.1R(-)). Cette anomalie est asymptomatique à l'état hétérozygote, mais elle se traduit, en cas d'absence totale de protéine, par une anémie hémolytique grave due à une fragilisation accrue de la membrane, et nécessitant des transfusions répétées.

Le domaine SAB de la protéine 4.1R est codé par l'exon 16 et l'exon 17. Alors que l'exon 17 est constitutif, l'exon 16 est alternatif et son épissage est régulé selon le stade de différenciation érythroïde. Il est exclu dans les progéniteurs immatures, et inclus progressivement en fin de différenciation. **L'inclusion de l'exon 16 est donc un événement important pour la fonction du globule rouge normal.**

La différenciation des progéniteurs érythroïdes en cellules matures nécessite un programme finement organisé de l'expression des gènes pour assurer la synthèse des protéines nécessaires au fonctionnement et à la survie du globule rouge. **La connaissance des mécanismes moléculaires qui accompagnent la différenciation érythroïde est essentielle pour comprendre comment une dérégulation de ces mécanismes intervient dans la genèse d'une leucémie ou d'une pathologie héréditaire du globule rouge.**

L'activation de l'Epo-R par l'érythropoïétine déclenche différentes voies de signalisation qui régulent les mécanismes nécessaires pour la survie et la différenciation des précurseurs érythroïdes. Dans les cellules érythroleucémiques de souris MEL, l'Epo-R est activé de façon constitutive induisant une signalisation constitutive indépendamment de l'érythropoïétine.

Durant ma thèse, je me suis intéressé à la différenciation érythroïde à travers l'évènement d'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R.

L'équipe a démontré que les oncogènes Spi-1/PU.1 et Fli-1 bloquent la différenciation érythroïde, mais que seul Spi-1/PU.1 inhibe l'épissage régulé de l'exon 16 du gène 4.1R dans les cellules érythroleucémiques MEL.

Spi-1/PU.1 est un oncogène dont l'activité est fortement dépendante de l'état de phosphorylation de la protéine. La phosphorylation de Spi-1/PU.1 favorise son affinité pour l'ADN et par conséquent la transcription de ses gènes cibles.

Les données de la littérature montrent une grande relation entre les voies de transduction du signal et le mécanisme d'épissage. Plusieurs voies de signalisation cellulaire ont été décrites dans la régulation de l'épissage alternatif, mais les intermédiaires qui agissent ne sont pas encore identifiés dans la majorité des cas.

Dans un premier temps, je me suis focalisé sur l'étude du mécanisme d'inhibition de l'épissage alternatif de l'exon 16 par Spi-1/PU.1. Je suis parti de l'hypothèse d'une cascade d'événements aboutissant à l'inhibition de l'exon 16, qui commence par l'activation ou l'inhibition d'une voie de signalisation et passe par l'expression de Spi-1/PU.1 et/ou par d'autres facteurs régulateurs.

Dans un deuxième temps, je me suis intéressé à l'étude du rôle du facteur d'épissage Srp40 dans la régulation de l'épissage de l'exon 16. Srp40 appartient à une famille de protéines dont la phosphorylation régule hautement leur activité. Plusieurs études ont montré Srp40 comme régulateur positif de l'épissage. Le déclenchement des voies de transduction du signal active la phosphorylation de Srp40 qui se fixe sur des séquences *cis* régulatrices pour activer le processus d'épissage d'un exon donné.

Donc, dans mon manuscrit de thèse trois grands mots clés vont apparaître et qui constitueront le cœur du sujet : l'**épissage**, la **protéine 4.1R** et l'**érythropoïèse**.

Je commencerai mon mémoire par une **première partie** consacrée aux données bibliographiques se rapportant à mon étude. Cette partie est divisée en trois chapitres contenant chacun les informations nécessaires à la situation du sujet et à la discussion des résultats. J'introduirai dans le **premier chapitre** la maturation de l'ARN pré-messager.

Ensuite je détaillerai l'épissage, les facteurs et les mécanismes qui interviennent dans la régulation de ce processus important mais complexe.

Dans le **deuxième chapitre**, je décrirai la différenciation érythroïde ainsi que l'état des voies de transduction du signal dans les cellules érythroïdes normales et dans les cellules érythroleucémiques de Friend qui constituent notre modèle de travail. Je terminerai ce chapitre en détaillant la fonction de l'oncogène Spi-1/PU.1, facteur de transcription érythroïde qui inhibe l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R.

Dans le **troisième chapitre**, j'exposerai l'importance de la protéine 4.1R au cours de la différenciation érythroïde en décrivant la structure, les caractéristiques et les fonctions de la protéine. Je terminerai par les données obtenues sur la régulation de l'épissage de l'exon 16 du pré-messager 4.1R au cours de la différenciation érythroïde.

Dans la **deuxième partie**, je décrirai les **résultats** acquis au cours de mon travail de thèse sous la forme d'une publication, actuellement soumise après révision, et d'un ensemble de résultats non publiés. Ce mémoire se terminera par une **discussion** sur l'ensemble des résultats et je proposerai les **perspectives** qui en découlent.

# I- L'épissage

## **1. La maturation de l'ARN pré-messager**

Chez les procaryotes la traduction de l'ARNm en protéines commence avant même que la transcription soit terminée. Chez les eucaryotes, la transcription de l'ADN par l'ARN polymérase II donne naissance à un ARN pré-messager encore appelé transcrit primaire qui doit subir différentes réactions de maturation pour donner les ARNm fonctionnels correspondants. Une fois formés dans le noyau, les messagers matures fonctionnels sont transportés vers le cytoplasme pour être traduits en protéines (Blaustein et al., 2004; Sanford and Caceres, 2004).

Le processus de maturation des pré-ARNm comporte trois grands événements :

- L'addition d'une coiffe en 5'
- Le clivage et la polyadénylation de l'extrémité 3'
- L'épissage de l'ARN

Ces trois événements sont co-régulés et couplés à la transcription (Bentley, 2002; Proudfoot and O'Sullivan, 2002).

### **1.1. L'addition d'une coiffe en 5'**

Peu après sa synthèse (20-30 nucléotides), l'extrémité 5' d'un pré-ARNm est modifiée par addition d'une structure appelée coiffe de 7-méthyl guanosine ; l'évènement commence par un transfert de GTP placé en sens opposé par rapport au nucléotide 5'-terminal du pré-ARNm. Des groupes méthyle sont ensuite transférés sur ce résidu G et, parfois sur le groupe ribosyle d'un ou de deux nucléotides de l'ARN primaire (**Figure 1**) .

La coiffe remplit plusieurs fonctions spécifiques, elle participe à la migration de l'ARNm vers le cytoplasme, elle aligne l'ARNm sur le ribosome lors de la traduction, elle stabilise l'ARNm et lui confère une résistance à la dégradation par les 5' exonucléases (Horne et al., 1990).

### **1.2. Le clivage et la polyadénylation de l'extrémité 3'**

La maturation au niveau de l'extrémité 3' implique le clivage par une endonucléase pour créer un groupement hydroxyle 3' libre auquel de multiples résidus d'acide adénylique sont ajoutés un par un par la poly(A) polymérase (**Figure 2**). La queue polyA n'est pas donc codée par le

génomique et elle joue un rôle important dans la terminaison de la transcription, la migration de l'ARNm vers le cytoplasme et dans sa protection de la dégradation (revue dans (Proudfoot and O'Sullivan, 2002)).

La queue polyA permet en plus la diversification protéique. En effet, selon la sélection des sites polyA, parfois il y a synthèse de deux ARNm distincts à partir du même transcrit primaire.

## 2. *L'épissage*

L'épissage est l'étape de maturation des pré-ARNm où :

- Les introns sont coupés (excision) de la structure primaire.
- Les exons sont ensuite liés entre eux bout à bout (épissage), pour établir la séquence primaire de l'ARN messager mature.

**Intron :** ce sont des séquences du pré-messager qui sont excisés et éliminés de la structure primaire des ARN au cours de la maturation des messagers. Les introns sont non conservés, et les seules séquences dans les introns qui sont conservées sont celles qui sont nécessaires à leur excision (sites d'épissages).

**Exon :** C'est la partie de la séquence d'un gène transcrite et conservée dans la structure de l'ARNm mature. Les exons correspondent souvent à un domaine fonctionnel de la protéine. Toutefois, il faut remarquer que toute séquence exonique n'est pas forcément traduite lors de la synthèse protéique, il existe des séquences nommées UTR (UnTranslated Region), localisées avant le codon d'initiation de la traduction AUG et après le codon de terminaison. La taille des exons est très variable. On distingue des exons courts (34 nucléotides pour l'exon 1 de l'APOII), longs (7572 nucléotides pour l'exon 26 de l'apoB). Un gène peut ne contenir qu'un seul exon et pas d'intron, il existe également des gènes de plus de cent exons.

### 2.1. **Jonctions intron/exon : Les sites d'épissage**

Les sites d'épissage sont des séquences nucléotidiques caractéristiques et conservées situées aux deux extrémités de chaque intron (jonction intron-exon) (Mount, 1982). Ces sites sont reconnus par le spliceosome pour l'initiation de l'épissage. On distingue (**Figure 3**):



Le site d'épissage en 5' : appelé également site donneur.

Le site d'épissage en 3' : appelé également site accepteur.

Généralement, les deux premiers résidus de l'intron situés au site d'épissage 5' sont GU tandis que les deux derniers résidus de l'intron situés au site d'épissage 3' sont AG (règle GU-AG). Dans des cas rares (environ un pour cent), les introns possèdent des dinucléotides AU et AC à leurs extrémités 5' et 3' (règle AU-AC).

En plus, on distingue sur la séquence de l'intron le site de branchement, situé à environ 30 nucléotides en amont du site accepteur. À l'intérieur du site de branchement, on distingue un nucléotide clé A appelé encore point de branchement.

Les régions adjacentes de l'intron possèdent des nucléotides préférentiels qui jouent un rôle important dans la reconnaissance du site d'épissage.

## **2.2. La réaction d'épissage**

La réaction d'épissage est dépendante de l'hydrolyse de l'ATP et elle consiste en deux étapes de trans-estérification. Le résultat net de la réaction d'épissage est la ligature des deux exons et la libération de l'intron intermédiaire sous la forme d'une structure en « lasso ».

La première réaction d'épissage correspond à la formation d'une liaison 2',5'- phosphodiester par l'attaque nucléophile du 2'-OH du ribose de l'adénosine de la boîte de branchement sur le phosphate de la jonction exon-intron en 5'. L'intron prend ainsi une structure en forme de lasso. Après cette coupure, le groupe 3'-OH maintenant libre de l'exon en 5', attaque le phosphate de la jonction intron-exon en aval. Les produits de cette réaction sont d'une part les deux exons ligaturés correctement et d'autre part, l'intron cyclisé au niveau de l'adénosine de la boîte de branchement (**Figure 4**). Le lasso est finalement ouvert par une enzyme de débranchement afin de pouvoir être recyclé (Brow, 2002; Jurica and Moore, 2002).

## **2.3. Le spliceosome : machinerie d'épissage**

L'épissage s'effectue au sein d'une structure nucléaire complexe appelée « spliceosome » (Maniatis and Reed, 1987; Sperling et al., 2008). Différents facteurs du spliceosome reconnaissent les séquences consensus d'épissage (Maniatis and Reed, 1987).

### 2.3.1. Assemblage du spliceosome

Classiquement, le spliceosome majeur agit sur des introns issus de gènes transcrits par l'ARN polymérase II et reconnaît le site d'épissage donneur en 5' commençant par un dinucléotide GU, le site d'épissage accepteur en 3' étant généralement un dinucléotide AG (règle GU-AG). Un deuxième type de spliceosome (mineur) agit minoritairement sur des introns issus de gènes transcrits par l'ARN polymérase II et obéissant à la règle AU-AC (Li et al., 2001; Nagai et al., 2001; Stark and Luhrmann, 2006; Tarn and Steitz, 1996).

La première étape de l'assemblage du spliceosome (complexe E) consiste en la reconnaissance du site d'épissage en 5' par le U1SnRNP, du point de branchement par le facteur d'épissage SF1, et la reconnaissance du site d'épissage en 3' par U2AF (U2SnRNP auxiliary factor).

Après cette étape d'initiation, le complexe A est formé quand le U2SnRNP se lie sur le point de branchement. Ensuite, le complexe B est formé par la liaison de U4, U6 et U5 SnRNP (**Figure 5**).

Après la formation du spliceosome, des changements de conformation importants de l'appariement des snRNAs et du pré-messager provoquent la libération des U1 et U4 snRNP et par la suite la formation du spliceosome actif et mature, appelé encore complexe C lequel catalyse la réaction d'épissage (Black, 2003; Sharp, 1994; Stark and Luhrmann, 2006).

Donc, des appariements entre les composants du spliceosome et l'ARN pré-messager sont essentiels pour l'épissage de ce dernier. Il a été montré que des mutations des sites d'appariement inhibent l'épissage.

Les protéines non-snRNP qui participent à la réaction d'épissage peuvent avoir un rôle d'hélicase, d'ATPase, de GTPase, de protéine kinase et peuvent être importantes pour les interactions protéine- protéine ou pour les interactions protéine- ARN (Jurica and Moore, 2003; Kambach et al., 1999).

D'autres facteurs appartenant à la famille des protéines SR sont chargés de stabiliser ces interactions. Les protéines SR sont capables d'interagir entre elles et avec les autres facteurs, permettant ainsi de connecter un site d'épissage 5' à un site 3'. Le domaine RS de tous ces facteurs joue un rôle prépondérant dans l'établissement de ces interactions.

La phosphorylation de facteurs d'épissage est nécessaire pour l'assemblage du spliceosome, et une déphosphorylation au moins partielle de ces mêmes facteurs doit intervenir juste avant

ou pendant la réaction catalytique (Cao et al., 1997; Mermoud et al., 1992; Mermoud et al., 1994; Tazi et al., 1993).

### **2.3.2. Composition du spliceosome**

Le spliceosome qui se constitue autour du pré-mRNA est formé par des UsnRNPs (uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins) et par une cinquantaine de facteurs protéiques non snRNP.

Les composants du spliceosome occupent des régions proches des sites de transcription (speckles) qui leur servent de zones de stockage ou de maturation. Ainsi, on trouve au niveau des speckles des protéines SR et notamment la protéine SC35. Cependant, d'autres compartiments nucléaires ont été rapportés, mais contiennent des quantités moindres d'éléments du spliceosome comme le corps de Cajal qui contient des snRNPs et des snRNAs mais pas de protéines SR, d'ADN et de pré-mRNA (Liu and Gall, 2007; Rino et al., 2007; Sleeman et al., 2003; Spector, 1993).

Chaque UsnRNP est constitué d'une petite molécule de snRNA, de 100 à 200 nucléotides de longueur, et d'environ 10 protéines différentes. Certaines de ces protéines (Sm et Lsm) s'assemblent en un « cœur » commun à toutes les UsnRNP, tandis que d'autres sont spécifiques de UsnRNP particulières. Par exemple, des sept protéines Sm, le U1 snRNP est composé de trois protéines spécifiques U1-A, U1-70K et U1-C.

Les snRNA des UsnRNP sont riches en uridine, d'où la dénomination UsnRNP. Les SnRNA se forment dans le nucléole.

Les snRNAs sont dotés d'une coiffe en 5' particulière de 2,2,7- triméthylguanosine et subissent plusieurs modifications de ribonucléotides (Yu et al., 1998).

Les snRNAs U1, U2, U4, U5 et U6 interviennent dans le spliceosome majeur tandis que les snRNA U11, U12, U4atac, U5 et U6atac composent le spliceosome mineur (Li et al., 2001; Stark and Luhrmann, 2006; Tarn and Steitz, 1996).

#### **Protéines Sm et Lsm**

Les protéines Sm sont reconnues par un anticorps anti-Sm issu du sérum d'un patient atteint du lupus érythémateux systémique. Sept protéines ont été identifiées (B/B', D1, D2, D3, E, F et G) (Lerner and Steitz, 1979).

Toutes les protéines Sm contiennent un domaine Sm réparti sur deux domaines courts d'acides aminés conservés, appelés Sm1 et Sm2 séparés par une boucle plus ou moins longue

selon la protéine. Les protéines Sm s'apparient progressivement pour former une structure en anneau (cœur Sm) à l'intérieur duquel se trouve les SnRNA.

Chez les eucaryotes, les protéines Sm s'associent aux snRNA U1, U2, U4 et U5. Cependant U6snRNA s'associe à des protéines semblables aux Sm appelées Lsm.

Les protéines Lsm possèdent un motif Sm hautement conservé entre les espèces, huit protéines ont été identifiées. Comme pour les protéines Sm, les protéines Lsm s'apparient en anneau de sept protéines (grâce au motif Sm) pour former le cœur spécifique de la snRNPU6 (Beggs, 2005; Brett et al., 2000).

### **3. *L'auto-épissage***

Outre les introns dont l'épissage est catalysé par le spliceosome, il en existe d'autres reconnues par leurs mécanismes d'épissage (groupe I intron et groupe II intron) (Haugen et al., 2005).

Groupe I intron et groupe II intron sont des petits ARN qui catalysent leur propre épissage sans l'aide des protéines (ribozymes) (Pyle et al., 2007). Ces introns se replient en structures spécialisées qui assurent deux réactions de trans-estérification similaires à celles qui sont décrites dans l'épissage des pré-ARNm. La réaction chimique de l'épissage pour les introns du groupe II est la même que pour les introns catalysés par le spliceosome (Pyle et al., 2007), (**Figure 6**) tandis que pour les introns du groupe I, le point de branchement est une Guanosine et la réaction d'épissage donne un intron linéaire (Haugen et al., 2005) (**Figure 7**).

Les introns du groupe I sont présents dans les transcrits primaires de nombreux virus ainsi que dans certains bactériens (Haugen et al., 2005). On trouve les introns du groupe II dans des transcrits primaires de certaines bactéries, de chloroplastes de plantes et de mitochondries de champignons (Lehmann and Schmidt, 2003).

### **4. *L'épissage alternatif***

L'épissage alternatif est un important mécanisme par lequel un seul gène donne plusieurs ARNm et plusieurs isoformes protéiques (**Figure 8**). Ce mécanisme consiste en une reconnaissance différentielle des sites d'épissages d'un ou de plusieurs motifs d'un ARNm selon le type cellulaire et/ou l'état de différenciation de la cellule et/ou en réponse à l'environnement extracellulaire.

L'épissage alternatif ne permet pas seulement la diversification protéique, mais il peut influencer d'une façon quantitative l'expression des gènes (Hughes, 2006; Stamm et al., 2005).

La régulation de l'épissage alternatif est cruciale pour les diverses fonctions cellulaires dans les conditions physiologiques normales et dans des situations pathologiques.

L'importance de l'épissage alternatif au cours de l'évolution est révélée par la présence de ce processus chez les espèces évoluées (hommes, souris, drosophile et *C.elegans*) (Brett et al., 2000).

Des analyses bioinformatiques montrent que 59% de 245 gènes présents sur le chromosome 22 subissent l'épissage alternatif. Des études par des puces à ADN, montrent que l'épissage alternatif affecte 74% des gènes humains (Johnson et al., 2003).

En moyenne un gène humain donne deux ou trois transcrits matures. Cependant, il existe certains cas extrêmes comme le cas du gène de neuroxin3 qui donne potentiellement 1728 transcrits à cause de l'épissage alternatif sur quatre différents sites. Chez la drosophile, le gène codant pour la (DSCAM) donne par épissage alternatif 38016 isoformes potentielles ce qui constitue un nombre plus grand que celui généré par le génome entier de la drosophile (Celotto and Graveley, 2001).

Il existe plusieurs types d'épissage alternatif qui aboutissent tous au même résultat : la diversification de l'expression des gènes (**Figure 9**):

- 1- Exclusion/ inclusion d'exon : Dans ce cas, les sites d'épissage externes d'un exon sont actifs ou inactifs. Il y a donc inclusion ou exclusion d'un exon interne en cassette
- 2- Sites d'épissage alternatif en 5' : l'épissage concerne le site donneur. Plusieurs sites d'épissage alternatif 5' sont raccordés au même site d'épissage 3' avec pour conséquence l'inclusion ou la délétion partielle de l'exon.
- 3- Sites d'épissage alternatif en 3' : l'épissage concerne ici le site accepteur. Plusieurs sites d'épissage alternatif 3' sont raccordés au même site d'épissage 5' avec pour conséquence l'inclusion ou la délétion partielle de l'exon.
- 4- Exclusion mutuelle d'exons : il y a compétition entre les paires de sites d'épissage mutuellement exclusifs. Lorsqu'un exon est inclus l'autre est exclu et inversement.

- 5- Rétention d'un intron : il s'agit d'une inactivation d'un couple de site d'épissage externe à l'exon et encadrant le même exon. L'intron reste retenu sur la séquence de l'ARN messenger.
- 6- Promoteurs alternatifs: l'utilisation de différents sites alternatifs d'initiation de la transcription permet de modifier l'extrémité 5'.
- 7- Sites poly(A) alternatifs: l'utilisation de plusieurs sites poly(A) alternatifs permet de modifier l'extrémité 3'.

#### **4.1. Conséquences de l'épissage alternatif**

L'épissage alternatif est un processus important de régulation de l'expression des gènes. Diverses conséquences en découlent et sont classées en plusieurs catégories :

##### **4.1.1. Introduction d'un codon stop**

Lors de l'épissage alternatif, l'inclusion ou l'exclusion d'exon, ou bien la modification de la longueur de tel ou tel exon peut entraîner un décalage du cadre de lecture, et de ce fait causer l'apparition prématurée d'un codon STOP.

Souvent, quand le codon STOP est situé à plus de 50-55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon, le transcrit formé est reconnu et dégradé par le système NMD (Non-Sense RNA Mediated Decay) (Nagy and Maquat, 1998).

Ce processus, constitue un système de contrôle de qualité et un mécanisme de régulation quantitative. L'augmentation du taux de production de codons STOP prématurés permet de diminuer le nombre de protéines traduites.

L'épissage alternatif peut apporter à la séquence du messenger un exon qui contient un codon STOP prématuré et dans ce cas il y a formation d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Ce mécanisme est responsable de la détermination du sexe chez la drosophile (Saccone et al., 2002).

#### **4.1.2. Modifications dans la structure de la protéine**

L'épissage alternatif résulte en plusieurs isoformes protéiques avec des propriétés biologiques différentes qui influent les propriétés de liaison, la localisation intracellulaire, l'activité enzymatique et /ou la stabilité de la protéine (Stamm et al., 2005).

Les isoformes protéiques produites par épissage alternatif se différencient par leurs propriétés de liaison avec d'autres protéines, avec des ligands et avec des acides nucléiques.

Ainsi, l'épissage alternatif détermine la localisation cellulaire de différentes protéines tout en affectant les signaux de localisation cellulaire ou l'interaction entre les protéines et les membranes.

L'inclusion de domaines alternatifs peut réguler la demi-vie d'une protéine. Dans le cas du gène c-fos, les petites isoformes générées par épissage alternatif sont plus stables que la protéine entière (Nestler et al., 1999).

### **5. *Régulation de l'épissage***

L'épissage alternatif est un processus complexe. Le choix des sites d'épissage est primordial lors de l'épissage des ARN pré-messagers. Ce phénomène de reconnaissance des jonctions exon/intron requiert un contrôle délicat afin que la cellule se comporte normalement aux différents stades de développement dans lesquels elle se situe.

Outre les sites d'épissage en 5' et 3', il existe d'autres sites appelés sites cryptiques, cachés dans la séquence des introns et au sein même des exons. Ces sites ne sont utilisés qu'en cas de défaillance de la machinerie d'épissage ou du site normal d'épissage (Krawczak et al., 1992).

Pour faire face à la multiplicité des sites potentiels d'épissage, le spliceosome doit être doué d'une grande flexibilité et comporte à la fois des éléments communs à tous les sites d'épissage et d'autres, spécifiques de certains d'entre eux (Jeanteur and Tazi, 2005). Ces éléments sont groupés en deux catégories : les éléments cis et les facteurs trans.

## 5.1. Les éléments cis

Les éléments cis sont de courtes séquences (10 nucléotides) conservées activatrices ou inhibitrices et qui peuvent être localisés dans les exons aussi bien que dans les introns, d'où quatre catégories : ESE et ESS (exonic splicing enhancer et exonic splicing silencer) d'une part, et ISE et ISS (intronic splicing enhancer et intronic splicing silencer) d'autre part (Jeanteur and Tazi, 2005).

En général, les éléments cis recrutent des facteurs agissant en trans comme les protéines SR et les protéines hnRNP qui activent ou inhibent la reconnaissance des sites d'épissage et l'assemblage du spliceosome par divers mécanismes (Wang and Burge, 2008) (**Figure 10**).

Cependant, certaines séquences inhibitrices (ESS ou ISS) ne lient pas des facteurs nucléaires mais forment une structure secondaire particulière qui permet la reconnaissance d'une séquence activatrice adjacente par des protéines SR (Blaustein et al., 2007; Buratti and Baralle, 2004).

### 5.1.1 Les séquences exoniques régulatrices d'épissage (ESRs)

#### *ESE*

La séquence entre le point de branchement et le site d'épissage en 3' est généralement riche en pyrimidine et elle a une faible affinité de liaison pour le facteur d'épissage U2AF essentiel pour la reconnaissance du site 3'. Les recherches pour expliquer le mécanisme de choix du site 3' ont conduit à la découverte des ESE (Zheng, 2004).

La plupart des exons contiennent des ESE dans leurs séquences (Wang and Burge, 2008). Les ESE recrutent en général des membres de la famille des protéines SR (Graveley, 2000) (**Figure 11**).

Les protéines SR se lient sur les ESE par l'intermédiaire de leurs domaines RRM N-terminal, ensuite elles permettent via leurs domaines RS des interactions protéine-protéine pour l'assemblage du spliceosome (Graveley and Maniatis, 1998).



Deux classes de ESE ont été identifiées : Les ESE riches en purines et les ESE non riches en purines.

Les ESE riches en purines sont les plus répandus et sont généralement localisés en aval d'un site d'épissage en 3'. Les ESE riches en purines, sont composés généralement de six nucléotides ou plus, qui sont des répétitions de A et de G.

Un ESE riche en purines a normalement un ou plusieurs sites de liaison pour les protéines SR. Les ESE non riches en purines comportent des ESE riches en AC ou en pyrimidines (Zheng, 2004).

Contrairement aux ESE, les ESS présentent peu de similarité de séquences entre eux.

### ***ESS***

Les ESS sont des inhibiteurs de la reconnaissance des sites d'épissage. Ils sont localisés fréquemment en aval d'un ESE, mais ils peuvent aussi fonctionner sans un ESE. Par exemple, de nombreux facteurs agissant en trans comme le PTB (hnRNP I), U2AF et des protéines SR se lient à l'ESS1 du papillomavirus bovin type 1 (BPV-1) (Zheng et al., 1998).

Le mécanisme par lequel chaque ESS inhibe l'épissage de l'ARN n'est pas encore bien connu. Les ESS peuvent inhiber l'épissage de l'ARN par divers mécanismes in vivo et in vitro, certains ESS antagonisent l'activité des ESE (Zheng et al., 1998) (**Figure 12**).

Les ESS recrutent souvent des inhibiteurs d'épissage de la famille des protéines hnRNP (Pozzoli and Sironi, 2005).

Les hnRNP fonctionnent selon divers mécanismes. Par exemple, PTB (hnRNP I) bloque les interactions entre U1 et U2 snRNP (Wang and Burge, 2008), tandis que hnRNP A1 inhibe l'épissage en empêchant la liaison des snRNP (Nasim et al., 2002; Zhou et al., 2002).

### **5.1.2. Les séquences introniques régulatrices d'épissage (ISRs)**

#### ***ISE***

Plusieurs éléments (motifs) sont connus pour agir en tant qu'ISRs, mais les protéines qui permettent leurs effets sont moins bien caractérisées que pour les ESEs. Certains ISEs semblent être dépendants des protéines SR (Gallego et al., 1997; Hastings et al., 2001). Dans d'autres cas, les protéines SR ne semblent pas se lier directement à l'élément de régulation.

L'ISE le mieux caractérisé c'est le motif poly-G (GGG) qui active la reconnaissance des sites d'épissage 5' et 3' adjacents. Cet ISE est commun pour les introns riches en GC et est

conservé entre l'homme et la souris (Wang and Burge, 2008). Le motif riche en CA (répétitions CA) active l'épissage de l'exon en amont en liant le facteur d'épissage hnRNP L (Hui et al., 2005; Hung et al., 2008). Le motif UGCAUG fonctionne comme un ISE en liant Fox-1/Fox-2 pour la régulation de l'épissage alternatif dans différents tissus incluant le cerveau et le muscle (Zhou et al., 2007).

### **ISS**

Le motif YCAY (Y=C ou U) reconnu par la famille des facteurs Nova (neurones-spécifiques) joue le rôle d'un ISS pour réguler de multiples événements d'épissage dans le cerveau. D'une façon intéressante, ce motif peut jouer le rôle d'un ESS selon leur localisation sur l'ARN pré-messager (Wang and Burge, 2008).

Parmi les autres ISS caractérisés, on peut distinguer les motifs riches en CU (CU-rich) qui lient des facteurs répresseurs comme PTB et hnRNPA1. C'est le cas de l'ISS « CUCUCU » qui se trouve dans l'intron en aval de l'exon N1 spécifique du neurone dans le transcrit c-src (Kashima et al., 2007).

Un modèle d'action des ISS a été proposé : Un facteur inhibiteur d'épissage, tel qu'une protéine hnRNP (PTB ou hnRNP A1), se lie à des éléments silenciers d'épissage introniques (ISS) en duplicata présents dans les introns flanquant un exon alternatif. La dimérisation de la protéine liée permet une juxtaposition des éléments ISS, entraînant la formation d'une boucle externe dans laquelle l'exon alternatif se trouve et est par conséquent exclu par la machinerie d'épissage (**Figure 13**) (Cartegni et al., 2002).

## **5.2. Les facteurs agissant en trans**

Les facteurs agissant en trans sont capables de reconnaître les séquences cis régulatrices. Ils sont capables d'activer ou d'inhiber l'épissage d'un pré-messager.

Les facteurs agissant en trans les plus reconnus sont classés en deux grandes familles de facteurs d'épissage :

- La famille des protéines SR : les membres de cette famille sont souvent des activateurs de l'épissage.
- Les protéines hnRNP : les membres de cette famille de protéines sont souvent des répresseurs d'épissage.

Être activateur ou inhibiteur n'est pas une règle générale pour ces deux types de facteur, il existe des cas où des protéines SR inhibent l'épissage ainsi qu'il existe des études qui ont décrit un rôle positif pour quelques protéines hnRNP dans l'épissage.

## **5.2.1. La famille des protéines SR**

### **5.2.1.1. Généralités**

Les protéines SR ont été identifiées comme des facteurs d'épissage dans les années 1990. La famille des protéines SR est formée actuellement par sept membres (protéines SR classiques) : SF2/ASF (SRp30a), SC35 (SRp30b), SRp20, SRp75, SRp40, SRp55 et 9G8 (Long and Caceres, 2009). Ces protéines ont été nommées suivant leur poids moléculaire sur gel SDS/PAGE et sont conservées chez les vertébrés et les non vertébrés (Zahler et al., 1992). Des protéines contenant un domaine riche en résidus sérine et arginine (domaine RS) ont été identifiées comme régulateurs d'épissage chez la drosophile : SWAP (supressor-of-white-apricote), Tra (transformer) et Tra-2 (transformer-2) (Long and Caceres, 2009). L'identification ultérieure de SF2/ASF (Ge et al., 1991; Krainer et al., 1991) et de SC35 (Fu and Maniatis, 1990) a révélé que ces protéines contiennent un domaine RS, aussi présent dans la protéine U1-70K du spliceosome (Spritz et al., 1987; Theissen et al., 1986). Le terme « protéines SR » a été choisi pour désigner les protéines ayant un domaine RS reconnu par l'anticorps monoclonal mAb104, et elles lient des sites actifs de transcription de l'ARN polymérase II (Roth et al., 1990).

### **5.2.1.2. Caractéristiques générales**

Les membres de la famille des protéines SR (protéines SR classiques) possèdent tous les critères suivants (revue dans (Long and Caceres, 2009)) :

- 1- Ils présentent une similarité structurale. Les membres de la famille des protéines SR possèdent des motifs de séquences communs, dont un ou deux motifs de reconnaissance à l'ARN en N-terminal (RRM et RRM-H) et un domaine riche en résidus sérine et arginine (domaine RS) (**Figure 14**).

- 2- Ils ont une double fonction : Les protéines SR jouent un rôle dans l'épissage constitutif ainsi que dans l'épissage alternatif.
- 3- Ils contiennent un phosphoépitope reconnu par l'anticorps monoclonal mAb104.
- 4- Ils sont co-purifiés dans la même fraction par précipitation saline en deux étapes, ils sont solubles dans 65% de sulfate d'ammonium et précipitent dans 20mM de chlorure de magnésium.
- 5- Ils peuvent compléter les extraits cytoplasmiques S100 (surnageant sans protéines SR résultant de la centrifugation à 100 000g des extraits cytoplasmiques) déficients pour la réaction d'épissage, suggérant une redondance de leur fonction dans la réaction d'épissage.

D'autres protéines contenant un domaine RS joue un rôle dans l'épissage ainsi que dans d'autres processus cellulaires comme le remodelage de la chromatine, la transcription et la progression du cycle cellulaire (Boucher et al., 2001). Certaines de ces protéines contiennent un domaine RRM, d'autres sont dépourvues de ce domaine, mais sont capables de lier l'ARN par l'intermédiaire d'autres motifs comme le motif PWI trouvé dans le facteur d'épissage SRm160 (Blencowe et al., 1998; Szymczyna et al., 2003).

Ces protéines sont classées sous le nom de protéines apparentées relatives aux SR (SR-related proteins : SRrps) (**Figure 15**).

D'autres protéines qui ont deux domaines RS flanquant le domaine RRM ou un domaine RS N-terminal et un domaine RRM C-terminal sont connues sous le nom de protéines SR additionnelles (additional SR proteins) (**Figure 16**). Ces protéines interviennent aussi dans l'épissage alternatif et constitutif.

Finalement, certaines protéines contiennent un domaine RS, mais ont d'autres domaines nécessaires pour leur activité enzymatique (**Figure 17**).

### **5.2.1.3 Rôle du domaine RS**

Alors que les domaines RRM (RNA recognition motif) sont suffisants pour lier des séquences spécifiques d'ARN, le domaine RS participe à des interactions protéiques en présence d'autres facteurs d'épissage contenant aussi un domaine RS dans leur séquence (Kohtz et al., 1994; Wu and Maniatis, 1993). Ces facteurs peuvent être des SR-related proteins (SRrps) et surtout des constituants du spliceosome. En effet, les protéines SR interagissent via leur domaine RS avec l'U1-70K, l'U2AF35 et probablement avec certains composants comme l'U5 snRNP (100K) et du U4/U6.U5 tri-snRNP.

Des études récentes ont montré des interactions du domaine RS-ARN au niveau du point de branchement et au niveau du site 5' durant l'assemblage du spliceosome (Shen and Green, 2004). En particulier le domaine RS recruté sur des ESE interagit avec le point de branchement dans le complexe A ce qui permet de penser que les interactions domaine RS - point de branchement pourraient intervenir dans l'activation de l'épissage via les ESEs.

De plus, le domaine RS peut fonctionner comme un signal de localisation nucléaire (NLS) affectant la localisation cellulaire des protéines SR via ses interactions avec les transporteurs des protéines SR (transportin-SR) (Caceres et al., 1997; Kataoka et al., 1999).

### **5.2.1.4. Rôle des protéines SR dans la régulation de l'épissage**

Les sites consensus d'épissage sont généralement insuffisants pour l'assemblage du spliceosome fonctionnel. Les séquences *cis* régulatrices (ESE, ESS, ISE et ISS) sont nécessaires pour l'accomplissement de l'épissage constitutif ainsi que l'épissage alternatif.

Les protéines SR agissent généralement comme des activateurs de l'épissage. Cependant, dans certains cas, les protéines SR échappent à cette règle et se lient à des silencers pour inhiber l'épissage.

### 5.2.1.5. Mécanismes d'activation de l'épissage par les protéines SR

Deux modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme d'activation de l'épissage par les protéines SR. Le premier repose sur le recrutement direct des protéines SR sur des ESE «recrutement model», le deuxième ne nécessite pas la liaison directe des protéines SR sur les séquences exoniques.

#### *Activation par liaison sur un ESE*

Les protéines SR se lient sur un ESE et activent la reconnaissance d'un site d'épissage 3' situé en amont par recrutement direct et stabilisation de U2AF sur le motif riche en Pyrimidine via ses interactions avec U2AF35 (Zuo and Maniatis, 1996). Une sous unité activatrice de l'épissage SRm160/300 (SR-related nuclear matrix protein of 160 kDa et un 300 kDa nuclear matrix antigen) participe à ce mécanisme. Cette protéine interagit avec les protéines SR et U1 snRNP et est stabilisée par U2 snRNP (Eldridge et al., 1999) ; (Graveley, 2000). De plus, les protéines SR peuvent interagir directement avec l'ARN au niveau du point de branchement pour activer l'assemblage du spliceosome (Shen and Green, 2004) (**Figure 18**).

Cependant, les protéines SR peuvent activer le choix du site 3' par interactions avec d'autres facteurs d'épissage ou en antagonisant l'effet négatif d'un inhibiteur d'épissage lié sur un ESS adjacent (Huang et al., 2001). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que le domaine RRM était suffisant pour activer l'épissage in vitro dans des extraits cytoplasmiques S100 (**Figure 19**).

De plus, les protéines SR activent le choix du site 5' d'épissage, quand elle se lient a un ESE situé en amont de ce site. De la même façon, les protéines SR favorisent le recrutement direct de U1 snRNP au site 5' par interaction avec le U1-70k. Kohtz et ses collaborateurs ont montré que la protéine SF2/ASF se lie sur un ESE pour activer le recrutement de U1 snRNP sur le site 5' d'épissage (Kohtz et al., 1994) (**Figure 20**).

Ainsi, dans l'épissage constitutif, les protéines SR sont capables d'apparier le site accepteur au site donneur par l'établissement d'un réseau protéique au-dessus de l'exon « définition de l'exon » (Berget, 1995). Ce mécanisme fait intervenir les protéines SR comme des protéines relais qui interagissent via leur domaine RS avec U2AF lié au niveau du site 3' et la U1 snRNP liée au site 5' (Wu and Maniatis, 1993) (**Figure 21**).

### ***Activation sans liaison sur un ESE***

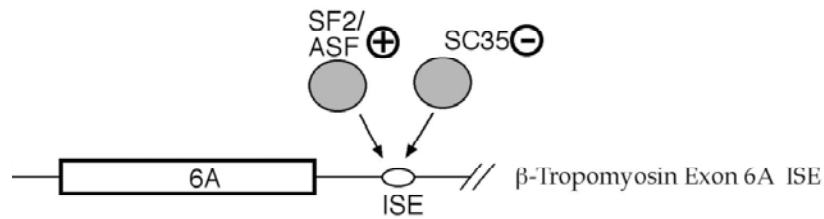
Ce mécanisme est identique à la régulation de l'épissage constitutif par définition de l'exon. Dans ce cas, les protéines SR sont capables d'apparier le site accepteur au site donneur par l'établissement d'un réseau protéique au-dessus de l'intron « définition de l'intron » (Wu and Maniatis, 1993). Ainsi, les protéines SR facilitent l'incorporation du tri snRNP U4/U6.U5 dans le spliceosome. Cette activité est due probablement à l'interaction des protéines SR avec les composants a domaine RS du tri snRNP (**Figure 22**).

### **5.2.1.6. Mécanismes d'inhibition de l'épissage par les protéines SR**

L'inhibition de l'épissage est attribuée généralement à la famille des protéines hnRNP. Cependant plusieurs études ont montré que des protéines SR ne sont pas uniquement des activateurs de l'épissage mais elles interviennent également dans le mécanisme d'inhibition.

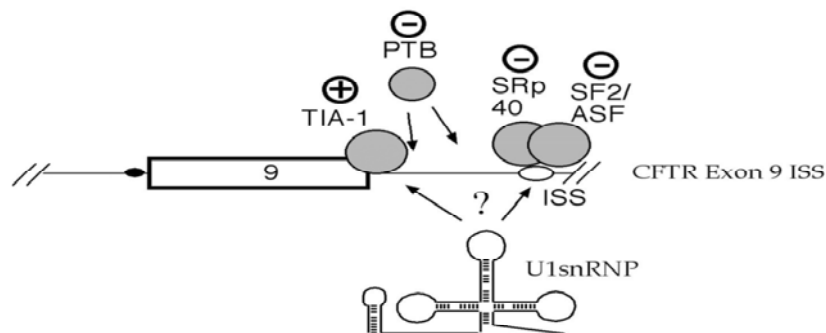
La fonction d'une protéine SR dépend de son site de liaison sur les séquences *cis* régulatrices. La protéine ASF/SF2 se lie sur un ISS situé en amont du site de branchement d'un site 3' d'épissage. Cette liaison inhibe l'interaction de U2 snRNP avec le point de branchement et par la suite l'inactivation du site 3' d'épissage (Kanopka et al., 1996).

Un autre modèle d'inhibition a été trouvé dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 6A de l'ARN pré-messager beta tropomyosin. Dans ce cas la protéine SC35 entre en compétition avec SF2/ASF pour occuper l'ISE, sachant que SC35 en se liant, n'a pas d'effet activateur (Gallego et al., 1997) (**Figure 23**).



**Figure 23** : Inhibition de l'épissage par compétition entre deux protéines SR (Buratti et al., 2007).

D'autres études ont rapporté l'effet inhibiteur des protéines SR (McNally and McNally, 1996, 1999; Simard and Chabot, 2002). Une étude récente a montré que les deux protéines SR SF2/ASF et SRp40 se lient sur un ISS pour inhiber l'épissage de l'exon 9 de l'ARN pré-messager CFTR (Buratti et al., 2007; Pagani et al., 2000). Les auteurs ont proposé un modèle d'inhibition dans lequel la liaison de ces deux protéines sur l'ISS crée un piège pour empêcher la liaison du U1 snRNP sur le site 5' d'épissage (Buratti et al., 2007) (**Figure 24**).



**Figure 24** : modèle proposé pour l'inhibition de l'épissage de l'exon 9 de l'ARN pré-messager CFTR par les protéines SR (Buratti et al., 2007).

### 5.2.1.7. Régulation des protéines SR

L'épissage de l'ARN pré-messager est régulé par des cycles de phosphorylation et de déphosphorylation (Mermoud et al., 1994), ceci est relié en partie à l'état de phosphorylation des protéines SR. Le domaine RS des protéines SR est riche en résidus sérines. Le niveau de phosphorylation des protéines SR joue un rôle important dans la régulation des interactions protéine-protéine, leur activité d'épissage, leur localisation intracellulaire (revue dans (Blaustein et al., 2007; Stamm, 2008)). Des protéines SR hypo ou hyperphosphorylées sont inactives dans la régulation de l'épissage (Sanford and Bruzik, 1999).



Plusieurs protéines kinases ont été décrites pour phosphoryler les protéines SR sur leur domaine RS : La famille SRPK (SR protein kinase) (Gui et al., 1994; Wang et al., 1998), la famille des kinases Clk/Sty (Colwill et al., 1996), la topoisomérase I (Rossi et al., 1996) et l'Akt kinase (Blaustein et al., 2005; Patel et al., 2005).

La SRPK1 est une sérine kinase spécifique pour les protéines SR, elle phosphoryle la partie N-terminal du domaine RS de la protéine ASF/SF2 (Ngo et al., 2008) tandis que Clk/Sty phosphoryle le domaine RS sur de multiples régions ce qui résulte en une hyperphosphorylation (Ngo et al., 2005). L'épissage alternatif de la protéine kinase C beta II est régulé par la phosphorylation de SRp40 par l'Akt (Patel et al., 2005). Akt phosphoryle aussi 9G8 et ASF/SF2 pour réguler l'épissage alternatif de l'exon EDA de l'ARN pré-messager de la fibronectine. La phosphorylation de ces protéines SR par Clk/Sty provoque un effet opposé sur l'exon, prouvant que les kinases ciblent différents résidus dans les protéines SR provoquant des effets différents sur l'épissage (Blaustein et al., 2005).

La présence des kinases dans le cytoplasme est nécessaire pour la phosphorylation des protéines SR sur le domaine RS avant le retour vers le noyau (Gupta et al., 2006), La phosphorylation de SF2/ASF facilite son import nucléaire et son accumulation dans les speckles nucléaires (Athanasίου et al., 2000). La déphosphorylation diminue l'interaction de 9G8 et de SF2/ASF au facteur d'export nucléaire TAP/NFX1 (Huang et al., 2004) et probablement les formes hypophosphorylées de ces deux protéines s'accumulent dans le cytosol (Blaustein et al., 2005).

La phosphorylation change l'affinité des protéines SR à interagir avec d'autres protéines. La phosphorylation de la protéine SRp38 augmente sa liaison à l'U1 70K snRNP mais diminue son interaction avec tra2-alpha (Shin et al., 2004). La phosphorylation de ASF/SF2 augmente la liaison avec l'U1 70K snRNP mais diminue la liaison avec le facteur d'export nucléaire TAP/NFX1 (Huang et al., 2004).

Les phosphatases interviennent aussi dans la régulation de l'épissage. Les phosphatases PP1 et PP2A ont été identifiées pour déphosphoryler des facteurs d'épissage et pour réguler par la suite l'épissage. Des phosphatases de la famille PP2A ont été purifiées parmi les composants du spliceosome (Blaustein et al., 2004). Les phosphatases agissent aussi sur des composants de l'U2 et l'U5 snRNP, elles sont nécessaires pour la deuxième réaction d'épissage (Ingelsson et al., 2006).

Une étude récente a montré un autre type de régulation des protéines SR. Dans cette étude, Shi et ses collaborateurs ont montré que la caféine régule l'épissage alternatif de certain nombre de gènes associés au cancer, comme le gène suppresseur de tumeur KLF6. La caféine exerce son effet par l'intermédiaire de la protéine SC35. En effet, la caféine réduit l'expression de SC35 ce qui inhibe l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager KLF6. La surexpression de SC35 reproduit l'effet de la caféine sur l'épissage (Shi et al., 2008).

#### **5.2.1.8 Protéines SR et transcription**

La transcription de l'ADN et l'épissage de l'ARN pré-messager sont deux processus couplés, les membres de la famille des protéines SR ont été identifiés parmi les centaines de protéines contenues dans le complexe de l'ARN polII (Das et al., 2007). Ce qui suggère que les protéines SR sont impliquées dans le couplage transcription-épissage. Des interactions entre des SR-related proteins et le CTD (C-terminal domain) de l'ARN polII ont été décrites (Yuryev et al., 1996). La protéine SC35 interagit avec le CTD de l'ARN polII et active l'élongation de certains gènes. En plus, il a été montré dans cette même étude que SC35 interagit avec le CDK9 (cyclin-dépendant kinase 9) ce qui entraîne la phosphorylation d'une sérine du CTD et l'activation de l'élongation de la transcription (Lin et al., 2008).

#### **5.2.1.9 Rôle des protéines SR dans le transport et la traduction de l'ARNm**

En plus de leur rôle clef dans la régulation de l'épissage, les protéines SR sont aussi impliquées dans d'autres mécanismes de la régulation de l'expression des gènes tels que, l'export nucléaire de l'ARNm, la stabilité, le contrôle de qualité (système NMD) et la traduction (Caceres et al., 1998). Il a été montré que 3 protéines SR, SRp20, 9G8 et ASF/SF2 se déplacent en continu entre le noyau et le cytoplasme (shuttling proteins) (Caceres et al., 1998). Ceci suggère que ces protéines SR interviennent dans le transport et le métabolisme de l'ARNm. En effet, SRp20, 9G8 et ASF/SF2 fonctionnent dans le transport nucléocytoplasmique par leurs interactions avec le récepteur de transport nucléaire de l'ARNm TAP/NFX1 (Huang and Steitz, 2001).

Les deux protéines 9G8 et SRp20 jouent un rôle dans l'export nucléaire de l'ARNm histone H2a par liaison à une séquence nucléotidique de 22 a.a de l'ARNm H2a (Huang and Steitz, 2001).

Les protéines SR jouent un rôle dans la régulation de l'activité du système NMD. La surexpression de ASF/SF2, SC35 ainsi que d'autres protéines SR induit le système NMD. Ce rôle nécessite le domaine RS et ne dépend pas de localisation nucléo-cytoplasmique de la protéine. En effet, ASF/SF2 fusionnée avec le signal de rétention nucléaire de SC35 reste retenue dans le noyau en gardant sa capacité d'activer le système NMD (Ralston et al., 2004).

Certaines protéines SR sont impliquées dans la traduction de l'ARNm **revue dans** (Long and Caceres, 2009). La protéine ASF/SF2 régule l'épissage alternatif de l'ARNm codant la kinase MNK2 et la kinase S6K1 impliquées dans la régulation de la traduction. La surexpression de SF2/ASF résulte en la production des isoformes de ces deux protéines qui induisent l'initiation de la traduction. De plus, ASF/SF2 active directement la traduction, elle s'associe aux polyribosomes et active la traduction d'un ARNm codant pour un cDNA rapporteur luciférase contenant un ESE (Sanford and Caceres, 2004).

### **5.2.2. La famille des protéines hnRNP**

Les membres de cette famille sont des protéines qui ont un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN et des domaines riches en glycines caractérisés par des répétitions de motif glycine-glycine-arginine nommé la boîte RGG. Ces derniers permettent la liaison des hnRNPs à l'ARN et à d'autres protéines (Chabot et al., 2003).

Les hnRNPs présentent une grande diversité structurale et sont impliquées dans divers processus biologiques allant de la transcription à la régulation de la traduction en passant par l'épissage, la polyadénylation, la stabilité, la rétention, l'export et la dégradation de l'ARN messager. Ces protéines peuvent alors avoir une double localisation, nucléaire et cytoplasmique, où leur fonction peut être liée à leur capacité à faire la navette du noyau vers le cytoplasme (Krecic and Swanson, 1999).

Un rôle dans la régulation d'épissage a été décrit pour la plupart des protéines hnRNPs principales. Tandis que d'autres hnRNP sont soit mal caractérisées (hnRNP N, S, T...), soit ne jouent pas un rôle dans l'épissage (hnRNPA3).

### **5.2.2.1. hnRNP A1 et hnRNP A2**

Ces deux protéines appartiennent à la sous famille, nommée hnRNP A/B regroupant aussi hnRNP A2/B1, A3, A0 et D et qui présentent toutes une similitude entre leurs RRM (Akindahunsi et al., 2005)

hnRNP A1 et A2 présentent une similitude structurale (68% de la séquence en acides aminés, 80% pour les RRM). Les deux contiennent aussi un signal d'exportation nucléocytoplasmique (M9) (Siomi and Dreyfuss, 1995).

La protéine hnRNPA1 se lie à l'ARN pré-messager sur des motifs UAG dans un contexte riche en G. Elle inhibe l'épissage en modifiant le choix des sites d'épissage en 5' (Mayeda et al., 1994; Yang et al., 1994). Son effet inhibiteur serait la conséquence de sa fixation sous une forme d'un réseau protéique (Damgaard et al., 2002). Ce rôle inhibiteur peut être plus globalement élargi à d'autres protéines de la famille des hnRNP A/B. L'activité de A2/B1 est 10 fois plus forte que celle de A1 sur la sélection des sites d'épissage in vitro (Mayeda et al., 1994).

La protéine hnRNPA1 est capable d'inhiber l'épissage par compétition avec un activateur la protéine SC35 sur un site de liaison chevauchant (Expert-Bezancon et al., 2004).

L'effet antagoniste des protéines SR et des protéines hnRNP est une preuve que l'épissage n'est pas régulé par un seul facteur, mais résulte d'un équilibre entre des facteurs inhibiteurs et des facteurs activateurs. Cette partie sera mieux discutée ultérieurement.

### **5.2.2.2. PTB ou hnRNP I**

La protéine PTB (Polypyrimidine Tract Binding Protein) ou hnRNP I, fonctionne généralement comme répresseur d'épissage en se fixant sur l'ARN au niveau des motifs UCUU ou CUCUCU dans un contexte riche en pyrimidine (polyrimidine tract). Elle entre donc en compétition avec la fixation de U2AF sur ses séquences et empêche la sélection du site 5' d'épissage. En effet, s'il existe plusieurs sites de liaison de PTB à proximité de l'exon alternatif, PTB peut entraîner l'exclusion d'un exon en compactant l'ARN en des complexes inaccessibles à la machinerie d'épissage (Del Gatto-Konczak et al., 1999).

### 5.2.2.3. Autres hnRNP

Un rôle dans l'épissage a été identifié pour **hnRNP L**. Ce facteur qui présente une similitude avec PTB, fonctionne comme activateur spécifique de l'épissage de la synthase d'oxyde nitrique endothéliale humaine (eNOS). hnRNP L se lie spécifiquement à des répétitions CA et active les sites d'épissage 5' en amont (Hui et al., 2005).

**hnRNP P2** (appelé également TLS/FUS), peut augmenter la sélection des sites d'épissage sur l'ARN pré-messager de l'adénovirus E1a (Hallier et al., 1998).

### 5.2.3. Antagonisme entre les protéines SR et les hnRNP

Le profil d'épissage alternatif d'un gène dépend des concentrations relatives des facteurs d'épissage, des protéines SR et des hnRNPs qui affectent la sélection des sites d'épissage au niveau de l'ARN pré-messager. Les protéines SR liées aux ESSs empêchent la fixation à l'ARN et déplacent les protéines inhibitrices liées à l'ARN comme hnRNP A1 (Huang et al., 2001). Le cas le plus étudié est celui de ASF/SF2 et hnRNP A1 mais ce mécanisme peut être étendu à d'autres protéines SR. En effet, le choix entre deux sites donneurs en compétition implique une modulation de la liaison de U1 snRNP au niveau des sites 5' d'épissage. En présence d'un excès de la protéine ASF/SF2, l'utilisation du site donneur proximal est favorisé. Dans ce cas, ASF/SF2 permet une occupation complète de tous les sites 5' d'épissage par U1 snRNP. Cependant, un excès de la protéine hnRNP A1 provoque la sélection du site donneur le plus distal (Chabot, 1996). Le rapport entre ces deux facteurs peut donc modifier *in vitro* l'inclusion de l'exon alternatif interne en cassette. Cet antagonisme entre ASF/SF2 et hnRNP A1 pourrait également s'appliquer à des sites accepteurs en compétition (Bai et al., 1999).

L'antagonisme peut exister aussi entre les protéines SR dans la régulation de l'épissage du même ARN pré-messager. En effet, la protéine ASF/SF2 active l'épissage de l'exon 6A du gène tropomyosin du poulet (Gallego et al., 1997). Cependant la protéine SC35 antagonise l'effet positif de ASF/SF2. Par compétition, elle occupe le même ISE et inhibe l'épissage. Ce phénomène d'antagonisme dépend des concentrations respectives de ces deux protéines.

#### 5.2.4. Autres facteurs agissant en trans

Les protéines SR et les protéines hnRNP permettent d'expliquer une large variété des décisions d'épissage. Cependant, il existe d'autres facteurs agissant en trans sur l'épissage et qui n'appartiennent à aucune de ses deux familles. Parmi ces facteurs je cite :

- La protéine **KSRP** qui joue un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif où elle assure un rôle activateur de la reconnaissance de l'exon N1 de c-src (Modafferi and Black, 1997).
- Les deux protéines Fox-1 et Fox-2 sont capables d'activer ou d'inhiber l'épissage dans de nombreux tissus à travers les séquences UGCAUG (Ponthier et al., 2006).
- Les protéines de la famille **CELF** (CUG-BP et ETR3-like factors) se lient un ESE musculaire (MSE) du pré-messager du troponin T cardiaque (cTNT) pour activer l'épissage de l'exon 5 (Ladd et al., 2001; Ladd et al., 2004).

D'autres facteurs agissant en trans sont tissus spécifiques et jouent un rôle important dans la régulation de l'épissage alternatif. La protéine **NOVA-1** est un exemple de facteurs trans tissus spécifiques agissant sur l'épissage. En effet NOVA-1 régule l'épissage alternatif dans le neurone et il est essentiel pour la viabilité neuronale. Cette protéine a aussi un domaine KH de liaison à l'ARN. Des souris NOVA-1  $-/-$  présentent un épissage alternatif aberrant dans l'ARN pré-messager des deux récepteurs : l'exon 3A du récepteur glycine alpha2 et l'exon gamma2L du récepteur GABA<sub>A</sub>. L'effet positif de NOVA-1 est antagonisé par nPTB, un homologue neuronal de PTB (Caceres and Kornblihtt, 2002).

## 6. *Épissage alternatif et maladies héréditaires*

Puisque la régulation de l'épissage alternatif est cruciale pour les diverses fonctions cellulaires, il ne serait pas étonnant que des défauts de ce processus soient à l'origine de certaines maladies héréditaires ou cancéreuses.

Différents éléments et facteurs interviennent dans le mécanisme d'épissage d'un pré-mRNA. Des défauts par mutations dans la séquence du pré-mRNA ou dans les régulateurs peuvent résulter en un épissage aberrant donnant naissance à un messenger codant pour une protéine anormale. Les études montrent que 15% des mutations qui causent des maladies génétiques sont dues à un défaut d'épissage (Krawczak et al., 1992).

Faustino et al ont classé les défauts d'épissage causant des maladies en quatre catégories (Faustino and Cooper, 2003) :

- 1- Mutations dans la séquence du pré-messenger qui altèrent l'épissage constitutif : la majorité correspond à des mutations ponctuelles par substitution dans une séquence intronique ou exonique ce qui provoque la rétention de l'intron ou l'exclusion de l'exon. Le résultat de ce défaut est la perte des fonctions normales à cause de la synthèse d'une protéine tronquée, ou à cause de problèmes de stabilité de la protéine. L'ARNm muté est souvent dégradé par le système NMD avant qu'il soit traduit en protéine.
- 2- Mutations des sites alternatifs d'épissage : elles affectent l'utilisation des sites alternatifs d'épissage. Si elles ne produisent pas de sites aberrants avec perte de fonction de la protéine, il y a des changements dans le rapport des différentes isoformes protéiques. Différentes maladies ont été décrites avec ces types de défauts. Des changements dans le rapport entre les deux isoformes de la protéine tau (tau4R/tau3R) sont à l'origine de différentes maladies du système nerveux central comme la forme familiale de démence fronto-temporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 (FTDP-17) (Tazi et al., 2009) ou la maladie d'alzheimer (Ingelsson et al., 2006). Des changements dans le taux des différentes isoformes du gène suppresseur de tumeur WT1 sont à l'origine du Pseudohermaphrodisme masculin (Barboux et al., 1997).
- 3- Mutations dans la machinerie basale d'épissage : les altérations de la machinerie basale d'épissage sont souvent létales, ainsi les maladies qui sont dues à ce défaut sont rares. Deux maladies ont été décrites comme le résultat d'un défaut d'assemblage du

spliceosome et qui touche deux types différents de neurones, les rétinopathies pigmentaires (RP) (Tazi et al., 2009) et l'amyotrophie spinale proximale (SMA) (Faustino and Cooper, 2003).

- 4- Mutations qui atteignent les facteurs régulateurs : La majorité des changements de profils d'épissage alternatif semble être associée à des altérations dans l'expression ou l'activité des facteurs d'épissage (Brinkman, 2004). Des pertes de fonction de la protéine TDP43 (TAR DNA Binding protein 43kDa), membre de la famille des protéines hnRNP interviennent dans la démence lobaire fronto-temporale. Les altérations des facteurs qui contrôlent l'épissage sont le plus souvent observées dans certains cancers.

## 7. *Epissage alternatif et cancer*

Les cellules cancéreuses présentent souvent des dérèglements de l'épissage alternatif affectant des gènes associés à la prolifération cellulaire, à la progression tumorale et à la résistance à l'apoptose. Comme les autres maladies, certaines de ces perturbations sont causées par des mutations aux sites d'épissage tandis que d'autres sont provoquées par des changements dans l'expression des protéines régulatrices (Revil et al., 2006).

Les études qui montrent des profils anormaux de l'épissage alternatif dans les cellules cancéreuses sont de plus en plus nombreuses. Les gènes codant p73 et p 63 font partie de la famille p53, un gène suppresseur de tumeur. L'épissage des pré-ARNm de p73 et p63 peut provoquer l'exclusion du domaine de transactivation et transforme ces protéines suppresseurs de tumeurs en oncogènes (Ozaki and Nakagawara, 2005).

L'isoforme de la glycoprotéine transmembranaire CD44 portant l'exon v6 induit des métastases de carcinomes mammaires et pancréatiques chez le rat (Wallach et al., 2000).

L'épissage alternatif du pré-messager Bcl-x donne l'isoforme Bcl-xl ou l'isoforme Bcl-xs selon l'utilisation des sites d'épissage 5'. Bcl-xl est produite majoritairement dans les cellules cancéreuses et présente une activité anti-apoptotique tandis que Bcl-xs est pro-apoptotique (Minn et al., 1996).

La liste montrant l'importance fonctionnelle de l'épissage alternatif pour les gènes impliqués ou associés au cancer commence à être importante. Ces études serviront dans la découverte des applications pour le diagnostic et pour la cancéro-thérapie.



La connaissance du rôle des isoformes protéiques dans le cancer est importante et essentielle pour les espoirs thérapeutiques. À cette fin, différentes approches ont été décrites comme la technologie de l'interférence à l'ARN, l'utilisation des oligonucléotides complémentaires aux sites d'épissage, l'utilisation d'oligonucléotides antisens,...

La modification de l'activité ou de l'expression des protéines qui influent sur l'épissage alternatif ainsi que la modification de sélection des sites d'épissage dans les cellules cancéreuses ouvriront la voie à une approche thérapeutique complémentaire aux traitements actuels contre le cancer (Revil et al., 2006).

## **8. *Epissage alternatif et signalisation***

La sélection des sites d'épissage est régulée par des changements de concentration et d'activité des protéines régulant l'épissage, ceci est assuré par la synthèse de protéines et/ou par la modulation de l'état de phosphorylation qui influence la localisation des facteurs d'épissage.

Le changement dans la sélection des sites d'épissage est une adaptation qui peut se produire dans une cellule saine comme dans des cellules malades.

Des stimuli comme des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones et des dépolarisations cellulaires résultent en des changements de la sélection des sites d'épissage (Stamm, 2002). Certaines études se sont focalisées sur la dissection des mécanismes par lesquels les voies de transduction du signal interviennent dans le transfert du message apporté par le stimulus depuis la surface cellulaire jusqu'au noyau où se situe la machinerie d'épissage.

Plusieurs voies de signalisation cellulaire ont été décrites dans la régulation de l'épissage alternatif, mais les intermédiaires qui agissent ne sont pas identifiés dans la majorité des cas.

L'exemple le mieux caractérisé est celui de la régulation de l'épissage de l'exon v5 de l'ARNm CD44. Un gène unique codant la protéine transmembranaire CD44 donne nombreuses isoformes protéiques par épissage alternatif par des modifications post traductionnelles (Ponta et al., 2003). La stimulation des récepteurs des lymphocytes T active Ras par l'intermédiaire de liaison de Grb2 et de SOS. Ras active Raf qui phosphoryle MEK1 qui à son tour phosphoryle et active ERK. ERK phosphorylée se délocalise vers le noyau pour activer l'inclusion de l'exon v5 de CD44 (Weg-Remers et al., 2001).

La recherche des intermédiaires a permis d'identifier en premier temps hnRNPA (inhibiteur de l'épissage de l'exon v5) comme cible de ERK. La régulation ne nécessite pas ici la synthèse de protéines ce qui montre que la phosphorylation est le régulateur principal (Matter et al., 2000).

D'autres études plus récentes ont montré que les deux protéines Sam68 et SRm160 activent l'inclusion de l'exon v5. Sam68 phosphorylée par ERK2, se lie à un ESE pour activer l'inclusion de l'exon v5 (Matter et al., 2002). SRm160 active aussi l'inclusion de l'exon v5 de façon dépendante de Ras en se liant probablement à Sam68 (Cheng and Sharp, 2006).

L'exemple de l'exon IIb de la protéine kinase C (PKC) montre bien comment des voies de transduction du signal régulent l'épissage alternatif suite à un stimulus hormonal. Le traitement des myotubes par l'insuline active l'inclusion de l'exon IIb (Chalfant et al., 1998). La liaison de l'insuline à son récepteur recrute et active la PI3K, ensuite la PI3K/Akt phosphoryle le facteur d'épissage SRP40 qui se lie à un ISE pour activer l'inclusion de l'exon IIb (Patel et al., 2005).

De même, la stimulation par des facteurs de croissance de la cascade Ras/PI3K/Akt permet la phosphorylation des protéines SR 9G8 et SF2/ASF qui se lient à des séquences *cis* pour activer l'inclusion de l'exon EDA du gène de fibronectine (Blaustein et al., 2004; Blaustein et al., 2005).

D'autres exemples ont été rapportés dans plusieurs revues (Blaustein et al., 2007; Stamm, 2002; Tarn, 2007).

Les voies de transduction du signal sont dérégulées dans un grand nombre de tumeurs humaines où l'épissage alternatif de nombreux gènes est altéré. La compréhension détaillée des mécanismes par lesquels les voies de signalisation agissent sur l'épissage permet de mieux comprendre la genèse de certaines tumeurs ainsi que d'autres pathologies affectant les cellules humaines.

## **II- L'érythropoïèse**

## **1. L'érythropoïèse**

L'érythropoïèse est un processus par lequel des cellules souches hématopoïétiques se différencient en des cellules érythroïdes matures anucléées (globules rouges).

Les globules rouges représentent 99% des cellules sanguines. Ils transportent l'oxygène aux tissus. L'érythropoïèse est finement régulée, elle doit être opérationnelle, constante et suffisante tout au long de la vie de l'individu.

L'érythropoïèse fait donc partie du système de production de l'ensemble des cellules sanguines, appelé l'hématopoïèse (**Figure 25**). Ce système permet la production de huit lignées cellulaires à partir d'un seul précurseur, la cellule souche hématopoïétique (CSH) (Cantor and Orkin, 2002). Les CSH sont caractérisées par une capacité d'auto renouvellement et de différenciation sous l'influence de nombreux facteurs.

Les cellules souches et les progéniteurs multipotents se différencient vers la voie lymphoïde ou myéloïde pour donner naissance aux progéniteurs communs myéloïdes CMP (Common Myeloid Progenitors) ou lymphoïdes CLP (Common Lymphoid Progenitors).

Le progéniteur lymphoïde CLP est capable de se différencier pour donner les deux types de lymphocytes (T et B).

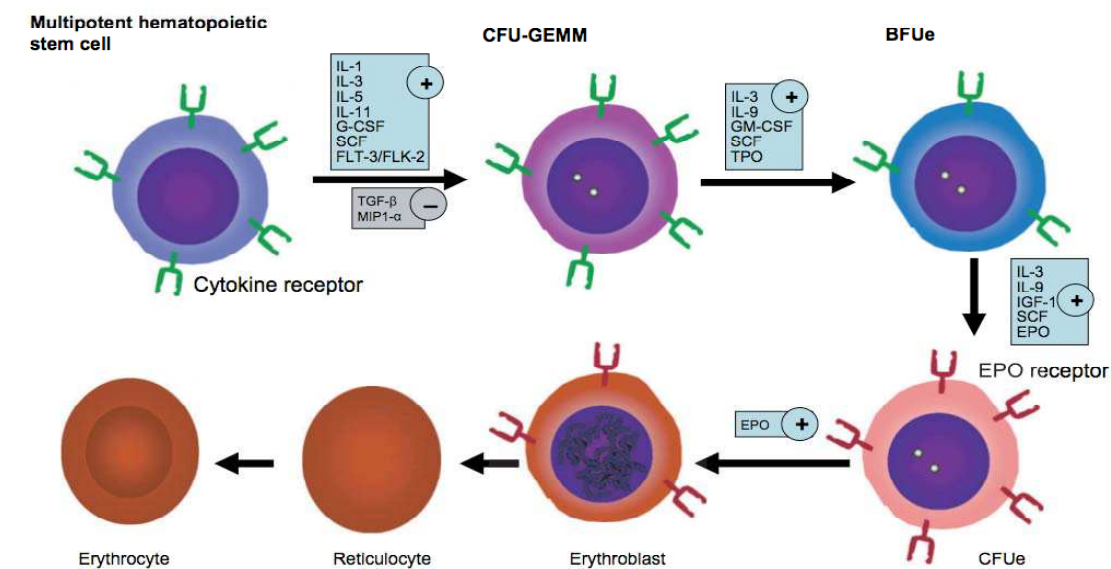
Le progéniteur CMP a le potentiel de se différencier vers d'autres progéniteurs encore plus engagés :

- MEP (Megacaryocyte/ Erythroid Progenitor) qui se différencie en BFU-E (Burst Forming Unit Erythroid) pour la lignée érythroïde et en BFU-Meg pour la lignée mégacaryocytaire.
- GMP (Granulocyte/ Macrophage progenitor) qui se différencie en CFU-M pour la lignée monocyttaire et CFU-G pour la lignée granulocytaire.

Sous l'influence de divers facteurs de croissance, les progéniteurs se différencient et subissent un processus de maturation pour enfin donner les cellules sanguines fonctionnelles.

## 2. Les différentes étapes de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse commence à partir d'une cellule souche hématopoïétique qui s'engage dans une voie de différenciation myéloïde, vers un progéniteur multipotent appelé CMP ou CFU-GEMM pour Colony Forming Unit Granulocyte/ Erythrocyte/ Megacaryocyte/ Macrophage ). Ce progéniteur va ensuite se différencier vers un progéniteur restreint dans la voie érythroïde appelé BFU-E (Burst Forming Unit Erythroid). Le BFU-E se différencie pour donner des CFU-E ( Colony- Forming Unit Erythroid Cells) qui sont dépendantes de l'Epo pour survivre. L'action de l'Epo sur ces cellules aboutit à la formation de précurseurs érythroblastiques (érythroblastes) morphologiquement reconnaissables au niveau médullaire. Les érythroblastes perdent leur noyau pour donner des réticulocytes qui après une maturation finale donnent les globules rouges matures dans le sang périphérique (Elliott et al., 2008) (**Figure 26**).



**Figure 26** : Les différentes étapes de l'érythropoïèse qui conduit à la formation d'un globe rouge mature à partir d'une cellule souche hématopoïétique. (Elliott et al., 2008)

## 3. Les érythroleucémies murines de Friend

Les érythroleucémies murines de Friend ont servi depuis 52 ans maintenant comme outil d'étude dans le domaine de l'érythropoïèse, de l'oncologie et de la virologie. Elles représentent un modèle d'étude de la progression tumorale (leucémie) permettant d'identifier les oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans ce processus

(Moreau-Gachelin, 2008). Ces études ont permis de faire d'importants progrès dans la compréhension de la mise en place d'un processus oncogénique et ont apporté de nombreuses informations sur le mécanisme de signalisation par le récepteur à l'érythropoïétine.

Les souris infectées par le complexe rétroviral de Friend développent des érythroleucémies (Ben-David and Bernstein, 1991). Ce complexe se compose de deux rétrovirus :

- Le virus à réplication déficiente, SFFV (Spleen Focus Forming Virus) incapable de se répliquer
- Le virus F-MuLV (Friend Murine Leukemia Virus) compétent pour la réplication.

Il existe deux souches de SFFV qui induisent des symptômes différents, la souche SFFVp (pour polycythemia) et la souche SFFVa (pour anemia).

Les souris infectées avec le complexe F-MuLV+SFFVp développent une polycythémie et les cellules érythroïdes de la rate peuvent proliférer et se différencier en absence de l'EPO, tandis que les souris infectées par le complexe F-MuLV+SFFVa présentent une anémie (diminution de l'hématocrite due, ici, à une augmentation du volume plasmatique et non à une diminution réelle du nombre de globules rouges dans le sang) (Tambourin et al., 1979).

Quel que soit le virus utilisé pour l'infection, l'érythroleucémie de Friend évolue en deux étapes. Rapidement après l'infection, on assiste à une prolifération polyclonale de progéniteurs érythrocytaires non leucémiques (BFU-E et CFU-E). Ces cellules infectées ont des capacités d'auto-renouvellement limitées en culture in vitro. Plus tardivement, entre 2 et 3 semaines après l'infection, on voit émerger des clones de proérythroblastes bloqués dans leur processus de différenciation, et aux capacités de prolifération illimitées in vitro (**Figure 27**).

95% des clones érythroleucémiques qui émergent présentent une insertion du provirus SFFV en amont du locus codant pour Spi-1/PU.1, impliquant un rôle déterminant de Spi-1/PU.1 dans ce processus pathologique (Moreau-Gachelin et al., 1989).

Dans le cas des cellules érythroleucémiques F-MuLV, 75% des cellules issus de souris infectées par le provirus F-MuLV présentent une activation du gène *fli-1* à cause de l'insertion du provirus en 5' de ce gène (Ben-David and Bernstein, 1991).

Les cellules MEL (Murine Erythroleukemia) issues d'une lignée SFFV sont capables de reprendre le programme de différenciation érythroïde en culture sous l'action d'inducteurs chimiques comme le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'Hexaméthylène bisacétamide (HMBA) et l'acide butyrique (Terada et al., 1978).

#### **4. *La régulation de l'érythropoïèse***

##### **L'érythropoïétine, régulateur des derniers stades de la différenciation érythrocytaire.**

Dès les cellules souches CSH jusqu'à la formation d'un globule rouge mature, l'érythropoïèse est finement régulée par une multitude de signaux différents (facteurs de croissance) interprétés par de nombreux récepteurs et intégrées par une combinaison d'expression de facteurs de transcription.

Les principaux facteurs de croissance impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse sont l'interleukine 3 (IL3) et le GM-CSF qui agissent au niveau des progéniteurs érythroïdes immatures, le SCF (stem cell factor) qui intervient jusqu'au stade de CFU-E, et l'érythropoïétine surtout à partir des stades de BFU-E matures.

L'érythropoïétine est la principale cytokine régulatrice de la production des globules rouges. Elle est produite principalement dans les cellules péritubulaires du rein et accessoirement dans les hépatocytes du foie chez l'adulte (Koury et al., 1988; Koury et al., 1991; Lacombe et al., 1988; Maxwell et al., 1993).

La cible essentielle de l'Epo est le progéniteur le plus mature de la lignée érythroïde (CFU-E), mais elle agit également en amont sur les BFU-E. Cependant, la formation des CFU-E n'est pas dépendante de l'EPO puisque des souris déficientes en EPO ou EPO-R sont capables de générer des progéniteurs BFU-E et CFU-E (Wu et al., 1995). Au-delà du stade CFU-E, l'EPO est indispensable alors que les autres cytokines n'induisent pas l'érythropoïèse terminale.

L'EPO interagit avec son récepteur membranaire (EPO-R). A la suite de cette liaison, elle induit une série d'événements qui aboutissent à la transduction d'un signal prolifératif, anti-apoptotique et de différenciation (Zhu et al., 2002).

## 5. *Activation de l'EPO-R et transduction du signal*

L'EPO-R appartient à la famille des récepteurs de cytokines de type I. Il est exprimé principalement dans les cellules érythroïdes (BFU-E et CFU-E), mais aussi dans d'autres tissus comme le cerveau et le système cardiovasculaire ce qui permet de supposer un rôle dans certaines pathologies liées à ces tissus (Brines and Cerami, 2006).

Chez l'homme l'EPO-R est formé de trois parties : une partie extracellulaire (225 a.a), une région transmembranaire (22 a.a) et une partie cytoplasmique (236 a.a) (Jelkmann et al., 2008) (**Figure 28**).

La partie extracellulaire est formée de deux domaines D1 et D2 qui forment deux feuillets bêta antiparallèles formant un L (fibronectin type II-like domains) (Syed et al., 1998). Elle contient quatre résidus cystéines conservés et un motif « WSXWS » (Tryptophane-Sérine-X-Tryptophane-Sérine). Ce motif de l'EPO-R est critique pour la liaison du ligand, l'internalisation et la transduction du signal (Quelle et al., 1992; Yoshimura et al., 1992).

La partie intracellulaire ne possède pas une activité catalytique tyrosine kinase. Elle est divisée en deux domaines fonctionnels. La région proximale contient deux motifs appelés Box1 et Box2, conservés par de nombreux autres récepteurs aux cytokines. Le motif Box1 et la région flanquante sont nécessaires pour l'activation de JAK2 kinase et pour sa liaison au récepteur (Jelkmann et al., 2008).

La région entre Box1 et Box2 mais pas le motif Box2 seul est requise pour l'initiation du signal de prolifération induit par l'EPO (Hilton and Berridge, 1995).

La région la plus distale de la membrane n'est pas requise pour le signal, elle contient huit tyrosines qui sont phosphorylées après fixation de l'EPO sur son récepteur et qui seront alors des sites de fixation pour de nouvelles molécules effectrices. Une étude a montré que ces résidus tyrosines ne sont pas requis pour la différenciation terminale des progéniteurs érythroïdes humains CD34+ (Fichelson et al., 1999).

La fixation de l'EPO sur l'EPO-R induit un changement de conformation de l'homodimère déjà formé qui conduit à son activation. De nombreuses molécules avec un domaine SH2 peuvent se fixer sur l'EPO-R et sont des molécules clés de la transduction du signal de l'EPO vers le noyau. Parmi ces facteurs, on distingue de nombreuses kinases et d'autres molécules de signalisation : JAK2 kinase, STAT5, PKC, PKB (Akt), Ras, Shc, Lyn ... **revue dans** (Wojchowski et al., 1999).



## 6. Les voies de signalisation érythrocytaires

### 6.1. La voie de JAK2-STAT5

JAK2 est une protéine à activité tyrosine kinase. C'est le facteur clé de la signalisation de l'EPO-R. La liaison de l'EPO à son récepteur résulte en l'auto-phosphorylation de JAK2 et son activation (Witthuhn et al., 1993).

JAK2 activée phosphoryle l'EPO-R ainsi que d'autres protéines incluant STAT1 et STAT5. Ces protéines STAT une fois phosphorylées vont s'homodimériser, puis migrer dans le noyau pour se fixer sur des séquences spécifiques de promoteurs et augmenter l'expression de certains gènes cibles (Ihle and Kerr, 1995) (**Figure 29**). Cependant, le rôle des protéines STAT dans l'érythropoïèse n'est pas établi. Une étude a montré que la protéine STAT5 n'est pas essentielle pour la différenciation érythroïde (Millot et al., 2001). Actuellement, il n'y a pas de gène de différenciation érythroïde spécifiquement induit par STAT5. Par contre, la voie JAK2/ STAT5 joue un rôle anti-apoptotique dans l'érythropoïèse, elle agit en synergie avec GATA-1 pour augmenter l'expression de Bcl-xL ce qui augmente ainsi la survie cellulaire (Silva et al., 1999).

### 6.2. La voie Ras-Raf-MAP kinase

La stimulation par l'EPO de son récepteur conduit à une activation des voies des MAP kinases. Il existe une grande complexité concernant les MAP kinases spécialement pour Jun kinases et P38 kinases. Le rôle de ces voies a été étudié dans de nombreux modèles cellulaires avec des résultats controversés. La voie classique décrite est :

EPOR → Shc → Grb2 → Sos1 → Ras → Raf-1 → MEK → MAP kinase

Ship1 (SH2 inositol 5-phosphatase1) se fixe sur l'EPO-R activé sur la tyrosine 401 majoritairement, Ship1 activée par phosphorylation recrute Shc et Grb2 au récepteur (Mason et al., 2000) (**Figure 30**).

Parmi les cibles des MAPK on distingue des facteurs de transcription qui régulent l'expression ou l'activité de certains gènes comme *c-myc* et les composants du complexe de transcription AP-1, *c-fos*, *c-jun* et *junB* (Muszynski et al., 1998). Une étude a montré que l'activation de l'EPO-R résulte en la phosphorylation de Raf-1, MEK et ERK1/2, Cependant l'inhibition de l'activation de Raf-1 n'altère pas la phosphorylation de *c-myc* par ERK1/2 (Chen and Sytkowski, 2001).

### 6.3. La voie de la PI3K

La p85, sous unité régulatrice de la PI3K, se lie par son domaine SH2 à l'EPO-R activé. Par la suite, la p110, sous unité catalytique est phosphorylée. Par ailleurs, La PI3K peut être activée par une autre voie qui ne fait pas intervenir le récepteur mais implique la molécule IRS-2 (Insulin Receptor Substrate-2). La phosphorylation de l'IRS-2 permet sa liaison avec la P85 (Verdier et al., 1997).

La PI3K activée phosphoryle la phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI-4,5)-P2) pour produire la phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PI-(3,4,5)-P3), qui ensuite active PDK1 conduisant à la phosphorylation et à l'activation de l'Akt (protéine kinase B : PKB), une sérine thréonine kinase. Akt phosphorylée est capable d'inhiber ou d'activer d'autres protéines pour régler divers mécanismes dans la cellule érythroïde. La PI3K active aussi différentes isoformes de la protéine kinase C . La PKC est une serine/thrionine kinase qui fait partie d'une famille formée de 13 membres divisés en plusieurs classes suivant la structure et le cofacteur de régulation (**Figure 31**).

La PI3K joue un rôle important dans la prolifération, la différenciation et la survie des progéniteurs érythroïdes (Haseyama et al., 1999; Klingmuller et al., 1997).

### 6.4. Inhibition de la transduction du signal érythrocytaire

Bien que les mécanismes d'activation de la signalisation soient de plus en plus détaillés et expliqués, peu de chose est connue concernant les mécanismes de régulation négative de la signalisation érythropoïétique.

Les principaux facteurs identifiés sont les huit membres de la famille de protéines SOCS (suppressor of Cytokine Signalling). Les protéines SOCS ont une extrémité N-terminale unique, un domaine SH2 central et une extrémité C-terminale appelée C-terminale SOCS box. La transcription des protéines SOCS est régulée immédiatement par rétrocontrôle des voies de signalisation. L'induction des transcrits SOCS1, SOCS3 et de Cis (cytokine inducible SH2 domain) a été observé dans des lignées cellulaires et dans des cellules primaires induites par l'EPO (Starr et al., 1997).

Cis est SOCS-3 se lie sur la tyrosine Y401 de l'EPO-R et inhibe par compétition la liaison de STAT5a/b, Shp2 et Ship1. Un autre modèle a été proposé, la protéine SOCS se lie sur JAK2 et recrute la machinerie d'ubiquitination pour déclencher la dégradation de JAK2 (Ungureanu et al., 2002) (**Figure 32**).

## **7. Les voies de transduction du signal dans les cellules érythroleucémiques de Friend (SFFV)**

### **7.1. L'Epo-R est activé d'une façon constitutive dans les cellules érythroleucémiques de Friend**

Le génome du SFFV à la différence de la plupart des autres rétrovirus ne code pour aucun oncogène. L'induction de la prolifération des précurseurs érythroïdes est causée par l'activation constitutive du récepteur à l'EPO par l'intermédiaire d'une protéine virale du SFFV, la GP-55 (55kDa) (Linemeyer et al., 1982); (Ruta et al., 1983). Cette protéine qui reste à la membrane des cellules infectées interagit directement avec l'EPO-R (Beckerle, 1990). Cette interaction entraîne l'activation de l'EPO-R et induit dans les érythroblastes infectés une signalisation constitutive indépendante de l'EPO.

En plus de l'EPO-R, GP55 recrute une version tronquée du récepteur stk/RON( sf-Stk pour short form of Stk) (Nishigaki et al., 2001); (Zhang et al., 2006). Sf-Stk interagit aussi avec l'EPO-R. Ainsi, un complexe GP-55/EPOR/sf-Stk peut se former dans les cellules érythroïdes sensibles au SFFV, ce qui a pour effet d'induire une signalisation et une prolifération indépendante de l'EPO (**Figure 33**).

### **7.2. Signalisation dans les cellules érythroleucémiques de Friend (SFFV)**

L'activité de liaison à l'ADN de STAT1/3 est inhibée dans les cellules érythroleucémiques MEL (SFFV). Ce blocage est dû à l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 bien que la phosphorylation de JAK2 ne soit pas inhibée dans ces cellules (Nishigaki et al., 2006). L'inhibition de la phosphorylation pourrait être due à la déphosphorylation de STAT1 par SHP-1. SHP-1 est une tyrosine phosphatase décrite pour son rôle négatif dans la transduction de signal érythroïde, elle est hautement exprimée dans les cellules érythroleucémiques SFFV. L'étude montre que l'activité de liaison à l'ADN de STAT5 est activée constitutivement dans des cellules MEL.

La voie de Raf-MAPK est constitutivement activée dans les cellules érythroleucémiques SFFV. L'étude a montré que, dans les cellules érythroleucémiques SFFV (HCD-57) Raf-1 et MEK sont constitutivement actives et que les MAPkinases sont constitutivement phosphorylées et activées (Muszynski et al., 1998).

Les événements conduisant à l'activation de la cascade Raf-1/MAPK comme la phosphorylation de Shc sur ses résidus tyrosine, la formation du complexe Shc-Grb2, et la liaison Ras/GTP, sont constitutivement actives dans les cellules MEL SFFV (HCD-57) mais ne sont pas essentiels pour la prolifération cellulaire (Muszynski et al., 2000).

L'invalidation de l'expression de Raf-1 par un *c-raf* antisens inhibe complètement la prolifération dans les cellules Epo-dépendantes, tandis que les cellules érythroleucémiques SFFV continuent à proliférer mais avec un niveau réduit, Ce qui suggère que Raf-1 n'est pas essentielle pour le maintien de la prolifération dans les cellules érythroleucémiques SFFV et doit coopérer avec d'autres voies de signalisation pour assurer la prolifération cellulaire (Muszynski et al., 1998).

La PI3K et l'Akt kinase sont constitutivement actives dans les cellules érythroleucémiques SFFV (HCD-57). Ces cellules montrent aussi une phosphorylation constitutive de l'IRS-2 . L'activation de la PI3K est requise pour la prolifération des cellules MEL SFFV indépendamment de l'EPO. L'inhibition de la PI3K montre une inhibition de la prolifération dose dépendante (Muszynski et al., 2000).

Dans d'autres études, l'inhibition de la PI3K a été montrée responsable de la prolifération des cellules tumorales, suggérant que l'activation constitutive de la voie de la PI3K est critique pour la croissance des cellules tumorales. Des études ont montré que le gène supresseur de tumeur PTEN fonctionne comme régulateur négatif de la voie PI3K/Akt et que des mutations de ce gène augmente la susceptibilité du cancer (Blencowe et al., 1998; Wu et al., 1998). Ainsi, l'activation de la voie PI3K/Akt pourrait être un événement commun conduisant à la leucémie et au cancer.

Dans les cellules MEL (SFFV), la voie PI3K est capable d'activer les MAPK. Dans ces cellules, la PKC constitutivement active est nécessaire pour l'activation des MAPK et pas de Raf-1 et de MEK. La PKC est par conséquent requise pour la prolifération de ces cellules EPO indépendantes (Klingmuller et al., 1997; Muszynski et al., 2000). L'activation de MAPK par la voie de la PI3K/PKC a été aussi montrée dans d'autres modèles cellulaires (Duckworth and Cantley, 1997).

## **8. *Les facteurs de transcription érythrocytaires***

L'érythropoïèse est un processus continu tout au long de la vie de l'individu. De multiples études se sont focalisées sur la compréhension des mécanismes qui régulent la prolifération et la différenciation des précurseurs érythroïdes en globules rouges matures. Les facteurs de transcription sont au cœur de ce processus. Ce sont des médiateurs du message transmis par les voies de signalisation et initié par les facteurs de croissance érythrocytaires (**Tableau 1**).

L'érythropoïèse fait intervenir à la fois des facteurs spécifiques de la lignée érythrocytaire et des facteurs au plus large spectre d'action, capables d'interagir avec les facteurs spécifiques pour donner un signal particulier de différenciation.

Dans cette partie, je me contenterais de parler de quelques facteurs de transcription qui agissent dans les cellules érythroïdes normales ainsi que dans les cellules murines érythroleucémiques de Friend.

### **8.1. GATA-1**

C'est un facteur hématopoïétique qui appartient à la famille des facteurs de transcription à doigts de zinc GATA (Perry and Soreq, 2002). Il est exprimé dans les cellules hématopoïétiques de différentes lignées : érythrocytaire, mégacaryocytaire, éosinophile et les mastocytes, mais aussi dans les cellules de Sertoli (Yamamoto et al., 1997).

La protéine GATA-1 contient un domaine C-terminal de liaison à l'ADN et deux domaines à doigts de zinc N-terminal qui stabilisent la liaison. En se fixant sur la séquence consensus (A/T)GATA(A/G) elle permet la régulation positive de l'expression de certains gènes érythroïdes comme les gènes de la glycophorine, de l'hémoglobine et du récepteur à l'érythropoïétine.

GATA-1 est nécessaire à la survie des progéniteurs érythroïdes et à la différenciation érythroïde terminale. Les souris qui n'expriment plus le gène GATA-1 décèdent au stade embryonnaire, à cause d'une anémie sévère due à un arrêt de la maturation érythroïde au stade de proérythroblaste (Fujiwara et al., 1996).

Outre sa liaison à l'ADN, GATA-1 assure ses fonctions grâce à ses interactions avec d'autres partenaires protéiques (FOG-1, LMO-2, EKLF/Sp1, p300/CBP, et Spi-1/PU.1) impliqués dans la régulation de l'expression des gènes érythrocytaires (Cantor and Orkin, 2002).

## 8.2. Fli-1

Fli-1 est un facteur de transcription de la famille ets, il joue un rôle important dans la mégacaryopoïèse et la vasculogénèse. Les souris transgéniques déficientes en *fli-1* meurent in-utero d'hémorragie sévère et d'un défaut de mégacaryopoïèse entre E11.5 et E12.5 (Hart et al., 2000); (Spyropoulos et al., 2000). L'expression de *fli-1* diminue au cours de la différenciation érythroïde. La surexpression de Fli-1 dans les progéniteurs érythroïdes inhibe leur différenciation en réponse aux inducteurs comme l'EPO ou l'hémine et provoque une diminution du niveau de l'ARNm de GATA-1 (Athanasidou et al., 2000).

Dans 75% des érythroleucémies induites par infection des souris avec le virus F-MuLV, le gène *fli-1* est surexprimé et a pour conséquence le blocage des cellules aux stades précurseurs érythroïdes (Ben-David et al., 1990). Fli-1 est encore exprimé dans les cellules érythroleucémiques SFFV suite à l'activation du gène *fli-1* par PU.1 (Starck et al., 1999).

L'oncogène PU.1 se lie sur deux sites ets du promoteur de *fli-1*. La quantité des transcrits *fli-1* diminue en même temps que celle de *pu.1* après induction de la différenciation par l'HMBA ou le DMSO. La surexpression de Fli-1 dans les cellules érythroleucémiques SFFV inhibe leur différenciation (Starck et al., 1999).

## 8.3. TRIM10/HERF-1

HERF-1 est une protéine hématopoïétique, elle est détectée à un faible niveau dans les cellules MEL. L'induction de la différenciation de ces cellules par le DMSO est associée à une augmentation de l'expression de HERF-1 de 30 fois (Harada et al., 1999). En revanche, l'inhibition de l'expression de HERF-1 bloque la production d'hémoglobine dans les cellules traitées par le DMSO. ce qui suggère un rôle important de HERF-1 dans la différenciation érythroïde terminale.

HERF-1 est nécessaire à la viabilité des cellules MEL induites à la différenciation. En effet, l'extinction de HERF-1 combinée à l'induction de la différenciation par le DMSO conduit à une apoptose et à un blocage total de la différenciation (Blaybel et al., 2008).

HERF-1 a été suggéré comme régulateur positif d'un événement de la différenciation érythroïde, l'inclusion de l'exon 16 du pré-messager 4.1R. Dans les cellules MEL, HERF-1 active l'inclusion de l'exon 16 du pré-messager 4.1R en présence de l'inducteur de différenciation DMSO (Blaybel et al., 2008). Dans la même étude, les auteurs ont montré que l'extinction de PU.1 entraîne une activation de HERF-1 suivie par une différenciation des cellules d'une manière indépendante de DMSO.

#### **8.4. Spi-1/PU.1**

Le gène *Spi-1/pu.1* code le facteur de transcription de la famille Ets Spi-1/PU.1 (SFFV Proviral Integration Site-1/ Purine Rich Box-1). PU.1 a d'abord été caractérisé comme un oncogène. Dans les progéniteurs érythroïdes, l'intégration du provirus SFFV dans le locus *Spi-1/PU.1* permet sa surexpression, ce qui bloque la différenciation terminale et entraîne le développement d'une érythroleucémie (Moreau-Gachelin et al., 1989). Spi-1/PU.1 est également décrit comme un facteur de transcription myéloïde. Il se fixe sur une séquence riche en purines (5'GGAA/G 3') contenue dans le promoteur des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II I-A $\beta$  (Klemsz et al., 1990). Le gène *pu.1* est localisé sur le chromosome 11 chez l'homme (11p11.22) (Nguyen et al., 1990) et sur le chromosome 2 chez la souris (2E3) (Moreau-Gachelin et al., 1989). Il code une protéine de 272 ou 266 acides aminés selon le codon d'initiation de la traduction utilisé.

##### **8.4.1. Structure de la protéine**

La protéine Spi-1/PU.1 est formée de trois domaines fonctionnels : un domaine C-terminal de liaison à l'ADN (164 à 272), une région centrale PEST (118 à 164) et une partie N-terminale (1 à 118) contenant le domaine de transactivation TAD (7 à 100) (**Figure 34**).

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) contient un motif ETS partagé par les facteurs de transcription de la famille ETS. Le DBD contient le signal de localisation nucléaire de la protéine (Boulukos et al., 1989). La séquence en acides aminés est conservée à 98% entre l'homme et la souris ce qui permet de lui suggérer une importance structurale et fonctionnelle (Listman et al., 2005). Spi-1/PU.1 lie l'ADN sous forme monomérique (Wasylyk et al., 1992) sur le site ETS 5'-GGAA-3' grâce à son domaine de liaison à l'ADN. Le domaine ETS (85

acides aminés) se replie en formant un motif hélice-boucle-hélice. Les arginines 232, 235 et les lysines 219 et 245 sont les quatre acides aminés basiques qui sont en contact avec l'ADN et sont conservés dans les domaines Ets des protéines de la famille ETS (Kodandapani et al., 1996). Le domaine ETS permet aussi des interactions physiques directes de PU.1 avec d'autres partenaires comme C/EBP $\beta$  (Yang et al., 2000), AML1 (Kim et al., 1999), GATA-1 (Liew et al., 2006) et c-Jun (Behre et al., 1999).

La région centrale (118-164) est dite PEST parce que riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine. Ce domaine est impliqué essentiellement dans des interactions protéine-protéine notamment avec Pip/IRF4 (PU.1 interacting partner) (Brass et al., 1996). PU.1 interagit aussi via le domaine PEST avec les IRFs (Interferon Regulatory factors) comme la protéine IRF-8 (Nakano et al., 2005). La phosphorylation du résidu serine 148 du domaine PEST est nécessaire pour ces interactions protéine-protéine. La déphosphorylation de PU.1 empêche son interaction avec la protéine IRF-4 (Pongubala et al., 1993).

Les domaines PEST sont considérés habituellement comme un signal de protéolyse intracellulaire (Rechsteiner, 1990). Cependant, la délétion de ce domaine n'influe pas sur la stabilité de la protéine par rapport à la protéine sauvage non délétée (Fisher et al., 1998).

Le domaine de transactivation contient des régions riches en acides aminés acides (7 à 70) et en glutamines (75 à 100). Ces régions se comportent comme des domaines transactivateurs autonomes qui pourraient avoir des fonctions différentes selon le contexte cellulaire.

#### **8.4.2. Expression de Spi-1/PU.1**

L'expression de Spi-1/PU.1 est restreinte au système hématopoïétique et est hautement régulée au cours du développement hématopoïétique. *Spi-1/PU.1* est exprimé dans les cellules myéloïdes matures ainsi que dans les lymphocytes B (Fisher et al., 1998; Klemsz et al., 1990). La dérégulation du gène cause une hématopoïèse défectueuse avec un développement aberrant des cellules myéloïdes et des lymphocytes B (Kodandapani et al., 1996).

Spi-1/PU.1 est totalement absent dans les cellules érythroïdes matures et dans les cellules lymphoïdes T. L'expression de Spi-1/PU.1 dans les cellules érythroïdes immatures n'est pas bien caractérisée. Une étude a montré une faible expression de Spi-1/PU.1 dans des cellules ayant une morphologie comparable aux érythroblastes (Klemsz et al., 1990). Akashi et ses collaborateurs ont mis en évidence une expression des transcrits Spi-1/PU.1 dans les



progéniteurs MEP (Akashi et al., 2000). L'expression de Spi-1/PU.1 a été aussi étudiée dans certaines lignées myéloïdes et lymphoïdes (Hromas et al., 1993); (Klemsz and Maki, 1996). Ce profil d'expression présente Spi-1/PU.1 comme un régulateur de la lymphomyélopoïèse.

#### **8.4.3. Régulation de l'expression de Spi-1/PU.1**

Des expériences de transfection *in vitro* ont montré que le promoteur de Spi-1/PU.1 est régulé par de nombreux facteurs dans les cellules myéloïdes et dans les cellules lymphoïdes T.

Dans les cellules myéloïdes, ce promoteur contient des sites de fixation pour Sp-1, pour des facteurs octamères (Oct) et pour Spi-1/PU.1 (Chen et al., 1995). Ainsi dans les cellules lymphoïdes B, le promoteur est activé par Oct-2 et par Bob-1 (B-cell-specific coactivator) (Chen et al., 1996; Kistler et al., 1995).

Les éléments distaux du gène sont nécessaires pour la régulation de l'expression de Spi-1/PU.1. La région située à 14 kb en amont du site d'initiation de la transcription est nécessaire à l'expression de *pu.1 in vivo*. L'absence de cette région conduit à une réduction de 80% de l'expression de *pu.1* dans les cellules myéloïdes (Li et al., 2001).

#### **8.4.4. Cibles et partenaires de Spi-1/PU.1**

Spi-1/PU.1 régule l'expression de nombreux gènes actifs dans les cellules myéloïdes et dans les lymphocytes B. Il coopère avec d'autres facteurs pour contrôler l'expression de ces gènes. Les éléments de réponse à Spi-1/PU.1 caractérisés dans les gènes myéloïdes se trouvent principalement dans les régions promotrices proches des sites d'initiation de la transcription des gènes alors qu'ils sont plutôt situés dans les régions introniques activatrices de la transcription des gènes lymphoïdes B.

Dans les cellules lymphoïdes B, il participe à la régulation de la transcription des gènes codant pour les chaînes G, lourde mu et légère kappa des immunoglobulines (IgG) .

Dans les cellules myéloïdes, Spi-1/PU.1 régule l'expression des récepteurs au G-CSF et M-CSF, des intégrines comme CD11b, des protéines de la matrice extracellulaire, d'autres facteurs de transcription comme SCL et d'autres gènes qui sont exprimés dans la lignée myéloïde (Okuno et al., 2005).

De plus, dans les cellules myéloïdes et dans les lymphocytes B, Spi-1/PU.1 est capable de se lier à son propre promoteur et d'induire son expression, créant ainsi une boucle d'autorégulation positive (Chen et al., 1995; Chen et al., 1996).

Spi-1/PU.1 régule aussi l'expression de certains gènes en interagissant avec d'autres facteurs comme C/EBP $\beta$  (Yang et al., 2000), Pip/IRF4 (Brass et al., 1996), AML1 (Kim et al., 1999), GATA-1 (Liew et al., 2006) et c-Jun (Behre et al., 1999).

#### **8.4.5. Rôle de Spi-1/PU.1 dans l'hématopoïèse normale**

Le niveau d'expression de Spi-1/PU.1 détermine différents destins dans les progéniteurs hématopoïétiques. Des progéniteurs PU.1<sup>-/-</sup> qui réexpriment des concentrations faibles de spi-1/PU.1 génèrent des cellules lymphoïdes B. Par contre, quand ils expriment des concentrations élevées de Spi-1/PU.1, ils s'engagent vers la voie myéloïde pour générer des macrophages (DeKoter and Singh, 2000). De plus, les cellules engagées vers la voie myéloïde se

différencient en macrophages en présence de quantités importantes de Spi-1/PU.1. Par contre, un niveau plus faible de Spi-1/PU.1 oriente les cellules vers la différenciation granulocytaire.

Le rôle de PU.1 dans l'hématopoïèse a été étudié grâce à deux modèles de souris (PU.1<sup>-/-</sup>) qui présentent une désactivation du gène *Spi-1/PU.1* (Kodandapani et al., 1996; Scott et al., 1994). Ces deux études ont montré que les souris PU.1<sup>-/-</sup> présentent des atteintes dans le développement des lignées lymphoïdes et myéloïdes avec l'absence de conséquences majeures de la mutation PU.1<sup>-/-</sup> dans l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse.

Les souris générées par McKercher meurent en 48h après la naissance si elles ne subissent pas de traitement antibiotique. À la naissance, les souris sont dépourvues de lymphocytes B et T de macrophages et de neutrophiles mais sans anomalies dans les lignées érythrocytaires et mégacaryocytaire. La différenciation des lymphocytes B est sévèrement altérée dès les stades précoces. Les cellules B220<sup>+</sup> présentes dans la rate et dans la moelle osseuse expriment de façon non coordonnée ou n'expriment pas les marqueurs caractéristiques des étapes de maturation des cellules B.

Les macrophages sont absents de l'hématopoïèse primitive et définitive. Les cellules de foie fœtal PU.1<sup>-/-</sup> ne prolifèrent pas et ne se différencient pas en macrophages en présence des

facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF et M-CSF) à cause de l'expression très faible de leurs récepteurs à la surface des cellules. Après la naissance, la différenciation granulocytaire reste anormale (pas de maturation terminale) et ces cellules ne présentent pas d'activité phagocytaire (Kodandapani et al., 1996).

Les souris générées par Scott meurent in utero (entre E16 et E17). Elles présentent un défaut de développement dans les lignées lymphoïdes et myélomonocytaires. Les précurseurs myéloïdes et lymphoïdes sont absents au stade E7 tandis que les précurseurs érythroïdes CFU-E et mégacaryocytaires CFU-Meg sont présents sans anomalies. Quand l'hématopoïèse définitive prend place (E12), aucun lymphocyte, macrophage et neutrophile n'est présent (Scott et al., 1994).

#### **8.4.6. Implication de Spi-1/PU.1 dans les érythroleucémies de Friend**

La surexpression de Spi-1/PU.1 est un événement clé dans le développement des érythroleucémies. Les clones proérythroleucémiques issus des souris infectées par le virus de Friend présentent dans 95% des cas une insertion du provirus SFFV en amont du locus *spi-1/pu.1* (Moreau-Gachelin et al., 1989; Paul et al., 1989). Cette insertion résulte en l'activation du locus *spi-1/pu.1* par des enhanceurs présents sur la séquence du SFFV-LTR, et par la suite, la surexpression du gène *spi-1/pu.1* qui sera traduit en protéine normale Spi-1/PU.1 (Moreau-Gachelin et al., 1989; Okuno et al., 2005; Paul et al., 1991).

L'induction de la différenciation des cellules érythroleucémiques par le DMSO est accompagnée d'une décroissance du niveau d'expression de Spi-1/PU.1 (Schuetze et al., 1992). La surexpression de Spi-1/PU.1 inhibe la différenciation des cellules MEL en présence de l'inducteur.

De plus, le rôle de Spi-1/PU.1 dans les érythroleucémies a été validé grâce à un modèle de souris transgéniques exprimant PU.1 sous le contrôle de la région LTR du SFFV (Chen et al., 1996). Trois à quatre mois après leur naissance, ces souris qui reproduisent les mêmes aspects des érythroleucémies de Friend, valident ainsi le rôle clé de Spi-1/PU.1 dans ce processus pathologique.

L'inhibition de l'expression de Spi-1/PU.1 grâce à un oligonucléotide anti-sens empêche la prolifération des cellules MEL (Delgado et al., 1994). L'extinction de Spi-1/PU.1 par RNAi est suffisant pour induire la différenciation érythroïde en absence d'inducteur (Rimmele et al.,

2007); (Blaybel et al., 2008). Cette différenciation est accompagnée d'un arrêt de prolifération, d'apoptose et d'un arrêt du cycle cellulaire.

En plus de la surexpression de Spi-1/PU.1, des altérations du gène supresseur de tumeur *p53* ont été détectées. Les mutations provoquent la perte de fonction de *p53* (Ben David et al., 1988; Mowat et al., 1985; Munroe et al., 1990). L'érythroleucémie induite par le virus de Friend se développe plus rapidement chez les souris transgéniques portant une forme mutée de *P53*, ainsi que chez des souris déficientes pour le gène *p53*.

#### **8.4.7. Inhibition de la différenciation par Spi-1/PU.1**

La surexpression de Spi-1/PU.1 est capable de bloquer la différenciation érythrocytaire. Cependant, cet effet nécessite l'activation des voies de transduction du signal. Dans les cellules érythroleucémiques de Friend, l'activation constitutive de l'EPO-R résulte en une activation constitutive de certaines voies de signalisation principales comme la voie de la PI3K et la voie des MEK kinases.

La surexpression de Spi-1/PU.1 dans des érythroblastes aviaires inhibe la différenciation des cellules et l'apoptose et active leur prolifération. Cependant, cet effet nécessite la co-expression d'un EPO-R constitutivement actif (Quang et al., 1997). Pereira et ses collaborateurs ont montré aussi que Spi-1/PU.1 coopère avec la protéine Gp-55 du virus SFFV pour induire le blocage de la différenciation (Pereira et al., 2000).

#### **8.4.8. Antagonisme fonctionnel entre Spi-1/PU.1 et GATA-1**

GATA-1 est un facteur de transcription qui joue un rôle clé dans le développement érythroïde normal (Morceau et al., 2004). L'activation de GATA-1 et la répression de la fonction de Spi-1/PU.1 sont des événements cruciaux pour l'engagement des cellules souches vers la voie érythroïde.

Spi-1/PU.1 interagit physiquement avec GATA-1 *in vitro* et *in vivo* (Rekhtman et al., 2003) (Nerlov et al., 2000; Zhang et al., 2000) et inhibe son activité transcriptionnelle. Spi-1/PU.1 réprime l'expression d'un gène rapporteur placé sous contrôle d'un promoteur activé par

GATA-1 (Matsumura et al., 2000; Nerlov et al., 2000; Zhang et al., 2000). Le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation sont nécessaires pour la répression et pour le blocage de la différenciation terminale dans les cellules MEL.

Chez des embryons de Xénope, la surexpression de Spi-1/PU.1 inhibe la différenciation érythroïde. L'introduction de GATA-1 exogène est capable de restaurer l'érythropoïèse chez les embryons de Xénope ainsi que la production dhémoglobine dans les cellules MEL (Rekhtman et al., 2003).

Il a été proposé que Spi-1/PU.1 inhibe la liaison de GATA-1 à l'ADN. Yamada et al ont observé que le blocage de la différenciation de cellules SFFV par Spi-1/PU.1 s'accompagne d'une réduction de la fixation de GATA-1 à l'ADN *in vitro* (Yamada et al., 1998). Zhang et al ont montré que l'inhibition de la différenciation de la lignée K562 par surexpression inductible de Spi-1/PU.1 est accompagnée par une diminution drastique de l'activité de liaison à l'ADN de GATA-1 (Zhang et al., 2000).

Le domaine TAD de Spi-1/PU.1 est nécessaire et suffisant pour inhiber la liaison à l'ADN de GATA-1. Il interagit avec le motif en doigt de zinc C-terminal de GATA-1 (Zhang et al., 2000). Cependant, ces résultats restent controversés, en effet, d'autres ont montré que la réduction du taux de protéine Spi-1/PU.1 active la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend sans influencer l'activité de liaison à l'ADN de GATA-1 (Stopka et al., 2005).

Un autre modèle d'antagonisme a été proposé : Rekhtman et ses collaborateurs ont montré que Spi-1/PU.1 coopère avec la protéine du rétinoblastome (pRB) (Rekhtman et al., 2003) pour inhiber GATA-1 et inhiber la différenciation érythroïde. Ils suggèrent que Spi-1/PU.1 se lie à GATA-1 (déjà fixé sur l'ADN). Ainsi, il apporte *via* son interaction avec la protéine RB un répresseur de la transcription au niveau du complexe transcriptionnel.

Spi-1/PU.1 peut aussi inhiber l'acétylation par CBP de nombreux facteurs de transcription érythrocytaires et des protéines histones (Hong et al., 2002). L'acétylation de GATA-1 par CBP est essentielle pour son activité durant la différenciation érythroïde. Par son interaction avec CBP, Spi-1/PU.1 inhibe l'acétylation de GATA-1 réduisant ainsi son activité transcriptionnelle.

Enfin, GATA-1 est aussi capable d'inhiber l'activité de Spi-1/PU.1. L'interaction de GATA-1 avec le domaine ETS de Spi-1/PU.1 inhibe la fixation de ce dernier sur l'ADN (Nerlov et al., 2000). D'autres études suggèrent que l'interaction entre Spi-1/PU.1 et GATA-1 empêche la fixation du coactivateur c-JUN sur Spi-1/PU.1 empêchant l'activité transactivatrice de ce dernier (Behre et al., 1999; Liew et al., 2006).

#### **8.4.9. Implication de Spi-1/PU.1 dans l'épissage**

Un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif a été attribué à Spi-1/PU.1. L'implication de Spi-1/PU.1 dans l'épissage a été montrée pour la première fois par Hallier et al. Ils ont montré que Spi-1/PU.1 interagit avec la protéine P54<sup>nrb</sup>, similaire au facteur d'épissage PSF, capable de se lier à l'ARN. L'interaction entre P54<sup>nrb</sup> et Spi-1/PU.1 nécessite le domaine de liaison à l'ARN du premier et le domaine de liaison à l'ADN du second (Hallier et al., 1996). Spi-1/PU.1 interfère *in vitro* avec l'épissage d'un minigène contenant les exons 1 et 2 de la globine $\beta$  humaine (Hallier et al., 1996).

Dans une autre étude, Hallier et al ont montré que Spi-1/PU.1 interagit avec le facteur de transcription présomptif TLS. TLS active l'utilisation du site 5' d'épissage distal durant l'épissage alternatif du gène E1A (Hallier et al., 1998). Spi-1/PU.1 s'oppose à l'effet de TLS et favorise l'utilisation d'un site proximal 5' d'épissage aux dépens d'un site distal.

L'importance de chaque domaine de Spi-1/PU.1 dans son activité d'épissage a été étudiée. Il a été montré que le domaine de liaison à l'ADN coopère avec le domaine PEST ou le domaine de transactivation pour modifier l'activité d'épissage de TLS. Ainsi, dans la même étude il a été montré l'importance des 27 a.a C-terminal de Spi-1/PU.1. Ces 27 a.a sont nécessaires pour l'activité d'épissage de Spi-1/PU.1 ainsi que pour son activité de liaison à l'ADN (Delva et al., 2004).

Notre équipe a montré l'implication de l'oncogène Spi-1/PU.1 dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R. Au cours de l'induction de la différenciation des cellules érythroleucémiques, la diminution de l'expression de Spi-1/PU.1 corrèle avec une activation de l'épissage de l'exon 16 endogène et de l'exon 16 exogène issu d'un minigène transfecté. La seule inhibition de Spi-1/PU.1 est suffisante pour activer cet événement d'épissage (Theoleyre et al., 2004). L'extinction par shRNA de *spi-1/pu.1* active l'inclusion de l'exon 16 (Blaybel et al., 2008). D'autres travaux de l'équipe ont essayé de comprendre le mécanisme de régulation de l'épissage par Spi-1/PU.1. Ils ont montré que

TRIM10/HERF1 active l'inclusion de l'exon 16 et que Spi-1/PU.1 inhibe l'expression de TRIM10/HERF1 dans les cellules érythroleucémiques (Blaybel et al., 2008).

#### **8.4.10. La phosphorylation de Spi-1/PU.1**

L'oncogène Spi-1/PU.1 contient dans sa séquence plusieurs résidus sérines phosphorylables (41, 45, 142 et 148) (Pongubala et al., 1993). La phosphorylation influe à la fois sur l'activité de liaison à l'ADN et sur l'activité transcriptionnelle de certains facteurs de transcription. Spi-1/PU.1 peut aussi être phosphorylé par la PKC sur des résidus thréonines (Ikizawa et al., 2001).

Pongubala et ses collaborateurs ont été les premiers à décrire la phosphorylation de Spi-1/PU.1 par la caséine kinase II. Spi-1/PU.1 phosphorylé recrute par interaction protéique NF-EM5 au niveau de séquences adjacentes à ses sites de fixation à l'ADN. Ce recrutement nécessite la phosphorylation de Spi-1/PU.1 au niveau de la sérine 148. Spi-1/PU.1 muté au niveau de la sérine 148 se lie à l'ADN mais il est incapable d'interagir avec NF-EM5 (Pongubala et al., 1993).

L'étude par Western blot de l'expression de Spi-1/PU.1 en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre les 111 a.a N-terminal a révélé d'autres bandes qui correspondent probablement à des formes phosphorylées de Spi-1/PU.1 (Delgado et al., 1994).

La phosphorylation de Spi-1/PU.1 par la caséine kinase II sur la sérine 148 augmente sa capacité à activer la transcription par liaison à l'ADN dans les macrophages stimulés par des lipopolysaccharides (Shackelford et al., 1995); (Lodie et al., 1997). Par contre, cette phosphorylation augmente la sensibilité de Spi-1/PU.1 aux protéases.

La phosphorylation de Spi-1/PU.1 est activée dans les cellules leucémiques U937 induites à la maturation par le TPA. Le TPA augmente l'activité de liaison de Spi-1/PU.1 en agissant sur l'état de phosphorylation sans agir sur la biosynthèse. L'activité de liaison est inhibée par l'inhibition de la PKC (Carey et al., 1996).

Pongubala et al ont ensuite montré que Spi-1/PU.1 est une cible de phosphorylation par la voie PI3K/Akt. La région riche en acides aminés acides dans le domaine de transactivation

33-74 et plus précisément la sérine 41 est nécessaire à la phosphorylation de Spi-1/PU.1 par Akt. Cette phosphorylation aboutit à l'activation de transcription de gènes cibles de spi-1/PU.1 (Rieske and Pongubala, 2001).

Spi-1/PU.1 se lie sur une séquence consensus du promoteur du gène *p47<sup>phox</sup>*, et il active sa transcription. La phosphorylation de Spi-1/PU.1 augmente son affinité de liaison sur ce promoteur (Marden et al., 2003).

La sérine 142 de Spi-1/PU.1 est phosphorylée par la voie P38/MAPK et intervient dans l'activation du gène anti-apoptotique *mcl-1*, dépendant de l4L-3 dans les cellules pro-B Ba/F3 (Wang et al., 2003).

L'hyperphosphorylation de Spi-1/PU.1 est associée au développement de certains types de leucémies myéloïdes aiguës (LAM). Le traitement des cellules myéloïdes par l'hydroquinone (métabolite de benzène) aboutit à une hyperphosphorylation de Spi-1/PU.1 qui corrèle avec l'activation de la différenciation myéloïde spécifique et la formation de colonies (Gross et al., 2006).

Spi-1/PU.1 phosphorylé se lie aussi sur le promoteur de gène *cox-2* et active son expression dans les macrophages. Azim et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que la NF-κN-inducing kinase (NIK) régule l'expression du gène *cox-2* via la phosphorylation de Spi-1/PU.1. Ils ont montré *in vitro* que NIK interagit avec la protéine GST-Spi-1/PU.1 et la phosphoryle. L'extinction de NIK a montré une diminution de liaison de Spi-1/PU.1 sur le promoteur du gène *cox-2* (Azim et al., 2007).

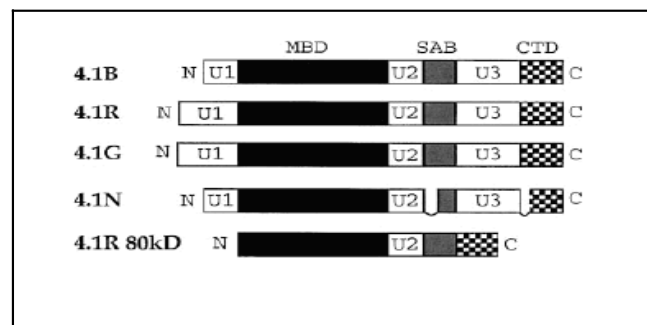


## **III-La protéine 4.1R**

## 1. *La protéine 4.1R : Membre de la famille des protéines 4.1*

La famille des protéines 4.1 est formée actuellement de quatre membres : 4.1R (érythrocytaire), 4.1G (générale) dont l'expression est ubiquitaire, 4.1N (neuronale) et 4.1B détectée uniquement dans le cerveau. Ces protéines sont codées par des gènes différents qui par épissage alternatif engendrent différentes isoformes protéiques.

Les membres de cette famille de protéines sont caractérisés par leur domaine FERM (Four.one protein, Ezrin, Radixin, Moesin) nommé aussi MBD (Membrane Binding domain), SAB (Spectrin Actin Binding Domain) et CTD (Carboxy- Terminal Domain) (Diakowski et al., 2006). Outre ces quatre domaines hautement conservés, les protéines de la famille 4.1 ont trois domaines uniques U1, U2 et U3 avec des séquences divergentes. Le domaine U1 (domaine HP) de la protéine 4.1R 135 kDa interagit avec la protéine CPAP (Hung et al., 2000), tandis que pour les autres domaines, aucune activité n'a été décrite (**Figure 35**).



**Figure 35** : Organisation des domaines des protéines de la famille 4.1. Le domaine MBD (Membrane Binding Domain), le domaine SAB (Spectrin Actin Binding Domain) et le domaine CTD (Carboxy-Terminal Domain) sont conservés entre les protéines 4.1 avec un pourcentage d'homologie de 72-74 %, 50-70 % et de 70-80 % respectivement. Les domaines uniques U1, U2, U3 ont des séquences divergentes entre les protéines 4.1 (Parra et al., 2000).

La protéine 4.1R est le membre de la famille le mieux caractérisé. La grande homologie structurale entre les autres protéines 4.1 avec 4.1R permet de supposer qu'elles interviennent dans des processus analogues à ceux de la protéine 4.1R (Hoover and Bryant, 2000).

La famille des protéines 4.1 fait partie d'une superfamille des protéines 4.1. Tous les membres de la superfamille contiennent un domaine FERM à l'extrémité N terminale de la protéine. Cette superfamille contient plus que 40 membres qui sont divisés en cinq sous-familles selon l'homologie des séquences (protéines 4.1, protéines ERM, talin related proteins, protéines PTPH (protein tyrosine phosphatase) et les protéines NBL4 (novel band

4.1-like 4) (Takeuchi et al., 1994). La plupart des membres de la superfamille 4.1 contient un domaine de liaison à l'actine.

### **1.1 La protéine 4.1G**

Le gène codant la protéine 4.1G (*Epb41l2*) est localisé sur le chromosome 6 chez l'homme et 10 chez la souris (Parra et al., 1998).

L'expression de la protéine 4.1G est ubiquitaire. L'ARNm 4.1G est largement exprimé dans le cerveau, la moelle épinière et les testicules. 4.1G est produite dans les neurones de l'hippocampe, du cerveau, mais aussi dans le cœur, les gonades, le placenta et les muscles squelettiques, les reins et le pancréas (Diakowski et al., 2006).

La protéine 4.1G (113 kDa) est formée de trois domaines présentant une grande homologie structurale avec la protéine 4.1R. La localisation cellulaire de 4.1G a été étudiée dans les cellules COS, elle se localise dans le cytosol, la zone périnucléaire, les centrosomes (Parra et al., 2000) et sur les fuseaux mitotiques au niveau des deux pôles de la cellule (Delhommeau et al., 2002), ce qui permet de supposer que 4.1G et 4.1R doivent exercer des fonctions similaires (vu l'homologie) mais dans des sites intracellulaires différents.

### **1.2. La protéine 4.1N**

Le gène EPB41L1 codant la protéine 4.1N est localisé sur le chromosome 20 chez l'homme et 2 chez la souris (Parra et al., 1998). Les deux domaines SAB et CTD présentent une faible homologie avec la protéine 4.1R (36 et 46% respectivement), tandis que le domaine FERM présente 70% d'homologie avec celui de la protéine 4.1R. Le domaine SAB de 4.1N ne se lie pas à l'actine (Gimm et al., 2002). L'ARNm 4.1N est exprimé dans le cerveau, la moelle épinière et les glandes surrénales. 4.1N est exprimée dans les neurones du système nerveux central et périphérique mais aussi dans les neurones embryonnaires dès les premiers stades de la différenciation post-mitotique.

4.1N stabilise la plasticité de la membrane neuronale via ses interactions avec le cytosquelette de spectrine et d'actine, les canaux membranaires et les guanylates cyclases associées à la membrane (Ramez et al., 2003).

### **1.3 La protéine 4.1B**

Le gène EPB41L3 codant la protéine 4.1B est localisé sur le chromosome 18 chez l'homme et 17 chez la souris (Parra et al., 2000). L'ARN 4.1B est exprimé dans le cerveau, la moelle épinière et les reins. La protéine (de poids moléculaire de 145 kDa) est surtout exprimée dans le cerveau de souris, les cellules de Purkinjje, le cervelet, les cellules pyramidales, le bulbe olfactif et l'hippocampe. Elle est aussi produite dans le cœur, les poumons, les reins, l'intestin et les testicules. Au niveau cellulaire elle est localisée au niveau des jonctions cellulaires de la membrane plasmique (Parra et al., 2000).

### **1.4 La protéine 4.1O**

La protéine 4.1O (protéine exprimée dans les ovaires) a été identifiée comme membre de la famille des protéines 4.1 (Ni et al., 2003). Le gène codant la protéine 4.1O est constitué de 14 exons et 13 introns. Des études récentes indiquent que la protéine 4.1O ne fait pas partie de la famille 4.1 mais elle est un membre d'une famille de protéines FERM et de protéines transmembranaires mal caractérisées (Baines, 2006).

### **1.5. La protéine 4.1R**

Le gène codant la protéine 4.1R (*epb41*) est localisé sur le chromosome 1 chez l'homme et 4 chez la souris (Parra et al., 1998). L'ARNm est détecté dans la moelle osseuse, le cervelet, les poumons, les testicules et le thymus (Diakowski et al., 2006).

En général, les protéines de la famille 4.1 sont des protéines multifonctionnelles, elles jouent un rôle dans la stabilité mécanique des membranes plasmiques via leurs interactions avec des protéines membranaires (comme la spectrine et l'actine). Les protéines 4.1 sont nécessaires pour l'assemblage à la membrane cellulaire de certaines protéines comme les récepteurs et d'autres protéines transmembranaires (Stagg et al., 2008).

Dans les lymphocytes T, la protéine 4.1G se lie à la protéine transmembranaire PTR-1 (CD226), suggérant un rôle dans la transduction du signal (Ralston et al., 2004). La localisation membranaire de la protéine 4.1G dans les cellules de Sertoli suggère un rôle fonctionnel de la protéine dans le maintien des jonctions intracellulaires (Terada et al., 2005).

Le co-transporteur cation-chlorure (KCC2) est un élément clé de la maturation des prolongements dendritiques (dendritic spines). La liaison de 4.1N au KCC2 joue un rôle important dans ce processus (Li et al., 2007).

La protéine 4.1N se lie via son domaine CTD au récepteur de l'inositol,1,4,5-triphosphate (IP3R) et inhibe sa migration dans les cellules de reins de chien MDCK (Madin-Darby canine kidney) (Zhang et al., 2003)

La protéine 4.1B se lie à l'extrémité C terminale intracellulaire des récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR8a et mGluR8b facilitant leur expression à la surface cellulaire et empêchant la réduction des concentrations d'AMPC intracellulaire (Rose et al., 2008).

## **2. La protéine 4.1R**

### **2.1 Gène 4.1R**

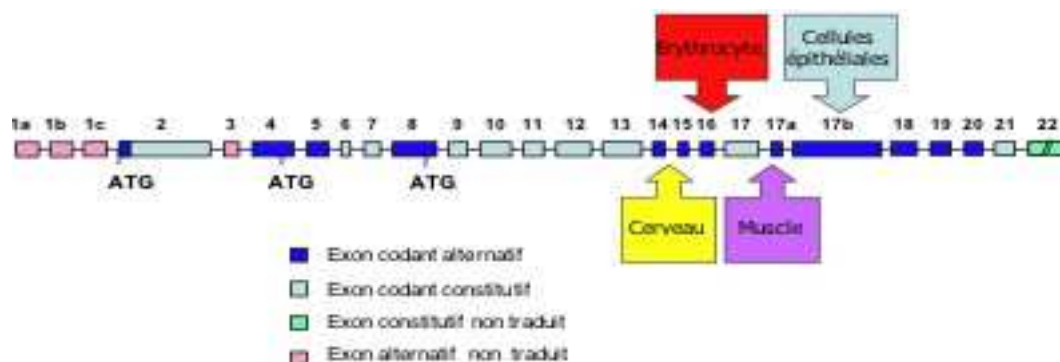
La protéine 4.1R est codée par un gène unique (*epb41*) de taille approximative de 240kb localisé dans le chromosome 1p36 chez l'homme (Baklouti et al., 1997; Huang et al., 2001).

Le gène 4.1 chez la souris s'étend sur 90 kb, il comprend 23 exons dont 13 sont constitutifs et 10 sont alternatifs exprimés d'une façon tissu spécifique .

La protéine 4.1R chez la souris présente 91% d'homologie dans sa séquence d'acides aminés avec la protéine 4.1R humaine. En plus, le gène 4.1R humain présente le même nombre d'exons que la souris. La taille des exons dans la région codante est similaire. De point de vue séquence, la région codante présente beaucoup d'homologie. En revanche, la région non codante est divergente entre les deux espèces (Baklouti et al., 1997).

### **2.2 L'épissage alternatif des ARNs pré-messager 4.1R et les différentes isoformes protéiques**

Le gène 4.1R contient trois sites potentiels d'initiation de la traduction, situés dans des exons alternatifs (Gascard et al., 1998; Huang et al., 1993; Tang et al., 1990). Ces sites en plus des combinaisons d'épissage constitutif et alternatif génèrent différentes isoformes protéiques dont deux majoritaires : l'isoforme de 80 kDa trouvée principalement dans les globules rouges matures,

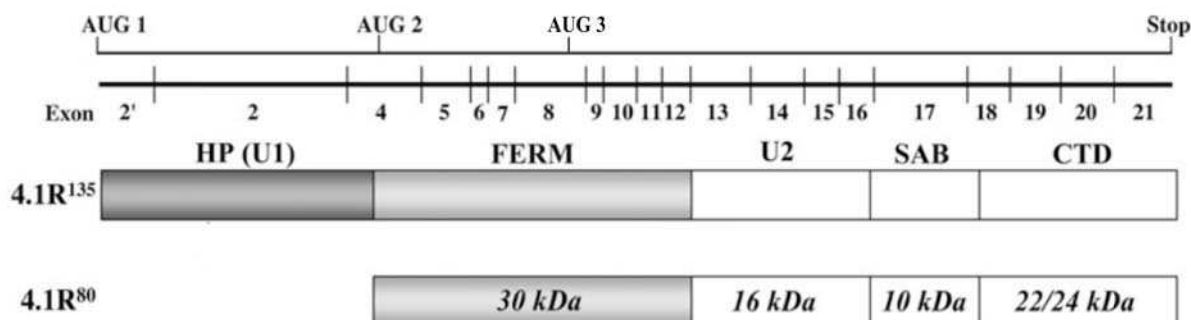


**Figure 36** : Schéma représentatif du gène 4.1 et les isoformes tissus spécifiques.

et l'isoforme de 135 kDa exprimée généralement dans les cellules non érythroïdes et dans les progéniteurs érythroïdes (Conboy et al., 1991) (**Figure 36**).

La production de l'isoforme de 135 kDa est issue de l'inclusion de l'exon 2' sur l'ARNm contenant le site d'initiation de la traduction amont (AUG1). L'isoforme de 80kDa est produite quand les 17 nucléotides de l'exon 2' sont exclus permettant l'utilisation de l'AUG2 localisé dans l'exon 4 (Baklouti et al., 1996; Conboy et al., 1991; Lospitao et al., 2008; Tang et al., 1990).

L'isoforme 4.1R 135 kDa contient à l'extrémité N-terminale 209 acides aminés en plus, appelés HP (head piece) mais ne contient pas les 21 a.a cruciaux pour l'interaction de la protéine 4.1R avec la spectrine (Chasis et al., 1993) (**Figure 37**).



**Figure 37** : Structure des isoformes 4.1R<sup>135</sup> et 4.1R<sup>80</sup>. L'ADNc code pour l'isoforme 4.1R<sup>135</sup> ou 4.1R<sup>80</sup> Selon l'utilisation de l'ATG1 ou l'ATG2 respectivement (Nunomura et al., 2009).

Le domaine HP de 209 acides aminés de l'isoforme 4.1R 135 kDa change les propriétés de liaison avec les autres protéines. La liaison de 4.1R 135 à la bande 3 est plus forte que celle de 4.1R 80, Cependant son affinité de liaison à la GPC est plus faible. De plus, la liaison de 4.1R80 à la calmoduline est Ca<sup>2+</sup> indépendante, tandis que la liaison de 4.1R135 est Ca<sup>2+</sup> dépendante (Nunomura et al., 2009).

L'ARNm codant l'isoforme de 80 kDa contient l'exon 16 mais pas les exons 14 et 15. Il est aussi détecté dans d'autres cellules non érythroïdes comme les cellules du muscle, du cerveau, de la rate et des testicules (Baklouti et al., 1997; Conboy et al., 1991; Huang et al., 1993).

L'ARNm 4.1R contenant l'exon 14 et 15 code pour une isoforme exprimée principalement dans le cerveau. L'exon 14 et 15 codent pour un peptide de 33 a.a (Baklouti et al., 1997; Horne et al., 1993).

L'exon 17a est détecté uniquement dans le muscle squelettique (Schischmanoff et al., 1997) (Baklouti et al., 1997). L'isoforme codée par l'ARNm contenant l'exon 17b est présente principalement dans les cellules épithéliales (Schischmanoff et al., 1997).

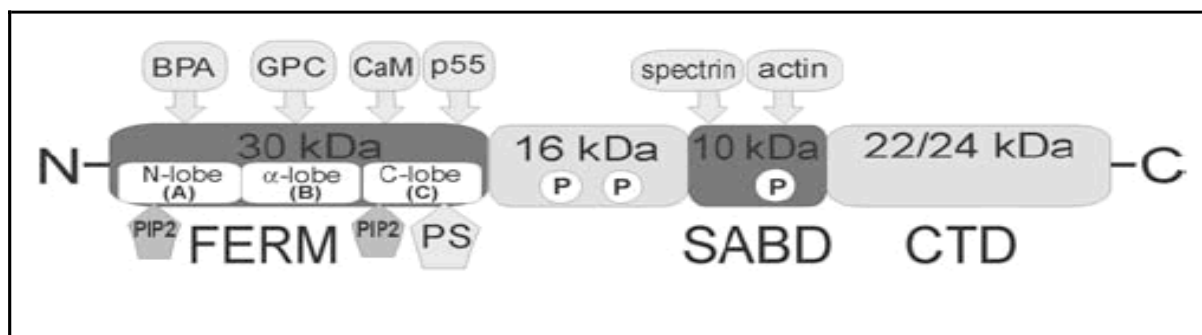
### ***3. L'isoforme érythrocytaire de la protéine 4.1R : 4.1R80***

#### **3.1 Structure de la protéine**

La digestion ménagée par la chymotrypsine permet de distinguer quatre domaines fonctionnels de la protéine 4.1R80 (**Figure 38**):

##### **3.1.1. Le domaine de 30kDa (FERM)**

Le domaine 30kDa contient de multiples sites de liaison pour les protéines transmembranaires, la Bande 3, la GPC (Takakuwa, 2000), et la CD44 (Nunomura et al., 1997). Il interagit également avec p55, et d'autres membres de la famille de protéines contenant un domaine PDZ (Chishti, 1998), avec CaM (Husain et al., 1985), avec la



**Figure 38** : Représentation schématique des domaines structuraux de la protéine 4.1R. BPA: Band 3; CaM: Calmoduline; GPC: Glycophorine C, p55: protéine p55; PIP2: phosphatidylinositol 4,5 biphosphate; PS; phosphatidylsérine. (Diakowski et al., 2006).

sous-unité alpha de la protéine importine réalisant la navette nucléaire (alpha importin) (Gascard et al., 1998), et avec le pICln (Tang and Tang, 1998). Ce domaine se lie également à la phosphatidylsérine (PS). L'analyse de la structure cristallographique montre que le domaine FERM est constitué de 3 sous domaines, les lobes : N,  $\alpha$ , et C. Chacun de ces lobes est responsable de la liaison avec une protéine membranaire (An et al., 2001).

Deux domaines de liaison à la protéine p55 ont été identifiés dans le domaine FERM, un domaine de 51 acides aminés codé par l'exon 10 (Nunomura et al., 2000) et un domaine de 35 acides aminés codés par l'exon 5 (Seo et al., 2009). L'exon 5 est conservé dans différentes protéines, ce qui présente une certaine importance pour cet exon. Seo et ses collaborateurs ont montré que l'exon 5 est nécessaire pour la localisation à la membrane cellulaire de la protéine 4.1R dans les cellules épithéliales. L'isoforme de 135 kDa sans l'exon 5 perd la capacité de localisation membranaire (Seo et al., 2009).

### 3.1.2. Le domaine 16kDa

La fonction de ce domaine n'est pas claire. Il contient deux sérines (S312 et S331) phosphorylables par les protéines kinase A et C. (Horne et al., 1990) . Une étude récente a montré que la phosphorylation de serine 312 du domaine de 16 kDa par la protéine kinase C diminue l'affinité de liaison de la protéine 4.1R80 à la GPC et au domaine SAB (Manno et al., 2005).



### **3.1.3. Le domaine CTD**

L'isoforme érythrocytaire de la protéine 4.1R migre sous forme de deux bandes sur gel SDS-PAGE avec des poids moléculaires apparents de 80kDa et de 78kDa, respectivement basé sur sa composition en acides aminés (Conboy et al., 1991).

Le domaine CTD est le domaine responsable de cette différence de taille. En effet, ce domaine peut être de 22 ou de 24 kDa. L'existence de deux tailles de 2kDa de différence résulte de la déamidation d'Asn502 en Asp502 au cours du vieillissement de l'érythrocyte (Inaba et al., 1992).

Le domaine CTD ne semble pas être indispensable pour la fonction de la protéine 4.1R dans les globules rouges (Moriniere et al., 2000). Il permet l'interaction de la 4.1R avec les constituants des jonctions serrées (les protéines ZO1, ZO2 et l'Occludine) (Mattagajasingh et al., 2000) et avec la protéine NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus), composante du fuseau mitotique (Delhommeau et al., 2002; Mattagajasingh et al., 1999). Le domaine CTD se lie également à la sous-unité eIF3-p44 du facteur de traduction eucaryote 3 (eIF3) (Hou et al., 2000).

### **3.1.4. Le domaine SAB**

Le SAB est un important domaine de la protéine 4.1R. Par l'intermédiaire de ses interactions avec la spectrine et l'actine, il permet la formation du complexe ternaire 4.1R/Spectrine/Actine essentiel à la stabilité de la membrane des globules rouges (Discher et al., 1993; Horne et al., 1993).

Ce domaine de 10kDa est constitué de 67 acides aminés (Lys406-Phe472), il est codé par les deux exons 16 et 17 de l'ARNm 4.1R. L'exon 16 code pour les 21 aa en N-terminal du domaine tandis que l'exon 17 code pour les 59 aa en C-terminal. La séquence de 21 aa Lys407-Glu427 est nécessaire pour la fonction de SAB. Le motif de liaison à l'actine a été réduit à un cluster constitué de 8 acides aminés, L446KKNFMES situé dans la partie codée par l'exon 17 (Gimm et al., 2002).

Les résidus Ser467 et Tyr418 sont phosphorylables par diverses kinases comme la PKA (Diakowski et al., 2006). Cette phosphorylation n'a pas d'effets sur l'affinité de liaison de SAB à la spectrine et à l'actine.

La structure primaire de SAB est conservée chez les vertébrés ce qui montre la conservation de son activité à l'exception de l'homologue 4.1N qui ne lie ni la spectrine ni l'actine (Discher et al., 1995).

## 3.2. Rôle de l'isoforme érythrocytaire de la protéine 4.1R : la protéine 4.1R80

### 3.2.1 Organisation structurale de la membrane érythrocytaire

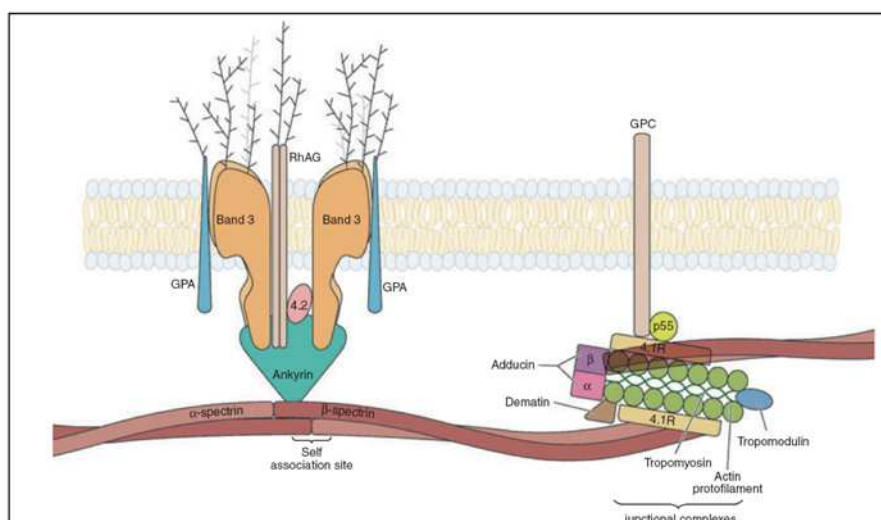
La protéine 4.1R80 est une composante clé de la membrane des globules rouges où elle joue un rôle majeur. Elle est au cœur du squelette membranaire où elle participe à sa formation et au maintien de sa stabilité par ses interactions avec d'autres partenaires protéiques.

La membrane érythrocytaire assure au globule rouge sa forme, sa stabilité et sa déformabilité, propriétés requises pour la survie et la résistance au stress circulatoire.

Cette membrane est constituée d'une bicouche lipidique, formée par des phospholipides et du cholestérol. La bicouche lipidique repose sur une charpente protéique, elle-même constituée par un maillage horizontal lié à la bicouche lipidique par des protéines verticales transmembranaires (**Figure 39**).

Les principales protéines du squelette membranaire sont : spectrine (deux chaînes alpha et beta), actine, protéine 4.1R, adducine, dematine, ankyrine, tropomyosine et tropomoduline. Les chaînes de spectrine s'unissent à leur extrémité distale par l'intermédiaire de l'actine. Ces interactions sont facilitées par la protéine 4.1R (An and Mohandas, 2008; Ohanian et al., 1984). Le complexe ternaire spectrine-actine-4.1R est un régulateur crucial de l'intégrité membranaire (An and Mohandas, 2008).

Les protéines transmembranaires sont la protéine bande 3, les polypeptides RhAG et la Glycophorine C. RhAG et bande 3 se fixent à la spectrine grâce à l'Ankyrine (Nicolas et al., 2003) tandis que la Glycophorine C se fixe aux protéines 4.1R et p55 (Marfatia et al., 1994); (Marfatia et al., 1995).



**Figure 39** : Représentation schématique de la membrane du globule rouge (An and Mohandas, 2008).

### 3.2.2 Rôle de la protéine 4.1R80 dans le maintien de la membrane érythrocytaire

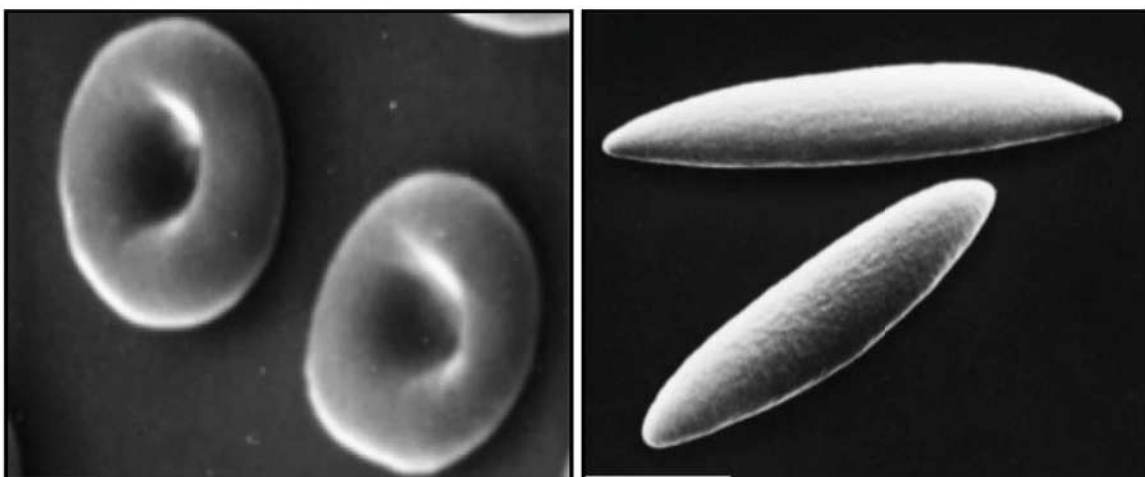
Les interactions verticales entre la bicouche lipidique et le squelette protéique jouent un rôle crucial dans le maintien de la capacité de cohésion de la membrane. Tandis que, les interactions latérales entre la spectrine et la protéine 4.1R sont les régulateurs principaux de la stabilité mécanique de la membrane. Le maintien de la capacité de cohésion et de la stabilité mécanique de la membrane est essentiel pour le globule rouge afin de maintenir ses propriétés mécaniques.

Des anomalies des protéines du squelette érythrocytaire peuvent conduire à des différentes anémies hémolytiques comme les elliptocytoses héréditaires (HE).

### 3.2.3. Les elliptocytoses héréditaires (HE) et la protéine 4.1R

Les elliptocytoses héréditaires sont des affections du cytosquelette du globule rouge caractérisées par la présence d'un nombre élevé d'hématies en forme d'ellipses, appelées elliptocytes examinées sur le frottis sanguin (Gallagher, 2004) (**Figure 40**). Elles se rencontrent dans toutes les populations notamment dans le nord de l'Europe (1/3000) (An and Mohandas, 2008).

5% des cas d'HE sont dus à des anomalies quantitatives et qualitatives de la protéine 4.1R (An and Mohandas, 2008). Les autres cas sont dus à des défauts touchant la spectrine.



**Figure 40** : Morphologie du globule rouge normale et pathologique. A gauche globule rouge mature en forme discoïde. A droite globule rouge en forme d'ellipse (elliptocyte) (An and Mohandas, 2008).

La déficience en 4.1R mène donc à l'elliptocytose héréditaire (HE). Une production de la protéine 4.1R dans les globules rouges vidés de leur hémoglobine (ghosts) aboutit à une restauration des propriétés de la membrane du globule rouge (Takakuwa et al., 1986; Tchernia et al., 1981). De même, l'addition du domaine 10kDa purifié à des membranes érythrocytaires instables et déficientes en 4.1R permet de restaurer la stabilité mécanique de ces membranes (Discher et al., 1993). Les patients ayant une protéine 4.1R mutée avec une délétion de la cassette de 21 acides aminés (situés entre les résidus Lys407 et Glu427) du domaine SAB présentent une anémie hémolytique avec elliptocytose (Conboy et al., 1991). Une analyse génomique d'un malade a indiqué une délétion entraînant un décalage du cadre de lecture, ayant pour résultat un codon stop prématuré (PTC) dans l'exon 16. La mutation empêche la synthèse d'un domaine de liaison spectrine/actine fonctionnel entraînant une déficience en protéine 4.1 associée à une HE. Il a été prouvé que le codon non-sens prématuré affecte exclusivement le métabolisme de l'ARNm dans les reticulocytes (Maillet et al., 1999). La déficience de la protéine 4.1R au niveau de la membrane du globule rouge provoque également un manque de glycophorine C et la formation d'elliptocytes. La protéine 4.1R est nécessaire pour maintenir la concentration de la glycophorine C au niveau de la membrane érythrocytaire.

Les souris transgéniques déficientes en protéines 4.1R sont viables. Elles ont une anémie hémolytique modérée. Les érythrocytes de ces souris présentent une morphologie anormale, une faible stabilité de la membrane érythrocytaire, une réduction de la concentration des protéines du squelette membranaire comme la spectrine et l'ankyrine. Ces données suggèrent que la perte de la protéine 4.1R empêche un assemblage normal des protéines du squelette membranaire dans les progéniteurs érythroïdes (Shi et al., 1999).

#### **4. *Rôle de la protéine 4.1R dans les cellules nucléées***

L'existence de multiples isoformes de la protéine 4.1R dans les cellules nucléées est l'indicateur d'une fonction autre que celle assurée dans les globules rouges. Certaines protéines interagissant avec 4.1R comme l'actine sont présentes dans le noyau, ce qui permet de supposer un rôle de la protéine 4.1R dans l'organisation de l'architecture nucléaire (Diakowski et al., 2006).

Un rôle dans la division cellulaire a été attribué à la protéine 4.1R. En effet, une co-localisation a été observée entre la protéine 4.1R et les microtubules dans les lymphocytes T (Perez-Ferreiro et al., 2001). De plus, une protéine 4.1R exogène produite dans les lymphocytes T co-localise avec le squelette de la tubuline. Cette interaction de 4.1R avec les microtubules en interphase joue un rôle important dans l'organisation de l'architecture du fuseau mitotique. Le domaine CTD est impliqué dans la régulation de la division cellulaire exercée par 4.1R. Il permet l'organisation des centrosomes et du fuseau mitotique. La protéine NuMA (Nuclear mitotic apparatus) se lie au site constitué de trois valines qui se trouvent dans le CTD (Mattagajasingh et al., 1999).

Le domaine HP de la protéine 4.1R 135 kDa interagit avec CPAP, une protéine du centrosome dont la localisation est identique à celle de la  $\gamma$ -tubuline. Cette interaction implique un rôle de 4.1R dans la division mitotique et dans la fonction du centrosome (Hung et al., 2000).

La protéine 4.1R joue aussi un rôle au niveau des centrosomes, elle participe au maintien de l'organisation des microtubules radiaux (Perez-Ferreiro et al., 2004).

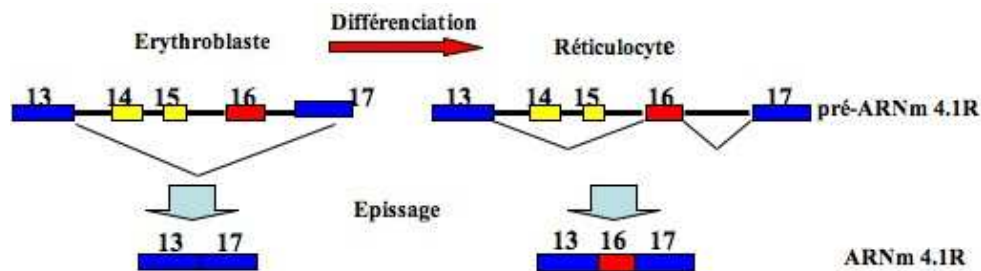
Une étude récente a montré une contribution cruciale de la protéine 4.1R dans l'intégrité structurale des centrosomes et des fuseaux mitotiques (Krauss et al., 2008).

La 4.1R joue également un rôle important dans l'organisation des jonctions serrées (*Zonula occludens*), car il a déjà été mentionné que le domaine CTD interagissait avec les protéines de ces jonctions : ZO1, ZO2, et Occludine (Mattagajasingh et al., 2000).

La protéine 4.1R est exprimée dans le cœur, où elle joue un rôle dans la modulation des propriétés fonctionnelles des transporteurs des ions avec des conséquences sur l'électrophysiologie cardiaque et un rôle possible durant le fonctionnement cardiaque normal et pathologique (Cunha and Mohler, 2008; Stagg et al., 2008).

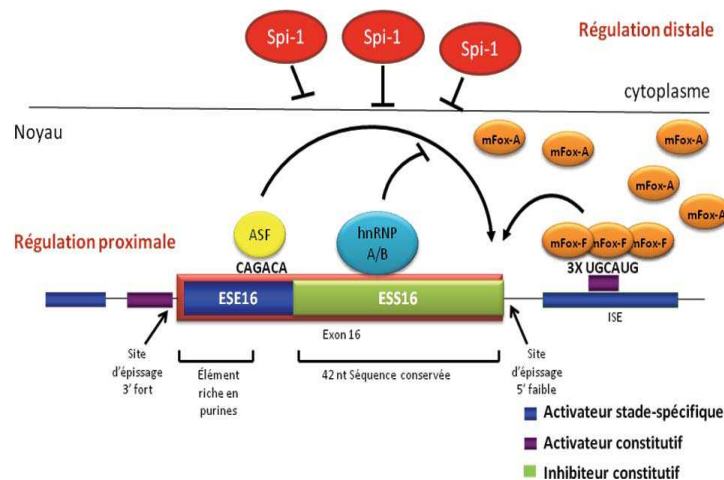
## 5. Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16 de la protéine 4.1R 80 kDa au cours de la différenciation érythroïde.

Le domaine SAB de la protéine 4.1R est codé par l'exon 16 et l'exon 17. Alors que l'exon 17 est constitutif, l'exon 16 est alternatif et son épissage est régulé selon le stade de différenciation érythroïde : il est exclu dans les progéniteurs immatures, et inclus progressivement en fin de différenciation (**Figure 41**). L'inclusion de l'exon 16 est donc un événement majeur pour la biogenèse du globule rouge normal.



**Figure 41** : L'épissage de l'exon 16 est hautement régulé en fonction du tissu et du stade de différenciation : il est exclu dans les ARN messagers 4.1R dans les érythroblastes et est inclus au stade des réticulocytes

Plusieurs séquences *cis* régulatrices ont été identifiées dans l'exon 16 (ESE, ESS) ou dans les introns flanquants (ISE, ISS). Des facteurs agissant en *trans* régulant l'épissage ont été décrits. Certains, parmi eux se lient aux séquences *cis* (régulation proximale), d'autres comme Spi-1/PU.1 agissent à distance par un mécanisme inconnu (régulation distale) (**Figure 42**).



**Figure 42** : Représentation schématique des éléments *cis* et des facteurs *trans* impliqués dans la régulation de l'épissage de l'exon 16 de 4.1R (Thèse Alexandre DOUABLIN, Lyon 2009).

## 5.1. Les éléments *cis* qui régulent l'épissage de l'exon 16

L'étude de l'épissage alternatif de l'exon 16 au cours de la différenciation érythroïde par l'équipe de F.BAKLOUTI a permis de réaliser beaucoup d'avancées dans ce domaine (Deguillien et al., 2001). Dans cette étude, un modèle pour l'étude de l'exon 16 a été validé et il a permis de vérifier l'importance des séquences *cis* dans la régulation de l'exon 16.

Ce modèle consiste en un minigène formé par l'exon 16 et une partie de ses introns flanquants (environ 300 nucléotides). Les cellules MEL induites vers la différenciation érythroïde terminale reproduisent l'épissage alternatif de l'exon 16 endogène ainsi que de l'exon 16 exogène issu du minigène. Ceci suggère que le minigène contient en plus de l'exon 16 les séquences introniques nécessaires pour la régulation de l'épissage (Deguillien et al., 2001)

L'intron en amont de l'exon 16 est formé dans la partie située avant le site d'épissage 3' d'une séquence riche en résidus pyrimidiques (poly(Y)). Cette séquence contient deux enhanceurs : i) un enhanceur distal qui active l'inclusion de l'exon 16 après induction de la différenciation (activateur stade-spécifique), ii) un enhanceur proximal qui active constitutivement l'inclusion de l'exon 16 (Deguillien et al., 2001).

Le site d'épissage donneur (3'ss) est un site fort d'épissage, il est similaire au site consensus. (Deguillien et al., 2001; Reed, 1996).

Les 15 nucléotides situés à l'extrémité 5' de l'exon constituent une séquence riche en purines avec des répétitions GA. Cette séquence appelée PRE16 inhibe l'inclusion de l'exon 16. La substitution de cette séquence par 15 nucléotides en 5' de l'exon 2 de la globine beta est associée à une augmentation de la reconnaissance de cet exon dans les cellules non différenciées (Deguillien et al., 2001).

Deux motifs UAG ont été identifiés dans la séquence de l'exon. Ces motifs sont connus comme des inhibiteurs d'épissage par liaison de hnRNPA1 (Del Gatto-Konczak et al., 1999). La mutation du premier motif situé après le PRE16 conduit à une légère inhibition de l'inclusion de l'exon 16. Tandis que la mutation du deuxième motif active significativement l'inclusion de l'exon 16 dans les cellules non induites et induites. Ce qui montre que ce motif a un effet inhibiteur constitutif sur l'inclusion de l'exon 16 (Deguillien et al., 2001).

La séquence formée par 42 nucléotides à l'extrémité 3' de l'exon est très conservée entre les espèces, ce qui indique une importance fonctionnelle. La substitution de cette séquence (appelée CE16) par la séquence correspondante de l'exon 2 de la globine beta aboutit à une inclusion constitutive de l'exon 16 dans les cellules MEL induites ou non. Ce qui montre qu'elle a un effet inhibiteur constitutif de l'inclusion de l'exon 16 (Deguillien et al., 2001).

Le motif **CAGACAT** situé dans le CE16 a un effet activateur de l'inclusion de l'exon 16. La liaison du facteur d'épissage SF2/ASF sur cet ESE active l'inclusion de l'exon 16. Des mutations de la séquence de cet ESE inhibe fortement l'inclusion de l'exon 16 (Yang et al., 2005).

Le site d'épissage 5' est un site faible d'épissage, les résidus en position +3 et +4 sont des pyrimidines (TT) alors que les séquences consensus dans cette région sont des purines (Reed, 1996).

La substitution des pyrimidines +3 et +4 par des purines (AA) change le site 5' en un site fort d'épissage, ce qui aboutit à une activation constitutive de l'inclusion de l'exon 16 dans les cellules non induites et induites (Deguillien et al., 2001).

L'intron situé en aval de l'exon 16 active son épissage. En effet cet intron contient 3 répétitions UGCAUG conservées au cours de l'évolution. L'altération de ces motifs inhibe l'inclusion de l'exon 16 dans les cellules différenciées (Deguillien et al., 2001). En plus il a été montré que ces motifs activent l'inclusion de l'exon 16 de façon dose dépendante et par liaison au facteur d'épissage Fox-2 dans les cellules MEL induites en différenciation (Ponthier et al., 2006; Yang et al., 2008).

## **5.2. Les facteurs agissant en *trans* régulant l'épissage de l'exon 16**

### **5.2.1. Fox-2/RBM9/HRNBP2**

La protéine Fox-2 ainsi que son homologue Fox-1 sont des régulateurs clés de l'épissage alternatif dans le système nerveux et dans d'autres tissus. Ces deux protéines sont codées par deux gènes différents et elles sont conservées entre les espèces (Zhang et al., 2008).



Chez l'homme et la souris, Fox-1 et Fox-2 ont un domaine RRM (RNA recognition Motif) identique et un domaine C-terminal variable, elles se lient généralement sur des motifs UGCAUG pour réguler l'épissage alternatif (Underwood et al., 2005).

Fox-1 et Fox-2 se lient sur le motif UGCAUG qui se trouve dans l'intron situé en aval de l'exon 16 du pré-messager 4.1R. La surexpression de ces protéines dans les cellules HeLa active l'inclusion d'exon 16 issu d'un minigène transfecté (Ponthier et al., 2006).

Chez la souris, l'expression de Fox-1 et Fox-2 a été détectée dans le cerveau, le cœur et dans les muscles squelettiques, tandis que seule Fox-2 est exprimée dans les cellules érythroïdes (Ponthier et al., 2006).

Le gène codant pour Fox-2 donne plusieurs isoformes « tissus spécifiques » suite à un épissage alternatif et à l'utilisation des promoteurs alternatifs (Underwood et al., 2005).

L'isoforme mFox-2A (murine Fox 2A) est spécifique des cellules érythroïdes. Parmi toutes les lignées testées, elle est détectée uniquement dans les cellules MEL alors que la protéine mFox-2F (murine Fox 2F) est ubiquitaire. Les 2 protéines mFox-2A et mFox-2F sont produites dans les cellules MEL. Il a été montré que l'expression de l'isoforme mFox-2A augmente dans les cellules MEL différenciées par rapport aux cellules non induites. En revanche, l'expression de l'isoforme mFox-2F diminue après différenciation. Ces 2 protéines activent l'épissage de l'exon 16 endogène et exogène *in vivo* dans les cellules MEL de manière dépendante au motif UGCAUG. La réduction de l'expression de ces deux protéines a montré que c'est l'isoforme érythroïde spécifique mFox-2A qui active l'inclusion de l'exon 16 au cours de la différenciation érythroïde (Yang et al., 2008).

### **5.2.2. SF2/ASF**

Le facteur d'épissage SF2/ASF appartient à la famille des protéines SR (voir premier chapitre). Il joue un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager, dans le transport et la traduction de l'ARNm. Cette protéine est l'une des trois protéines SR identifiées faisant la navette en continu (Shuttling proteins) entre le noyau et le cytoplasme (Caceres et al., 1998).

Les résultats de l'étude du rôle de SF2/ASF montrent que ce facteur est un important régulateur de l'inclusion d'exon 16 spécifique du stade de la différenciation érythroïde.

L'expression de la protéine SF2/ASF augmente au cours de la différenciation des cellules MEL, elle se lie sur un ESE (CAGTAG) pour activer l'inclusion de l'exon 16.

SF2/ASF est capable aussi de réguler l'épissage de l'exon 16 *in vitro*. L'addition de SF2/ASF à des extraits S100 des cellules Hela (extraits dépourvu des protéines SR et déficients pour l'épissage) active l'inclusion de l'exon 16 issu d'un minigène. L'activation dépend aussi de l'ESE (CAGATAG) puisque SF2/ASF n'active pas l'inclusion de l'exon 16 issu d'un minigène muté sur la séquence de l'ESE (Yang et al., 2005).

#### **5.2.4. HERF-1**

Peu de choses sont connues sur la fonction de cette protéine hématopoïétique. Le rôle de HERF-1 sur l'épissage de l'exon 16 a été étudié par l'équipe de F.BAKLOUTI. L'activation de l'inclusion de l'exon 16 corrèle avec l'expression de HERF-1 au cours de la différenciation érythroïde. La surexpression de HERF-1 dans les cellules MEL active l'inclusion de l'exon 16 en présence du DMSO (Blaybel et al., 2008).

#### **5.2.5. hnRNPA/B**

Les protéines hnRNPA/B inhibent l'épissage alternatif de l'exon 16 par ses interactions avec le silencer d'épissage exonique constitutif situé dans le CE16

L'addition de la protéine hnRNPA1 à des réactions d'épissage *in vitro* en présence des extraits nucléaires des cellules HeLa réduit le taux d'inclusion de l'exon 16. L'inhibition de l'exon 16 est très sensible à la dose des protéines hnRNPA/B.

La surexpression de hnRNPA1 dans les cellules HeLa inhibe l'inclusion de l'exon 16 issu d'un minigène transfecté. Le domaine d'interaction avec les protéines ainsi que le domaine d'interaction avec l'ARN de hnRNPA1 sont requis pour cette activité d'inhibition.

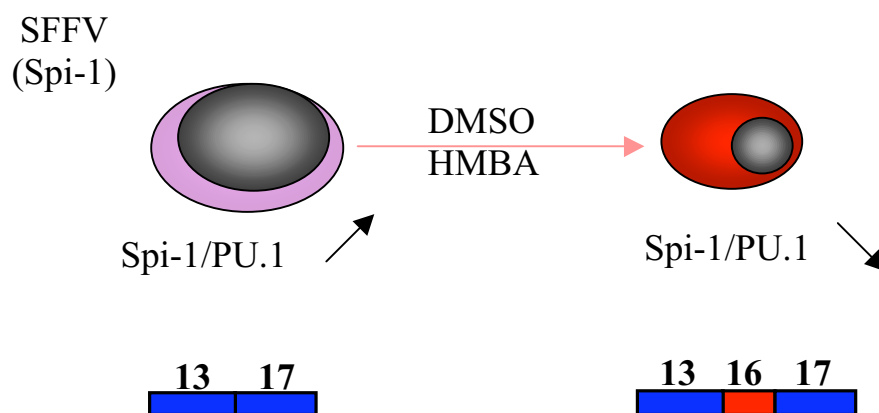
Au cours de la différenciation érythroïde, l'inclusion de l'exon 16 corrèle avec la diminution de la concentration des protéines hnRNPA/B. Les érythroblastes immatures isolés de la rate des souris infectées par le virus de Freind produisent un haut niveau de hnRNPA/B. Après 44 heures d'induction de leur différenciation par l'érythropoïétine, une très faible concentration des hnRNPA/B a été détectée, cette diminution coïncide avec l'activation de l'inclusion de l'exon 16 (Hou et al., 2002).

### 5.2.6. Spi-1/PU.1

Les travaux de recherche réalisés par Oriane THEOLEYRE dans l'équipe de F.BAKLOUTI ont montré un rôle de Spi-1/PU.1 dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16. Les oncogènes Spi-1/PU.1 et Fli-1 bloquent la différenciation érythroïde, mais seul Spi-1/PU.1 inhibe l'épissage régulé de l'exon 16 du gène 4.1R dans les cellules érythroleucémiques MEL (Theoleyre et al., 2004).

L'expression de *pu.1* est activée dans les cellules MEL SFFV. Ces cellules se différencient lorsqu'elles sont traitées avec du DMSO (dimethylsulfoxyde) ou du HMBA (hemaméthylène bisacétamide). Cette différenciation induite est accompagnée par une décroissance rapide et spécifique des transcrits et protéines Spi-1/PU.1 et par une activation de l'inclusion de l'exon 16 (**Figure 43**).

Les cellules F-MuLV n'expriment pas le gène *pu.1* mais c'est l'expression de *fli-1* qui est activée. Ces cellules présentent une forte inclusion de l'exon 16 concomitante avec un niveau important de Fli-1 avant et après induction de la différenciation. La surexpression de Spi-1/PU.1 dans les cellules F-MuLV est associée à une réduction de l'inclusion de l'exon 16 en absence ou en présence de DMSO. La diminution de l'expression de Spi-1/PU.1 est donc un événement clé pour l'activation de l'inclusion de l'exon 16 au cours de la différenciation érythroïde (Theoleyre et al., 2004).



**Figure 43** : Induction des cellules MEL. Les cellules MEL induites en différenciation par le DMSO (dimethylsulfoxyde) ou le HMBA (hémaméthylène bisacétamide) sont capables de reproduire l'événement de l'épissage alternatif de l'exon 16. Cette différenciation induite est accompagnée par une décroissance rapide et spécifique des transcrits et protéines Spi-1/PU.1.

## **IV- Objectifs**

La connaissance des mécanismes moléculaires qui accompagnent la différenciation érythroïde est essentielle pour comprendre comment une dérégulation de ces mécanismes intervient dans la genèse d'une leucémie. L'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R est un important événement cellulaire qui accompagne la différenciation érythroïde.

Notre équipe avait démontré que les oncogènes Spi-1/PU.1 et Fli-1 bloquent la différenciation érythroïde, mais que seul Spi-1/PU.1 inhibe l'épissage régulé de l'exon 16 du gène 4.1R dans les cellules érythroleucémiques MEL. Dans ces cellules MEL, l'Epo-R est activé de façon constitutive induisant une signalisation constitutive des voies PI3K et MAPK indépendamment de l'érythropoïétine.

Dans les cellules myéloïdes, la cascade PI3K>>Akt phosphoryle l'oncogène Spi-1/PU.1 sur son domaine de transactivation. Également, les facteurs d'épissage de la famille SR peuvent être phosphorylés sur leur domaine RS via la voie PI3K>>Akt.

L'objectif principal de ma thèse est la recherche des facteurs et des mécanismes qui découlent de la voie PI3K et qui interviennent dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16 4.1R ainsi que dans la différenciation des cellules érythroleucémiques MEL.

## **V- Résultats et discussion**

# ***I. Implication de la voie de signalisation PI3K dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-messager 4.1R et dans la différenciation des cellules érythroleucémiques MEL***

## **I.1. Introduction**

Notre équipe s'intéresse à un événement d'épissage alternatif spécifique de la lignée érythrocytaire : l'inclusion de l'exon 16 du pré-messager 4.1R en fin de différenciation érythroïde. Cet événement d'épissage est régulé selon le stade de différenciation érythroïde: il est exclu dans les progéniteurs immatures, et inclu progressivement en fin de différenciation (Baklouti et al., 1996; Chasis et al., 1993). L'exon 16 code avec l'exon 17 pour le domaine SAB de la protéine 4.1R nécessaire pour son interaction avec le complexe spectrine/actine. L'inclusion de l'exon 16 est donc un événement majeur pour la fonction érythrocytaire de la protéine 4.1R.

Les cellules érythroleucémiques de Friend constituent notre modèle pour l'étude de l'épissage de l'exon 16 du pré-messager 4.1R. Une caractéristique importante de ces cellules MEL est qu'elles peuvent réintégrer un processus de différenciation, lorsqu'elles sont traitées avec du DMSO (dimethylsulfoxyde) ou du HMBA (hemamethylene bisacetamide) et sont capables de reproduire l'événement d'épissage de l'exon 16 endogène ainsi que d'un exon 16 exogène issu d'un minigène transfecté (Baklouti et al., 1996; Deguillien et al., 2001). Cette différenciation induite est accompagnée par une décroissance rapide et spécifique des transcrits et protéines Spi-1/PU.1 (Schuetze et al., 1992).

L'épissage de l'exon 16 est également liée à Spi-1/PU.1. Spi-1/PU.1 est un facteur de transcription hématopoïétique de la famille *ets*, il intervient largement dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs érythroïdes (Back et al., 2004; Fisher et al., 2004). Il est exprimé dans les cellules myéloïdes matures ainsi que dans les lymphocytes B (Fisher and Scott, 1998; Klemsz et al., 1990). Une expression de *pu.1* a été détectée dans les progéniteurs érythroïdes immatures tandis qu'elle est totalement absente dans les cellules érythroïdes matures et dans les lymphoïdes T (Akashi et al., 2000; Klemsz et al., 1990). Dans les progéniteurs érythroïdes, l'intégration du provirus SFFV dans le locus *Spi-1* permet la surexpression de Spi-1/PU.1 qui bloque la différenciation des proérythroblastes et entraîne le développement d'une érythroleucémie.

Des résultats dans l'équipe, ont montré que l'oncogène Spi-1/PU.1 inhibe l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R (Blaybel et al., 2008; Theoleyre et al., 2004). Le mécanisme d'inhibition de l'épissage de l'exon 16 par Spi-1/PU.1 n'est pas encore connu.

L'implication du facteur de transcription Spi-1/PU.1 dans l'épissage a été évoquée pour la première fois par Hallier et ses collaborateurs. Leur étude a montré un rôle indirect de Spi-1/PU.1 dans la régulation d'un évènement d'épissage alternatif.

Spi-1/PU.1 interagit via son domaine de liaison à l'ADN avec le domaine de liaison à l'ARN de la protéine p54nrb. Par cette interaction directe, Spi-1/PU.1 altère la liaison de P54nrb sur l'ARN et interfère *in vitro* avec l'épissage d'un minigène contenant les exons 1 et 2 de la  $\beta$ -globine humaine (Hallier et al., 1996). Ensuite, il a été montré que Spi-1/PU.1 interagit *in vitro* et *in vivo* avec la protéine TLS. Cette protéine permet la sélection du site 5' d'épissage distal du pré-messager E1A dans les cellules érythroïdes (Hallier et al., 1998). Spi-1/PU.1 s'oppose *in vitro* (Hallier et al., 1998) et *in vivo* (Delva et al., 2004) à l'effet de TLS sur l'épissage de l'ARNm E1A et favorise la sélection du site 5' d'épissage proximal.

Nos données (Blaybel et al., 2008; Theoleyre et al., 2004) ainsi que celles de la littérature permettent d'attribuer au facteur de transcription Spi-1/PU.1 une autre fonction de régulateur de l'épissage. Ces deux fonctions ne sont pas en contradiction avec les données de la littérature qui montrent que la transcription et la maturation de l'ARN pré-messager (épissage y compris) sont deux événements co-régulés (Bentley, 2002; Proudfoot and O'Sullivan, 2002). Dans le même sens, en 2006, Guillouf et al ont montré que Spi-1/PU.1 est capable d'interférer avec l'épissage alternatif des ARN pré-messagers des gènes dont il régule la transcription (Guillouf et al., 2006).

Le changement dans le profil d'épissage alternatif d'un ARN pré-messager constitue la réponse de la cellule à un stimulus extracellulaire ou à son environnement (Stamm, 2002). Ce changement peut se produire dans une cellule saine comme dans une cellule malade. Les voies de transduction de signal transfèrent le message apporté par un stimulus depuis la surface cellulaire jusqu'au noyau où se déroule l'épissage.

L'intervention des voies de signalisation dans la régulation de l'épissage a été décrite dans plusieurs études (Blaustein et al., 2007; Stamm, 2002; Tarn, 2007). Les intermédiaires qui agissent entre la signalisation et l'épissage sont des facteurs dont l'activité est modulée par la phosphorylation.



L'oncogène Spi-1/PU.1 contient dans sa séquence plusieurs résidus sérines phosphorylables (Pongubala et al., 1993). Spi-1/PU.1 peut être phosphorylé par la PKC sur des résidus thréonines (Ikizawa et al., 2001). La phosphorylation de Spi-1/PU.1 joue un rôle important dans son activité (voir chapitre II, partie 8.4.10). La phosphorylation de Spi/PU.1 par la caséine kinase II sur la sérine 148 augmente son activité transcriptionnelle (Pongubala et al., 1993) (Lodie et al., 1997). De même, la phosphorylation de Spi-1/PU.1 par la PI3K/Akt est nécessaire à l'activation de transcription des gènes cibles de Spi-1/PU.1 (Rieske and Pongubala, 2001).

Dans les cellules MEL, la voie de la MAP-kinase et la voie PI3K sont constitutivement actives suite à l'induction continue de l'EPO-R par la protéine virale GP-55 (voir chapitre II, partie 7).

La phosphorylation de Spi-1/PU.1 dans le contexte érythroïde n'a jamais été décrite. Dans cette partie de ma thèse, je me focalise sur l'importance de la phosphorylation de Spi-1/PU.1 dans la régulation de la différenciation des cellules MEL et dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R. En premier temps, j'étudie l'implication de la voie PI3K/Akt dans ces deux événements, ensuite j'étudie l'implication de cette voie dans la régulation de l'expression de Spi-1/PU.1. Enfin, par des mutagenèses dirigées, j'étudie l'importance des deux sérines 41 et 148 dans l'activité érythroïde de Spi-1/PU.1.

Les résultats présentés dans cette partie (article) montrent un rôle principal de la voie PI3K/Akt dans l'inhibition de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend ainsi que dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R. L'inhibition de la PI3K bloque l'expression de Spi-1/PU.1 de façon dose dépendante et en cascade : elle inhibe d'abord la phosphorylation de Spi-1/PU.1 par Akt puis entraîne le blocage de la boucle d'autorégulation du gène *spi-1/pu.1*. Nous montrons également que seule la phosphorylation de Spi-1/PU.1 sur la sérine 41 est nécessaire pour l'inhibition de la différenciation. Tandis que, les deux sérines 41 et 148 sont nécessaires pour l'inhibition de l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R.

## **I.2. Article:**

### **Subtle distinct regulations of late erythroid molecular events by PI3K/AKT-mediated activation of Spi-1/PU.1 oncogene autoregulation loop**

Osman Breig (Ph.D.), Orianne Théoleyre (Ph.D.), Alexandre Douablin (Ph.D.), and Faouzi Baklouti (Ph.D.)

mRNA Metabolism in Normal and Pathological Cells; CGMC, CNRS, Université Lyon 1, Villeurbanne, France.

**Running Title:** PI3K/AKT induces PU.1 autoregulation loop

**Corresponding author:** F. Baklouti, Ph.D.

**address:** mRNA Metabolism in Normal and Pathological Cells  
CGMC; CNRS UMR 5534  
Université Lyon 1; Bât. Gregor Mendel  
16, rue R. Dubois  
69622 Villeurbanne Cedex, France.

**Phone:** (33) 4 72 43 29 28

**Fax:** (33) 4 72 43 26 85

**e-mail:** [faouzi.baklouti@univ-lyon1.fr](mailto:faouzi.baklouti@univ-lyon1.fr)

## ABSTRACT

Spi-1/PU.1 oncogene is downregulated as proerythroblasts undergo terminal differentiation. Insertion of the Friend virus upstream of the Spi-1/PU.1 locus leads to the constitutive upregulation of Spi-1/PU.1, and a subsequent block in the differentiation of the affected erythroblasts. We have shown that sustained overexpression of Spi-1/PU.1 also inhibits the erythroid splicing of protein 4.1R exon 16, irrespective of chemical induction of differentiation. Here we demonstrate a positive feedback loop that couples constitutive PI3K/AKT signaling to high expression of Spi-1/PU.1 in Friend erythroleukemia cells. Inhibition of PI3K/AKT results in Spi-1/PU.1 downregulation in a stepwise fashion, and induces cell differentiation. Chromatin immunoprecipitation assays further supported the positive autoregulatory effect of Spi-1/PU.1. Mutational analysis indicated that Ser41, but not Ser148, is necessary for Spi-1/PU.1-mediated repression of hemoglobin expression, whereas both Ser residues are required for Spi-1/PU.1 inhibition of the erythroid splicing event. We further show that inhibition of the erythroid transcriptional and splicing events are strictly dependent on distinct Spi-1/PU.1 phosphorylation modifications rather than Spi-1/PU.1 expression level *per se*. Our data further support that Spi-1/PU.1 inhibits 4.1R erythroid splicing through two different pathways, and bring new insights into the extracellular signal impact triggered by erythropoietin on late erythroid regulatory program, including pre-mRNA splicing.

\*Abbreviations: ChIP: Chromatin Immunoprecipitation; DMSO: Dimethylsulfoxide; Epo: erythropoietin; MEL: mouse erythroleukemia; SFFV: Spleen Focus-Forming Virus

## INTRODUCTION

Spi-1/PU.1 is a member of the *ets* family of transcription factors, that is expressed specifically in hematopoietic tissues. *spi-1/pu.1* gene disruption results in lethality (Scott *et al.*, 1994). It is essential for controlling the balance between self-renewal and differentiation in hematopoietic progenitor cells, and functions in a concentration-dependent manner to promote differentiation of the lymphoid and myeloid lineages ((Back *et al.*, 2004; Fisher *et al.*, 2004), and references therein). Furthermore, Spi-1/PU.1 is expressed at low levels in erythroid progenitor cells and subsequently downregulated upon terminal differentiation. It acts to maintain the self-renewal capacity of immature erythroid precursors, and to prevent differentiation in the erythroid lineage (Back *et al.*, 2004; Fisher *et al.*, 2004).

Spi-1/PU.1 was initially discovered as a proviral integration site in Friend virus-induced erythroleukemia (reviewed in (Moreau-Gachelin, 2008)). Friend virus complex consists of 2 viruses, a helper replication-competent Friend murine leukemia virus (F-MuLV), and a replication-defective spleen-focus forming virus (SFFV). Friend SFFV carries a unique *env* gene encoding a truncated form of a retroviral envelope glycoprotein (gp55), which is responsible for its pathogenicity (reviewed in (Moreau-Gachelin, 2008)): In the first stage of the disease, gp55 binds and activates the erythropoietin receptor (Epo-R) and a short form of the receptor tyrosine kinase (sf-Stk), resulting in constitutive activation of signal transducing molecules and the development of Epo-independent erythroid hyperplasia and polycythemia, due to the polyclonal expansion and differentiation of erythroid cells in the absence of Epo. The second stage of the disease results from the outgrowth of Friend SFFV-infected erythroid cells that have become transformed due to integration of the virus into the *Spi-1* locus. This event triggers aberrant overexpression of the Spi-1/PU.1 protein in erythroid cells, and causes a block in their

differentiation and the outgrowth of transformed mouse erythroleukemia (MEL) cells (Moreau-Gachelin *et al.*, 1989; Paul *et al.*, 1991; Schuetze *et al.*, 1992). Treatment of the cells with polar compounds, such as dimethylsulfoxide (DMSO) and hexamethylene bisacetamide (HMBA), causes them to reenter a differentiation program best characterized by rapid downregulation of Spi-1/PU.1 and the concomitant accumulation of hemoglobin and other membrane erythrocyte-specific proteins (reviewed in (Moreau-Gachelin, 2008)). Consistently, forced expression of Spi-1/PU.1 blocks MEL cell differentiation (Rao *et al.*, 1997), and results in inhibition of growth and differentiation, and apoptotic death of other erythroleukemia cell lines (Yamada *et al.*, 1997).

Binding of Epo to its receptor triggers the phosphorylation and activation of EpoR-bound JAK2 tyrosine kinase, resulting in activation of several downstream signaling pathways that include the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB or AKT), the STAT5-Bcl-XL, and the ERK/MAPK (reviewed in (Ghaffari *et al.*, 2003)). In human erythroid progenitors, PI3K activation protects the cells from apoptosis and mediates Epo-induced proliferation through downregulation of p25Kip1 expression (Bouscary *et al.*, 2003). Activation of AKT serine threonine kinase of PKB family is crucial for Epo-induced erythropoiesis ((Bouscary *et al.*, 2003; Myklebust *et al.*, 2002), and references therein). This activation is mediated by PI3K through phosphorylation of Ser473 on AKT. In this context of Epo-signaling, AKT is a major effector downstream of PI3K, playing fundamental roles in the regulation of cell cycle, survival, and differentiation (Bao *et al.*, 1999; Bouscary *et al.*, 2003). Moreover, AKT activation has been reported in SFFV-infected erythroleukemic cells, in which EpoR is constitutively activated by the viral gp55 (Nishigaki *et al.*, 2000). In fact, most of the signal transduction pathways induced in erythroid cells by Epo, including the Jak-STAT pathway, are constitutively activated in SFFV-transformed cells in the absence of Epo ((Nishigaki *et al.*, 2006), and references therein).

Proliferation of Epo-independent proerythroblastic cells (called SH2 cells), derived from

transgenic mice overexpressing Spi-1/PU.1, requires active PI3K/AKT and MAPK pathways as well (Barnache *et al.*, 2001). Consistently, Epo initiates a transcriptional program that leads to significant change of expression levels in over 580 genes, the majority of which are apparently regulated in a PI3K-dependent manner (Sivertsen *et al.*, 2006).

The inclusion of exon 16 in mature protein 4.1R mRNA is probably the best studied example of stage-specific pre-mRNA splicing that characterizes the late erythroid development. It has been well documented that exon 16 is excluded in early erythroid progenitors, and included in late erythroid differentiated cells (Baklouti *et al.*, 1996; Chasis *et al.*, 1993). This regulated splicing event underlies the production of a functional 4.1R; inclusion of the 21 amino acid peptide encoded by exon 16, at the *N*-terminus of the 10kDa spectrin/actin-binding domain of 4.1R is indeed essential to promote high mechanical stability and high deformability of the mature red cell membrane. We have shown that Epo-non responsive MEL cells reproduce exon 16 regulated splicing upon DMSO-induction to erythroid differentiation from either the endogenous pre-mRNA (Baklouti *et al.*, 1996) or from transfected minigene transcript (Deguillien *et al.*, 2001). More recently, we have observed that Epo-responsive erythroleukemia cells as well, efficiently regulate this splicing event when induced in culture with either DMSO or Epo (Théoleyre *et al.*, 2004). Exon 16 splicing is tightly correlated with Spi-1/PU.1 expression: upregulated Spi-1/PU.1 in proliferative MEL cells, as well as forced expression of Spi-1/PU.1 inhibit exon 16 inclusion (Théoleyre *et al.*, 2004). DMSO-induced or shRNA-mediated downregulation of Spi-1/PU.1 release the inhibition and lead to exon 16 inclusion (Blaybel *et al.*, 2008b).

For many years, great effort has been made in order to understand how signals received by cells impact transcription factor activity. In an attempt to connect the splicing event and its block by upregulated Spi-1/PU.1 with the signaling pathways activated in MEL cells, we here provide the

first direct evidence for an Epo-generated signal that modulates an erythroid-specific splicing. Our results show that constitutive PI3K/AKT sustains Spi-1/PU.1 autoregulated expression, which inhibits protein 4.1R exon 16 splicing, and erythroid differentiation as evidenced by impaired globin gene expression. Inhibition of PI3K/AKT signaling blocks Spi-1/PU.1 autoregulation loop and induces cell differentiation and 4.1R erythroid splicing activation. However, mutational targeting of specific serine residues of Spi-1/PU.1 led to uncouple the two Spi-1/PU.1 inhibitory effects on 4.1R splicing and globin gene expression. Taking together, these data demonstrate subtle differential effects of Spi-1/PU.1 expression on late erythroid regulated events.

## RESULTS

### 1. PI3K/AKT inhibition triggers erythroleukemia cell differentiation in the absence of DMSO

PI3K complex is a protein dimer that consists of a p85 regulatory subunit and a p110 catalytic subunit. Earlier works have shown that p85 expression, phosphorylation and activity decline in Friend cells after DMSO exposure for 96h (Bavelloni *et al.*, 2000; Cataldi *et al.*, 2000).

Immunoblot analysis of p85 subunit shows a reduction of the phosphorylated form of p-85 (P-p85) when the cells are treated with 10-20  $\mu$ M LY294002 or DMSO (Fig.1A). Activation of PI3K triggers the phosphorylation of its downstream target AKT. As shown in Fig.1B, the phosphorylated AKT(Ser473) decreases upon LY294002 treatment in a dose-dependent manner, suggesting that LY294002 is effective on both PI3K auto-phosphorylation and downstream AKT phosphorylation.

We then tested the effect of PI3K/AKT inhibition on MEL SFFV cells. Cells were seeded at stationary phase in the presence of increasing concentrations of LY294002, within a non-toxic range, and cell differentiation was monitored 96h after exposure to the inhibitor. This experiment reproducibly revealed that LY294002 triggers MEL cell differentiation in a concentration-dependent manner (Fig.1C): at a 5 $\mu$ M concentration, ~12% of the cells were benzidine-positive, while at a 20 $\mu$ M concentration, this percentage was over 65%. In the same sets of experiments, the proportion of differentiating cells was higher, ~78%, when the cells were induced to differentiate with 1.8% DMSO.



These results evidence that inhibition of the constitutive PI3K/AKT signaling triggers Friend erythroleukemia cell differentiation in the absence of DMSO chemical induction.

## **2. PI3K/AKT signaling inhibits protein 4.1R exon 16 erythroid splicing**

In a recent work, we have provided evidence that induction of differentiation of MEL SFFV cells triggers a transcription event (globin gene activation) and a splicing event (4.1R exon 16 inclusion) through different pathways (Blaybel et al., 2008b). These events are probably the best characterized transcription and splicing events that label the late stage of erythroid differentiation. We asked whether PI3K/AKT signaling inhibition impacts both of these regulated events. In new sets of experiments, MEL SFFV cells were either left untreated or treated with 10 or 20 $\mu$ M LY294002 for 4 days, as described above, and exon 16 splicing was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. As outlined in Figure 2, inhibition of the constitutive PI3K/AKT signaling results in the activation of 4.1R exon 16 splicing, again in an inhibitor dose-dependent manner. However, in keeping with the effect observed on hemoglobin production, treatment with LY294002 inhibitor seems to have a less conspicuous effect on exon 16 inclusion than DMSO.

Similar data were obtained using Epo-responsive cells (Friend erythroleukemia SFFV SKT6 cells, and Rauscher cells) (not shown), indicating that PI3K/AKT signaling inhibits erythroleukemia cell differentiation, regardless of the Epo-responsiveness of the cell line.

Collectively, these observations suggest that inhibition of the constitutive PI3K/AKT signaling alone promotes both globin gene transcription and erythroid-specific splicing of 4.1R exon 16 in erythroleukemia cells, in the absence of DMSO or Epo induction of differentiation.

### **3. Inhibition of PI3K/AKT signaling downregulates Spi-1/PU.1 expression in a stepwise fashion**

Upregulated Spi-1/PU.1 in Friend cells inhibits globin gene transcription and blocks 4.1R pre-mRNA erythroid splicing (Théoleyre *et al.*, 2004). We tested Spi-1/PU.1 expression in cells treated with PI3K/AKT inhibitor LY294002. Immunoblot analysis of Spi-1/PU.1 expression revealed 2 or 3 isoforms with apparent molecular weights ranging within 35-37 kDa, that represent different phosphorylated forms of Spi-1/PU.1 (Delgado *et al.*, 1994). As shown in Fig.3A, the unphosphorylated Spi-1/PU.1 appears unaltered up to a concentration of LY294002 of 15 $\mu$ M, and subsequently declines at a higher concentration (20 $\mu$ M). Most remarkably, the phosphorylated forms of Spi-1/PU.1 steadily decreased as the dose of LY294002 increased, and starting from as low as 5 $\mu$ M.

We asked whether Spi-1/PU.1 downregulation occurs at the protein level or rather at the mRNA level. To address this issue, we examined Spi-1/PU.1 mRNA accumulation during LY294002 inhibition of PI3K/AKT signaling, using real-time RT-PCR. This experiment clearly revealed a decrease in mRNA level that coincides with the decrease observed at the protein level for the same LY294002 concentrations (Fig.3B).

Spi-1/PU.1 has been described to activate its own gene in myeloid cells by binding an *ets* sequence at +20 of the transcription start site (Chen *et al.*, 1995). We examined the Spi-1/PU.1 transcription factor occupancy at the +20 *ets* site by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay, using anti-Spi-1/PU.1 antibody. DNA recovered from the immune complexes was analyzed by q-PCR using primers surrounding the +20 site. As shown in Fig.4, the ChIP experiment revealed that Spi-1/PU.1 occupancy of the +20 *ets* site is more efficient than that of a non-specific protein.

These data suggest that inhibition of the PI3K/AKT signaling triggers a stepwise downregulation of Spi-1/PU.1, and that PI3K/AKT-mediated phosphorylation of Spi-1/PU.1 is needed for its transactivation property, including the transactivation of *spi-1/pu.1* gene itself, through a positive feedback loop.

#### **4. Inhibition of PI3K/AKT is insufficient to activate 4.1R erythroid splicing in cells overexpressing Spi-1/PU.1**

We next asked whether PI3K/AKT inhibits cell differentiation through a *stricto sensu* Spi-1/PU.1 upregulation, or rather through a phosphorylation activated form of Spi-1/PU.1. To address this issue, wildtype Spi-1/PU.1 was overexpressed in MEL cells, under the control of heterologous promoters, and stably transfected clones were selected. One clone expressing a low level (l-PU.1+ clone) and one clone expressing a high level (h-PU.1+ clone) of Spi-1/PU.1 were subsequently analyzed for their ability to respond to PI3K/AKT inhibition. The generated MEL cell clones were exposed to DMSO or 20 $\mu$ M LY294002. Untransfected cells again showed a shut-off of Spi-1/PU.1 upon exposure to DMSO, and a concentration-dependent downregulation upon LY294002 exposure (Fig.5A). Constitutive low expression of Spi-1/PU.1 was detected in l-PU.1+ cells, and a much stronger Spi-1/PU.1 signals were revealed in h-PU.1+ cells, cultured in the same conditions (Fig.5A). Hemoglobin synthesis was impaired in the two cell lines overexpressing Spi-1/PU.1, even after DMSO treatment. Interestingly, PI3K/AKT inhibition induced hemoglobin synthesis in l-PU.1+ cells. Conversely, h-PU.1+ culture exposed to 20 $\mu$ M LY294002 produced only few, if any, benzidine positive cells. In total, a converse relationship between the level of expressed Spi-1/PU.1 and the percentage of benzidine positive cells (72% in untransfected cells, 40% in l-PU.1+ cells, 3% in h-PU.1+ cells) is observed, suggesting a titration effect between Spi-1/PU.1

quantitative level and its phosphorylation level (Fig.5A). Moreover, western blot analysis revealed only a partial inhibition of Spi-1/PU.1 phosphorylation in cells overexpressing Spi-1/PU.1 (Fig.5A), which argues in favor of a titration effect on LY294002-mediated PI3K/AKT inhibition.

Interestingly, exon 16 splicing was also modulated in these cells: as expected, exon inclusion was inhibited in DMSO-treated cells overexpressing Spi-1/PU.1, but not in untransfected or mock cells (Fig.5B). However, inhibition of PI3K/AKT induced the activation of exon splicing in untransfected and mock cells, but not in cells overexpressing Spi-1/PU.1 (Fig.5B).

Collectively, these experiments provide evidence that Spi-1/PU.1 inhibits both late erythroid transcriptional and splicing events in a phosphorylation-dependent manner. Exon 16 remains massively excluded in LY294002-treated cells, suggesting that Spi-1/PU.1 inhibits exon 16 splicing through its unphosphorylated form, expressed from the transfected Spi-1/PU.1 cDNA, or that residual phosphorylated forms remain active at 20 $\mu$ M LY294002 concentration. Equally possible is the presence of a PI3K/AKT-independent pathway, in addition to the PI3K/AKT-mediated pathway, to phosphorylate Spi-1/PU.1.

## **5. Distinct effects of phosphorylated Ser residues on Spi-1/PU.1 role in globin gene expression and 4.1R erythroid splicing**

Spi-1/PU.1 is phosphorylated on multiple serine residues in its transactivation and PEST regions (Pongubala *et al.*, 1993). In particular, phosphorylation of Spi-1/PU.1 on Ser148 by casein kinase II controls the recruitment of B cell specific factors as NF-EM5 and Pip on the  $\kappa$ E3' and  $\lambda$ B enhancers, leading to an increase of the transcriptional activity of Spi-1/PU.1 (Eisenbeis *et al.*, 1995; Pongubala *et al.*, 1993). It has also been evidenced that AKT stimulation of Spi-1/PU.1 is

due to phosphorylation within the transactivation domain at aminoacid residue Ser41. Mutation of serine 41 to alanine (S41A) impaired Spi-1/PU.1 induction by AKT signal (Rieske & Pongubala, 2001).

We asked if Spi-1/PU.1 requires either or both of these sites for repression of the transcription and the splicing events. Wildtype Spi-1/PU.1 and mutants containing serine to alanine mutations at positions 41 and 148 were generated, and transfected as EGFP-fusions in MEL SFFV cells. Cells were cultured in the presence or absence of DMSO. Immunoblot analysis using anti-Spi-1/PU.1 antibody ascertained the high expression of EGFP-Spi-1/PU.1 fusion proteins, that is maintained after DMSO exposure, whereas the endogenous Spi-1/PU.1 dramatically decreases in all cell clones, upon DMSO-induction (Fig.6A). Expression of wildtype Spi-1/PU.1 and mutant S148A impaired hemoglobin synthesis, whereas that of mutant S41A resulted in about 40% of hemoglobin producing cells after DMSO treatment (Fig.6A and B). These results suggest that phosphorylation at Ser41 residue, but not at Ser148, is required for Spi-1/PU.1 transcriptional activity as a globin gene repressor. However, expression of S41A or S148A Spi-1/PU.1 mutants failed to inhibit exon inclusion (Fig.6C). These data demonstrate that Spi-1/PU.1 phosphorylation-mediated modifications, both within the transactivation domain and the PEST domain are required for the inhibitory effect of Spi-1/PU.1 on exon 16 erythroid splicing.

Collectively, these experiments provide evidence that distinct Spi-1/PU.1 phosphorylation-mediated modifications direct specific inhibitions of late erythroid molecular events.

## DISCUSSION

### **PI3K/AKT-mediated phosphorylation of Spi-1/PU.1 sustains a high level of expression of Spi-1/PU.1 through an autoregulatory loop**

The signaling events initiated by the binding of Epo to the Epo-R induce proliferation, survival, as well as differentiation of erythroid progenitors (Jelkmann, 2007). Most Friend erythroleukemia cell lines display an SFFV provirus integrated in a reverse orientation relative to the Spi-1/PU.1 promoter. This observation led to the hypothesis that enhancer elements present in the LTR of SFFV activates Spi-1/PU.1 transcription, however direct experimental evidence for this model is still lacking (Moreau-Gachelin, 2008). In Friend erythroleukemia, it has been anticipated that in the early, preleukemic stage, the Spi-1/PU.1 promoter may be activated in a Spi-1/PU.1-independent manner by an EpoR/F-gp55 signal. Hereafter, cell clones with integrated SFFV provirus in the *spi-1/pu.1* gene locus expand and display high level of Spi-1/PU.1, involving the activation of *spi-1/pu.1* gene transcription by an enhancer element present in the SFFV LTR (Moreau-Gachelin *et al.*, 1989; Okuno *et al.*, 2005). High levels of Spi-1/PU.1 protein are necessary to maintain the transformed phenotype (Afrikanova *et al.*, 2002).

We here identified the PI3K/AKT pathway as a mediator of Spi-1/PU.1 autoregulatory loop that maintains Spi-1/PU.1 in a phosphorylated form capable to transactivate its own gene. Data gathered from previous works and data presented here, altogether suggest that activation of Spi-1/PU.1 in MEL cells implies a two-step regulatory mechanism, whereby SFFV gp55 glycoprotein first binds and activates Epo-R, which leads to constitutive activation of PI3K/AKT signaling. Active PI3K/AKT subsequently mediates Spi-1/PU.1 phosphorylation and therefore triggers a constitutive activation of *spi-1/pu.1* gene through a positive feedback loop. This autoregulatory

mechanism sustains a high level of expression of Spi-1/PU.1, responsible of the block of erythroid differentiation. Inhibition of PI3K/AKT blocks PI3K/AKT-mediated phosphorylation of Spi-1/PU.1, and subsequently inactivates Spi-1/PU.1-mediated autoregulation. Supportive of this model is the observation that Epo-R activation by the *env* gene of SFFV leads to transcriptional upregulation of Spi-1/PU.1 in the absence of Epo and in the absence of an integrated SFFV provirus within the Spi-1/PU.1 locus (Afrikanova *et al.*, 2002).

### **Spi-1/PU.1 inhibits hemoglobin synthesis in a PI3K/AKT-dependent manner**

We here demonstrate that specific inhibition of PI3K/AKT is sufficient to induce hemoglobin synthesis. Nonetheless, a previous work has shown that LY294002 inhibition of PI3K/AKT signaling prevents differentiation of MEL cells (Bavelloni *et al.*, 2000). This apparent contradiction might be due to the fact that in the majority of our experiments, we used either DMSO or 10-20 $\mu$ M LY294002, whereas in early works, cells were treated using 0.1-10 $\mu$ M LY294002, concomitantly with DMSO (Bavelloni *et al.*, 2000; Cataldi *et al.*, 2000). By constitutively overexpressing Spi-1/PU.1 at different levels in MEL cells, we were able to show that Spi-1/PU.1 protein level can titrate the inhibitory effect of LY294002 (Fig. 5), and therefore the inhibition efficiency of the PI3K/AKT signaling depends on the balance between Spi-1/PU.1 expression level and the concentration of LY294002 inhibitor. The possibility remains that use of different MEL cell clones, 707 clone (Bavelloni *et al.*, 2000) vs 745-A clone (this work), might account for the apparent conflicted results. However, we did observe similar effects of PI3K/AKT inhibition in SKT6 and Rauscher erythroleukemia cells (not shown).

We also found that PI3K/AKT phosphorylation of Spi-1/PU.1 is responsible for its role in blocking erythroid differentiation of MEL cells, and more specifically hemoglobin synthesis. As

recapitulated in Figure 7, the repression activity of Spi-1/PU.1 requires phosphorylation of the transactivation domain on S41 residue, but not that of the PEST domain on S148. These data are consistent with previous works addressing the transcription regulation of erythroid gene targets by the functional antagonism between Spi-1/PU.1 and GATA-1. This antagonism involves direct interactions between the two proteins, where the GATA-1 C-terminal zinc finger, on one side, and both the DNA binding and transactivation domains of Spi-1/PU.1, on the other side, are implicated. Both of these Spi-1/PU.1 domains are also needed to block erythroid differentiation in MEL cells (Nerlov *et al.*, 2000; Rekhtman *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999).

### **Spi-1/PU.1 inhibits 4.1R erythroid splicing through PI3K/AKT-dependent and -independent pathways**

A growing attention has been focused on how cellular signals induced by growth factors, cytokines, hormones, and membrane depolarization can change the splicing pattern of several pre-mRNAs (Blaustein *et al.*, 2007; Tarn, 2007). Recent works have provided in vitro and in vivo evidence showing that PI3K/AKT pathway regulates specific alternative splicing events via phosphorylation of selective SR proteins (Blaustein *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2005). We here provide the first observation that couples a functionally critical alternative splicing event to a signaling cascade that plays an essential role in Epo-induced erythropoiesis. In total, downregulation of Spi-1/PU.1, either through DMSO treatment (Schuetze *et al.*, 1992), sh-RNA-mediated knockdown (Blaybel *et al.*, 2008b), or PI3K/AKT signaling inhibition (this work), remains the key event that commits Friend erythroleukemia cells to late erythroid differentiation, and induces the erythroid splicing of 4.1R exon 16.



High level of Spi-1/PU.1 expressed in proliferative MEL cells, or forced expression of Spi-1/PU.1 in DMSO-induced cells, prone to differentiate, result in efficient block of 4.1R exon 16 splicing (Théoleyre *et al.*, 2004). Results presented here indicated that Spi-1/PU.1 inhibits exon 16 splicing in a phosphorylation-dependent manner. Moreover, phosphorylation of both the transactivation and the PEST domains is important for Spi-1/PU.1 effect on splicing (Fig.7). These data are consistent with previous observation showing the importance of both of these domains of Spi-1/PU.1 in modulating alternative splicing events within an exogenous pre-mRNA template (Delva *et al.*, 2004).

The cumulative data on Epo-R signaling and Spi-1/PU.1 deregulation in MEL cells, and the impacts on transcriptional and splicing targets, suggest a coordinated stage-specific sequence of events that are initiated by constitutive activation of Epo-R and its downstream signaling pathways. The distinct effects of Spi-1/PU.1 phosphorylation on globin gene transcription and 4.1R exon 16 splicing suggest the presence of two inhibitory pathways of late erythroid differentiation; one of which is PI3K/AKT-dependent and acts on Spi-1/PU.1 transcriptional activity, including the activation of its own gene, and the other is PI3K/AKT-independent. Both signaling cascades, however, are required for 4.1R exon 16 splicing inhibition in proliferative MEL cells (Fig.7). These observations further fuel the concept we have proposed of two different Spi-1/PU.1-mediated pathways contributing to exon 16 exclusion (Blaybel *et al.*, 2008b).

## METHODS

### Plasmids constructs

We generated recombinant plasmids expressing different levels of Spi-1/PU.1, upon MEL cell stable transfection. For low Spi-1/PU.1 expression, we used the previously described pHOOK-Spi-1 construct (Théoleyre *et al.*, 2004); the cell clone will be referred to as "l-PU.1+" clone. For high Spi-1/PU.1 expression, we generated a new cell clone, as follows: the entire coding sequence of Spi-1/PU.1 was amplified by RT-PCR using the following forward and reverse primers: PU-S1: 5'-CTCTCCGGAATGTTACAGGCGTGCAAAATG-3', and PU-AS1: 5'-TGCGAATTCTCAGTGGGGCGGGAGGCGCCG-3'. For accurate cloning, *BspEI* and *EcoRI* restriction sites were added at the 5' ends of these primers, respectively (underlined). The PCR product was inserted at the *BspEI/EcoRI* site of PEFbosEGFP-C1 expression vector (Sanjuan *et al.*, 2001), in matched open reading frame with the EGFP. The resulting construct PEFbosEGFP-C1-PU.1 was transfected in MEL cells, and the selected clone used in this study will be referred to as "h-PU.1+".

Mutations of Spi-1/PU.1 were made by a two step PCR approach (Maillet *et al.*, 1996), using the WT construct PEFbosEGFP-C1-PU.1 as template. The first step PCRs were performed with each of the outer primers, PU-S1 or PU-AS1, and the corresponding inner primers containing the specific mutation to be incorporated in the cDNA. The resulting PCR products were then used as templates for the second step PCR, and amplification was performed using the outer primers. The final PCR products were subcloned as *BspEI/EcoRI* digested fragments in PEFbosEGFP-C1. The inserts were fully sequenced to ascertain the incorporation of the specific nucleotide changes, and the absence of otherwise changes in sequences and reading frames. The inner primer set for Spi-

1/PU.1 S41A mutation was: S41A-S: 5'-TTCGTGGGCGCCGATGGAGA-3'; S41A-AS: 5'-TCTCCATCGGCGCCCCACGAA-3'. The inner primer set for S148A mutation was: S148A-S: 5'-CTGGAGGTGGCTGATGGAGA-3'; S148A-AS: 5'-TCTCCATCAGCCACCTCCAG-3'. The nucleotide changes are underlined.

### **Cell culture, induction and transfection**

Three erythroleukemia cell lines were used: MEL 745-A is an Epo non-responsive SFFV subclone, and SKT6 and Rauscher are Epo-responsive cell lines (Théoleyre *et al.*, 2004). Cells were grown in suspension in IMDM medium supplemented with 13% fetal bovin serum under standard conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Induction of erythroid differentiation was performed by culturing the cells for 4 days, in a fresh complete medium, supplemented with 1.8 % DMSO. Inhibition of PI3K/AKT signaling was achieved by adding LY294002 specific inhibitor (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) to cell culture at 5 to 20µM final concentrations. Hemoglobin synthesis was assessed by the benzidine staining reaction using standard procedure (Cataldi *et al.*, 2000).

For stable expression, proliferative cells ( $2 \times 10^5$  cells) were transfected with 0.5-1µg plasmid DNA using LipofectAmine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) or Transfast (Promega, Charbonnières-Les Bains, France) compounds in 24-well tissue culture plates, according to the manufacturers' procedures. Transfected cells were then seeded to limited dilutions in 96-well plates with complete IMDM medium containing 800 µg G418/ml, or 400 µg zeocin/ml, to select stably transfected clones. Individual clones were analyzed for the expression of the exogenous proteins.

### **Semiquantitative RT-PCR and real-time RT-PCR**

Total RNA was isolated using TRIZOL reagent (Invitrogen) from cell lysates according to the manufacturer's protocol. Inclusion of exon 16 in mature 4.1R mRNA was assessed by semi-quantitative RT-PCR, as previously described (Deguillien et al., 2001; Théoleyre et al., 2004).

The steady-state expression of Spi-1/PU.1 mRNA was estimated by real-time RT-PCR, using a forward primer within exon 3: 5'-CCGCACACCATGTCCACAAC-3', and a reverse primer within exon 4: 5'-ATCCGGGGCATGTAGGAAAC-3', and generated a 193 bp fragment. Beta-actin mRNA, used as internal control, was amplified using previously described primers (Juban *et al.*, 2009), and generated a 230 bp fragment. The reverse transcription step was performed on 1µg of total RNA for 60 min at 37°C, using 0,01µg of random hexamers, 0,125 mM of dNTP mix, 1U of RNase inhibitor and 10U of reverse transcriptase (Fermentas, St-Rémy les Chevreuse, France). The PCR step was performed using light cycler 480 SYBER Green I Master (Roche Applied Bioscience, Meylan, France) as follows: To 2,5 µl of 1/5 diluted RT product, were added 10µM of each primer and 5µl of PCR Mix, in a final volume of 10µl. Forty five cycles of amplification (20 sec at 95°C; 20 sec at 60 °C; 15 sec at 72°C) were performed on a LightCycler MX3000P (Stratagene Agilent Technologies, Massy, France).

### **Western blot**

Erythroleukemia cells were cultured under various treatment conditions. Whole cell lysates were prepared from these cells, fractionated on SDS-PAGE, and blotted onto nitrocellulose membranes. The protocols were as previously detailed (Blaybel et al., 2008b).

The membranes were probed with the following primary antibodies: anti-Spi-1/PU.1 antibodies: the first batch was a gift from Dr. F. Moreau-Gachelin, (Delgado *et al.*, 1994) (1/1000), the second batch was an anti-Spi-1/PU.1 directed against the C-terminal region (1/200, Santa Cruz, manufactured by Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France); anti-PI3K p85 subunit (1/1000, a gift from Dr. Mouchiroud); anti-phospho-AKT(Ser473) antibody, specifically directed against the phosphorylated form of AKT on Ser residue 473 (1/200, Santa Cruz); anti-GFP (1/1000, Roche Applied Bioscience); anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody directed against mouse  $\beta$ -actin (1/10000, Chemicon International, Temecula, CA, USA); anti-Grb2 antibody (1/10000, BD Transduction Laboratories). Anti  $\beta$ -actin and anti-Grb2 antibodies were used to standardize proteins signals. After primary antibodies, appropriate peroxidase conjugated secondary antibodies were used. Immunoreactive bands were revealed by ECL+ enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden).

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay**

ChIP experiments were performed essentially as previously detailed (Juban *et al.*, 2009). Briefly, MEL cells were crosslinked with 1% formaldehyde, washed with PBS, and lysed in SDS buffer. DNA was then fragmented on ice by sonication to mean lengths of about 300 bp. Complexes were immunoprecipitated overnight at 4°C on a rotating wheel, using 3 $\mu$ g of anti-Spi-1/PU.1 antibody or anti-p27 antibody (Santa-Cruz). DNA fragments were recovered by proteinase K digestion and phenol-chloroform extraction. Immunoprecipitated DNA was quantified by real-time PCR using the following Spi-1/PU.1-specific primers: ChIP-S: 5'-GAGACTTCCTGTAGCGCAAG-3'; ChIP-AS: 5'-TGGGTCAGACGCAGGGCTCA-3'.

## REFERENCES

Afrikanova I, Yeh E, Bartos D, Watowich SS, Longmore GD (2002). Oncogene cooperativity in Friend erythroleukemia: erythropoietin receptor activation by the env gene of SFFV leads to transcriptional upregulation of PU.1, independent of SFFV proviral insertion. *Oncogene* **21**: 1272-84.

Back J, Dierich A, Bronn C, Kastner P, Chan S (2004). PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells. *Blood* **103**: 3615-23.

Baklouti F, Huang SC, Tang TK, Delaunay J, Marchesi VT, Benz EJ, Jr. (1996). Asynchronous regulation of splicing events within protein 4.1 pre-mRNA during erythroid differentiation. *Blood* **87**: 3934-41.

Bao H, Jacobs-Helber SM, Lawson AE, Penta K, Wickrema A, Sawyer ST (1999). Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood* **93**: 3757-73.

Barnache S, Mayeux P, Payrastre B, Moreau-Gachelin F (2001). Alterations of the phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the erythropoietin-independent Spi-1/PU.1 transgenic proerythroblasts. *Blood* **98**: 2372-81.

Bavelloni A, Faenza I, Aluigi M, Ferri A, Toker A, Maraldi NM *et al* (2000). Inhibition of phosphoinositide 3-kinase impairs pre-commitment cell cycle traverse and prevents differentiation in erythroleukaemia cells. *Cell Death Differ* **7**: 112-7.

Blaustein M, Pelisch F, Srebrow A (2007). Signals, pathways and splicing regulation. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 2031-48.

Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Munoz MJ, Wengier D, Quadrana L *et al* (2005). Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 1037-44.

Blaybel R, Théoleyre O, Douablin A, Baklouti F (2008). Downregulation of the Spi-1/PU.1 oncogene induces the expression of TRIM10/HERF1, a key factor required for terminal erythroid cell differentiation and survival. *Cell Res* **18**: 834-45.

Bouscary D, Pene F, Claessens YE, Muller O, Chretien S, Fontenay-Roupie M *et al* (2003). Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* **101**: 3436-43.

Cataldi A, Di Pietro R, Centurione L, Grilli A, Cutroneo G, Miscia S (2000). Phosphatidylinositol-3-kinase activation and atypical protein kinase C zeta phosphorylation characterize the DMSO signalling in erythroleukemia cells. *Cell Signal* **12**: 667-72.

- Chasis JA, Coulombel L, Conboy J, McGee S, Andrews K, Kan YW *et al* (1993). Differentiation-associated switches in protein 4.1 expression. Synthesis of multiple structural isoforms during normal human erythropoiesis. *J Clin Invest* **91**: 329-38.
- Chen H, Ray-Gallet D, Zhang P, Hetherington CJ, Gonzalez DA, Zhang DE *et al* (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* **11**: 1549-60.
- Deguillien M, Huang SC, Morinière M, Dreumont N, Benz EJ, Jr., Baklouti F (2001). Multiple cis elements regulate an alternative splicing event at 4.1R pre-mRNA during erythroid differentiation. *Blood* **98**: 3809-3816.
- Delgado MD, Hallier M, Meneceur P, Tavitian A, Moreau-Gachelin F (1994). Inhibition of Friend cells proliferation by spi-1 antisense oligodeoxynucleotides. *Oncogene* **9**: 1723-7.
- Delva L, Gallais I, Guillouf C, Denis N, Orvain C, Moreau-Gachelin F (2004). Multiple functional domains of the oncoproteins Spi-1/PU.1 and TLS are involved in their opposite splicing effects in erythroleukemic cells. *Oncogene* **23**: 4389-99.
- Eisenbeis CF, Singh H, Storb U (1995). Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev* **9**: 1377-87.
- Fisher RC, Slayton WB, Chien C, Guthrie SM, Bray C, Scott EW (2004). PU.1 supports proliferation of immature erythroid progenitors. *Leuk Res* **28**: 83-9.



Ghaffari S, Huang LJS, Zhang J, Lodish HF (2003). Erythropoietin receptor signaling processes. In: Molineux G, Foote MA and Elliott SG (eds). *Erythropoietins and Erythropoiesis*. Birkhauser: Basel, Switzerland.

Jelkmann W (2007). Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* **78**: 183-205.

Juban G, Giraud G, Guyot B, Belin S, Diaz JJ, Starck J *et al* (2009). Spi-1 and Fli-1 directly activate common target genes involved in ribosome biogenesis in Friend erythroleukemic cells. *Mol Cell Biol* **29**: 2852-64.

Maillet P, Delaunay J, Baklouti F (1996). Chimeric probe-mediated ribonuclease protection assay for molecular diagnosis of mRNA deficiencies. *Hum Mutat* **7**: 61-64.

Moreau-Gachelin F (2008). Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. *Retrovirology* **5**: 99.

Moreau-Gachelin F, Ray D, Mattei MG, Tambourin P, Tavitian A (1989). The putative oncogene Spi-1: murine chromosomal localization and transcriptional activation in murine acute erythroleukemias. *Oncogene* **4**: 1449-56.

Myklebust JH, Blomhoff HK, Rusten LS, Stokke T, Smeland EB (2002). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* **30**: 990-1000.

Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, Graf T (2000). GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* **95**: 2543-51.

Nishigaki K, Hanson C, Ohashi T, Spadaccini A, Ruscetti S (2006). Erythroblast transformation by the friend spleen focus-forming virus is associated with a block in erythropoietin-induced STAT1 phosphorylation and DNA binding and correlates with high expression of the hematopoietic phosphatase SHP-1. *J Virol* **80**: 5678-85.

Nishigaki K, Hanson C, Ohashi T, Thompson D, Muszynski K, Ruscetti S (2000). Erythroid cells rendered erythropoietin independent by infection with Friend spleen focus-forming virus show constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase: involvement of insulin receptor substrate-related adapter proteins. *J Virol* **74**: 3037-45.

Okuno Y, Huang G, Rosenbauer F, Evans EK, Radomska HS, Iwasaki H *et al* (2005). Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Mol Cell Biol* **25**: 2832-45.

Patel NA, Kaneko S, Apostolatos HS, Bae SS, Watson JE, Davidowitz K *et al* (2005). Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase CbetaII alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *J Biol Chem* **280**: 14302-9.

Paul R, Schuetze S, Kozak SL, Kozak CA, Kabat D (1991). The Sfpi-1 proviral integration site of Friend erythroleukemia encodes the ets-related transcription factor Pu.1. *J Virol* **65**: 464-7.

Pongubala JM, Van Beveren C, Nagulapalli S, Klemsz MJ, McKercher SR, Maki RA *et al* (1993). Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation. *Science* **259**: 1622-5.

Rao G, Rekhtman N, Cheng G, Krasikov T, Skoultchi AI (1997). Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. *Oncogene* **14**: 123-31.

Rekhtman N, Radparvar F, Evans T, Skoultchi AI (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* **13**: 1398-411.

Rieske P, Pongubala JM (2001). AKT induces transcriptional activity of PU.1 through phosphorylation-mediated modifications within its transactivation domain. *J Biol Chem* **276**: 8460-8.

Sanjuan MA, Jones DR, Izquierdo M, Merida I (2001). Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. *J Cell Biol* **153**: 207-20.

Schuetze S, Paul R, Gliniak BC, Kabat D (1992). Role of the PU.1 transcription factor in controlling differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* **12**: 2967-75.

Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**: 1573-7.

Sivertsen EA, Hystad ME, Gutzkow KB, Dosen G, Smeland EB, Blomhoff HK *et al* (2006).

PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *Br J Haematol* **135**: 117-28.

Tarn WY (2007). Cellular signals modulate alternative splicing. *J Biomed Sci* **14**: 517-22.

Théoleyre O, Deguillien M, Morinière M, Starck J, Moreau-Gachelin F, Morlé F *et al* (2004).

Spi-1/PU.1 but not Fli-1 inhibits erythroid-specific alternative splicing of 4.1R pre-mRNA in murine erythroleukemia cells. *Oncogene* **23**: 920-7.

Yamada T, Kondoh N, Matsumoto M, Yoshida M, Maekawa A, Oikawa T (1997).

Overexpression of PU.1 induces growth and differentiation inhibition and apoptotic cell death in murine erythroleukemia cells. *Blood* **89**: 1383-93.

Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS *et al* (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8705-10.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. I. Merida (Dept of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnologia, Madrid, Spain) for pEFbosEGFP\_C1 plasmid, Dr. F. Moreau-Gachelin (Inserm U830, Institut Curie, Paris, France) for anti-Spi-1/PU.1 antibody, G. Giraud for helping with the CHIP assay, and Dr. G. Mouchiroud and Dr. F. Morlé (CGMC, Villeurbanne, France) for sharing reagents, including anti-p85 antibody.

This work was supported by grants from the "Ligue contre le Cancer, Comité de la Loire".

Authors were supported by the INSERM, the "Ligue contre le Cancer, Comité de la Loire", the "Ligue contre le Cancer, Comité du Doubs"

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## LEGENDS TO FIGURES

### **Figure 1: PI3K/AKT inhibition results in differentiation of Friend erythroleukemia cells**

**A:** Immunoblot analysis of p85 subunit of PI3K using an anti-p85 antibody in untreated (-) SFFV erythroleukemia cells, or cells treated with DMSO (D), 10 $\mu$ M LY294002 (L10) or 20 $\mu$ M LY294002 (L20), for 96h. Actin immunoblot is used as a loading control. The antibody reveals both phosphorylated (P-p85) and unphosphorylated (p85) forms of p85 subunit.

**B:** Immunoblot analysis of phosphorylated AKT (P-AKT(Ser473)) using an antibody specifically directed against the phospho-epitope. SFFV cells were exposed to increasing concentrations (5-20  $\mu$ M) of LY294002 for 96 h or to 1.8% DMSO. (-): untreated cells.

**C:** Impact of LY294002 on SFFV cell differentiation. PI3K/AKT signaling was inhibited by adding LY294002 compound at an increasing concentrations (5 to 20  $\mu$ M). Cells cultured without LY294002 inhibitor were induced to differentiate using 1.8% DMSO. Differentiating cells were monitored using benzidine reaction test. Data are the mean of 4 different experiments ( $\pm$ SD).

### **Figure 2: PI3K/AKT inhibition promotes 4.1R exon 16 inclusion in Friend erythroleukemia cells**

Cells were treated with 10 or 20  $\mu$ M LY294002 for 4 days, and 4.1R exon 16 splicing pattern was analyzed by semi-quantitative RT-PCR.

**A:** Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products obtained at a limited number of cycles (22, 24 and 26 cycles). +16 and -16 correspond to PCR fragments containing or missing exon 16, respectively. (-): untreated cells.

**B:** Semi-quantitative analysis of exon 16 splicing expressed as a percentage of  $(+16)/(+16)+(-16)$  ratio. Data were reproducible through 3 different sets of experiments. Percentages are shown as a mean  $\pm$  SD. Cells were treated with 1.8% DMSO, 10  $\mu$ M LY294002 (L10), or 20  $\mu$ M LY294002 (L20).

### **Figure 3: Inhibition of PI3K/AKT signaling downregulates Spi-1/PU.1 expression**

MEL cells were cultured in the presence of increasing concentration of LY294002 inhibitor (LY29): 0 to 20  $\mu$ M (L0 to L20, respectively).

**A.** Immunoblot analysis of Spi-1/PU.1 protein expression. Grb2 immunoblot is used as a loading control. Note that Spi-1/PU.1 phosphorylated forms (P-PU.1) decrease and globin production increases in an LY294002-dose dependent fashion.

**B.** Real-time RT-PCR analysis of Spi-1/PU.1 mRNA. mRNA steady-state levels are normalized with respect to actin mRNA, used as an internal control. Data are expressed as ratios of normalized Spi-1/PU.1 mRNA for each point to the normalized Spi-1/PU.1 mRNA in absence of the inhibitor. The experiment was performed in triplicate, and data are expressed as means $\pm$ SD. It clearly shows that LY294002 inhibition of PI3K/AKT signaling alters Spi-1/PU.1 mRNA production in a dose-dependent manner.

#### **Figure 4: ChIP analysis of Spi-1/PU.1 autoregulation potential**

The *ets* site, acting as an enhancer in position +20 within the *spi-1/pu.1* gene (PU.1(+20)) was explored for Spi-1/PU.1 protein binding. DNA-protein complexes were immunoprecipitated using either anti-Spi-1/PU.1 antibody or a non-specific anti-p27 antibody. Immunoprecipitated DNA fragments were amplified using primers specific for each gene promoter/enhancer. GAPDH, 129k and 153k were used as negative controls. Nip7 served as a positive control for Spi-1/PU.1 binding (Juban *et al.*,2009) Data are expressed as site occupancy normalized against GAPDH background DNA-protein association.

#### **Figure 5: Inhibition of hemoglobin synthesis and 4.1R erythroid splicing requires Spi-1/PU.1 phosphorylation**

MEL cells were stably transfected with Spi-1/PU.1 recombinant plasmids, expressing different levels of Spi-1/PU.1 (see Methods' section). One clone expressing low level of Spi-1/PU.1 (l-PU.1+) and one clone expressing high level of Spi-1/PU.1 (h-PU.1+) were investigated for their response to PI3K/AKT signaling inhibition.

**A.** Immunoblot analysis of Spi-1/PU.1 expression using anti-Spi-1/PU.1 antibody. Grb2 and actin immunoblots are used as controls.

*Left panels:* Untransfected cells were treated with 10 (L10) or 20 (L20)  $\mu$ M LY294002. Again, LY294002 induces cell differentiation in a dose-dependent manner. Mock cells were transfected with EGFP-containing plasmid. EGFP (~27 kDa) was revealed with anti-GFP antibody, and the endogenous Spi-1/PU.1 (~34-37 kDa) was analyzed by anti-Spi-1/PU.1 antibody. In mock cells,



Spi-1/PU.1 is switched off in a similar fashion as in untransfected cells, in the presence of either DMSO or LY294002.

*Right panel:* Spi-1/PU.1 derived from transfected plasmids is expressed in untreated, as well as in DMSO- or LY294002-treated cells. The upper and middle parts correspond to a same membrane probed with anti-Spi-1/PU.1 antibody. They show the expression of EGFP-PU.1 (~64 kDa) and the endogenous Spi-1/PU.1, respectively. However the upper part is a 20 sec exposure, whereas the middle part is a 60 sec exposure. The percentage of benzidine positive cells is indicated for one set of experiments. The experiment was reproducible at least through three cell cultures.

**B.** Semi-quantitative analysis of exon 16 splicing. The exon inclusion is enhanced in untransfected cells and in mock cells, upon exposure to either DMSO or LY294002. In cells overexpressing Spi-1/PU.1, the exon is roughly excluded in all conditions, suggesting that LY294002-mediated inhibition of Spi-1/PU.1 phosphorylation is insufficient to repress exon inclusion.

### **Figure 6: Distinct effects of Spi-1/PU.1 phosphorylation modifications on hemoglobin synthesis and 4.1R splicing**

MEL cells were stably transfected with wildtype Spi-1/PU.1 (WT) or a mutated Spi-1/PU.1, carrying serine to alanine substitution, either at position 41 (S41A) or 148 (S148A). Cells were cultured in the presence (+) or absence (-) of DMSO.

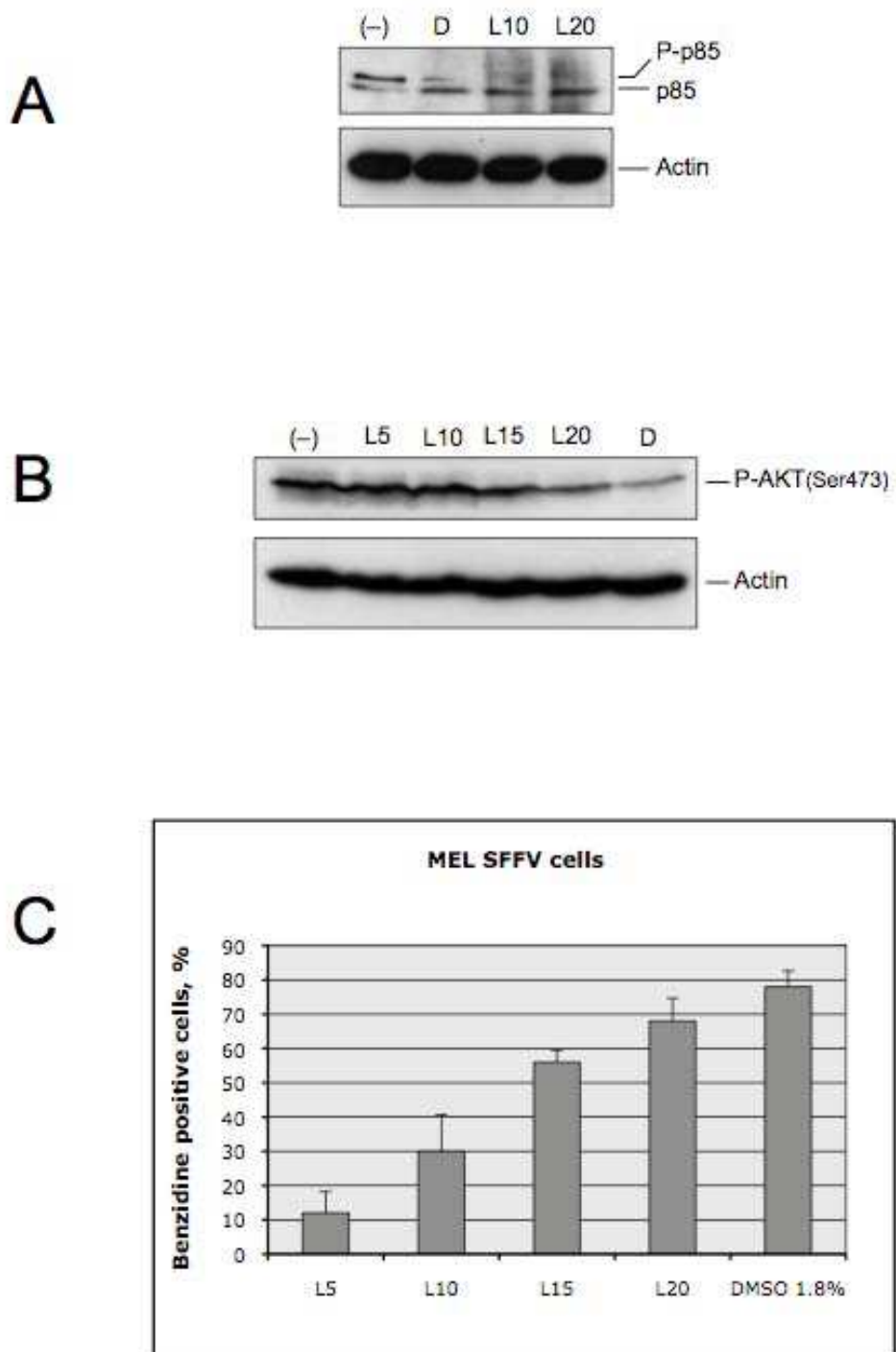
**A.** Immunoblot analysis of Spi-1/PU.1 expression. DMSO exposure induces the downregulation of the endogenous Spi-1/PU.1 but does not affect the expression of the transfected Spi-1/PU.1. Actin immunoblot is used as a loading control. The percentage of benzidine positive cells is indicated for one set of experiments.

**B.** Evaluation of hemoglobin-containing cells in MEL cell clones overexpressing WT or mutant Spi-1/PU.1. Data are given for three independent experiments as means $\pm$ SD.

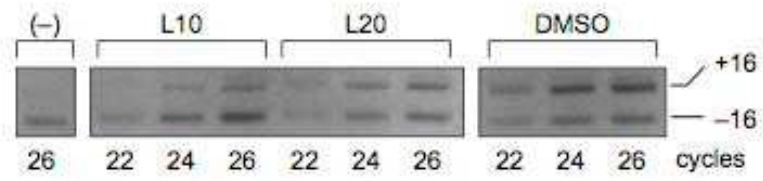
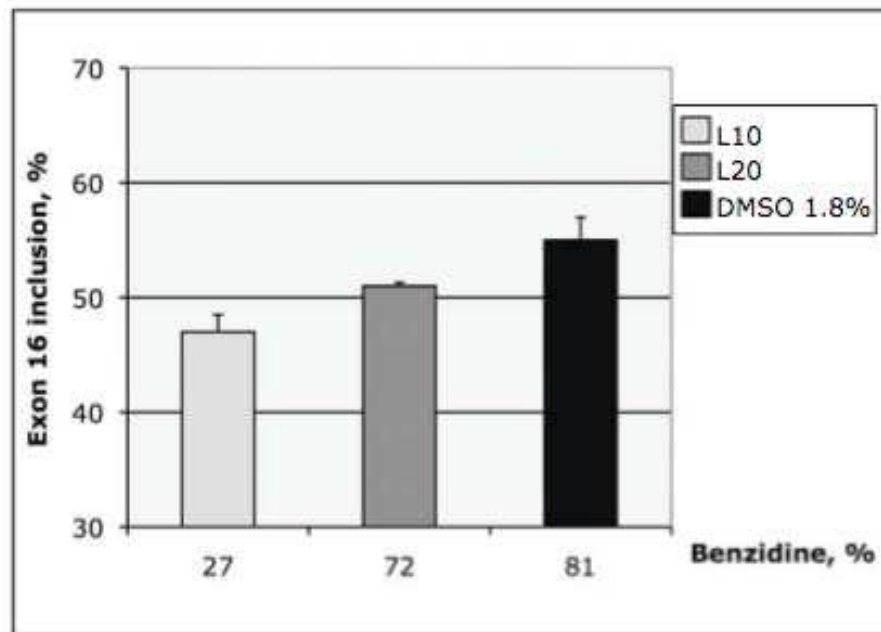
**C.** Semi-quantitative analysis of exon 16 splicing in MEL cells overexpressing WT or mutant Spi-1/PU.1. Mock correspond to cells transfected with vector containing only the EGFP cDNA.

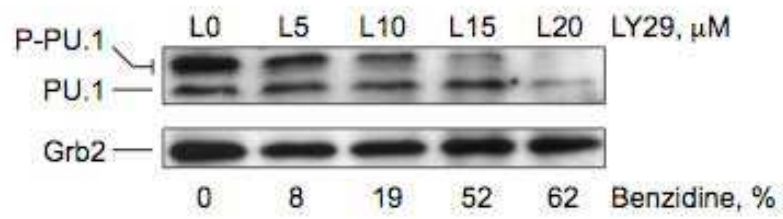
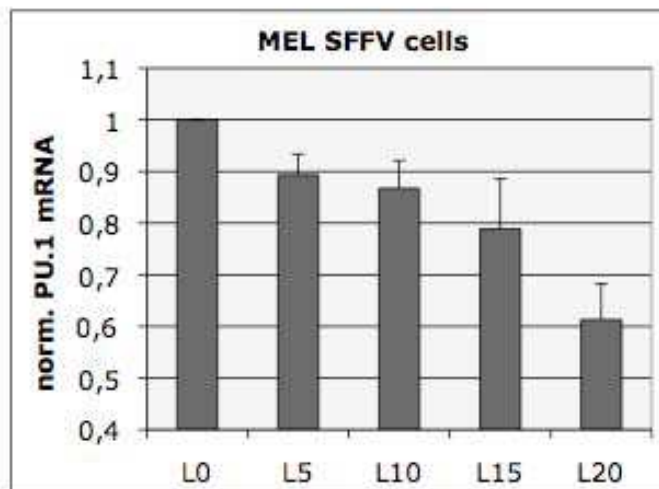
**Figure 7: A model for Spi-1/PU.1 distinct effects on Spi-1/PU.1 autoregulation and on late erythroid events.**

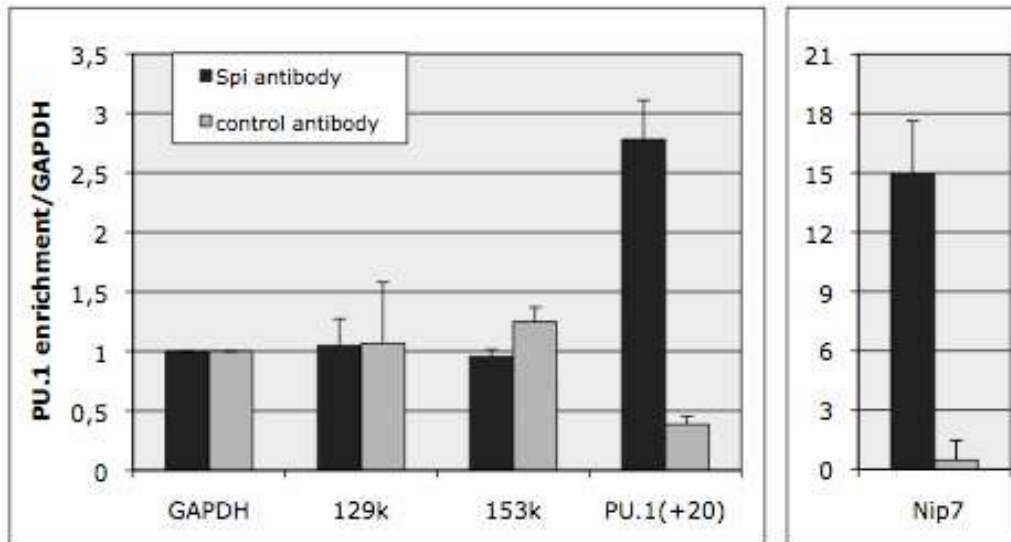
Data gathered from previous works and new data presented here allow to draw this regulatory model. Phosphorylation on serine residue 41 (S41) within the transactivation domain of Spi-1/PU.1 is needed for Spi-1/PU.1 positive autoregulation and for transcription repression of globin genes (Hb). It is also necessary, but insufficient, for Spi-1/PU.1-mediated inhibition of 4.1R exon 16 splicing (Ex16). On the other hand, phosphorylation on serine residue 148 (S148) within the PEST domain of Spi-1/PU.1 is not required for transcription repression of globin genes, and, again, it is necessary, but insufficient, for inhibition of the splicing event.



**Figure 1**

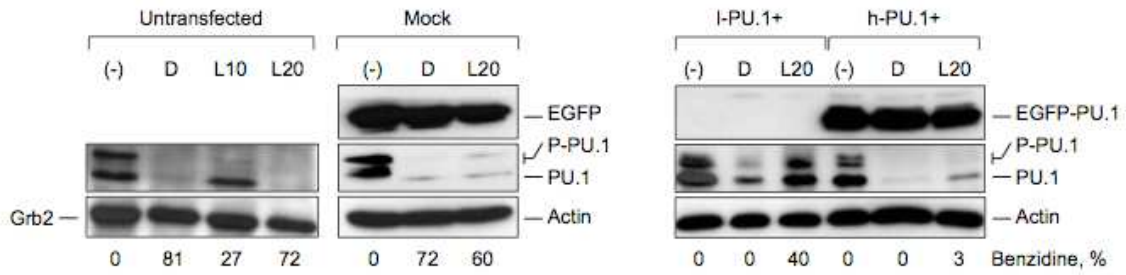
**A****B****Figure 2**

**A****B****Figure 3**

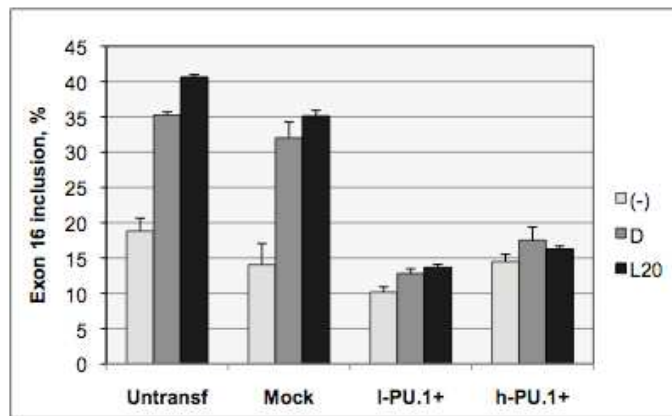


**Figure 4**

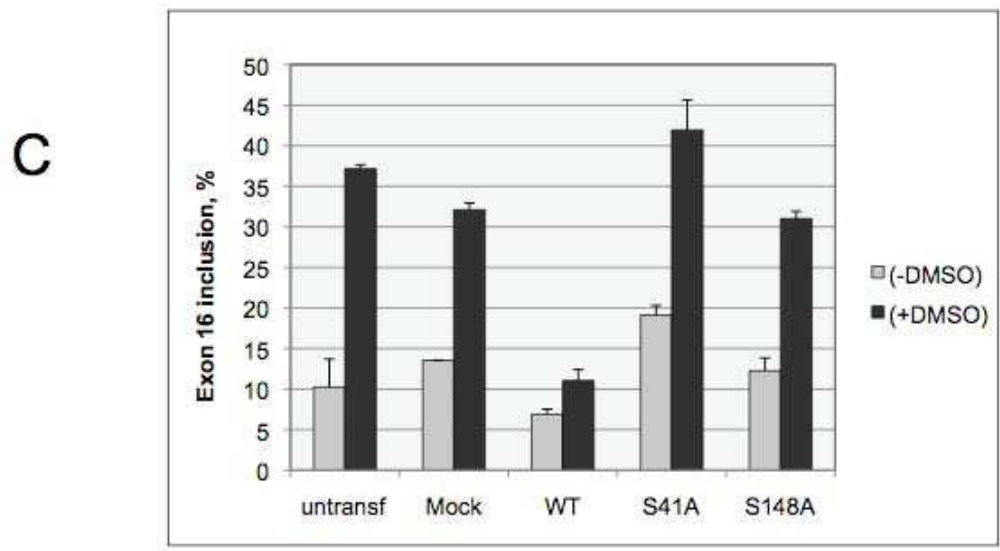
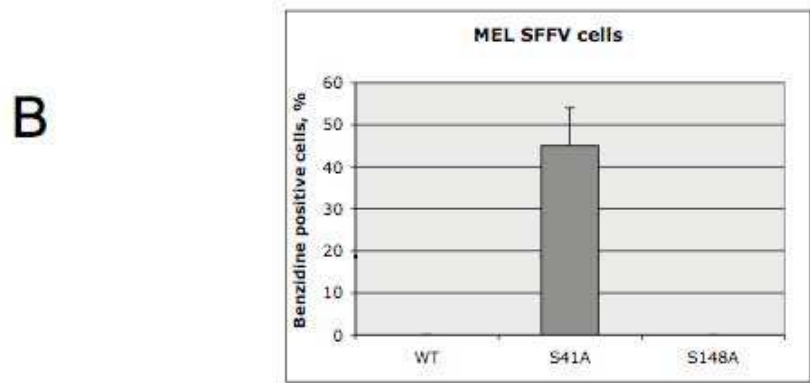
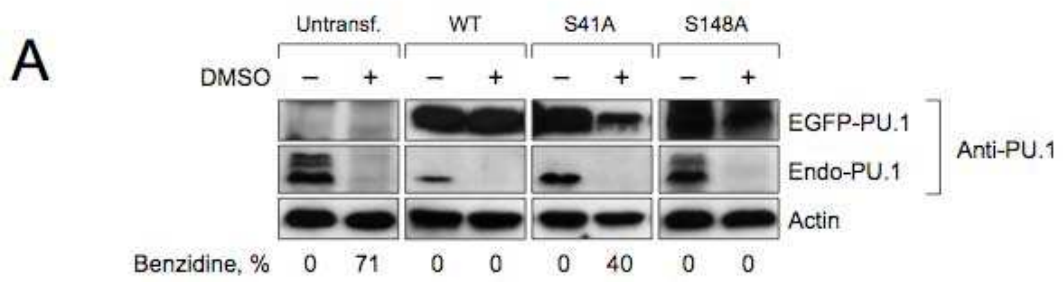
**A**



**B**

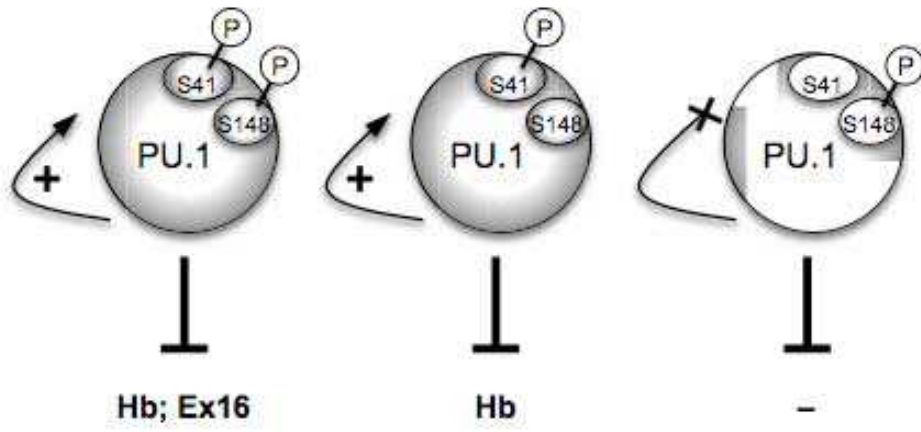


**Figure 5**



**Figure 6**





**Figure 7**

### I.3. Conclusion

Les souris infectées par le complexe de Friend (SFFV+MuLV) développent une érythroleucémie en deux phases:

- Dans la première phase, la glycoprotéine GP55 codée par le gène *env* du virus SFFV active l'EPO-R de façon constitutive résultant en une production massive d'érythroblastes indépendamment de l'érythropoïétine (Li et al., 1990). GP55 interagit aussi et active la sf-STK, une forme tronquée du récepteur STK. Cette activation contribue aussi à une prolifération érythroïde accrue (Nishigaki et al., 2001; Persons et al., 1999). A ce stade du développement de la maladie, les érythroblastes sont capables de se différencier en globules rouges après traitement par l'érythropoïétine.
- La deuxième phase est marquée par la dérégulation de l'expression de Spi-1/PU.1. La surexpression de Spi-1/PU.1 aboutit à des érythroblastes leucémiques indépendants de l'érythropoïétine pouvant proliférer indéfiniment. Après plusieurs semaines d'infection, le provirus SFFV s'intègre en amont du locus codant le gène *pu.1*. Cette insertion active sa transcription par l'introduction du LTR capable d'activer le promoteur du gène *pu.1* (Moreau-Gachelin et al., 1988; Paul et al., 1989; Paul et al., 1991).

Dans cette étude, nous proposons un mécanisme par lequel Spi-1/PU.1 intervient dans l'inhibition de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend (MEL) et dans l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R. Nous montrons que la protéine Spi-1/PU.1 se lie sur son propre promoteur pour activer la transcription du gène *pu.1*. L'activité transcriptionnelle de Spi-1/PU.1 est dépendante de son état de phosphorylation par la PI3K/Akt. En effet, La PI3K/Akt phosphoryle Spi-1/PU.1 sur la sérine 41 du domaine de transactivation, ainsi la forme phosphorylée est responsable de l'activité transcriptionnelle. L'inhibition de la PI3K par le Ly294002 bloque l'expression de Spi-1/PU.1 de façon dose dépendante et en cascade : elle inhibe d'abord la phosphorylation de Spi-1/PU.1 par Akt puis entraîne le blocage de la boucle d'auto-régulation. La diminution de l'expression de Spi-1/PU.1 est responsable du rétablissement de la différenciation des cellules MEL ainsi que de l'activation de certains événements qui accompagnent cette différenciation, comme l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R.

Nos résultats constituent une preuve qui appuie fortement les données de la littérature qui montrent que la surexpression de l'oncogène Spi-1/PU.1 est indispensable pour l'inhibition de la différenciation et pour le maintien de la prolifération des cellules érythroleucémiques de Friend.

L'infection des cellules de la moelle osseuse par le virus SFFV immortalise ces cellules et génère des érythroblastes qui ont une grande capacité d'auto-renouvellement. (Ruscetti 1999). Des souris transgéniques exprimant PU.1 sous le contrôle de la région LTR du SFFV, reproduisent le même aspect des érythroleucémies de Friend, validant le rôle de Spi-1/PU.1 dans ce processus (Chen et al., 1996).

L'inhibition de l'expression de Spi-1/PU.1 grâce à un oligonucléotide anti-sens empêche la prolifération des cellules MEL (Delgado et al., 1994). L'extinction de Spi-1/PU.1 par RNAi est suffisante pour induire la différenciation érythroïde en absence d'inducteur (Atar and Levi, 2005; Blaybel et al., 2008; Rimmele et al., 2007).

Nous montrons aussi que dans les cellules MEL, l'expression de Spi-1/PU.1 est sous la dépendance de la signalisation par la PI3K/Akt. L'activation constitutive de la voie PI3K est l'un des évènements qui accompagnent la différenciation de l'érythroleucémie de Friend. L'Epo-R activé par la GP55 déclenche de façon constitutive les voies de signalisation de la PI3-kinase et de la MAP-kinase. Nous proposons que l'inhibition de la différenciation des cellules MEL par Spi-1/PU.1 nécessite aussi l'intervention d'une signalisation PI3K/Akt active. Cette conclusion est en parfait accord avec les données de la littérature. En effet, il a été montré que la seule expression de Spi-1/PU.1 en présence d'une signalisation active (Epo-R actif) est capable d'activer la prolifération et d'inhiber la différenciation des érythroblastes aviaires (Pereira et al., 2000; Quang et al., 1997).

L'étude d'Afrikanova et al en 2002 a montré que la co-expression de Spi-1/PU.1 et de la protéine GP55 (SFFV) dans des cellules érythroïdes résulte en une activation de la régulation de la transcription de Spi-1/PU.1 indépendamment de l'insertion virale du SFFV dans le locus codant Spi-1/PU.1 et indépendamment de l'érythropoïétine (Afrikanova et al., 2002). Cet effet est dû dans un premier temps à l'activation de l'Epo-R par la protéine GP55. Ce mécanisme est responsable du développement de l'érythroleucémie.

Cette étude permet de conclure que la régulation de l'expression de Spi-1/PU.1 commence dès la première phase du développement de l'érythroleucémie et que son expression élevée est nécessaire au maintien du phénotype des cellules érythroleucémiques durant et après la deuxième phase de la maladie.

Une étude récente a montré de la même façon, que Stat3 active le développement de l'érythroleucémie en induisant l'expression de Spi-1/PU.1 (Hegde et al., 2009). Cette étude est une nouvelle preuve de l'importance de la régulation de l'expression de Spi-1/PU.1 par la signalisation qui découle de l'Epo-R dans le développement et le maintien de l'érythroleucémie de Friend.

Par ailleurs, dans notre étude nous avons identifié le mécanisme de régulation de l'expression de Spi-1/PU.1 par la signalisation PI3K/Akt. La régulation de l'expression de Spi-1/PU.1 a été étudiée dans des systèmes myéloïdes (Chen et al., 1995) et dans les lymphocytes B (Chen et al., 1996; Kistler et al., 1995). Ces études ont montré que l'expression de Spi-1/PU.1 est régulée par de nombreux facteurs qui se lient sur des séquences spécifiques du promoteur. Chen et al ont proposé un mécanisme d'autorégulation de Spi-1/PU.1 dans les cellules myéloïdes (Chen et al., 1995). Notre étude montre pour la première fois l'autorégulation de Spi-1/PU.1 dans des cellules érythroïdes. Par des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine, nous montrons la liaison directe de Spi-1/PU.1 sur son gène codant (*pu.1*).

La régulation d'un événement cellulaire par une protéine donnée, dépend en principe de l'état (modification post-traductionnelle surtout par phosphorylation) et/ou de la quantité de la protéine.

Une expression faible de Spi-1/PU.1 a été décrite dans les érythroblastes immatures, tandis que cette expression est éteinte dans les cellules matures (Hromas et al., 1993). Durant le passage de la première à la deuxième phase de développement de l'érythroleucémie de Friend, la dérégulation de l'expression de Spi-1/PU.1 inhibe la capacité des proérythroblastes à se différencier.

Les cellules MEL expriment une quantité importante de protéine Spi-1/PU.1. L'induction de la différenciation des cellules MEL par le DMSO est accompagnée d'une décroissance du niveau d'expression de Spi-1/PU.1 (Schuetze et al., 1992), la surexpression de Spi-1/PU.1 (transfection d'un plasmide codant la protéine Spi-1/PU.1) inhibe la différenciation des cellules MEL en présence du DMSO (Theoleyre et al., 2004; Yamada et al., 1997).

Ces données montrent l'importance du niveau d'expression de Spi-1/PU.1 pour l'inhibition de la différenciation érythroïde et pour le passage de la première à la deuxième phase de développement de la leucémie de Friend.

L'implication de la PI3K dans la régulation de l'expression de Spi-1/PU.1 a été étudiée dans les cellules MEL. L'inhibition de la PI3K bloque la boucle d'autorégulation de Spi-1/PU.1 ce qui conduit à l'activation de la différenciation et de l'épissage de l'exon 16.

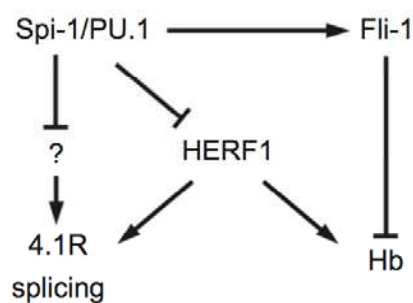
Nos résultats montrent que l'inhibition de la PI3K est incapable d'activer la différenciation des clones MEL qui expriment des quantités élevées de Spi-1/PU.1 (h-PU.1). Tandis que dans des clones MEL qui expriment faiblement Spi-1/PU.1 (l-PU.1) on observe une activation de la différenciation suite à l'inhibition de la PI3K. Nous montrons ainsi l'existence d'un effet de titration entre le niveau d'expression de Spi-1/PU.1 et son état de phosphorylation. Ces résultats sont en accord avec l'étude d'Afrikanova et al, qui montre que la régulation de la transcription de Spi-1/PU.1 dans des clones MEL diffère selon la quantité de la protéine exogène présente (Afrikanova et al., 2002).

Nos résultats décrivent la régulation de deux événements différents par Spi-1/PU.1 : l'inhibition de la différenciation des cellules MEL et l'inhibition de l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R. Ces régulations font intervenir donc la capacité de Spi-1/PU.1 à réguler la transcription des gènes érythroïdes (et sa propre transcription) et la capacité à intervenir dans la régulation de l'épissage. Il a été montré dans la littérature l'importance de chaque domaine de Spi-1/PU.1 pour ces diverses activités. En effet, la protéine Spi-1/PU.1 est divisée en trois domaines fonctionnels, le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine central PEST et le domaine de transactivation (TAD) situé à l'extrémité N-terminal (voir chapitre II, partie 8.4.1).

Nous montrons que la sérine 41 (domaine TAD) est nécessaire pour que Spi-1/PU.1 inhibe la production d'hémoglobine dans les cellules MEL, alors que la sérine 148 n'est pas nécessaire pour cette activité. En revanche, nous montrons que les deux sérines 41 et 148 sont impliquées dans le rôle de Spi-1/PU.1 pour inhiber l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R. La sérine 41 est une cible de phosphorylation par la PI3K/Akt (Rieske and Pongubala, 2001). La sérine 148 a été décrite comme site de phosphorylation par la caséine kinase II (Lodie et al., 1997; Pongubala et al., 1993). Nos résultats montrent l'importance des voies de signalisation et l'importance de la phosphorylation pour les diverses activités de Spi-1/PU.1.

En résumé, nous montrons que Spi-1/PU.1 inhibe la différenciation des cellules MEL par une voie dépendante de la PI3K/Akt et qui implique son domaine TAD (sérine 41). L'inhibition de l'épissage de l'exon 16, quant à elle passe, par deux voies : l'une dépendante de la PI3K et qui implique le domaine TAD (sérine 41), l'autre indépendante de la PI3K et qui implique le domaine PEST (sérine 148). Chacune de ces deux voies est nécessaire mais insuffisante pour l'inhibition de l'épissage de l'exon 16 par Spi-1/PU.1.

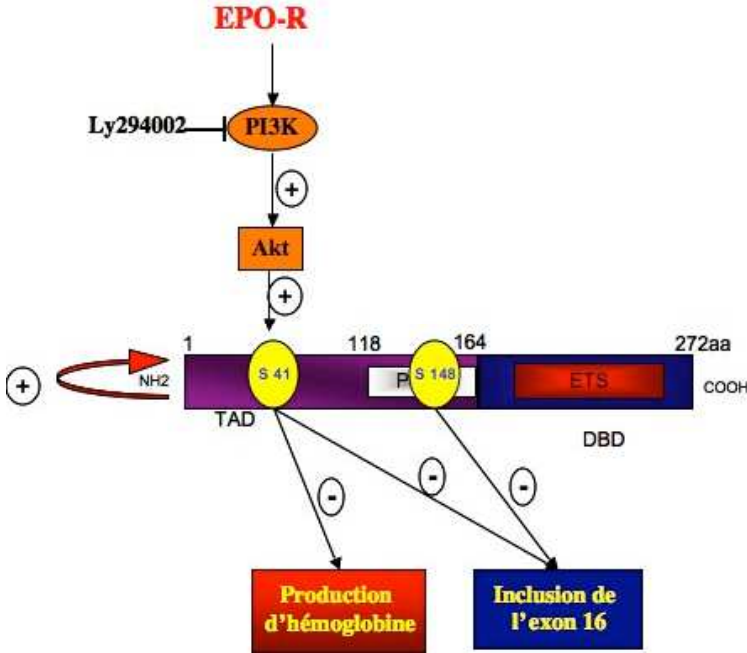
Avec ces résultats, on propose de nouveau le schéma établi par l'équipe qui supposait que Spi-1/PU.1 agit par des voies différentes sur l'épissage et sur la production d'hémoglobine sans négliger l'existence de facteurs communs entre ces voies (Blaybel et al., 2008).



Dans cette étude, Rand BLAYBEL (ex-doctorante de l'équipe) a montré que HERF-1 joue un rôle crucial (nécessaire mais insuffisant) dans la différenciation des cellules MEL et précisément dans la reconnaissance de l'exon 16 dans l'ARN pré-messager 4.1R. L'extinction de HERF-1 inhibe ces deux événements. En plus, elle a montré que Spi-1/PU.1 inhibe l'expression de HERF-1. Dans son schéma, elle propose HERF-1 comme un facteur commun appartenant aux deux voies par lesquelles Spi-1/PU.1 agit sur l'épissage et sur la production d'hémoglobine (Blaybel et al., 2008).

Nos résultats sur l'importance des domaines PEST et TAD dans l'activité érythroïde Spi-1/PU.1 sont en accord avec les différentes études de la littérature qui se sont focalisées sur l'importance des divers domaines fonctionnels de Spi-1/PU.1. Le domaine TAD ainsi que le domaine DBD sont nécessaires pour l'inhibition de la différenciation des cellules MEL par Spi-1/PU.1 par antagonisme fonctionnel avec GATA-1 (via son domaine C-terminal à doigt de Zinc) (Nerlov et al., 2000; Rekhtman et al., 2003; Zhang et al., 2000). L'étude de Delva et al., a montré l'importance du domaine PEST dans l'activité d'épissage de Spi-1/PU.1 (Delva et al., 2004). Ce domaine en association avec le domaine DBD est nécessaire pour l'effet de Spi-1/PU.1 dans la sélection de site d'épissage 5'.

En conclusion, les résultats obtenus dans notre étude nous permettent d'établir un modèle de la régulation de l'expression de Spi-1/PU.1, ainsi de la régulation par Spi-1/PU.1 de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend et de l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R.

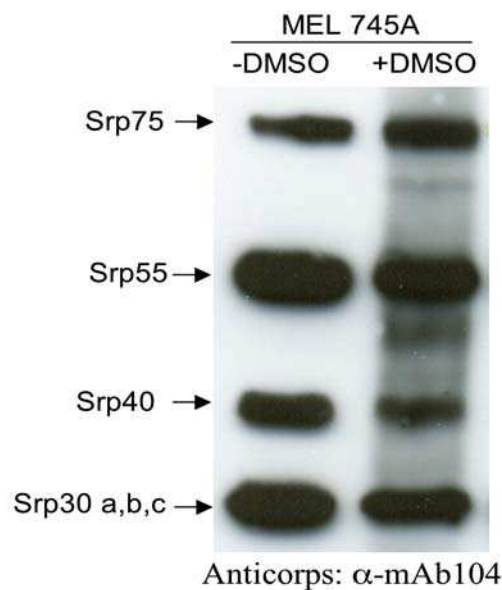


## II. Rôle de la protéine SRP40 dans la régulation de l'épissage de l'exon 16 du pré-messager 4.1R

### II.1.1. Analyse de l'expression protéique des facteurs d'épissage SR

J'ai analysé le profil d'expression des protéines SR au cours de la différenciation érythroïde, par Western blot avec un anticorps monoclonal mAb104 dirigé contre le phospho-épitope RS des protéines SR (Roth et al., 1990; Roth et al., 1991). L'analyse a été faite sur des extraits protéiques totaux de cellules MEL 745A induites ou non à la différenciation érythroïde durant 4 jours (**Figure 44**).

Le Western blot montre globalement une baisse d'expression de la plupart des protéines SR après induction de la différenciation érythroïde à l'exception de la protéine Srp75. La diminution de Srp40 est importante. En revanche, la diminution du taux de protéines Srp55 ainsi que celle de la bande de 30 kDa regroupant trois protéines dont SF2/ASF est moins importante.



**Figure 44** : Variation de l'expression des protéines SR au cours de la différenciation des cellules MEL 745A. Western blot réalisé sur des extraits protéiques totaux provenant des cellules MEL 745A non induites (-DMSO) et induites à la différenciation durant 4 jours (+DMSO)



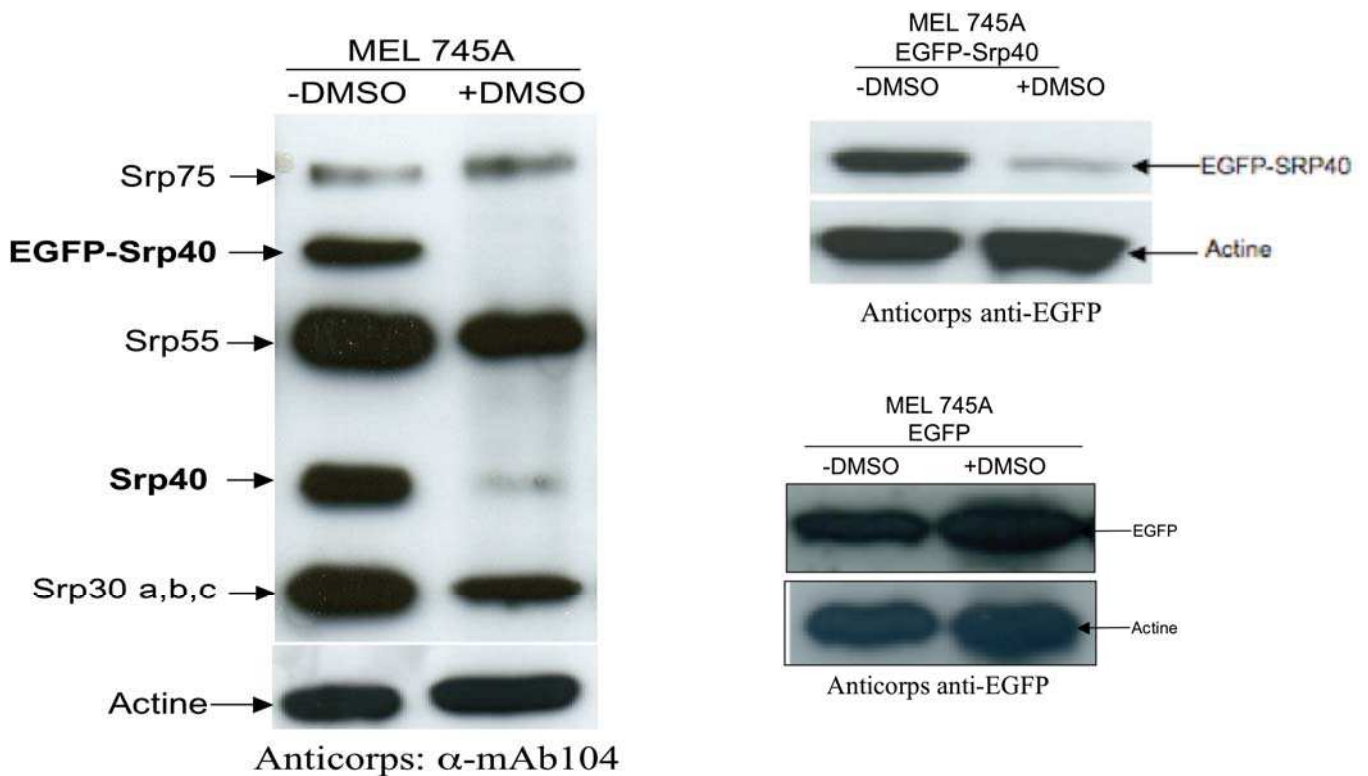
La diminution au niveau de la bande à 30 kDa peut ne pas être en contradiction avec les résultats de Yang et al qui montrent une augmentation de SF2/ASF au cours de la différenciation érythroïde (Yang et al., 2005). En effet, dans son étude, il a utilisé un anticorps spécifique de SF2/ASF. Tandis que notre anticorps mAb104 détecte les formes phosphorylées des protéines SF2/ASF, 9G8 et SC35. La diminution de 9G8 et de SC35 pourrait expliquer la baisse au niveau de la bande à 30 kDa.

L'hypothèse d'un rôle inhibiteur dans l'épissage des protéines SR est valable puisque plusieurs études ont décrit un rôle semblable, bien que ces facteurs soient définis en général comme des activateurs d'épissage. Reste que SF2/ASF a été décrit comme activateur de l'épissage de l'exon 16 (Yang et al., 2005). Dans la littérature, il existe des données qui décrivent un rôle contradictoire de deux protéines SR (SF2/ASF et SC35) sur le même processus d'épissage (Gallego et al., 1997).

### **II.1.2. Surexpression de SRP40 dans les cellules MEL 745A**

La surexpression de Srp40 ou sa répression par shRNA inductible dans les cellules MEL a été envisagée pour l'étude du rôle de Srp40 sur l'épissage. En premier temps, Nous avons choisi de surexprimer une protéine de fusion EGFP-SRP40, ce qui permet i) de valider par un anticorps anti-EGFP le résultat de Western blot obtenu avec l'anticorps mAb104, ii) de distinguer l'expression de Srp40 endogène par rapport à l'exogène issu de la transfection, et iii) de suivre la localisation cellulaire de Srp40 au cours de la différenciation.

Les deux Western blot réalisés avec l'anticorps mAb104 et avec l'anticorps anti-EGFP montrent une diminution importante de l'expression de Srp40 au cours de la différenciation (**Figure 45**). La protéine EGFP exprimée seule dans les cellules MEL 745A ne diminue pas au cours de la différenciation. La diminution de l'expression de EGFP-Srp40 bien que contrôlée par le promoteur EFbos du vecteur nous laisse penser que la dégradation de Srp40

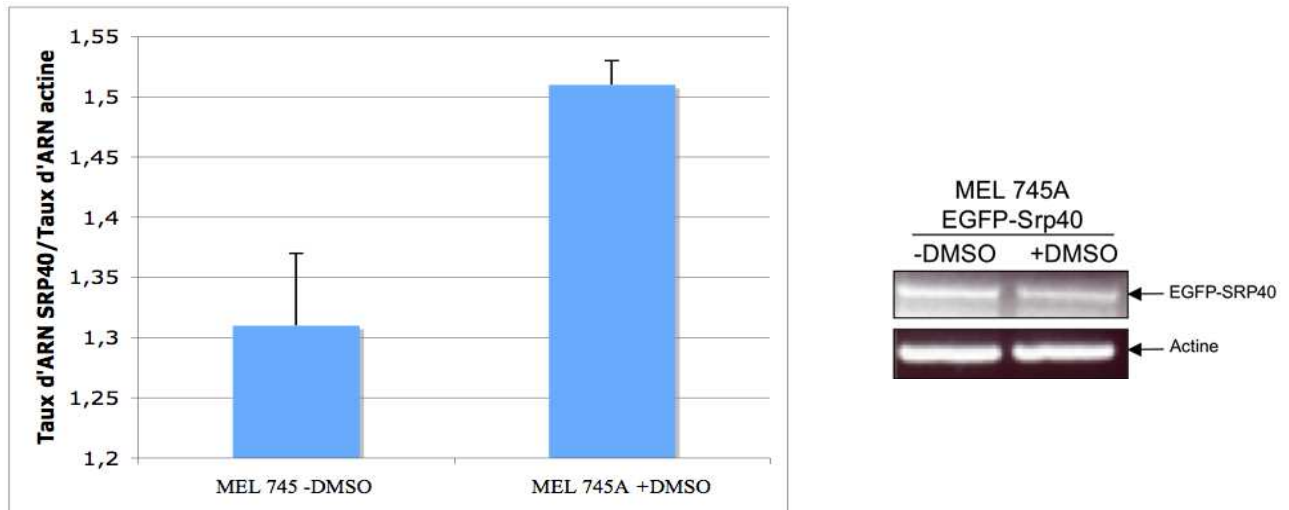


**Figure 45** : Surexpression d'EGFP-Srp40 dans les cellules MEL 745A. (a,b) Westernblot réalisés sur des extraits protéiques d'un clone cellulaire exprimant la protéine de fusion EGFP-Srp40. (c) Westernblot réalisé sur des extraits provenant d'un clone cellulaire exprimant l'EGFP.

au cours de la différenciation s'effectue soit au niveau du transcrit soit au niveau de la protéine.

### II.1.3. L'expression en ARNm de Srp40 augmente au cours de la différenciation

La quantification par RT-PCR semi quantitative montre une augmentation de l'expression en ARNm de Srp40 endogène (**Figure 46**). En revanche, l'analyse par RT-PCR montre que l'ARN codant la protéine de fusion EGFP-SRP40 reste inchangé au cours de la différenciation.



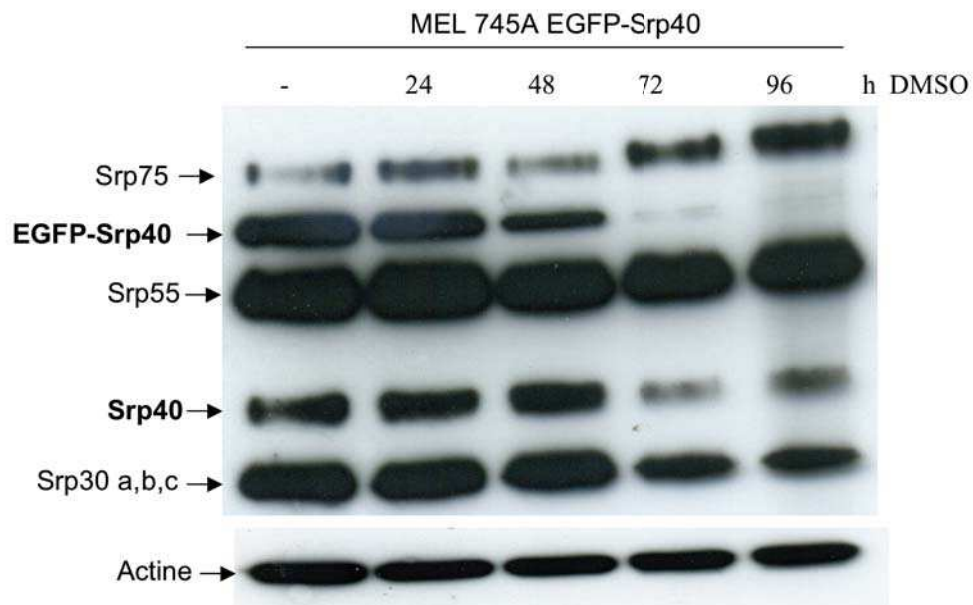
**Figure 46 :** Variation de l'expression en ARN de Srp40 et d'EGFP-Srp40. (a) RT-PCR semi-quantitative réalisée sur des ARN extraits à partir des cellules MEL 745A non induites (-DMSO) et induites à la différenciation durant 4jours (+DMSO).(b) RT-PCR réalisées sur des ARN extraits à partir d'un clone cellulaire MEL 745A exprimant l'EGFP-Srp40 non induites (-DMSO) et induites à la différenciation durant 4jours (+DMSO).

Ces résultats éliminent en premier temps la possibilité de dégradation de l'ARNm par le système NMD. L'augmentation d'expression en ARNm et la diminution de l'expression protéique pourraient être expliquées soit par l'inhibition de la traduction de l'ARNm soit par la dégradation de la protéine au cours de la différenciation.

#### II.1.4. Cinétique de la diminution de l'expression de Srp40 au cours de la différenciation

J'ai suivi la diminution de l'expression protéique de Srp40 au cours de la différenciation érythroïde. Une chute de l'expression de Srp40 endogène ainsi que de Srp40 exogène (EGFP-Srp40) se produit après 48 heures d'induction de la différenciation (**Figure 47**). L'expression de l'endogène reste inchangée entre 0 et 48 heures tandis que pour EGFP-Srp40 on observe une légère diminution dès 24 heures de différenciation.

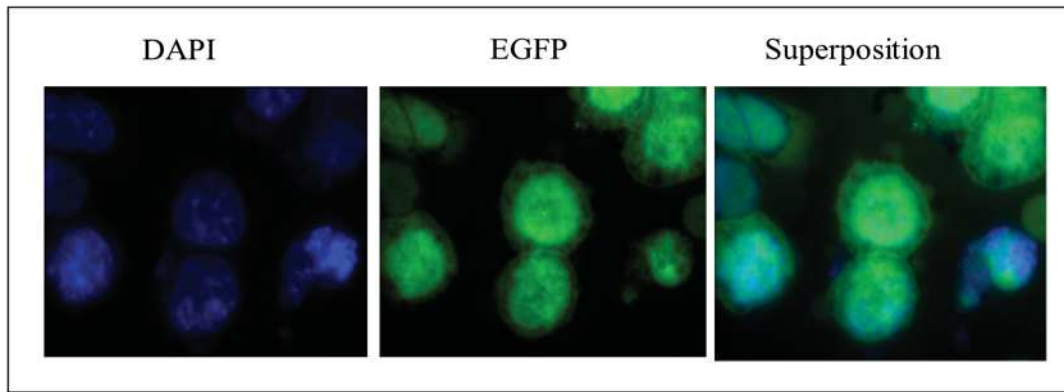
L'expression de Srp75 présente un profil intéressant. Elle augmente à partir de 48 heures de différenciation. Cette augmentation corrèle avec la diminution de l'expression de Srp40. Cette observation permet de poser de nouveau la question de la redondance des protéines SR.



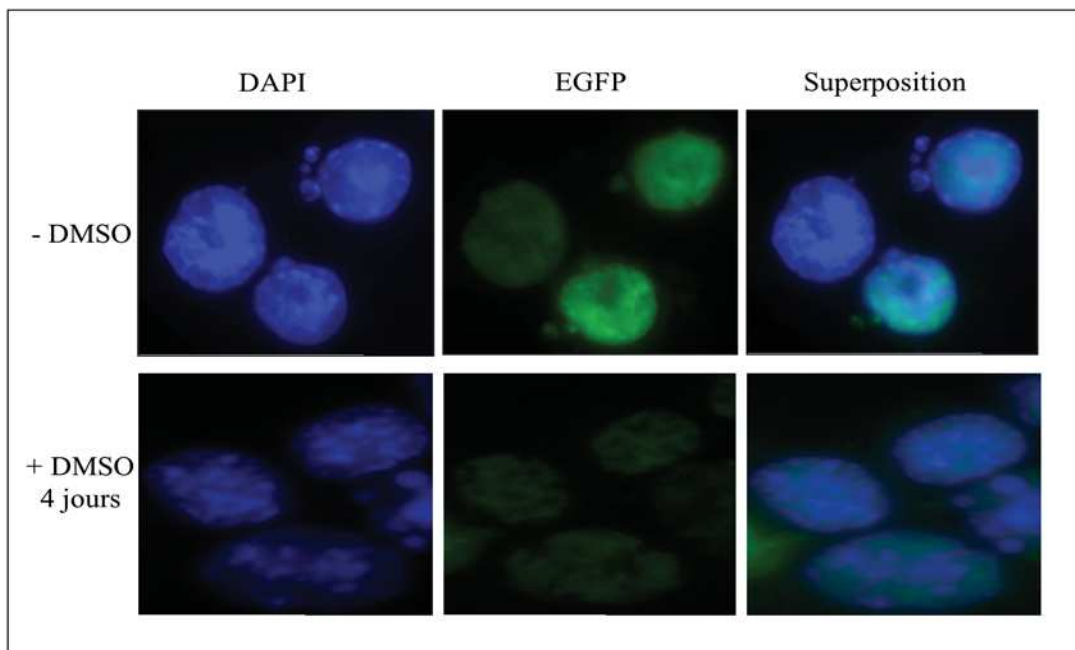
**Figure 47** : Variation de l'expression des protéines SR avec le temps dans les cellules MEL 745A induites à la différenciation par le DMSO.

### II.1.5. Srp40 est localisée dans le noyau lors de la différenciation érythroïde

La localisation cellulaire joue un rôle important sur la fonction des protéines SR. Caceres et al ont montré que les trois protéines SR SRp20, 9G8 et SF2/ASF se délocalisent en continu (shuttling proteins) entre le noyau et le cytoplasme, tandis que les autres (SRp40 inclus) restent nucléaires (Caceres et al., 1998). Cependant, ils n'ont pas exclu que les autres protéines SR puissent aussi dans d'autres conditions se déplacer entre le noyau et le cytoplasme. Afin de comprendre la diminution de Srp40, j'ai suivi la localisation de la protéine de fusion EGFP-Srp40 dans les cellules MEL 745A entre l'état non différencié et l'état différencié par rapport à un marquage du noyau au DAPI.



Localisation cellulaire de la protéine EGFP dans les cellules MEL 745A non induites à la différenciation



**Figure 48** : Visualisation en microscopie à fluorescence de la localisation cellulaire de la protéine de fusion EGFP-Srp40 dans les cellules MEL 745A non induites (-DMSO) et induites à la différenciation durant 4 jours (+DMSO).

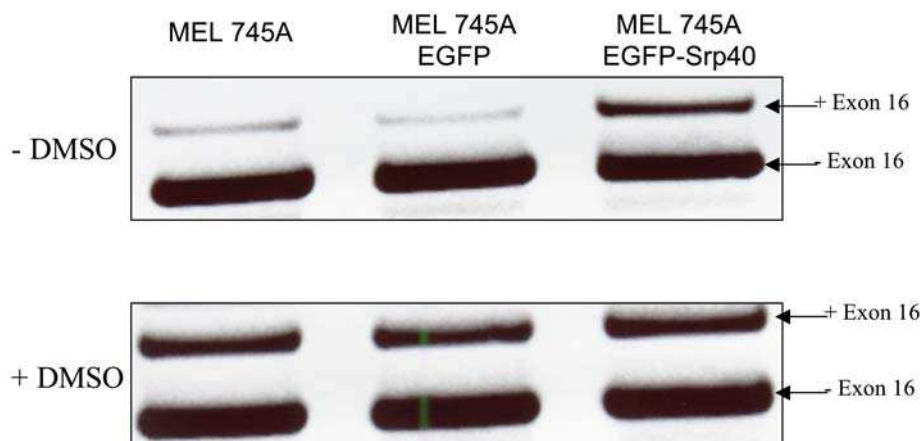
D'après la figure (**Figure 48**) il apparaît que la protéine de fusion EGFP-Srp40, lorsque les cellules MEL 745A sont non différenciées, est située uniquement et de manière uniforme dans le noyau. Lorsque ces cellules sont induites à se différencier par le DMSO, la protéine conserve sa localisation nucléaire uniforme dans le noyau avec une diminution de l'intensité de fluorescence due à la diminution de l'expression de la protéine. L'EGFP toute seule est localisée dans les deux compartiments nucléaire et cytoplasmique. Ce résultat est en accord avec l'étude de Caceres et al (Caceres et al., 1998).

## II.1.6 Srp40 active l'inclusion de l'exon 16 dans les cellules MEL 745A indépendamment de la différenciation

Afin d'identifier le rôle de Srp40 sur l'épissage de l'exon 16, j'ai réalisé des RT-PCR pour amplifier l'ARNm avec ou sans exon 16 soit dans les cellules MEL 745A qui expriment l'EGFP-Srp40, soit dans les cellules qui expriment l'EGFP et aussi dans les cellules non transfectées.

D'une façon surprenante et en contradiction avec notre hypothèse de départ fondée sur l'expression des protéines SR au cours de la différenciation, les résultats montrent une activation flagrante de l'inclusion de l'exon 16 dans les cellules qui expriment la protéine EGFP-Srp40 indépendamment de la différenciation (**Figure 49**). L'EGFP seule n'a pas d'effet sur l'inclusion de l'exon 16 qui reste basale comme dans les cellules MEL 745A.

Du fait de la chute de l'expression de Srp40 dans le clone MEL 745A EGFP-Srp40, quatre jours après l'induction de la différenciation, le niveau d'activation de l'inclusion de l'exon 16 dans les cellules exprimant EGFP-Srp40 est équivalent à celui observé dans les cellules exprimant l'EGFP seule et dans les cellules MEL 745A non transfectées.



**Figure 49** : Effet de la surexpression de Srp40 sur l'épissage de l'exon 16 dans les cellules MEL 745A non induites (-DMSO) et induites à la différenciation durant 4jours (+DMSO). RT-PCR réalisée sur des ARN extraits à partir: des cellules MEL 745A non transfectées, clone cellulaire MEL 745A exprimant l'EGFP et clone cellulaire MEL 745A exprimant l'EGFP-Srp40.

## II.2. Discussion

Les membres de la famille des protéines SR sont les régulateurs d'épissage les mieux caractérisés chez les mammifères. Ces protéines présentent entre elles une grande homologie structurale et fonctionnelle (voir chapitre I, partie 5.2.1).

SRp40 est l'un des facteurs d'épissage les plus étudiés parmi les membres de la famille des protéines SR. Plusieurs études ont montré un rôle activateur de SRp40 dans le processus d'épissage (Patel et al., 2001; Tyson-Capper et al., 2005; Yan et al., 2009). Certaines études ont visé la caractérisation des mécanismes complets de régulation de l'épissage par SRp40. Ces études ont montré que l'activité de SRp40 était souvent modulée par les voies de transduction du signal (Patel et al., 2001).

Les protéines SR sont phosphorylées au niveau de leur domaine RS sur les résidus sérines (Zahler et al., 1992). La phosphorylation influence la spécificité de liaison à l'ARN, l'activité d'épissage et la localisation subcellulaire des protéines SR et affecte leurs interactions (Mermoud et al., 1994; Sanford and Bruzik, 1999) (voir Chapitre 1, partie 5.2.1.7).

Mes résultats ont montré que Srp40 est un activateur de l'inclusion de l'exon 16 du pré-messager 4.1R.

Les protéines SR se lient sur des séquences *cis* régulatrices pour agir sur l'épissage. Des études précédentes (recherche bioinformatique et mutagenèse dirigée) ont permis l'identification de séquences *cis* régulatrices intervenant dans l'épissage alternatif de l'exon 16. Le motif **AGACTAG** situé à 13 nucléotides de l'extrémité 5' de l'exon 16, a été identifié par recherche bioinformatique comme un ESE qui lie Srp40.

<u>Srp40</u>	<u>SF2/ASF</u>
AAAAAGAGAGAA <b>AGACTAG</b> ATGGTGAAAACATTTATAT <b>CAGACAT</b> AGCAATTTAATGTTGGAG	

Séquences consensus de liaison de Srp40 et de SF2/ASF sur l'exon 16

Jusqu'à ce jour, il n'est pas encore montré par retard sur gel que Srp40 se lie vraiment sur ce motif. Des résultats antérieurs dans l'équipe ont cependant montré que des mutations de ce motif conduisent à une inhibition de l'inclusion de l'exon 16 (Deguillien et al., 2001). Ces

résultats sont en accord avec l'hypothèse que ce motif joue le rôle d'un enhancer pour l'inclusion de l'exon 16 en recrutant Srp40.

### **Srp40 est un activateur stade spécifique de l'inclusion de l'exon 16**

L'inclusion de l'exon 16 est soumise au contrôle de multiples régulateurs (facteurs *trans* qui se fixent sur des éléments *cis*). Un régulateur qui agit sur la reconnaissance de l'exon à l'état non différencié comme à l'état différencié est qualifié de régulateur constitutif. Quand ce régulateur agit sur la reconnaissance de l'exon 16 soit à l'état non différencié soit à l'état différencié celui-ci est un régulateur stade spécifique.

Du fait d'un mécanisme de régulation encore inconnu, Srp40 est présent et fonctionnel seulement dans les cellules MEL non induites à la différenciation.

À l'état non induit, il n'y a pas de reconnaissance de l'exon 16 malgré la présence de Srp40. La surexpression de Srp40 active l'inclusion de l'exon indépendamment de l'induction de la différenciation. Une question se pose : qu'est ce qui empêche Srp40 de faire face à l'inhibition de l'inclusion de l'exon 16 par Spi-1/PU.1, hnRNPA/B ou par d'autres facteurs non encore identifiés, pour activer l'épissage ?

La régulation de l'épissage spécialement par la famille des protéines SR est gouvernée par deux facteurs : i) l'activité des protéines SR, modulée souvent par la phosphorylation, ii) la concentration de ces protéines, augmentée souvent par l'activation de leur synthèse.

Balustein et ses collaborateurs ont montré que c'est l'activité des protéines SR qui intervient dans la régulation de l'épissage du pré-messager de la fibronectine. Les facteurs de croissance activent certaines voies de signalisation dont la voie PI3K/Akt. Cette voie active par phosphorylation les deux protéines SR SF2/ASF et 9G8 qui activent en retour l'inclusion de l'exon EDA du gène de fibronectine (Blaustein et al., 2004); (Blaustein et al., 2005).

Dans leurs études, Patel et ses collaborateurs ont confirmé que c'est l'état de phosphorylation de SRp40 et non la concentration de la protéine qui régule l'inclusion de l'exon IIB du gène de la protéine kinase C. L'insuline stimule la PI3K qui active via Akt la phosphorylation de SRp40. A l'état phosphorylé SRP40 se fixe sur des ISE pour activer l'épissage de l'exon IIB (Patel et al., 2001); (Patel et al., 2005).

L'activation de l'inclusion de l'exon 16 par SF2/ASF au cours de la différenciation érythroïde est accompagnée d'une augmentation de concentration de la protéine (Yang et al., 2005).



Dans nos cellules MEL, les deux voies principales de signalisation PI3K et MEK kinases sont activées d'une façon constitutive. Dans la première partie des résultats, j'ai montré que Spi-1/PU.1 activé par phosphorylation par la voie PI3K inhibe l'inclusion de l'exon 16.

Il est raisonnable de supposer que la protéine Srp40 présente dans les cellules MEL est activée par phosphorylation au moins par la voie PI3K.

Ces données privilègient l'hypothèse que la concentration de Srp40 présente dans les cellules MEL est insuffisante pour activer l'inclusion de l'exon 16.

La régulation de l'épissage résulte d'une balance constituée d'un côté des facteurs activateurs et d'un autre côté des facteurs inhibiteurs. L'augmentation ou la diminution des concentrations de l'un de ces facteurs peut modifier le profil d'épissage.

## **II.3. Matériels et méthodes**

### **II.3.1. Culture cellulaire et induction de la différenciation**

Les cellules MEL 745A sont cultivées à 37°C dans du milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Invitrogen) supplémenté de 10% en sérum de veau fœtal (PAA).

La lignée MEL 745A ( $2.10^5$  cellules/mL) est induite en différenciation dans le milieu IMDM 13% FBS en présence de 1,8% de DMSO. Après 4 jours d'induction, le taux de cellules différenciées est estimé par un test à la benzidine colorant en bleues les cellules hémoglobinisées (l'hémoglobine catalyse l'oxydation de benzidine en milieu acide et en présence d'une petite quantité d'eau oxygénée).

### **II.3.2. Transfection et établissement des clones stables**

Les transfections sont réalisées dans les cellules MEL 745A avec 2µg d'ADN plasmidique selon le protocole de transfection par Escort (Sigma). Le plasmide PEFbosEGFP-C1 possède le gène de résistance à la néomycine. Les clones MEL 745A EGFP-Srp40 et MEL 745A EGFP ont par conséquent été sélectionnés avec 100µg/mL de G418 (Invivogen) dans le milieu de culture. Pour obtenir des clones stables, le lendemain de la transfection, les cellules

sont ensemencées dans des plaques de 96 puits pour avoir une colonie monoclonale après quelques semaines de sélection au G418.

### **II.3.3. Construction du vecteur d'expression**

Pour produire l'ADNc de Srp40, une PCR a été réalisée avec des amorces BspEI/S (5' CCGTCCGGAATGAGTGGCTGTCGAGTGTTT 3') contenant le site BspEI et EcoRI/AS (5' CCGGAATTCTTAATTGCCACTGTCAACTGA 3') contenant le site EcoRI, sur 35 cycles dont la température de dénaturation est de 95°C pendant 30 secondes, la température d'hybridation est de 53°C durant 30 secondes et la température d'élongation est de 72°C pendant une minute. Après ces cycles, une nouvelle fois, l'ADN est placé à 72°C pendant 10 minutes afin de finir correctement l'élongation.

L'ADN obtenu et le vecteur pEFEGFP c1 ont été digérés par les enzymes de restriction BspEI et EcoRI puis purifiés sur gel. Ensuite, le fragment Srp40 a été inséré dans le vecteur (kit rapid ligation Fermentas) puis transformés dans les DH5 $\alpha$ . Les plasmides recombinants ont été sélectionnés avec la kanamycine.

### **II.3.4. Extraction d'ARN et analyse par RT-PCR**

Les ARN totaux sont extraits par le réactif Tri Reagent (Euromedex) selon le protocole du fabricant. 1  $\mu$ g d'ARN est rétro-transcrit dans un volume final de 20  $\mu$ L en présence d'hexamères aléatoires (25 pmoles/réaction) et 40 unités de transcriptase reverse (Fermentas). La PCR de l'ADNc de Srp40 pour le clonage est réalisée avec la Taq High Fidelity (Fermentas). Les autres PCR sont réalisées avec EcoNoTaq (Lucigen).

Afin d'amplifier l'exon 16 des cellules étudiées, une RT-PCR est effectuée sur 35 cycles avec les amorces antisens E17AS2 (GTTCTTTTTCAGTTCAGTACTGATGCTGGCATG) et sens 3259 a (ATGAATTCAGAGCCCACAGAAGCATGGA) pour lesquels la température de dénaturation est de 94°C pendant 30 secondes, celle d'hybridation est de 62°C durant 30 secondes et celle d'élongation est de 72°C pendant 30 secondes. Après ces cycles, une nouvelle élongation est mise en route à 72°C durant 10 minutes.

Pour amplifier l'ADNc de l'EGFP-Srp40, une PCR a été réalisée sur des extraits d'ARN du clone MEL 745A EGFP-Srp40 avec une amorce sens EGFP/S qui s'hybride avec la séquence de l'EGFP (5' ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 3') et une amorce anti-sens SRP40/AS51 qui s'hybride avec la séquence de Srp40 (5' CTCCTCGCT GCTGGATTTA 3'). J'ai suivi le même protocole pour la PCR de Srp40 excepté pour la température d'hybridation qui est de 64°C.

### **II.3.5. Extraction des protéines totales et Western blot**

Les cellules sont récupérées par centrifugation et sont lysées dans un tampon de lyse (20mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 1mM EDTA, 0.2% NP40, 10% glycérol, 1mM DTT, 0.35M NaCl et 0.5mM PMSF) en présence d'inhibiteurs de protéases (Complete mini EDTA free (Roche, Meylan, France)).

20µg de protéines ont été déposées après dénaturation (en présence d'un agent réducteur) sur un gel SDS-PAGE 12% et ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm (Amersham Biosciences). La membrane est saturée pendant une heure dans une solution de TBS-Tween 0,1%-Lait 10% (TBS : Tris 20 mM ; NaCl 150 mM, pH8). L'hybridation de la membrane est réalisée pendant 2 heures soit avec l'anticorps primaire (dans du TBS-TWEEN 0,1%, lait 3%) mAb104 dilué au 1/10<sup>ème</sup>, soit avec l'anticorps anti-EGFP (Santa Cruz) 1/1000<sup>ème</sup> soit avec l'anticorps anti-actine (Santa Cruz) dilué au 1/10000<sup>ème</sup>.

Les anticorps primaires sont ensuite révélés grâce à l'hybridation des anticorps secondaires couplés à la peroxydase (dilué dans du TBS-TWEEN 0,1%, lait 3%) pendant 1 heure. Les anticorps secondaires utilisés sont l'anticorps Goat Anti Mouse IgM (Santa cruz) et l'anticorps Goat Anti Mouse IgG (Santa cruz) dilués au 1/10000<sup>ème</sup> dirigés respectivement contre mAb104 et contre les deux anticorps anti-EGFP et anti-actine (Santa Cruz). Les anticorps secondaires sont ensuite révélés par chimioluminescence avec le kit « ECL plus » (Amersham Biosciences).

### **II.3.6. Localisation cellulaire de la protéine de fusion EGFP**

5.10<sup>5</sup> cellules sont cultivées en plaques 6 puits dans lesquels sont disposées des lamelles préalablement enduites de fibronectine (50µg/mL) (BD Biosciences), la veille de la visualisation sous microscope. Le lendemain, j'ai lavé les puits avec du PBS 1X deux fois. Puis j'ai fixé les cellules 5 minutes à température ambiante avec 1 mL d'une solution de

fixation (0,4g de sucrose, 1ml de Formaldéhyde, 20 mL de PBS 1X). La fixation est arrêtée et les cellules sont lavées deux fois en PBS 1X. Les lamelles sont retirées puis rincées dans l'eau et enfin asséchées. Les noyaux ont été colorés en bleu entre lame et lamelle avec une solution DAPI (Invitrogen). Les lames sont ensuite incubées à 4°C pendant 10 min à l'obscurité. Les cellules sont observées au microscope à fluorescence révélant le DAPI ou l'EGFP.

## **VI- Conclusion générale et perspectives**

Le but de mon travail de thèse était d'identifier des facteurs et des mécanismes intervenant dans l'activation de l'épissage alternatif de l'exon 16 du pré-messager 4.1R au cours de la différenciation érythroïde.

Dans la première partie, je me suis focalisé sur l'implication de la signalisation PI3K via Spi-1/PU.1 dans cette régulation. J'ai montré que la phosphorylation par la PI3K/Akt est nécessaire pour l'autorégulation de Spi-1/PU.1 et que l'oncogène Spi-1/PU.1 agit sur la différenciation des cellules MEL et l'épissage de l'exon 16 par des mécanismes faisant intervenir différents domaines fonctionnels de la protéine.

Ces travaux s'intègrent dans le projet de l'équipe, qui vise à étudier l'implication de toutes les voies de signalisation de l'Epo-R qui interviennent dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-messager 4.1R au cours de la différenciation érythroïde.

La liaison de l'érythropoïétine à son récepteur active diverses voies de signalisation: la voie de la PI3K, la voie des MAPK et la voie de JAK2-STAT5 (voir chapitre II, partie 6). Dans notre modèle cellulaire (cellules érythroleucémiques de Friend), l'Epo-R est activé de façon constitutive déclenchant ainsi une signalisation activée constitutivement (voir chapitre II, partie 7).

Dans l'équipe, des résultats (non publiés) montrent que l'inhibition des MEK1/2 par un inhibiteur spécifique, le U0126 n'a pas d'effet ni sur la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 16 ni sur la différenciation des cellules MEL. Ces résultats suggèrent que, si la voie des MAPK était impliquée, elle serait insuffisante pour l'inhibition de ces deux événements.

L'inhibition de la voie JAK2/STAT5 et l'existence des connections entre les diverses voies de signalisation sont à étudier. L'établissement d'un schéma des voies de signalisation érythroïde impliquées dans la régulation de l'épissage, permettra d'avoir une plateforme de donnée pour l'étude des autres processus d'épissage de la différenciation érythroïde.

Une étude récente a montré l'existence d'autres processus d'épissage régulés au cours de la différenciation érythroïde (Yamamoto et al ; 2009) qui, comme pour l'inclusion de l'exon 16 devraient aboutir à la formation de protéines fonctionnelles, nécessaires à un globule rouge sain et fonctionnel.

Nos résultats sur l'implication des voies de signalisation dans l'épissage de l'exon 16 et la différenciation des cellules MEL ont montré une similitude des effets produits soit par l'inhibition de la PI3K (par le LY294002) soit par le traitement des cellules au DMSO. L'inhibition de la voie des MAPK n'a pas d'effets sur la différenciation, de même que sur l'inclusion de l'exon 16. Ainsi, nous montrons que l'inhibition de la différenciation des cellules MEL dépend spécifiquement de la voie PI3K (suffisante) et non pas de la voie MAPK (non impliquée ou insuffisante). A la lumière de ces résultats, nous nous posons la question de l'action du DMSO sur le mécanisme d'induction de la différenciation. Mes résultats de thèse montrent que le traitement des cellules MEL par le DMSO ou par l'inhibiteur de la PI3K (LY294002) produisent les mêmes effets :

- Activation de la différenciation des cellules (production d'hémoglobine)
- Inhibition de la signalisation PI3K/Akt
- Inhibition de l'expression de Spi-1/PU.1
- Activation de l'épissage alternatif de l'exon 16

Ces effets n'ont pas été reproduits par l'inhibition des MAPK. Nous proposons l'hypothèse, que le DMSO agit sur les cellules MEL en inhibant la signalisation PI3K/Akt (nécessaire pour l'inhibition de la différenciation).

Pour vérifier ces résultats, des travaux sont en cours. En faisant agir le DMSO sur les cellules MEL nous regardons s'il est capable d'inhiber de façon spécifique durant de courtes durées des cibles de la PI3K et non pas d'autres voies de signalisation. De même, nous allons tester la capacité du DMSO à inhiber l'activité de la PI3K dans les progéniteurs non transformés.

Le mécanisme d'inhibition de l'épissage de l'exon 16 par Spi-1/PU.1 n'est toujours pas identifié. Deux hypothèses sont envisagées: Spi-1/PU.1 inhibe l'épissage érythroïde de l'exon 16 soit par sa liaison directe sur l'ADN, soit par le contrôle de l'expression d'autres facteurs (facteurs d'épissage ou d'autres facteurs de transcription).

Spi-1/PU.1 pourrait agir sur l'épissage en se fixant aux promoteurs et en recrutant d'autres facteurs d'épissage au niveau de l'ARN pré-messager (couplage transcription-épissage). Ainsi, Spi-1/PU.1 pourrait se lier à des facteurs impliqués dans l'épissage de l'exon 16 et qui sont en liaison directe avec l'ARN.

Une liaison directe de Spi-1/PU.1 sur le promoteur est défavorisée par des données de l'équipe. Dans son étude, O.Théolyere a montré que Spi-1/PU.1 est capable d'inhiber

l'épissage de l'exon 16 endogène (sous la dépendance du promoteur 4.1R) ainsi que l'épissage de l'exon 16 exogène issu d'un minigène transfecté (indépendant du promoteur 4.1R) (Theoleyre et al., 2004). Donc, une liaison physique directe de Spi-1/PU.1 sur l'ADN (promoteur) est probablement écartée par cette étude.

Nous avons montré également que la surexpression d'une forme mutée de Spi-1/PU.1 incapable de fixer l'ADN dans les cellules MEL est associée à une inhibition de l'inclusion de l'exon 16 après leur traitement au DMSO (thèse de Rand BLAYBEL, Lyon 2009). Ceci suggère que l'effet inhibiteur de Spi-1/PU.1 est indépendant de sa liaison à l'ADN.

Notre deuxième hypothèse en faveur d'une interaction avec des facteurs d'épissage nous paraît favorable (Spi-1/PU.1 agit de façon indirecte sur l'épissage de l'exon 16). Des études de la littérature ont montré que Spi-1/PU.1 interagit avec des facteurs d'épissage (p54nrb et TLS) pour intervenir dans la régulation d'un processus d'épissage (Delva et al., 2004; Hallier et al., 1998). Rand Blaybel a montré que l'épissage de l'exon 16 dans les cellules MEL n'est pas régulé par les facteurs d'épissage P54nrb et TLS et que l'action de Spi-1/PU.1 ne passe pas par ces deux facteurs (thèse de Rand BLAYBEL, Lyon 2009). Cependant, elle a montré que Spi-1/PU.1 régule l'expression de Herf-1 qui, elle même, est capable d'inhiber l'épissage de l'exon 16 (Blaybel et al., 2008).

La liste des facteurs d'épissage qui régulent l'inclusion de l'exon 16 sur le messageur 4.1R mature n'est pas encore complète. Le rôle de certains facteurs a été décrit (voir chapitre III, partie 5.2), d'autres ne sont pas encore étudiés. Il serait intéressant de rechercher par des expériences de co-immunoprécipitation, d'éventuelles interactions physiques entre ces facteurs et Spi-1/PU.1.

Parmi les facteurs qui ne sont pas encore étudiés, nous nous sommes intéressés à la famille des facteurs d'épissage SR et spécialement Srp40. Un membre de cette famille (SF2/ASF), a été décrit comme activateur de l'épissage de l'exon 16 (Yang et al., 2005).

Dans la deuxième partie, nos résultats montrent que le facteur d'épissage Srp40 joue le rôle d'activateur stade spécifique de l'épissage alternatif de l'exon 16 dans les cellules MEL non induites à la différenciation. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui décrivent les protéines SR (Srp40 inclus) comme des facteurs activateurs d'épissage (voir chapitre I, partie 5.2.1). La non-corrélation entre la diminution de l'expression protéique de Srp40 et l'activation de l'épissage alternatif de l'exon 16 au cours de la différenciation écarte



l'hypothèse que Srp40 comme SF2/ASF est un activateur de l'épissage alternatif de l'exon16 au cours de la différenciation des cellules MEL.

La protéine Srp40 est capable d'agir sur l'épissage de nombreux ARN pré-messagers. La diminution drastique de l'expression protéique de Srp40 (endogène et exogène) nous conduit à se poser la question de l'importance de cette protéine dans le mécanisme de contrôle de la prolifération versus différenciation des cellules MEL. Nous pensons que Srp40 joue un rôle dans l'épissage des ARN pré-messagers des protéines importantes pour la prolifération et que la diminution de l'expression de Srp40 est nécessaire à la différenciation des cellules MEL.

Nos résultats montrent que la diminution de Srp40 n'est pas liée à une baisse de synthèse de l'ARNm mais plutôt à une diminution au niveau de l'expression protéique. La compréhension du mécanisme d'extinction de Srp40 au cours de la différenciation pourrait permettre d'explorer ses fonctions dans les cellules MEL. La protéine Srp40 est formée de deux domaines : un domaine de liaison à l'ARN et un domaine d'interaction protéine-protéine. Les domaines RRM des protéines SR présentent une grande homologie structurale, tandis que le domaine RS diffère d'une protéine SR à une autre, ce qui pourrait permettre d'expliquer la différence de comportement de Srp40 (diminution d'expression) et SF2/ASF (augmentation de l'expression) au cours de la différenciation.

Nous pensons que la protéine Srp40 est dégradée au cours de la différenciation des cellules MEL, et que c'est le domaine RS de la protéine qui constitue un signal de dégradation. Pour vérifier cette hypothèse, nous préparons un mutant de Srp40 (sans domaine RS) afin de le transfecter dans les cellules MEL et suivre son expression au cours de la différenciation.

Des expériences d'immuno-précipitation de Srp40 sont envisageables, elles permettraient d'identifier des protéines qui se lient à Srp40 et qui interviennent dans sa dégradation et/ou dans la prolifération des cellules MEL.

Enfin, il reste un point important qui consiste à étudier l'importance de la phosphorylation par la PI3K/Akt dans l'activité des facteurs d'épissage de la famille SR. En effet, ces facteurs sont des phosphoprotéines et la phosphorylation joue un rôle important dans la régulation de l'activité des protéines SR et dans leur localisation cellulaire (voir chapitre I, partie 5.2.1.7). Dans nos cellules MEL, la voie de la PI3K/Akt est activée de façon constitutive et les protéines SR y sont bien exprimées. Outre son rôle dans la régulation de l'expression de Spi-

1/PU.1, une éventuelle implication de la PI3K dans l'activité des protéines SR fera d'elle le chef d'orchestre commandant différents évènements de la prolifération et de la différenciation des cellules érythroleucémiques de Friend.

L'ensemble de nos études a été réalisé dans des cellules transformées (MEL). L'avantage de ce modèle cellulaire est la facilité de manipulation des cellules immortalisées cultivées en permanence. Les résultats devront être vérifiés dans les cellules primaires normales non transformées. Pour cela, nous avons mis au point, la culture de progéniteurs érythroïdes et nous vérifions nos résultats sur des progéniteurs de foie fœtal de souris, induits ou non à la différenciation par l'érythropoïétine.

# **Références bibliographiques**

- Afrikanova, I., E. Yeh, D. Bartos, S. S. Watowich, and G. D. Longmore, 2002, Oncogene cooperativity in Friend erythroleukemia: erythropoietin receptor activation by the env gene of SFFV leads to transcriptional upregulation of PU.1, independent of SFFV proviral insertion: *Oncogene*, v. 21, p. 1272-84.
- Akashi, K., T. Reya, D. Dalma-Weiszhausz, and I. L. Weissman, 2000, Lymphoid precursors: *Curr Opin Immunol*, v. 12, p. 144-50.
- Akindahunsi, A. A., A. Bandiera, and G. Manzini, 2005, Vertebrate 2xRBD hnRNP proteins: a comparative analysis of genome, mRNA and protein sequences: *Comput Biol Chem*, v. 29, p. 13-23.
- An, X., and N. Mohandas, 2008, Disorders of red cell membrane: *Br J Haematol*, v. 141, p. 367-75.
- An, X. L., Y. Takakuwa, S. Manno, B. G. Han, P. Gascard, and N. Mohandas, 2001, Structural and functional characterization of protein 4.1R-phosphatidylserine interaction: potential role in 4.1R sorting within cells: *J Biol Chem*, v. 276, p. 35778-85.
- Atar, O., and B. Z. Levi, 2005, PU.1 silencing leads to terminal differentiation of erythroleukemia cells: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 329, p. 1288-92.
- Athanasiou, M., G. Mavrothalassitis, L. Sun-Hoffman, and D. G. Blair, 2000, FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells: *Leukemia*, v. 14, p. 439-45.
- Azim, A. C., X. Wang, G. Y. Park, R. T. Sadikot, H. Cao, B. Mathew, M. Atchison, R. B. van Breemen, M. Joo, and J. W. Christman, 2007, NF-kappaB-inducing kinase regulates cyclooxygenase 2 gene expression in macrophages by phosphorylation of PU.1: *J Immunol*, v. 179, p. 7868-75.
- Back, J., A. Dierich, C. Bronn, P. Kastner, and S. Chan, 2004, PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells: *Blood*, v. 103, p. 3615-23.
- Bai, Y., D. Lee, T. Yu, and L. A. Chasin, 1999, Control of 3' splice site choice in vivo by ASF/SF2 and hnRNP A1: *Nucleic Acids Res*, v. 27, p. 1126-34.
- Baines, A. J., 2006, A FERM-adjacent (FA) region defines a subset of the 4.1 superfamily and is a potential regulator of FERM domain function: *BMC Genomics*, v. 7, p. 85.
- Baklouti, F., S. C. Huang, T. K. Tang, J. Delaunay, V. T. Marchesi, and E. J. Benz, Jr., 1996, Asynchronous regulation of splicing events within protein 4.1 pre-mRNA during erythroid differentiation: *Blood*, v. 87, p. 3934-41.
- Baklouti, F., S. C. Huang, T. J. Vulliamy, J. Delaunay, and E. J. Benz, Jr., 1997, Organization of the human protein 4.1 genomic locus: new insights into the tissue-specific alternative splicing of the pre-mRNA: *Genomics*, v. 39, p. 289-302.
- Barboux, S., P. Niaudet, M. C. Gubler, J. P. Grunfeld, F. Jaubert, F. Kuttent, C. N. Fekete, N. Souleyreau-Therville, E. Thibaud, M. Fellous, and K. McElreavey, 1997, Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome: *Nat Genet*, v. 17, p. 467-70.
- Beckerle, M. C., 1990, The adhesion plaque protein, talin, is phosphorylated in vivo in chicken embryo fibroblasts exposed to a tumor-promoting phorbol ester: *Cell Regul*, v. 1, p. 227-36.
- Beggs, J. D., 2005, Lsm proteins and RNA processing: *Biochem Soc Trans*, v. 33, p. 433-8.

- Behre, G., A. J. Whitmarsh, M. P. Coghlan, T. Hoang, C. L. Carpenter, D. E. Zhang, R. J. Davis, and D. G. Tenen, 1999, c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor: *J Biol Chem*, v. 274, p. 4939-46.
- Ben David, Y., V. R. Prideaux, V. Chow, S. Benchimol, and A. Bernstein, 1988, Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus: *Oncogene*, v. 3, p. 179-85.
- Ben-David, Y., and A. Bernstein, 1991, Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer: *Cell*, v. 66, p. 831-4.
- Ben-David, Y., E. B. Giddens, and A. Bernstein, 1990, Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, p. 1332-6.
- Bentley, D., 2002, The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory: *Curr Opin Cell Biol*, v. 14, p. 336-42.
- Berget, S. M., 1995, Exon recognition in vertebrate splicing: *J Biol Chem*, v. 270, p. 2411-4.
- Black, D. L., 2003, Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing: *Annu Rev Biochem*, v. 72, p. 291-336.
- Blaustein, M., F. Pelisch, O. A. Coso, M. J. Bissell, A. R. Kornblihtt, and A. Srebrow, 2004, Mammary epithelial-mesenchymal interaction regulates fibronectin alternative splicing via phosphatidylinositol 3-kinase: *J Biol Chem*, v. 279, p. 21029-37.
- Blaustein, M., F. Pelisch, and A. Srebrow, 2007, Signals, pathways and splicing regulation: *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39, p. 2031-48.
- Blaustein, M., F. Pelisch, T. Tanos, M. J. Munoz, D. Wengier, L. Quadrana, J. R. Sanford, J. P. Muschietti, A. R. Kornblihtt, J. F. Caceres, O. A. Coso, and A. Srebrow, 2005, Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT: *Nat Struct Mol Biol*, v. 12, p. 1037-44.
- Blaybel, R., O. Theoleyre, A. Douablin, and F. Baklouti, 2008, Downregulation of the Spi-1/PU.1 oncogene induces the expression of TRIM10/HERF1, a key factor required for terminal erythroid cell differentiation and survival: *Cell Res*, v. 18, p. 834-45.
- Blencowe, B. J., R. Issner, J. A. Nickerson, and P. A. Sharp, 1998, A coactivator of pre-mRNA splicing: *Genes Dev*, v. 12, p. 996-1009.
- Boucher, L., C. A. Ouzounis, A. J. Enright, and B. J. Blencowe, 2001, A genome-wide survey of RS domain proteins: *Rna*, v. 7, p. 1693-701.
- Boulukos, K. E., P. Pognonec, B. Rabault, A. Begue, and J. Ghysdael, 1989, Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro: *Mol Cell Biol*, v. 9, p. 5718-21.
- Brass, A. L., E. Kehrl, C. F. Eisenbeis, U. Storb, and H. Singh, 1996, Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1: *Genes Dev*, v. 10, p. 2335-47.
- Brett, D., J. Hanke, G. Lehmann, S. Haase, S. Delbruck, S. Krueger, J. Reich, and P. Bork, 2000, EST comparison indicates 38% of human mRNAs contain possible alternative splice forms: *FEBS Lett*, v. 474, p. 83-6.
- Brines, M., and A. Cerami, 2006, Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise: *Kidney Int*, v. 70, p. 246-50.
- Brinkman, B. M., 2004, Splice variants as cancer biomarkers: *Clin Biochem*, v. 37, p. 584-94.
- Brow, D. A., 2002, Allosteric cascade of spliceosome activation: *Annu Rev Genet*, v. 36, p. 333-60.
- Buratti, E., and F. E. Baralle, 2004, Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process: *Mol Cell Biol*, v. 24, p. 10505-14.

- Buratti, E., C. Stuani, G. De Prato, and F. E. Baralle, 2007, SR protein-mediated inhibition of CFTR exon 9 inclusion: molecular characterization of the intronic splicing silencer: *Nucleic Acids Res*, v. 35, p. 4359-68.
- Caceres, J. F., and A. R. Kornblihtt, 2002, Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease: *Trends Genet*, v. 18, p. 186-93.
- Caceres, J. F., T. Misteli, G. R. Screaton, D. L. Spector, and A. R. Krainer, 1997, Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity: *J Cell Biol*, v. 138, p. 225-38.
- Caceres, J. F., G. R. Screaton, and A. R. Krainer, 1998, A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm: *Genes Dev*, v. 12, p. 55-66.
- Cantor, A. B., and S. H. Orkin, 2002, Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners: *Oncogene*, v. 21, p. 3368-76.
- Cao, W., S. F. Jamison, and M. A. Garcia-Blanco, 1997, Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro: *Rna*, v. 3, p. 1456-67.
- Carey, J. O., K. J. Posekany, J. E. deVente, G. R. Pettit, and D. K. Ways, 1996, Phorbol ester-stimulated phosphorylation of PU.1: association with leukemic cell growth inhibition: *Blood*, v. 87, p. 4316-24.
- Cartegni, L., S. L. Chew, and A. R. Krainer, 2002, Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing: *Nat Rev Genet*, v. 3, p. 285-98.
- Celotto, A. M., and B. R. Graveley, 2001, Alternative splicing of the *Drosophila* Dscam pre-mRNA is both temporally and spatially regulated: *Genetics*, v. 159, p. 599-608.
- Chabot, B., 1996, Directing alternative splicing: cast and scenarios: *Trends Genet*, v. 12, p. 472-8.
- Chabot, B., C. LeBel, S. Hutchison, F. H. Nasim, and M. J. Simard, 2003, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle A/B proteins and the control of alternative splicing of the mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle A1 pre-mRNA: *Prog Mol Subcell Biol*, v. 31, p. 59-88.
- Chalfant, C. E., J. E. Watson, L. D. Bisnauth, J. B. Kang, N. Patel, L. M. Obeid, D. C. Eichler, and D. R. Cooper, 1998, Insulin regulates protein kinase C $\beta$ II expression through enhanced exon inclusion in L6 skeletal muscle cells. A novel mechanism of insulin- and insulin-like growth factor- $\alpha$ -induced 5' splice site selection: *J Biol Chem*, v. 273, p. 910-6.
- Chasis, J. A., L. Coulombel, J. Conboy, S. McGee, K. Andrews, Y. W. Kan, and N. Mohandas, 1993, Differentiation-associated switches in protein 4.1 expression. Synthesis of multiple structural isoforms during normal human erythropoiesis: *J Clin Invest*, v. 91, p. 329-38.
- Chen, C., and A. J. Sytkowski, 2001, Erythropoietin activates two distinct signaling pathways required for the initiation and the elongation of c-myc: *J Biol Chem*, v. 276, p. 38518-26.
- Chen, H., D. Ray-Gallet, P. Zhang, C. J. Hetherington, D. A. Gonzalez, D. E. Zhang, F. Moreau-Gachelin, and D. G. Tenen, 1995, PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells: *Oncogene*, v. 11, p. 1549-60.
- Chen, H., P. Zhang, H. S. Radomska, C. J. Hetherington, D. E. Zhang, and D. G. Tenen, 1996, Octamer binding factors and their coactivator can activate the murine PU.1 (spi-1) promoter: *J Biol Chem*, v. 271, p. 15743-52.
- Cheng, C., and P. A. Sharp, 2006, Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion: *Mol Cell Biol*, v. 26, p. 362-70.

- Chishti, A. H., 1998, Function of p55 and its nonerythroid homologues: *Curr Opin Hematol*, v. 5, p. 116-21.
- Colwill, K., T. Pawson, B. Andrews, J. Prasad, J. L. Manley, J. C. Bell, and P. I. Duncan, 1996, The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution: *Embo J*, v. 15, p. 265-75.
- Conboy, J. G., J. Y. Chan, J. A. Chasis, Y. W. Kan, and N. Mohandas, 1991, Tissue- and development-specific alternative RNA splicing regulates expression of multiple isoforms of erythroid membrane protein 4.1: *J Biol Chem*, v. 266, p. 8273-80.
- Cunha, S. R., and P. J. Mohler, 2008, Cardiac cytoskeleton and arrhythmia: an unexpected role for protein 4.1R in cardiac excitability: *Circ Res*, v. 103, p. 779-81.
- Damgaard, C. K., T. O. Tange, and J. Kjems, 2002, hnRNP A1 controls HIV-1 mRNA splicing through cooperative binding to intron and exon splicing silencers in the context of a conserved secondary structure: *Rna*, v. 8, p. 1401-15.
- Das, R., J. Yu, Z. Zhang, M. P. Gygi, A. R. Krainer, S. P. Gygi, and R. Reed, 2007, SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing: *Mol Cell*, v. 26, p. 867-81.
- Deguillien, M., S. C. Huang, M. Moriniere, N. Dreumont, E. J. Benz, Jr., and F. Baklouti, 2001, Multiple cis elements regulate an alternative splicing event at 4.1R pre-mRNA during erythroid differentiation: *Blood*, v. 98, p. 3809-16.
- DeKoter, R. P., and H. Singh, 2000, Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1: *Science*, v. 288, p. 1439-41.
- Del Gatto-Konczak, F., M. Olive, M. C. Gesnel, and R. Breathnach, 1999, hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer: *Mol Cell Biol*, v. 19, p. 251-60.
- Delgado, M. D., M. Hallier, P. Meneceur, A. Tavitian, and F. Moreau-Gachelin, 1994, Inhibition of Friend cells proliferation by spi-1 antisense oligodeoxynucleotides: *Oncogene*, v. 9, p. 1723-7.
- Delhommeau, F., C. Vasseur-Godbillon, P. Leclerc, P. O. Schischmanoff, L. Croisille, P. Rince, M. Moriniere, E. J. Benz, Jr., G. Tchernia, G. Tamagnini, L. Ribeiro, J. Delaunay, and F. Baklouti, 2002, A splicing alteration of 4.1R pre-mRNA generates 2 protein isoforms with distinct assembly to spindle poles in mitotic cells: *Blood*, v. 100, p. 2629-36.
- Delva, L., I. Gallais, C. Guillouf, N. Denis, C. Orvain, and F. Moreau-Gachelin, 2004, Multiple functional domains of the oncoproteins Spi-1/PU.1 and TLS are involved in their opposite splicing effects in erythroleukemic cells: *Oncogene*, v. 23, p. 4389-99.
- Diakowski, W., M. Grzybek, and A. F. Sikorski, 2006, Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily: *Folia Histochem Cytobiol*, v. 44, p. 231-48.
- Discher, D., M. Parra, J. G. Conboy, and N. Mohandas, 1993, Mechanochemistry of the alternatively spliced spectrin-actin binding domain in membrane skeletal protein 4.1: *J Biol Chem*, v. 268, p. 7186-95.
- Discher, D. E., R. Winardi, P. O. Schischmanoff, M. Parra, J. G. Conboy, and N. Mohandas, 1995, Mechanochemistry of protein 4.1's spectrin-actin-binding domain: ternary complex interactions, membrane binding, network integration, structural strengthening: *J Cell Biol*, v. 130, p. 897-907.
- Duckworth, B. C., and L. C. Cantley, 1997, Conditional inhibition of the mitogen-activated protein kinase cascade by wortmannin. Dependence on signal strength: *J Biol Chem*, v. 272, p. 27665-70.

- Eldridge, A. G., Y. Li, P. A. Sharp, and B. J. Blencowe, 1999, The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 6125-30.
- Elliott, S., E. Pham, and I. C. Macdougall, 2008, Erythropoietins: a common mechanism of action: *Exp Hematol*, v. 36, p. 1573-84.
- Expert-Bezancon, A., A. Sureau, P. Durosay, R. Salesse, H. Groeneveld, J. P. Lecaer, and J. Marie, 2004, hnRNP A1 and the SR proteins ASF/SF2 and SC35 have antagonistic functions in splicing of beta-tropomyosin exon 6B: *J Biol Chem*, v. 279, p. 38249-59.
- Faustino, N. A., and T. A. Cooper, 2003, Pre-mRNA splicing and human disease: *Genes Dev*, v. 17, p. 419-37.
- Fichelson, S., S. Chretien, M. Rokicka-Piotrowicz, S. Bouhanik, S. Gisselbrecht, P. Mayeux, and C. Lacombe, 1999, Tyrosine residues of the erythropoietin receptor are dispensable for erythroid differentiation of human CD34+ progenitors: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 256, p. 685-91.
- Fisher, R. C., M. C. Olson, J. M. Pongubala, J. M. Perkel, M. L. Atchison, E. W. Scott, and M. C. Simon, 1998, Normal myeloid development requires both the glutamine-rich transactivation domain and the PEST region of transcription factor PU.1 but not the potent acidic transactivation domain: *Mol Cell Biol*, v. 18, p. 4347-57.
- Fisher, R. C., and E. W. Scott, 1998, Role of PU.1 in hematopoiesis: *Stem Cells*, v. 16, p. 25-37.
- Fisher, R. C., W. B. Slayton, C. Chien, S. M. Guthrie, C. Bray, and E. W. Scott, 2004, PU.1 supports proliferation of immature erythroid progenitors: *Leuk Res*, v. 28, p. 83-9.
- Fu, X. D., and T. Maniatis, 1990, Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus: *Nature*, v. 343, p. 437-41.
- Fujiwara, Y., C. P. Browne, K. Cunniff, S. C. Goff, and S. H. Orkin, 1996, Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 12355-8.
- Gallagher, P. G., 2004, Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R: *Semin Hematol*, v. 41, p. 142-64.
- Gallego, M. E., R. Gattoni, J. Stevenin, J. Marie, and A. Expert-Bezancon, 1997, The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A: *Embo J*, v. 16, p. 1772-84.
- Gascard, P., G. Lee, L. Coulombel, I. Auffray, M. Lum, M. Parra, J. G. Conboy, N. Mohandas, and J. A. Chasis, 1998, Characterization of multiple isoforms of protein 4.1R expressed during erythroid terminal differentiation: *Blood*, v. 92, p. 4404-14.
- Ge, H., P. Zuo, and J. L. Manley, 1991, Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators: *Cell*, v. 66, p. 373-82.
- Gimm, J. A., X. An, W. Nunomura, and N. Mohandas, 2002, Functional characterization of spectrin-actin-binding domains in 4.1 family of proteins: *Biochemistry*, v. 41, p. 7275-82.
- Graveley, B. R., 2000, Sorting out the complexity of SR protein functions: *Rna*, v. 6, p. 1197-211.
- Graveley, B. R., and T. Maniatis, 1998, Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing: *Mol Cell*, v. 1, p. 765-71.
- Gross, S. A., J. H. Zheng, A. T. Le, P. J. Kerzic, and R. D. Irons, 2006, PU.1 phosphorylation correlates with hydroquinone-induced alterations in myeloid differentiation and cytokine-dependent clonogenic response in human CD34(+) hematopoietic progenitor cells: *Cell Biol Toxicol*, v. 22, p. 229-41.



- Gui, J. F., W. S. Lane, and X. D. Fu, 1994, A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle: *Nature*, v. 369, p. 678-82.
- Guillouf, C., I. Gallais, and F. Moreau-Gachelin, 2006, Spi-1/PU.1 oncoprotein affects splicing decisions in a promoter binding-dependent manner: *J Biol Chem*, v. 281, p. 19145-55.
- Gupta, P., G. U. Gurudutta, Y. K. Verma, V. Kishore, S. Gulati, R. K. Sharma, R. Chandra, and D. Saluja, 2006, PU.1: An ETS family transcription factor that regulates leukemogenesis besides normal hematopoiesis: *Stem Cells Dev*, v. 15, p. 609-17.
- Hallier, M., A. Lerga, S. Barnache, A. Tavitian, and F. Moreau-Gachelin, 1998, The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS: *J Biol Chem*, v. 273, p. 4838-42.
- Hallier, M., A. Tavitian, and F. Moreau-Gachelin, 1996, The transcription factor Spi-1/PU.1 binds RNA and interferes with the RNA-binding protein p54nrb: *J Biol Chem*, v. 271, p. 11177-81.
- Harada, H., Y. Harada, D. P. O'Brien, D. S. Rice, C. W. Naeve, and J. R. Downing, 1999, HERF1, a novel hematopoiesis-specific RING finger protein, is required for terminal differentiation of erythroid cells: *Mol Cell Biol*, v. 19, p. 3808-15.
- Hart, A., F. Melet, P. Grossfeld, K. Chien, C. Jones, A. Tunnacliffe, R. Favier, and A. Bernstein, 2000, Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia: *Immunity*, v. 13, p. 167-77.
- Haseyama, Y., K. Sawada, A. Oda, K. Koizumi, H. Takano, T. Tarumi, M. Nishio, M. Handa, Y. Ikeda, and T. Koike, 1999, Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis: *Blood*, v. 94, p. 1568-77.
- Hastings, M. L., C. M. Wilson, and S. H. Munroe, 2001, A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA: *Rna*, v. 7, p. 859-74.
- Haugen, P., D. M. Simon, and D. Bhattacharya, 2005, The natural history of group I introns: *Trends Genet*, v. 21, p. 111-9.
- Hegde, S., S. Ni, S. He, D. Yoon, G. S. Feng, S. S. Watowich, R. F. Paulson, and P. A. Hankey, 2009, Stat3 promotes the development of erythroleukemia by inducing Pu.1 expression and inhibiting erythroid differentiation: *Oncogene*, v. 28, p. 3349-59.
- Hilton, C. J., and M. V. Berridge, 1995, Conserved region of the cytoplasmic domain is not essential for erythropoietin-dependent growth: *Growth Factors*, v. 12, p. 263-76.
- Hong, W., A. Y. Kim, S. Ky, C. Rakowski, S. B. Seo, D. Chakravarti, M. Atchison, and G. A. Blobel, 2002, Inhibition of CBP-mediated protein acetylation by the Ets family oncoprotein PU.1: *Mol Cell Biol*, v. 22, p. 3729-43.
- Hoover, K. B., and P. J. Bryant, 2000, The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton: *Curr Opin Cell Biol*, v. 12, p. 229-34.
- Horne, W. C., S. C. Huang, P. S. Becker, T. K. Tang, and E. J. Benz, Jr., 1993, Tissue-specific alternative splicing of protein 4.1 inserts an exon necessary for formation of the ternary complex with erythrocyte spectrin and F-actin: *Blood*, v. 82, p. 2558-63.
- Horne, W. C., W. C. Prinz, and E. K. Tang, 1990, Identification of two cAMP-dependent phosphorylation sites on erythrocyte protein 4.1: *Biochim Biophys Acta*, v. 1055, p. 87-92.
- Hou, C. L., C. Tang, S. R. Roffler, and T. K. Tang, 2000, Protein 4.1R binding to eIF3-p44 suggests an interaction between the cytoskeletal network and the translation apparatus: *Blood*, v. 96, p. 747-53.

- Hou, V. C., R. Lersch, S. L. Gee, J. L. Ponthier, A. J. Lo, M. Wu, C. W. Turck, M. Koury, A. R. Krainer, A. Mayeda, and J. G. Conboy, 2002, Decrease in hnRNP A/B expression during erythropoiesis mediates a pre-mRNA splicing switch: *Embo J*, v. 21, p. 6195-204.
- Hromas, R., A. Orazi, R. S. Neiman, R. Maki, C. Van Beveran, J. Moore, and M. Klemsz, 1993, Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1: *Blood*, v. 82, p. 2998-3004.
- Huang, J. P., C. J. Tang, G. H. Kou, V. T. Marchesi, E. J. Benz, Jr., and T. K. Tang, 1993, Genomic structure of the locus encoding protein 4.1. Structural basis for complex combinational patterns of tissue-specific alternative RNA splicing: *J Biol Chem*, v. 268, p. 3758-66.
- Huang, S., U. D. Lichtenauer, S. Pack, C. Wang, A. C. Kim, M. Lutchman, C. A. Koch, J. Torres-Cruz, S. C. Huang, E. J. Benz, Jr., H. Christiansen, B. Dockhorn-Dworniczak, C. Poremba, A. O. Vortmeyer, A. H. Chishti, and Z. Zhuang, 2001, Reassignment of the EPB4.1 gene to 1p36 and assessment of its involvement in neuroblastomas: *Eur J Clin Invest*, v. 31, p. 907-14.
- Huang, Y., and J. A. Steitz, 2001, Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA: *Mol Cell*, v. 7, p. 899-905.
- Huang, Y., T. A. Yario, and J. A. Steitz, 2004, A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 9666-70.
- Hughes, T. A., 2006, Regulation of gene expression by alternative untranslated regions: *Trends Genet*, v. 22, p. 119-22.
- Hui, J., L. H. Hung, M. Heiner, S. Schreiner, N. Neumuller, G. Reither, S. A. Haas, and A. Bindereif, 2005, Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing: *Embo J*, v. 24, p. 1988-98.
- Hung, L. H., M. Heiner, J. Hui, S. Schreiner, V. Benes, and A. Bindereif, 2008, Diverse roles of hnRNP L in mammalian mRNA processing: a combined microarray and RNAi analysis: *Rna*, v. 14, p. 284-96.
- Hung, L. Y., C. J. Tang, and T. K. Tang, 2000, Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the gamma-tubulin complex: *Mol Cell Biol*, v. 20, p. 7813-25.
- Husain, A., G. J. Howlett, and W. H. Sawyer, 1985, The interaction of calmodulin with erythrocyte membrane proteins: *Biochem Int*, v. 10, p. 1-12.
- Ihle, J. N., and I. M. Kerr, 1995, Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily: *Trends Genet*, v. 11, p. 69-74.
- Ikizawa, K., K. Kajiwara, K. Izuhara, and Y. Yanagihara, 2001, PKCdelta and zeta mediate IL-4/IL-13-induced germline epsilon transcription in human B cells: a putative regulation via PU.1 phosphorylation: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 288, p. 34-41.
- Inaba, M., K. C. Gupta, M. Kuwabara, T. Takahashi, E. J. Benz, Jr., and Y. Maede, 1992, Deamidation of human erythrocyte protein 4.1: possible role in aging: *Blood*, v. 79, p. 3355-61.
- Ingelsson, M., K. Ramasamy, I. Cantuti-Castelvetri, L. Skoglund, T. Matsui, J. Orne, H. Kowa, S. Raju, C. R. Vanderburg, J. C. Augustinack, R. de Silva, A. J. Lees, L. Lannfelt, J. H. Growdon, M. P. Frosch, D. G. Standaert, M. C. Irizarry, and B. T. Hyman, 2006, No alteration in tau exon 10 alternative splicing in tangle-bearing neurons of the Alzheimer's disease brain: *Acta Neuropathol*, v. 112, p. 439-49.
- Jeanteur, P., and J. Tazi, 2005, [Selective modification of alternative splicing by indole derivatives that target SR protein splicing factors]: *Med Sci (Paris)*, v. 21, p. 793-5.

- Jelkmann, W., J. Bohlius, M. Hallek, and A. J. Sytkowski, 2008, The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues: *Crit Rev Oncol Hematol*, v. 67, p. 39-61.
- Johnson, J. M., J. Castle, P. Garrett-Engele, Z. Kan, P. M. Loerch, C. D. Armour, R. Santos, E. E. Schadt, R. Stoughton, and D. D. Shoemaker, 2003, Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays: *Science*, v. 302, p. 2141-4.
- Jurica, M. S., and M. J. Moore, 2002, Capturing splicing complexes to study structure and mechanism: *Methods*, v. 28, p. 336-45.
- Jurica, M. S., and M. J. Moore, 2003, Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins: *Mol Cell*, v. 12, p. 5-14.
- Kambach, C., S. Walke, and K. Nagai, 1999, Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles: *Curr Opin Struct Biol*, v. 9, p. 222-30.
- Kanopka, A., O. Muhlemann, and G. Akusjarvi, 1996, Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA: *Nature*, v. 381, p. 535-8.
- Kashima, T., N. Rao, and J. L. Manley, 2007, An intronic element contributes to splicing repression in spinal muscular atrophy: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, p. 3426-31.
- Kataoka, N., J. L. Bachorik, and G. Dreyfuss, 1999, Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins: *J Cell Biol*, v. 145, p. 1145-52.
- Kim, W. Y., M. Sieweke, E. Ogawa, H. J. Wee, U. Englmeier, T. Graf, and Y. Ito, 1999, Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains: *Embo J*, v. 18, p. 1609-20.
- Kistler, B., P. Pfisterer, and T. Wirth, 1995, Lymphoid- and myeloid-specific activity of the PU.1 promoter is determined by the combinatorial action of octamer and ets transcription factors: *Oncogene*, v. 11, p. 1095-106.
- Klemsz, M. J., and R. A. Maki, 1996, Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains: *Mol Cell Biol*, v. 16, p. 390-7.
- Klemsz, M. J., S. R. McKercher, A. Celada, C. Van Beveren, and R. A. Maki, 1990, The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene: *Cell*, v. 61, p. 113-24.
- Klingmuller, U., H. Wu, J. G. Hsiao, A. Toker, B. C. Duckworth, L. C. Cantley, and H. F. Lodish, 1997, Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 3016-21.
- Kodandapani, R., F. Pio, C. Z. Ni, G. Piccialli, M. Klemsz, S. McKercher, R. A. Maki, and K. R. Ely, 1996, A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex: *Nature*, v. 380, p. 456-60.
- Kohtz, J. D., S. F. Jamison, C. L. Will, P. Zuo, R. Luhrmann, M. A. Garcia-Blanco, and J. L. Manley, 1994, Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors: *Nature*, v. 368, p. 119-24.
- Koury, S. T., M. C. Bondurant, and M. J. Koury, 1988, Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization: *Blood*, v. 71, p. 524-7.
- Koury, S. T., M. C. Bondurant, M. J. Koury, and G. L. Semenza, 1991, Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization: *Blood*, v. 77, p. 2497-503.
- Krainer, A. R., A. Mayeda, D. Kozak, and G. Binns, 1991, Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and *Drosophila* splicing regulators: *Cell*, v. 66, p. 383-94.
- Krauss, S. W., J. R. Spence, S. Bahmanyar, A. I. Barth, M. M. Go, D. Czerwinski, and A. J. Meyer, 2008, Downregulation of protein 4.1R, a mature centriole protein, disrupts

- centrosomes, alters cell cycle progression, and perturbs mitotic spindles and anaphase: *Mol Cell Biol*, v. 28, p. 2283-94.
- Krawczak, M., J. Reiss, and D. N. Cooper, 1992, The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences: *Hum Genet*, v. 90, p. 41-54.
- Krecic, A. M., and M. S. Swanson, 1999, hnRNP complexes: composition, structure, and function: *Curr Opin Cell Biol*, v. 11, p. 363-71.
- Lacombe, C., J. L. Da Silva, P. Bruneval, J. G. Fournier, F. Wendling, N. Casadevall, J. P. Camilleri, J. Bariety, B. Varet, and P. Tambourin, 1988, Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney: *J Clin Invest*, v. 81, p. 620-3.
- Ladd, A. N., N. Charlet, and T. A. Cooper, 2001, The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing: *Mol Cell Biol*, v. 21, p. 1285-96.
- Ladd, A. N., N. H. Nguyen, K. Malhotra, and T. A. Cooper, 2004, CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing: *J Biol Chem*, v. 279, p. 17756-64.
- Lehmann, K., and U. Schmidt, 2003, Group II introns: structure and catalytic versatility of large natural ribozymes: *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 38, p. 249-303.
- Lerner, M. R., and J. A. Steitz, 1979, Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 76, p. 5495-9.
- Li, H., S. Khirug, C. Cai, A. Ludwig, P. Blaesse, J. Kolikova, R. Afzalov, S. K. Coleman, S. Lauri, M. S. Airaksinen, K. Keinanen, L. Khiroug, M. Saarma, K. Kaila, and C. Rivera, 2007, KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development: *Neuron*, v. 56, p. 1019-33.
- Li, J. P., A. D. D'Andrea, H. F. Lodish, and D. Baltimore, 1990, Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor: *Nature*, v. 343, p. 762-4.
- Li, Y., Y. Okuno, P. Zhang, H. S. Radomska, H. Chen, H. Iwasaki, K. Akashi, M. J. Klemsz, S. R. McKercher, R. A. Maki, and D. G. Tenen, 2001, Regulation of the PU.1 gene by distal elements: *Blood*, v. 98, p. 2958-65.
- Liew, C. W., K. D. Rand, R. J. Simpson, W. W. Yung, R. E. Mansfield, M. Crossley, M. Proetorius-Ibba, C. Nerlov, F. M. Poulsen, and J. P. Mackay, 2006, Molecular analysis of the interaction between the hematopoietic master transcription factors GATA-1 and PU.1: *J Biol Chem*, v. 281, p. 28296-306.
- Lin, S., G. Coutinho-Mansfield, D. Wang, S. Pandit, and X. D. Fu, 2008, The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation: *Nat Struct Mol Biol*, v. 15, p. 819-26.
- Linemeyer, D. L., J. G. Menke, S. K. Ruscetti, L. H. Evans, and E. M. Scolnick, 1982, Envelope gene sequences which encode the gp52 protein of spleen focus-forming virus are required for the induction of erythroid cell proliferation: *J Virol*, v. 43, p. 223-33.
- Listman, J. A., N. Wara-aswapati, J. E. Race, L. W. Blystone, N. Walker-Kopp, Z. Yang, and P. E. Auron, 2005, Conserved ETS domain arginines mediate DNA binding, nuclear localization, and a novel mode of bZIP interaction: *J Biol Chem*, v. 280, p. 41421-8.
- Liu, J. L., and J. G. Gall, 2007, U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with P bodies: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, p. 11655-9.

- Lodie, T. A., R. Savedra, Jr., D. T. Golenbock, C. P. Van Beveren, R. A. Maki, and M. J. Fenton, 1997, Stimulation of macrophages by lipopolysaccharide alters the phosphorylation state, conformation, and function of PU.1 via activation of casein kinase II: *J Immunol*, v. 158, p. 1848-56.
- Long, J. C., and J. F. Caceres, 2009, The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression: *Biochem J*, v. 417, p. 15-27.
- Longman, D., I. L. Johnstone, and J. F. Caceres, 2000, Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans*: *Embo J*, v. 19, p. 1625-37.
- Lospitao, E., C. M. Perez-Ferreiro, A. Gosalbez, M. A. Alonso, and I. Correias, 2008, An internal ribosome entry site element directs the synthesis of the 80 kDa isoforms of protein 4.1R: *BMC Biol*, v. 6, p. 51.
- Maillet, P., N. Dalla Venezia, F. Lorenzo, M. Moriniere, M. Bozon, B. Noel, J. Delaunay, and F. Baklouti, 1999, A premature termination codon within an alternative exon affecting only the metabolism of transcripts that retain this exon: *Hum Mutat*, v. 14, p. 145-55.
- Maniatis, T., and R. Reed, 1987, The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing: *Nature*, v. 325, p. 673-8.
- Manno, S., Y. Takakuwa, and N. Mohandas, 2005, Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation: *J Biol Chem*, v. 280, p. 7581-7.
- Marden, C. M., D. Stefanidis, D. S. Cunninghame-Graham, and C. M. Casimir, 2003, Differentiation-dependent up-regulation of p47(phox) gene transcription is associated with changes in PU.1 phosphorylation and increased binding affinity: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 305, p. 193-202.
- Marfatia, S. M., R. A. Leu, D. Branton, and A. H. Chishti, 1995, Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein: *J Biol Chem*, v. 270, p. 715-9.
- Marfatia, S. M., R. A. Lue, D. Branton, and A. H. Chishti, 1994, In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C: *J Biol Chem*, v. 269, p. 8631-4.
- Mason, J. M., B. K. Beattie, Q. Liu, D. J. Dumont, and D. L. Barber, 2000, The SH2 inositol 5-phosphatase Ship1 is recruited in an SH2-dependent manner to the erythropoietin receptor: *J Biol Chem*, v. 275, p. 4398-406.
- Matsumura, I., A. Kawasaki, H. Tanaka, J. Sonoyama, S. Ezoe, N. Minegishi, K. Nakajima, M. Yamamoto, and Y. Kanakura, 2000, Biologic significance of GATA-1 activities in Ras-mediated megakaryocytic differentiation of hematopoietic cell lines: *Blood*, v. 96, p. 2440-50.
- Mattagajasingh, S. N., S. C. Huang, J. S. Hartenstein, and E. J. Benz, Jr., 2000, Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton: *J Biol Chem*, v. 275, p. 30573-85.
- Mattagajasingh, S. N., S. C. Huang, J. S. Hartenstein, M. Snyder, V. T. Marchesi, and E. J. Benz, 1999, A nonerythroid isoform of protein 4.1R interacts with the nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein: *J Cell Biol*, v. 145, p. 29-43.
- Matter, N., P. Herrlich, and H. Konig, 2002, Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68: *Nature*, v. 420, p. 691-5.
- Matter, N., M. Marx, S. Weg-Remers, H. Ponta, P. Herrlich, and H. Konig, 2000, Heterogeneous ribonucleoprotein A1 is part of an exon-specific splice-silencing complex controlled by oncogenic signaling pathways: *J Biol Chem*, v. 275, p. 35353-60.

- Maxwell, P. H., M. K. Osmond, C. W. Pugh, A. Heryet, L. G. Nicholls, C. C. Tan, B. G. Doe, D. J. Ferguson, M. H. Johnson, and P. J. Ratcliffe, 1993, Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice: *Kidney Int*, v. 44, p. 1149-62.
- Mayeda, A., S. H. Munroe, J. F. Caceres, and A. R. Krainer, 1994, Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins: *Embo J*, v. 13, p. 5483-95.
- McNally, L. M., and M. T. McNally, 1996, SR protein splicing factors interact with the Rous sarcoma virus negative regulator of splicing element: *J Virol*, v. 70, p. 1163-72.
- McNally, L. M., and M. T. McNally, 1999, U1 small nuclear ribonucleoprotein and splicing inhibition by the rous sarcoma virus negative regulator of splicing element: *J Virol*, v. 73, p. 2385-93.
- Mermoud, J. E., P. Cohen, and A. I. Lamond, 1992, Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing: *Nucleic Acids Res*, v. 20, p. 5263-9.
- Mermoud, J. E., P. T. Cohen, and A. I. Lamond, 1994, Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism: *Embo J*, v. 13, p. 5679-88.
- Millot, G. A., F. Svinarchuk, C. Lacout, W. Vainchenker, and D. Dumenil, 2001, The granulocyte colony-stimulating factor receptor supports erythroid differentiation in the absence of the erythropoietin receptor or Stat5: *Br J Haematol*, v. 112, p. 449-58.
- Minn, A. J., L. H. Boise, and C. B. Thompson, 1996, Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L): *J Biol Chem*, v. 271, p. 6306-12.
- Modafferi, E. F., and D. L. Black, 1997, A complex intronic splicing enhancer from the c-src pre-mRNA activates inclusion of a heterologous exon: *Mol Cell Biol*, v. 17, p. 6537-45.
- Morceau, F., M. Schnekenburger, M. Dicato, and M. Diederich, 2004, GATA-1: friends, brothers, and coworkers: *Ann N Y Acad Sci*, v. 1030, p. 537-54.
- Moreau-Gachelin, F., 2008, Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation: *Retrovirology*, v. 5, p. 99.
- Moreau-Gachelin, F., D. Ray, M. G. Mattei, P. Tambourin, and A. Tavitian, 1989, The putative oncogene Spi-1: murine chromosomal localization and transcriptional activation in murine acute erythroleukemias: *Oncogene*, v. 4, p. 1449-56.
- Moreau-Gachelin, F., A. Tavitian, and P. Tambourin, 1988, Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias: *Nature*, v. 331, p. 277-80.
- Moriniere, M., L. Ribeiro, N. Dalla Venezia, M. Deguillien, P. Maillet, T. Cynober, F. Delhommeau, H. Almeida, G. Tamagnini, J. Delaunay, and F. Baklouti, 2000, Elliptocytosis in patients with C-terminal domain mutations of protein 4.1 correlates with encoded messenger RNA levels rather than with alterations in primary protein structure: *Blood*, v. 95, p. 1834-41.
- Mount, S. M., 1982, A catalogue of splice junction sequences: *Nucleic Acids Res*, v. 10, p. 459-72.
- Mowat, M., A. Cheng, N. Kimura, A. Bernstein, and S. Benchimol, 1985, Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus: *Nature*, v. 314, p. 633-6.
- Munroe, D. G., J. W. Peacock, and S. Benchimol, 1990, Inactivation of the cellular p53 gene is a common feature of Friend virus-induced erythroleukemia: relationship of inactivation to dominant transforming alleles: *Mol Cell Biol*, v. 10, p. 3307-13.
- Muszynski, K. W., T. Ohashi, C. Hanson, and S. K. Ruscetti, 1998, Both the polycythemia- and anemia-inducing strains of Friend spleen focus-forming virus induce constitutive activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: *J Virol*, v. 72, p. 919-25.

- Muszynski, K. W., D. Thompson, C. Hanson, R. Lyons, A. Spadaccini, and S. K. Ruscetti, 2000, Growth factor-independent proliferation of erythroid cells infected with Friend spleen focus-forming virus is protein kinase C dependent but does not require Ras-GTP: *J Virol*, v. 74, p. 8444-51.
- Nagai, K., Y. Muto, D. A. Pomeranz Krummel, C. Kambach, T. Ignjatovic, S. Walke, and A. Kuglstatler, 2001, Structure and assembly of the spliceosomal snRNPs. Novartis Medal Lecture: *Biochem Soc Trans*, v. 29, p. 15-26.
- Nagy, E., and L. E. Maquat, 1998, A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance: *Trends Biochem Sci*, v. 23, p. 198-9.
- Nakano, N., C. Nishiyama, N. Masuoka, M. Nishiyama, H. Yamane, K. Okumura, and H. Ogawa, 2005, Analysis of PU.1/ICSBP (IRF-8) complex formation with various PU.1 mutants: molecular cloning of rat *Icsbp* (*Irf-8*) cDNA: *Immunogenetics*, v. 56, p. 871-7.
- Nasim, F. U., S. Hutchison, M. Cordeau, and B. Chabot, 2002, High-affinity hnRNP A1 binding sites and duplex-forming inverted repeats have similar effects on 5' splice site selection in support of a common looping out and repression mechanism: *Rna*, v. 8, p. 1078-89.
- Nerlov, C., E. Querfurth, H. Kulesa, and T. Graf, 2000, GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription: *Blood*, v. 95, p. 2543-51.
- Nestler, E. J., M. B. Kelz, and J. Chen, 1999, DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity: *Brain Res*, v. 835, p. 10-7.
- Ngo, J. C., S. Chakrabarti, J. H. Ding, A. Velazquez-Dones, B. Nolen, B. E. Aubol, J. A. Adams, X. D. Fu, and G. Ghosh, 2005, Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2: *Mol Cell*, v. 20, p. 77-89.
- Ngo, J. C., K. Giang, S. Chakrabarti, C. T. Ma, N. Huynh, J. C. Hagopian, P. C. Dorrestein, X. D. Fu, J. A. Adams, and G. Ghosh, 2008, A sliding docking interaction is essential for sequential and processive phosphorylation of an SR protein by SRPK1: *Mol Cell*, v. 29, p. 563-76.
- Nguyen, V. C., D. Ray, M. S. Gross, M. F. de Tand, J. Frezal, and F. Moreau-Gachelin, 1990, Localization of the human oncogene SPI1 on chromosome 11, region p11.22: *Hum Genet*, v. 84, p. 542-6.
- Ni, X., C. Ji, G. Cao, H. Cheng, L. Guo, S. Gu, K. Ying, R. C. Zhao, and Y. Mao, 2003, Molecular cloning and characterization of the protein 4.1O gene, a novel member of the protein 4.1 family with focal expression in ovary: *J Hum Genet*, v. 48, p. 101-6.
- Nicolas, V., C. Le Van Kim, P. Gane, C. Birkenmeier, J. P. Cartron, Y. Colin, and I. Mouro-Chanteloup, 2003, Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation: *J Biol Chem*, v. 278, p. 25526-33.
- Nishigaki, K., C. Hanson, T. Ohashi, A. Spadaccini, and S. Ruscetti, 2006, Erythroblast transformation by the friend spleen focus-forming virus is associated with a block in erythropoietin-induced STAT1 phosphorylation and DNA binding and correlates with high expression of the hematopoietic phosphatase SHP-1: *J Virol*, v. 80, p. 5678-85.
- Nishigaki, K., D. Thompson, C. Hanson, T. Yugawa, and S. Ruscetti, 2001, The envelope glycoprotein of friend spleen focus-forming virus covalently interacts with and constitutively activates a truncated form of the receptor tyrosine kinase Stk: *J Virol*, v. 75, p. 7893-903.

- Nunomura, W., M. Parra, M. Hebiguchi, K. Sawada, N. Mohandas, and Y. Takakuwa, 2009, Marked difference in membrane-protein-binding properties of the two isoforms of protein 4.1R expressed at early and late stages of erythroid differentiation: *Biochem J*, v. 417, p. 141-8.
- Nunomura, W., Y. Takakuwa, M. Parra, J. Conboy, and N. Mohandas, 2000, Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane: *J Biol Chem*, v. 275, p. 24540-6.
- Nunomura, W., Y. Takakuwa, R. Tokimitsu, S. W. Krauss, M. Kawashima, and N. Mohandas, 1997, Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction: *J Biol Chem*, v. 272, p. 30322-8.
- Ohanian, V., L. C. Wolfe, K. M. John, J. C. Pinder, S. E. Lux, and W. B. Gratzer, 1984, Analysis of the ternary interaction of the red cell membrane skeletal proteins spectrin, actin, and 4.1: *Biochemistry*, v. 23, p. 4416-20.
- Okuno, Y., G. Huang, F. Rosenbauer, E. K. Evans, H. S. Radomska, H. Iwasaki, K. Akashi, F. Moreau-Gachelin, Y. Li, P. Zhang, B. Gottgens, and D. G. Tenen, 2005, Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element: *Mol Cell Biol*, v. 25, p. 2832-45.
- Ozaki, T., and A. Nakagawara, 2005, p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world: *Cancer Sci*, v. 96, p. 729-37.
- Pagani, F., E. Buratti, C. Stuani, M. Romano, E. Zuccato, M. Niksic, L. Giglio, D. Faraguna, and F. E. Baralle, 2000, Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element: *J Biol Chem*, v. 275, p. 21041-7.
- Parra, M., P. Gascard, L. D. Walensky, J. A. Gimm, S. Blackshaw, N. Chan, Y. Takakuwa, T. Berger, G. Lee, J. A. Chasis, S. H. Snyder, N. Mohandas, and J. G. Conboy, 2000, Molecular and functional characterization of protein 4.1B, a novel member of the protein 4.1 family with high level, focal expression in brain: *J Biol Chem*, v. 275, p. 3247-55.
- Parra, M., P. Gascard, L. D. Walensky, S. H. Snyder, N. Mohandas, and J. G. Conboy, 1998, Cloning and characterization of 4.1G (EPB41L2), a new member of the skeletal protein 4.1 (EPB41) gene family: *Genomics*, v. 49, p. 298-306.
- Patel, N. A., C. E. Chalfant, J. E. Watson, J. R. Wyatt, N. M. Dean, D. C. Eichler, and D. R. Cooper, 2001, Insulin regulates alternative splicing of protein kinase C beta II through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway involving the nuclear serine/arginine-rich splicing factor, SRp40, in skeletal muscle cells: *J Biol Chem*, v. 276, p. 22648-54.
- Patel, N. A., S. Kaneko, H. S. Apostolatos, S. S. Bae, J. E. Watson, K. Davidowitz, D. S. Chappell, M. J. Birnbaum, J. Q. Cheng, and D. R. Cooper, 2005, Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase CbetaII alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40: *J Biol Chem*, v. 280, p. 14302-9.
- Paul, R., S. Schuetze, S. L. Kozak, and D. Kabat, 1989, A common site for immortalizing proviral integrations in Friend erythroleukemia: molecular cloning and characterization: *J Virol*, v. 63, p. 4958-61.
- Paul, R., S. Schuetze, S. L. Kozak, C. A. Kozak, and D. Kabat, 1991, The Sfpi-1 proviral integration site of Friend erythroleukemia encodes the ets-related transcription factor Pu.1: *J Virol*, v. 65, p. 464-7.



- Pereira, R., J. Raingeaud, M. Pironin, J. Ghysdael, and C. T. Quang, 2000, SPI-1 transforming properties depend upon specifically activated forms of the EPOR: *Oncogene*, v. 19, p. 5106-10.
- Perez-Ferreiro, C. M., C. M. Luque, and I. Correias, 2001, 4.1R proteins associate with interphase microtubules in human T cells: a 4.1R constitutive region is involved in tubulin binding: *J Biol Chem*, v. 276, p. 44785-91.
- Perez-Ferreiro, C. M., I. Vernos, and I. Correias, 2004, Protein 4.1R regulates interphase microtubule organization at the centrosome: *J Cell Sci*, v. 117, p. 6197-206.
- Perry, C., and H. Soreq, 2002, Transcriptional regulation of erythropoiesis. Fine tuning of combinatorial multi-domain elements: *Eur J Biochem*, v. 269, p. 3607-18.
- Persons, D. A., R. F. Paulson, M. R. Loyd, M. T. Herley, S. M. Bodner, A. Bernstein, P. H. Correll, and P. A. Ney, 1999, Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase: *Nat Genet*, v. 23, p. 159-65.
- Pongubala, J. M., C. Van Beveren, S. Nagulapalli, M. J. Klemsz, S. R. McKercher, R. A. Maki, and M. L. Atchison, 1993, Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation: *Science*, v. 259, p. 1622-5.
- Ponta, H., L. Sherman, and P. A. Herrlich, 2003, CD44: from adhesion molecules to signalling regulators: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 4, p. 33-45.
- Ponthier, J. L., C. Schluepen, W. Chen, R. A. Lersch, S. L. Gee, V. C. Hou, A. J. Lo, S. A. Short, J. A. Chasis, J. C. Winkelmann, and J. G. Conboy, 2006, Fox-2 splicing factor binds to a conserved intron motif to promote inclusion of protein 4.1R alternative exon 16: *J Biol Chem*, v. 281, p. 12468-74.
- Pozzoli, U., and M. Sironi, 2005, Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals: *Cell Mol Life Sci*, v. 62, p. 1579-604.
- Proudfoot, N., and J. O'Sullivan, 2002, Polyadenylation: a tail of two complexes: *Curr Biol*, v. 12, p. R855-7.
- Pyle, A. M., O. Fedorova, and C. Waldsich, 2007, Folding of group II introns: a model system for large, multidomain RNAs?: *Trends Biochem Sci*, v. 32, p. 138-45.
- Quang, C. T., O. Wessely, M. Pironin, H. Beug, and J. Ghysdael, 1997, Cooperation of Spi-1/PU.1 with an activated erythropoietin receptor inhibits apoptosis and Epo-dependent differentiation in primary erythroblasts and induces their Kit ligand-dependent proliferation: *Embo J*, v. 16, p. 5639-53.
- Quelle, D. E., F. W. Quelle, and D. M. Wojchowski, 1992, Mutations in the WSAWSE and cytosolic domains of the erythropoietin receptor affect signal transduction and ligand binding and internalization: *Mol Cell Biol*, v. 12, p. 4553-61.
- Ralston, K. J., S. L. Hird, X. Zhang, J. L. Scott, B. Jin, R. F. Thorne, M. C. Berndt, A. W. Boyd, and G. F. Burns, 2004, The LFA-1-associated molecule PTA-1 (CD226) on T cells forms a dynamic molecular complex with protein 4.1G and human discs large: *J Biol Chem*, v. 279, p. 33816-28.
- Ramez, M., M. Blot-Chabaud, F. Cluzeaud, S. Chanan, M. Patterson, L. D. Walensky, S. Marfatia, A. J. Baines, J. A. Chasis, J. G. Conboy, N. Mohandas, and P. Gascard, 2003, Distinct distribution of specific members of protein 4.1 gene family in the mouse nephron: *Kidney Int*, v. 63, p. 1321-37.
- Rechsteiner, M., 1990, PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis: *Semin Cell Biol*, v. 1, p. 433-40.
- Reed, R., 1996, Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing: *Curr Opin Genet Dev*, v. 6, p. 215-20.
- Rekhtman, N., K. S. Choe, I. Matushansky, S. Murray, T. Stopka, and A. I. Skoultschi, 2003, PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation: *Mol Cell Biol*, v. 23, p. 7460-74.

- Revil, T., L. Shkreta, and B. Chabot, 2006, [Pre-mRNA alternative splicing in cancer: functional impact, molecular mechanisms and therapeutic perspectives]: *Bull Cancer*, v. 93, p. 909-19.
- Rieske, P., and J. M. Pongubala, 2001, AKT induces transcriptional activity of PU.1 through phosphorylation-mediated modifications within its transactivation domain: *J Biol Chem*, v. 276, p. 8460-8.
- Rimmele, P., O. Kosmider, P. Mayeux, F. Moreau-Gachelin, and C. Guillouf, 2007, Spi-1/PU.1 participates in erythroleukemogenesis by inhibiting apoptosis in cooperation with Epo signaling and by blocking erythroid differentiation: *Blood*, v. 109, p. 3007-14.
- Rino, J., T. Carvalho, J. Braga, J. M. Desterro, R. Luhrmann, and M. Carmo-Fonseca, 2007, A stochastic view of spliceosome assembly and recycling in the nucleus: *PLoS Comput Biol*, v. 3, p. 2019-31.
- Rose, M., E. Dutting, and R. Enz, 2008, Band 4.1 proteins are expressed in the retina and interact with both isoforms of the metabotropic glutamate receptor type 8: *J Neurochem*.
- Rossi, F., E. Labourier, T. Forne, G. Divita, J. Derancourt, J. F. Riou, E. Antoine, G. Cathala, C. Brunel, and J. Tazi, 1996, Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I: *Nature*, v. 381, p. 80-2.
- Roth, M. B., C. Murphy, and J. G. Gall, 1990, A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope stains lampbrush chromosome loops and small granules in the amphibian germinal vesicle: *J Cell Biol*, v. 111, p. 2217-23.
- Roth, M. B., A. M. Zahler, and J. A. Stolk, 1991, A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription: *J Cell Biol*, v. 115, p. 587-96.
- Ruta, M., R. Bestwick, C. Machida, and D. Kabat, 1983, Loss of leukemogenicity caused by mutations in the membrane glycoprotein structural gene of Friend spleen focus-forming virus: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 80, p. 4704-8.
- Saccone, G., A. Pane, and L. C. Polito, 2002, Sex determination in flies, fruitflies and butterflies: *Genetica*, v. 116, p. 15-23.
- Sanford, J. R., and J. P. Bruzik, 1999, Developmental regulation of SR protein phosphorylation and activity: *Genes Dev*, v. 13, p. 1513-8.
- Sanford, J. R., and J. F. Caceres, 2004, Pre-mRNA splicing: life at the centre of the central dogma: *J Cell Sci*, v. 117, p. 6261-3.
- Schischmanoff, P. O., P. Yaswen, M. K. Parra, G. Lee, J. A. Chasis, N. Mohandas, and J. G. Conboy, 1997, Cell shape-dependent regulation of protein 4.1 alternative pre-mRNA splicing in mammary epithelial cells: *J Biol Chem*, v. 272, p. 10254-9.
- Schuetze, S., R. Paul, B. C. Gliniak, and D. Kabat, 1992, Role of the PU.1 transcription factor in controlling differentiation of Friend erythroleukemia cells: *Mol Cell Biol*, v. 12, p. 2967-75.
- Scott, E. W., M. C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh, 1994, Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages: *Science*, v. 265, p. 1573-7.
- Seo, P. S., J. J. Jeong, L. Zeng, C. G. Takoudis, B. J. Quinn, A. A. Khan, T. Hanada, and A. H. Chishti, 2009, Alternatively spliced exon 5 of the FERM domain of protein 4.1R encodes a novel binding site for erythrocyte p55 and is critical for membrane targeting in epithelial cells: *Biochim Biophys Acta*, v. 1793, p. 281-9.
- Shackelford, R., D. O. Adams, and S. P. Johnson, 1995, IFN-gamma and lipopolysaccharide induce DNA binding of transcription factor PU.1 in murine tissue macrophages: *J Immunol*, v. 154, p. 1374-82.

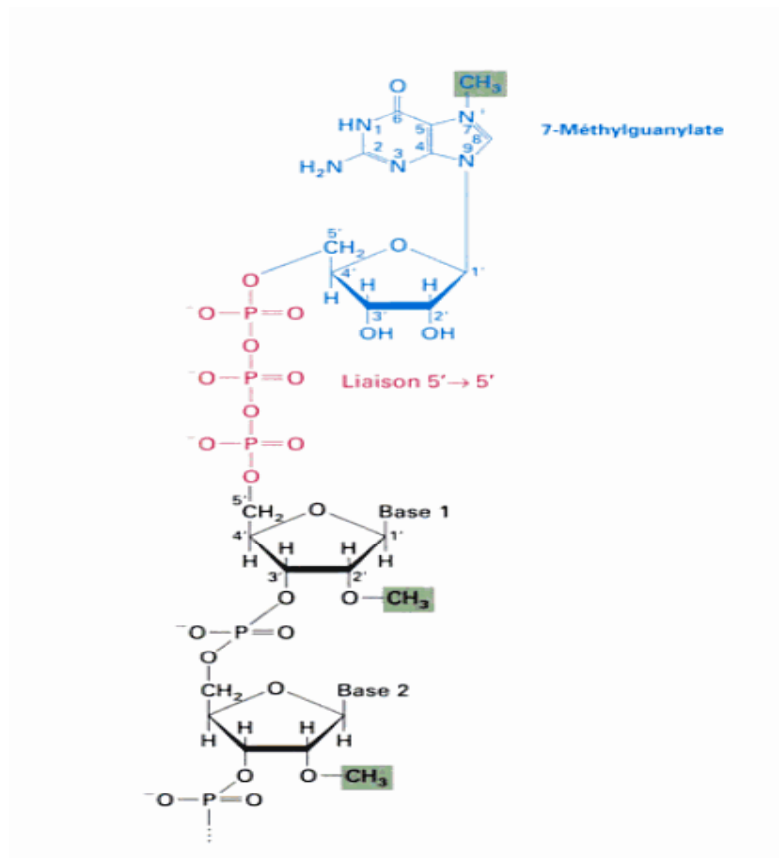
- Sharp, P. A., 1994, Split genes and RNA splicing: *Cell*, v. 77, p. 805-15.
- Shen, H., and M. R. Green, 2004, A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly: *Mol Cell*, v. 16, p. 363-73.
- Shi, J., Z. Hu, K. Pabon, and K. W. Scotto, 2008, Caffeine regulates alternative splicing in a subset of cancer-associated genes: a role for SC35: *Mol Cell Biol*, v. 28, p. 883-95.
- Shi, Z. T., V. Afzal, B. Collier, D. Patel, J. A. Chasis, M. Parra, G. Lee, C. Paszty, M. Stevens, L. Walensky, L. L. Peters, N. Mohandas, E. Rubin, and J. G. Conboy, 1999, Protein 4.1R-deficient mice are viable but have erythroid membrane skeleton abnormalities: *J Clin Invest*, v. 103, p. 331-40.
- Shin, C., Y. Feng, and J. L. Manley, 2004, Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock: *Nature*, v. 427, p. 553-8.
- Silva, M., A. Benito, C. Sanz, F. Prosper, D. Ekhterae, G. Nunez, and J. L. Fernandez-Luna, 1999, Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines: *J Biol Chem*, v. 274, p. 22165-9.
- Simard, M. J., and B. Chabot, 2002, SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization: *Mol Cell Biol*, v. 22, p. 4001-10.
- Siomi, H., and G. Dreyfuss, 1995, A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein: *J Cell Biol*, v. 129, p. 551-60.
- Sleeman, J. E., L. Trinkle-Mulcahy, A. R. Prescott, S. C. Ogg, and A. I. Lamond, 2003, Cajal body proteins SMN and Coilin show differential dynamic behaviour in vivo: *J Cell Sci*, v. 116, p. 2039-50.
- Spector, D. L., 1993, Nuclear organization of pre-mRNA processing: *Curr Opin Cell Biol*, v. 5, p. 442-7.
- Sperling, J., M. Azubel, and R. Sperling, 2008, Structure and function of the Pre-mRNA splicing machine: *Structure*, v. 16, p. 1605-15.
- Spritz, R. A., K. Strunk, C. S. Surowy, S. O. Hoch, D. E. Barton, and U. Francke, 1987, The human U1-70K snRNP protein: cDNA cloning, chromosomal localization, expression, alternative splicing and RNA-binding: *Nucleic Acids Res*, v. 15, p. 10373-91.
- Spyropoulos, D. D., P. N. Pharr, K. R. Lavenburg, P. Jackers, T. S. Papas, M. Ogawa, and D. K. Watson, 2000, Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor: *Mol Cell Biol*, v. 20, p. 5643-52.
- Stagg, M. A., E. Carter, N. Sohrabi, U. Siedlecka, G. K. Soppa, F. Mead, N. Mohandas, P. Taylor-Harris, A. Baines, P. Bennett, M. H. Yacoub, J. C. Pinder, and C. M. Terracciano, 2008, Cytoskeletal protein 4.1R affects repolarization and regulates calcium handling in the heart: *Circ Res*, v. 103, p. 855-63.
- Stamm, S., 2002, Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome: *Hum Mol Genet*, v. 11, p. 2409-16.
- Stamm, S., 2008, Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation: *J Biol Chem*, v. 283, p. 1223-7.
- Stamm, S., S. Ben-Ari, I. Rafalska, Y. Tang, Z. Zhang, D. Toiber, T. A. Thanaraj, and H. Soreq, 2005, Function of alternative splicing: *Gene*, v. 344, p. 1-20.
- Starck, J., A. Doubeikovski, S. Sarrazin, C. Gonnet, G. Rao, A. Skoultchi, J. Godet, I. Dusanter-Fourt, and F. Morle, 1999, Spi-1/PU.1 is a positive regulator of the Fli-1 gene involved in inhibition of erythroid differentiation in friend erythroleukemic cell lines: *Mol Cell Biol*, v. 19, p. 121-35.
- Stark, H., and R. Luhrmann, 2006, Cryo-electron microscopy of spliceosomal components: *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, v. 35, p. 435-57.

- Starr, R., T. A. Willson, E. M. Viney, L. J. Murray, J. R. Rayner, B. J. Jenkins, T. J. Gonda, W. S. Alexander, D. Metcalf, N. A. Nicola, and D. J. Hilton, 1997, A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling: *Nature*, v. 387, p. 917-21.
- Stopka, T., D. F. Amanatullah, M. Papetti, and A. I. Skoultchi, 2005, PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure: *Embo J*, v. 24, p. 3712-23.
- Syed, R. S., S. W. Reid, C. Li, J. C. Cheetham, K. H. Aoki, B. Liu, H. Zhan, T. D. Osslund, A. J. Chirino, J. Zhang, J. Finer-Moore, S. Elliott, K. Sitney, B. A. Katz, D. J. Matthews, J. J. Wendoloski, J. Egrie, and R. M. Stroud, 1998, Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation: *Nature*, v. 395, p. 511-6.
- Szymczyna, B. R., J. Bowman, S. McCracken, A. Pineda-Lucena, Y. Lu, B. Cox, M. Lambermon, B. R. Graveley, C. H. Arrowsmith, and B. J. Blencowe, 2003, Structure and function of the PWI motif: a novel nucleic acid-binding domain that facilitates pre-mRNA processing: *Genes Dev*, v. 17, p. 461-75.
- Takakuwa, Y., 2000, Protein 4.1, a multifunctional protein of the erythrocyte membrane skeleton: structure and functions in erythrocytes and nonerythroid cells: *Int J Hematol*, v. 72, p. 298-309.
- Takakuwa, Y., G. Tchernia, M. Rossi, M. Benabadji, and N. Mohandas, 1986, Restoration of normal membrane stability to unstable protein 4.1-deficient erythrocyte membranes by incorporation of purified protein 4.1: *J Clin Invest*, v. 78, p. 80-5.
- Takeuchi, K., A. Kawashima, A. Nagafuchi, and S. Tsukita, 1994, Structural diversity of band 4.1 superfamily members: *J Cell Sci*, v. 107 ( Pt 7), p. 1921-8.
- Tambourin, P. E., F. Wendling, C. Jasmin, and F. Smadja-Joffe, 1979, The physiopathology of Friend leukemia: *Leuk Res*, v. 3, p. 117-29.
- Tang, C. J., and T. K. Tang, 1998, The 30-kD domain of protein 4.1 mediates its binding to the carboxyl terminus of pICln, a protein involved in cellular volume regulation: *Blood*, v. 92, p. 1442-7.
- Tang, T. K., Z. Qin, T. Leto, V. T. Marchesi, and E. J. Benz, Jr., 1990, Heterogeneity of mRNA and protein products arising from the protein 4.1 gene in erythroid and nonerythroid tissues: *J Cell Biol*, v. 110, p. 617-24.
- Tarn, W. Y., 2007, Cellular signals modulate alternative splicing: *J Biomed Sci*, v. 14, p. 517-22.
- Tarn, W. Y., and J. A. Steitz, 1996, A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro: *Cell*, v. 84, p. 801-11.
- Tazi, J., N. Bakkour, and S. Stamm, 2009, Alternative splicing and disease: *Biochim Biophys Acta*, v. 1792, p. 14-26.
- Tazi, J., U. Kornstadt, F. Rossi, P. Jeanteur, G. Cathala, C. Brunel, and R. Luhrmann, 1993, Thiophosphorylation of U1-70K protein inhibits pre-mRNA splicing: *Nature*, v. 363, p. 283-6.
- Tchernia, G., N. Mohandas, and S. B. Shoheit, 1981, Deficiency of skeletal membrane protein band 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosis. Implications for erythrocyte membrane stability: *J Clin Invest*, v. 68, p. 454-60.
- Terada, M., P. A. Marks, and R. A. Rifkind, 1978, Erythroid cell differentiation: *Mol Cell Biochem*, v. 21, p. 33-41.
- Terada, N., N. Ohno, H. Yamakawa, O. Ohara, X. Liao, T. Baba, and S. Ohno, 2005, Immunohistochemical study of a membrane skeletal molecule, protein 4.1G, in mouse seminiferous tubules: *Histochem Cell Biol*, v. 124, p. 303-11.

- Theissen, H., M. Etzerodt, R. Reuter, C. Schneider, F. Lottspeich, P. Argos, R. Luhrmann, and L. Philipson, 1986, Cloning of the human cDNA for the U1 RNA-associated 70K protein: *Embo J*, v. 5, p. 3209-17.
- Theoleyre, O., and F. Baklouti, 2004, [Oncogenic transcription factors as splicing regulators]: *Med Sci (Paris)*, v. 20, p. 1014-9.
- Theoleyre, O., M. Deguillien, M. Moriniere, J. Starck, F. Moreau-Gachelin, F. Morle, and F. Baklouti, 2004, Spi-1/PU.1 but not Fli-1 inhibits erythroid-specific alternative splicing of 4.1R pre-mRNA in murine erythroleukemia cells: *Oncogene*, v. 23, p. 920-7.
- Tyson-Capper, A. J., J. Bailey, A. R. Krainer, S. C. Robson, and G. N. Europe-Finner, 2005, The switch in alternative splicing of cyclic AMP-response element modulator protein CREM $\tau$  $2\alpha$  (activator) to CREM $\alpha$  (repressor) in human myometrial cells is mediated by SRp40: *J Biol Chem*, v. 280, p. 34521-9.
- Underwood, J. G., P. L. Boutz, J. D. Dougherty, P. Stoilov, and D. L. Black, 2005, Homologues of the *Caenorhabditis elegans* Fox-1 protein are neuronal splicing regulators in mammals: *Mol Cell Biol*, v. 25, p. 10005-16.
- Ungureanu, D., P. Saharinen, I. Junttila, D. J. Hilton, and O. Silvennoinen, 2002, Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1: *Mol Cell Biol*, v. 22, p. 3316-26.
- Verdier, F., S. Chretien, C. Billat, S. Gisselbrecht, C. Lacombe, and P. Mayeux, 1997, Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-2. An alternate pathway for erythropoietin-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation: *J Biol Chem*, v. 272, p. 26173-8.
- Wallach, S. B., A. Friedmann, and D. Naor, 2000, The CD44 receptor of the mouse LB T-cell lymphoma: analysis of the isoform repertoire and ligand binding properties by reverse-transcriptase polymerase chain reaction and antisense oligonucleotides: *Cancer Detect Prev*, v. 24, p. 33-45.
- Wang, H. Y., W. Lin, J. A. Dyck, J. M. Yeakley, Z. Songyang, L. C. Cantley, and X. D. Fu, 1998, SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells: *J Cell Biol*, v. 140, p. 737-50.
- Wang, J. M., M. Z. Lai, and H. F. Yang-Yen, 2003, Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway: *Mol Cell Biol*, v. 23, p. 1896-909.
- Wang, Z., and C. B. Burge, 2008, Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code: *Rna*, v. 14, p. 802-13.
- Wasylyk, C., J. P. Kerckaert, and B. Wasylyk, 1992, A novel modulator domain of Ets transcription factors: *Genes Dev*, v. 6, p. 965-74.
- Weg-Remers, S., H. Ponta, P. Herrlich, and H. Konig, 2001, Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway: *Embo J*, v. 20, p. 4194-203.
- Witthuhn, B. A., F. W. Quelle, O. Silvennoinen, T. Yi, B. Tang, O. Miura, and J. N. Ihle, 1993, JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin: *Cell*, v. 74, p. 227-36.
- Wojchowski, D. M., R. C. Gregory, C. P. Miller, A. K. Pandit, and T. J. Pircher, 1999, Signal transduction in the erythropoietin receptor system: *Exp Cell Res*, v. 253, p. 143-56.
- Wu, H., X. Liu, R. Jaenisch, and H. F. Lodish, 1995, Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor: *Cell*, v. 83, p. 59-67.
- Wu, J. Y., and T. Maniatis, 1993, Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing: *Cell*, v. 75, p. 1061-70.

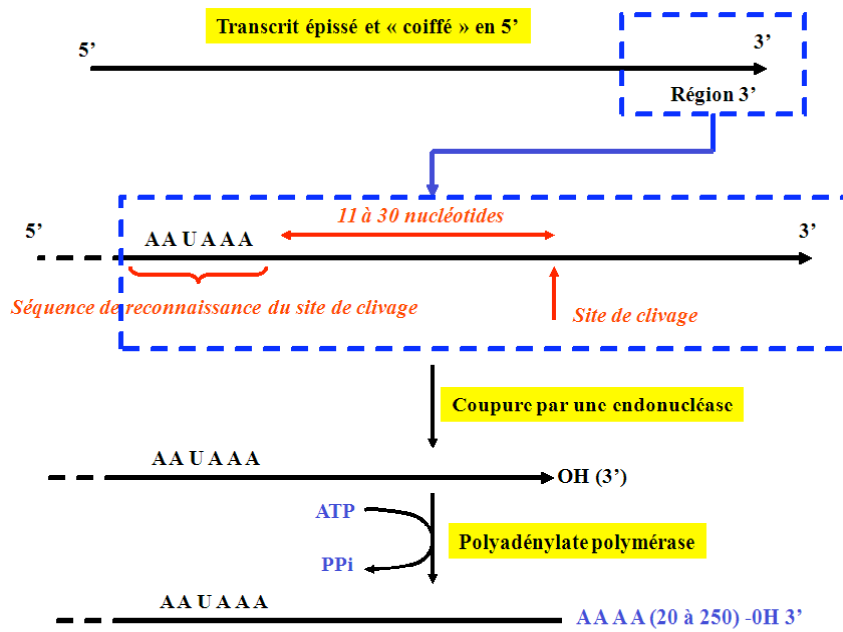
- Wu, X., K. Senechal, M. S. Neshat, Y. E. Whang, and C. L. Sawyers, 1998, The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 15587-91.
- Yamada, T., F. Kihara-Negishi, H. Yamamoto, M. Yamamoto, Y. Hashimoto, and T. Oikawa, 1998, Reduction of DNA binding activity of the GATA-1 transcription factor in the apoptotic process induced by overexpression of PU.1 in murine erythroleukemia cells: *Exp Cell Res*, v. 245, p. 186-94.
- Yamada, T., N. Kondoh, M. Matsumoto, M. Yoshida, A. Maekawa, and T. Oikawa, 1997, Overexpression of PU.1 induces growth and differentiation inhibition and apoptotic cell death in murine erythroleukemia cells: *Blood*, v. 89, p. 1383-93.
- Yamamoto, M., S. Takahashi, K. Onodera, Y. Muraosa, and J. D. Engel, 1997, Upstream and downstream of erythroid transcription factor GATA-1: *Genes Cells*, v. 2, p. 107-15.
- Yamamoto ML, Clark TA, Gee SL, Kang JA, Schweitzer AC, Wickrema A, Conboy JG. Alternative pre-mRNA splicing switches modulate gene expression in late erythropoiesis. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3363-70.
- Yan, X. B., C. H. Tang, Y. Huang, H. Fang, Z. Q. Yu, L. M. Wu, and R. Y. Liu, 2009, Alternative splicing in exon 9 of glucocorticoid receptor pre-mRNA is regulated by SRp40: *Mol Biol Rep*.
- Yang, G., S. C. Huang, J. Y. Wu, and E. J. Benz, Jr., 2005, An erythroid differentiation-specific splicing switch in protein 4.1R mediated by the interaction of SF2/ASF with an exonic splicing enhancer: *Blood*, v. 105, p. 2146-53.
- Yang, G., S. C. Huang, J. Y. Wu, and E. J. Benz, Jr., 2008, Regulated Fox-2 isoform expression mediates protein 4.1R splicing during erythroid differentiation: *Blood*, v. 111, p. 392-401.
- Yang, X., M. R. Bani, S. J. Lu, S. Rowan, Y. Ben-David, and B. Chabot, 1994, The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 6924-8.
- Yang, Z., N. Wara-Aswapati, C. Chen, J. Tsukada, and P. E. Auron, 2000, NF-IL6 (C/EBPbeta) vigorously activates il1b gene expression via a Spi-1 (PU.1) protein-protein tether: *J Biol Chem*, v. 275, p. 21272-7.
- Yoshimura, A., T. Zimmers, D. Neumann, G. Longmore, Y. Yoshimura, and H. F. Lodish, 1992, Mutations in the Trp-Ser-X-Trp-Ser motif of the erythropoietin receptor abolish processing, ligand binding, and activation of the receptor: *J Biol Chem*, v. 267, p. 11619-25.
- Yu, Y. T., M. D. Shu, and J. A. Steitz, 1998, Modifications of U2 snRNA are required for snRNP assembly and pre-mRNA splicing: *Embo J*, v. 17, p. 5783-95.
- Yuryev, A., M. Patturajan, Y. Litingtung, R. V. Joshi, C. Gentile, M. Gebara, and J. L. Corden, 1996, The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 6975-80.
- Zahler, A. M., W. S. Lane, J. A. Stolk, and M. B. Roth, 1992, SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors: *Genes Dev*, v. 6, p. 837-47.
- Zhang, C., Z. Zhang, J. Castle, S. Sun, J. Johnson, A. R. Krainer, and M. Q. Zhang, 2008, Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2: *Genes Dev*, v. 22, p. 2550-63.
- Zhang, J., M. S. Randall, M. R. Loyd, W. Li, R. L. Schweers, D. A. Persons, J. E. Rehg, C. T. Noguchi, J. N. Ihle, and P. A. Ney, 2006, Role of erythropoietin receptor signaling in Friend virus-induced erythroblastosis and polycythemia: *Blood*, v. 107, p. 73-8.

- Zhang, P., X. Zhang, A. Iwama, C. Yu, K. A. Smith, B. U. Mueller, S. Narravula, B. E. Torbett, S. H. Orkin, and D. G. Tenen, 2000, PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding: *Blood*, v. 96, p. 2641-8.
- Zhang, S., A. Mizutani, C. Hisatsune, T. Higo, H. Bannai, T. Nakayama, M. Hattori, and K. Mikoshiba, 2003, Protein 4.1N is required for translocation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 to the basolateral membrane domain in polarized Madin-Darby canine kidney cells: *J Biol Chem*, v. 278, p. 4048-56.
- Zheng, Z. M., 2004, Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression: *J Biomed Sci*, v. 11, p. 278-94.
- Zheng, Z. M., M. Huynen, and C. C. Baker, 1998, A pyrimidine-rich exonic splicing suppressor binds multiple RNA splicing factors and inhibits spliceosome assembly: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 14088-93.
- Zhou, H. L., A. P. Baraniak, and H. Lou, 2007, Role for Fox-1/Fox-2 in mediating the neuronal pathway of calcitonin/calcitonin gene-related peptide alternative RNA processing: *Mol Cell Biol*, v. 27, p. 830-41.
- Zhou, Z., L. J. Licklider, S. P. Gygi, and R. Reed, 2002, Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome: *Nature*, v. 419, p. 182-5.
- Zhu, H., T. Jackson, and H. F. Bunn, 2002, Detecting and responding to hypoxia: *Nephrol Dial Transplant*, v. 17 Suppl 1, p. 3-7.
- Zuo, P., and T. Maniatis, 1996, The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing: *Genes Dev*, v. 10, p. 1356-68.



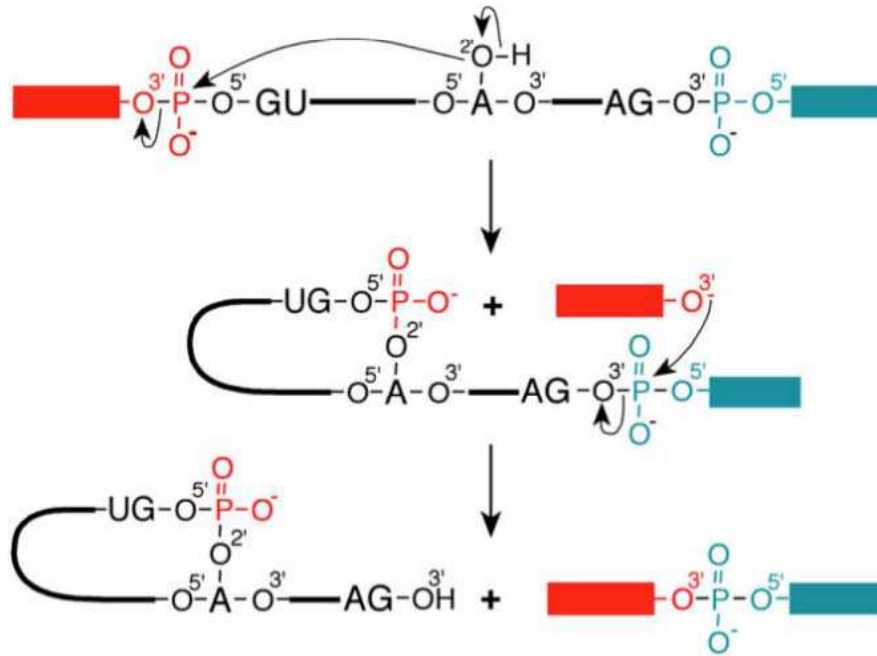
**Figure 1** : L'addition d'une coiffe en 5'



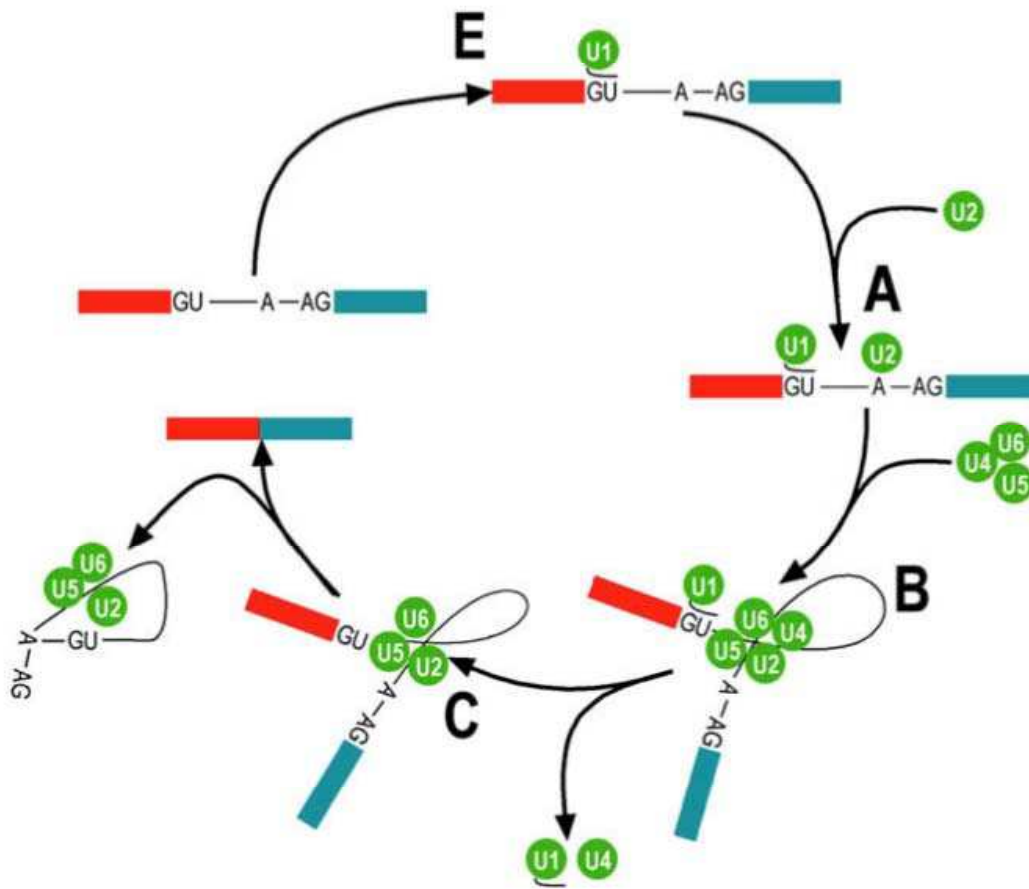


**Figure 2 :** La polyadénylation. Coupure de l'ARNm au niveau du site de clivage par une endonucléase et ajout d'environ 200 Adénosines par la Poly(A)polymérase

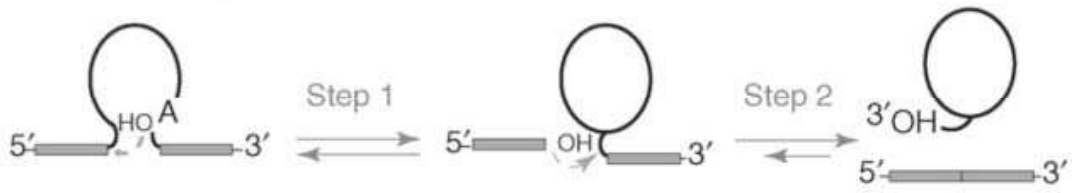




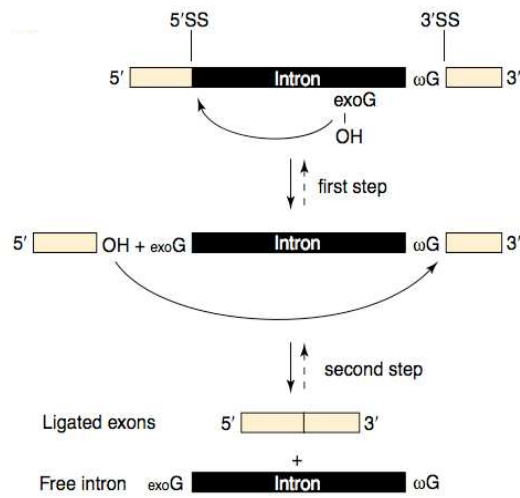
**Figure 4** : Les deux réactions de trans-esterification de l'épissage (Sperling et al., 2008).



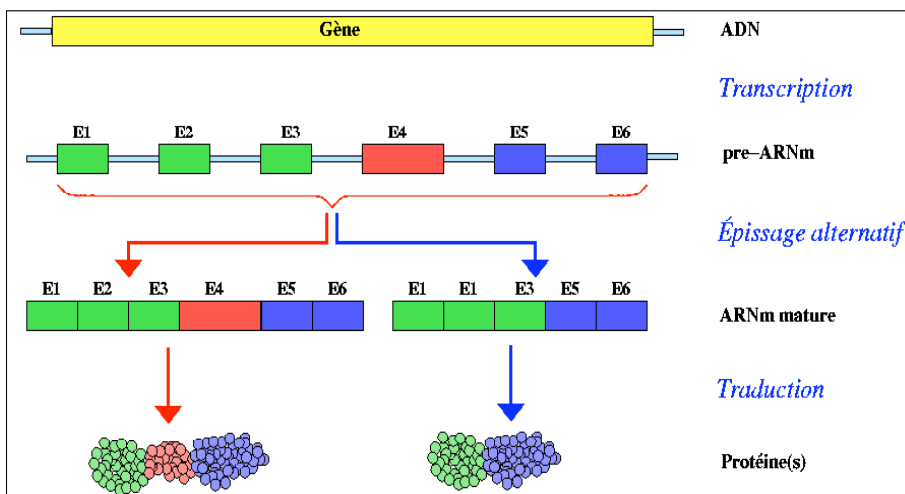
**Figure 5** : Représentation schématique des différentes étapes de l'assemblage du spliceosome (Sperling et al., 2008).



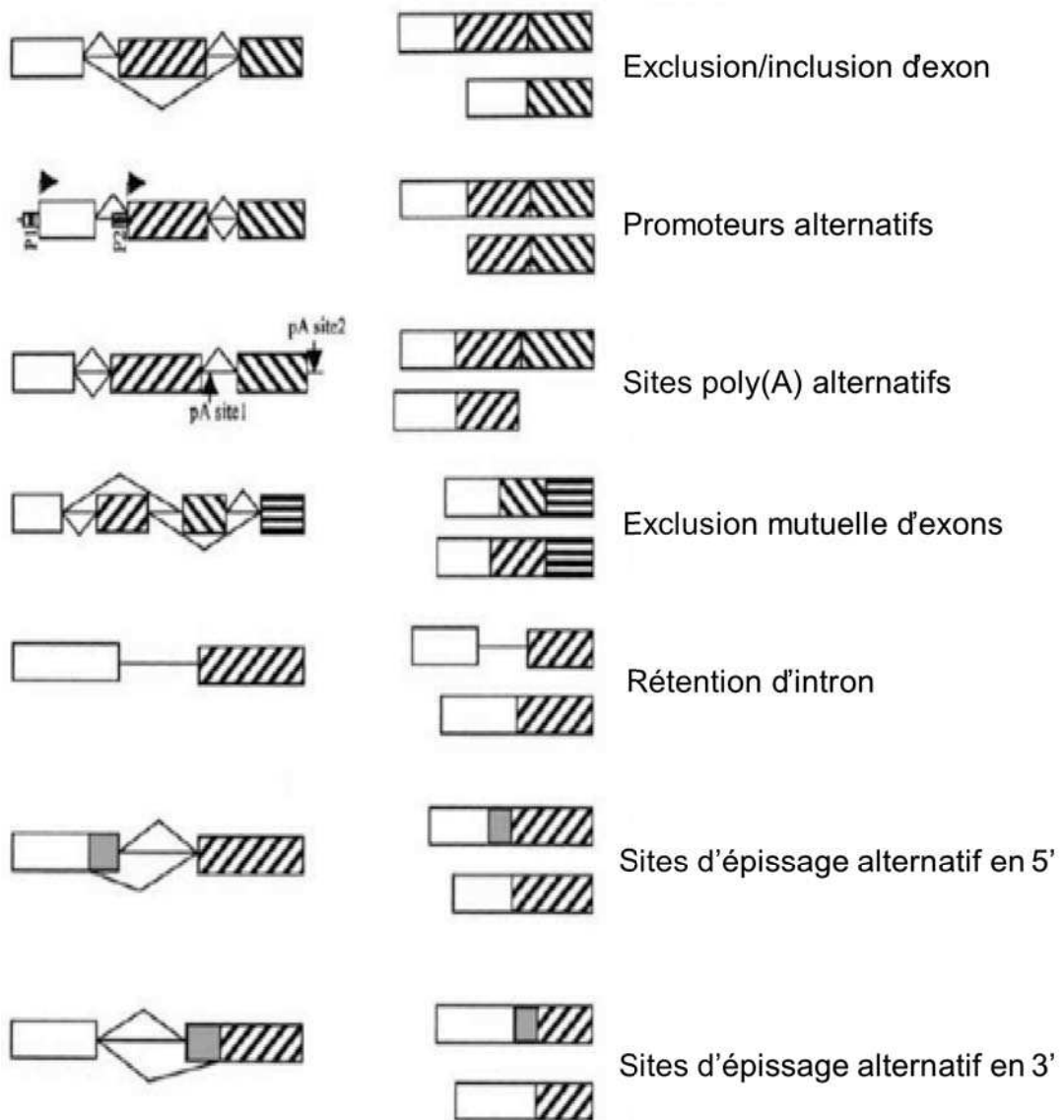
**Figure 6** : Auto-épissage des introns du groupe II (Pyle et al., 2007).



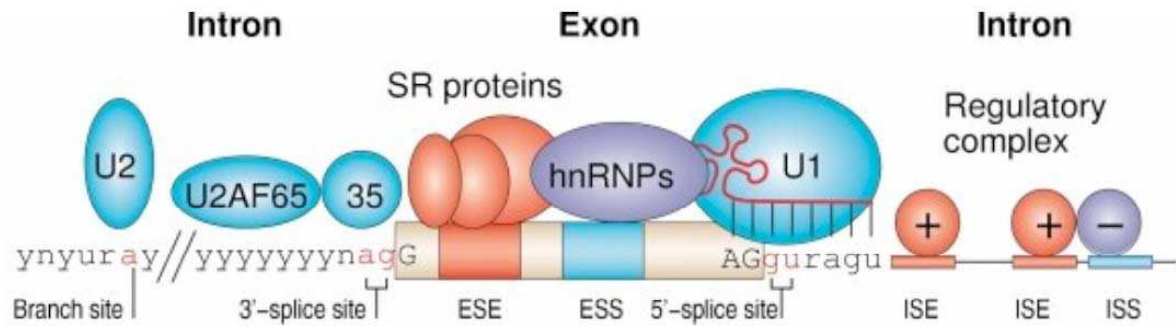
**Figure 7** : Auto-épissage des introns du groupe I (Haugen et al., 2005).



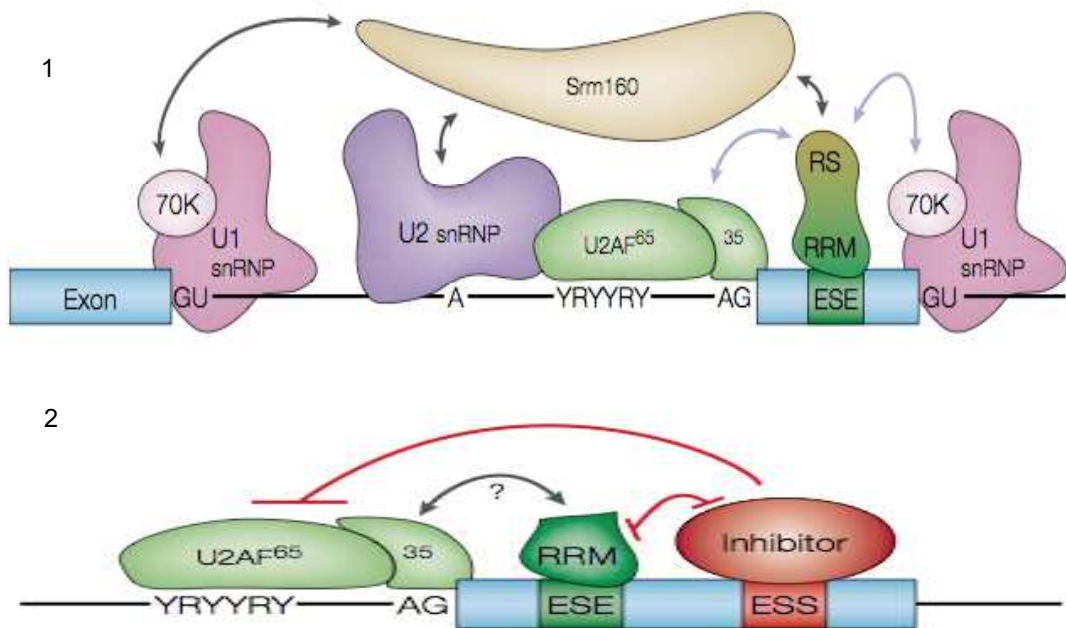
**Figure 8** : L'épissage alternatif



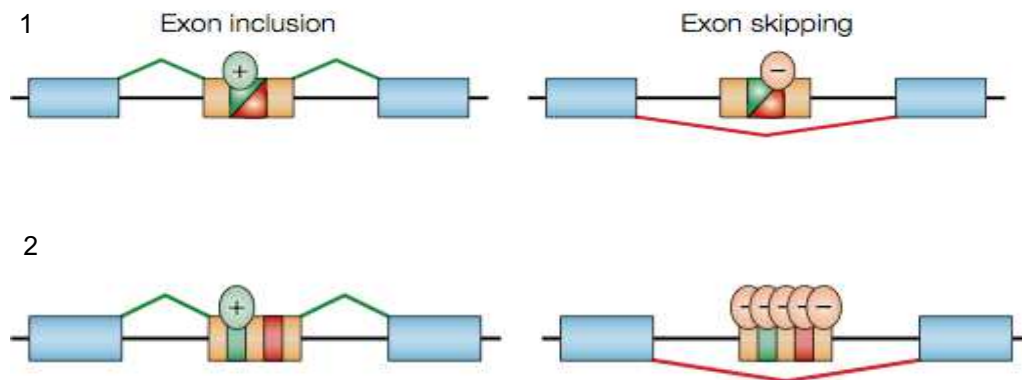
**Figure 9** : Les différents types d'épissage alternatif (Akgul et al., 2004).



**Figure 10 :** Elements régulateurs de l'épissage de l'ARN pré-messager. Les exons ainsi que les introns contiennent des séquences régulatrices positives (enhancers) reconnues par les protéines SR; ou négatives (silencers) reconnues par les protéines hnRNP (Pagani & Baralle, 2004).

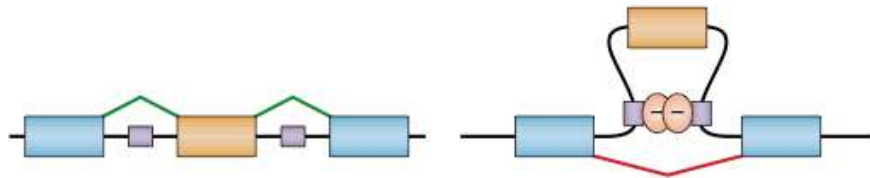


**Figure 11 :** Activation de l'épissage par un ESE: deux modèles ont été proposés. 1- Une protéine SR se lie sur l'ESE via son domaine RRM et recrute les composants du spliceosome via son domaine RS. 2- Une protéine SR se lie sur l'ESE et antagonise l'effet négatif d'un inhibiteur d'épissage associé à un ESS (Cartegni et al., 2002).

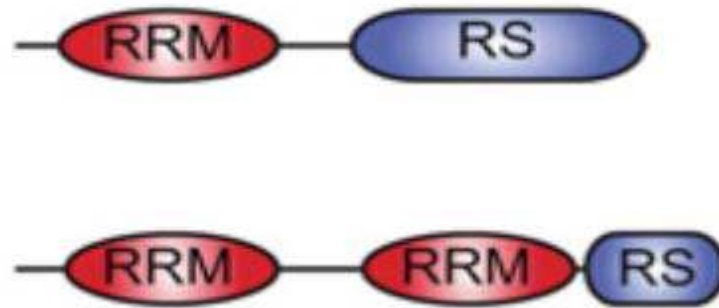


**Figure 12** : Inhibition de l'épissage par un ESS: 1- Inhibition par compétition directe. Compétition entre un activateur (SR) et un inhibiteur (hnRNP) pour occuper des séquences *cis* chevauchantes (ESE, ESS). 2- Inhibition de l'épissage par recouvrement d'un ESE par des inhibiteurs (hnRNP). Un facteur inhibiteur se lie sur un ESS et recrute d'autres facteurs pour former un complexe qui cache le site de liaison d'un activateur sur l'ESE adjacent (Cartegni et al., 2002).

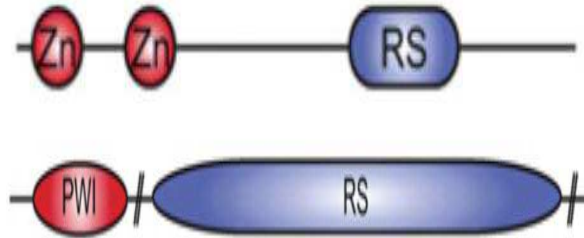




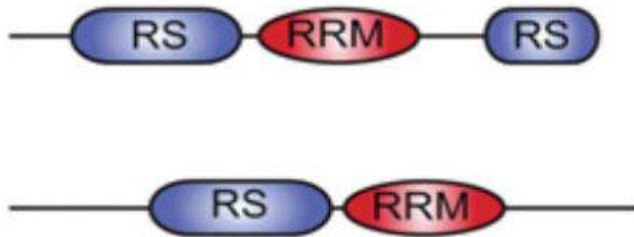
**Figure 13 :** Inhibition de l'épissage par un ISS (Inhibition par une boucle d'exon) (Cartegni et al., 2002).



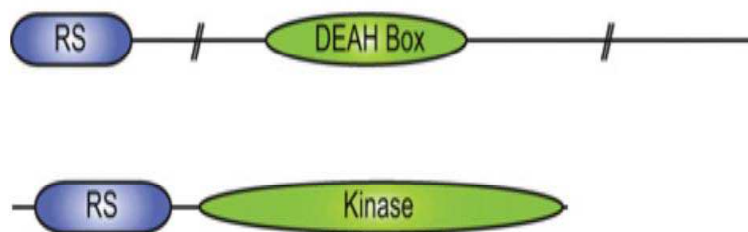
**Figure 14** : Représentation schématique des protéines SR (Long & Caceres, 2009)



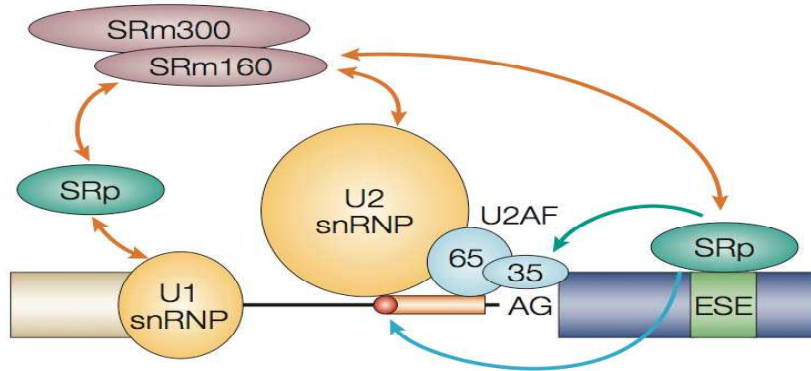
**Figure 15** : Représentation schématique des protéines relatives aux SR (Long & Caceres, 2009).



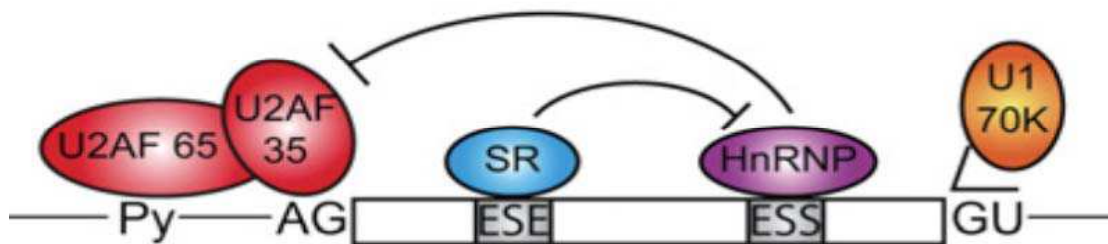
**Figure 16** : Représentation schématique des protéines SR additionnelles (Long & Caceres, 2009).



**Figure 17** : Représentation schématique des autres protéines a domaine RS (Long & Caceres, 2009).



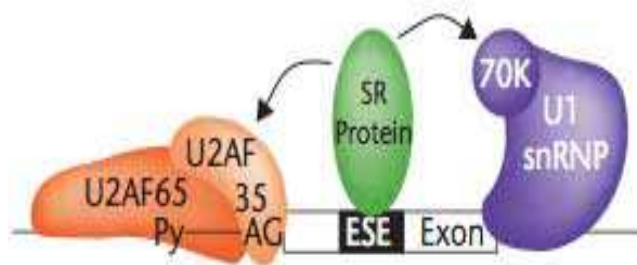
**Figure 18** : Activation de l'épissage par liaison directe des protéines SR sur un ESE (Matlin et al., 2005)



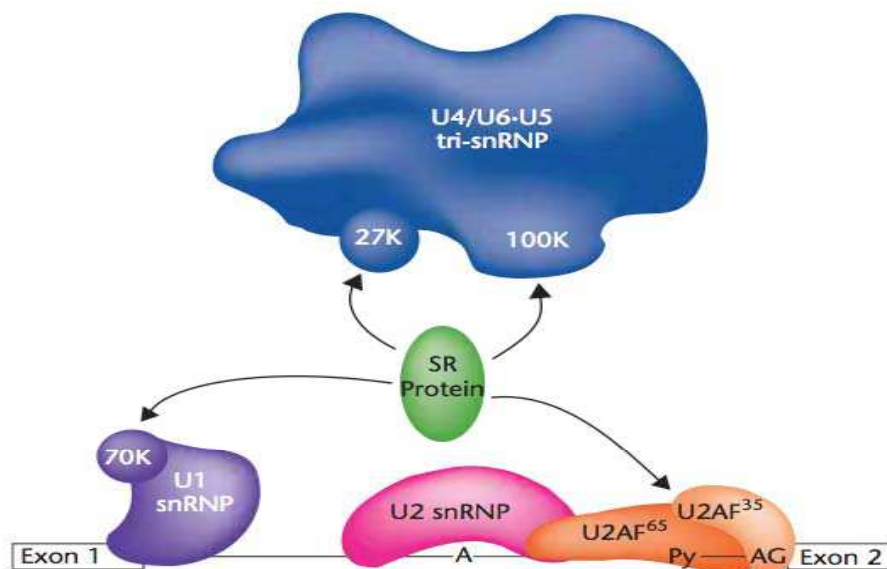
**Figure 19** : Les protéines SR antagonisent l'effet des represseurs pour activer l'épissage (Long & Caceres, 2009).



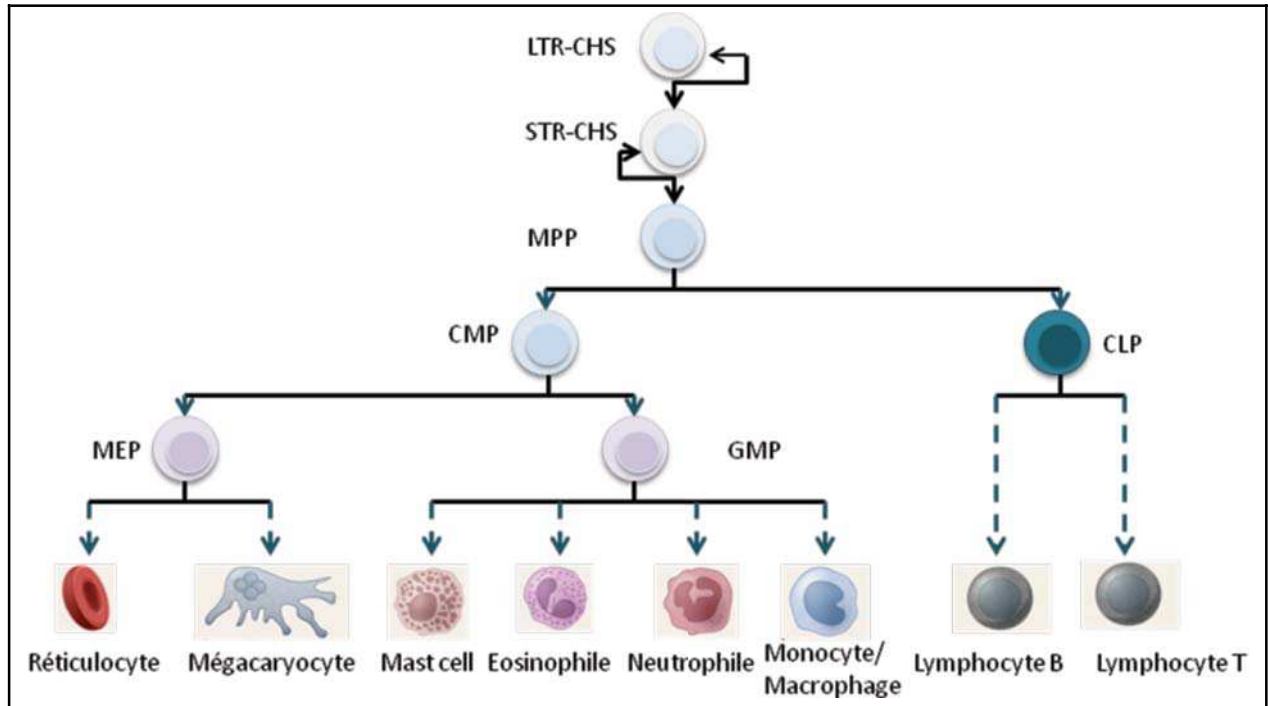
**Figure 20** : Activation du site 5' d'épissage par les protéines SR (Graveley et al., 2005).



**Figure 21** : Intervention des protéines SR dans la régulation de l'épissage constitutif « définition de l'exon » (Graveley et al., 2005).

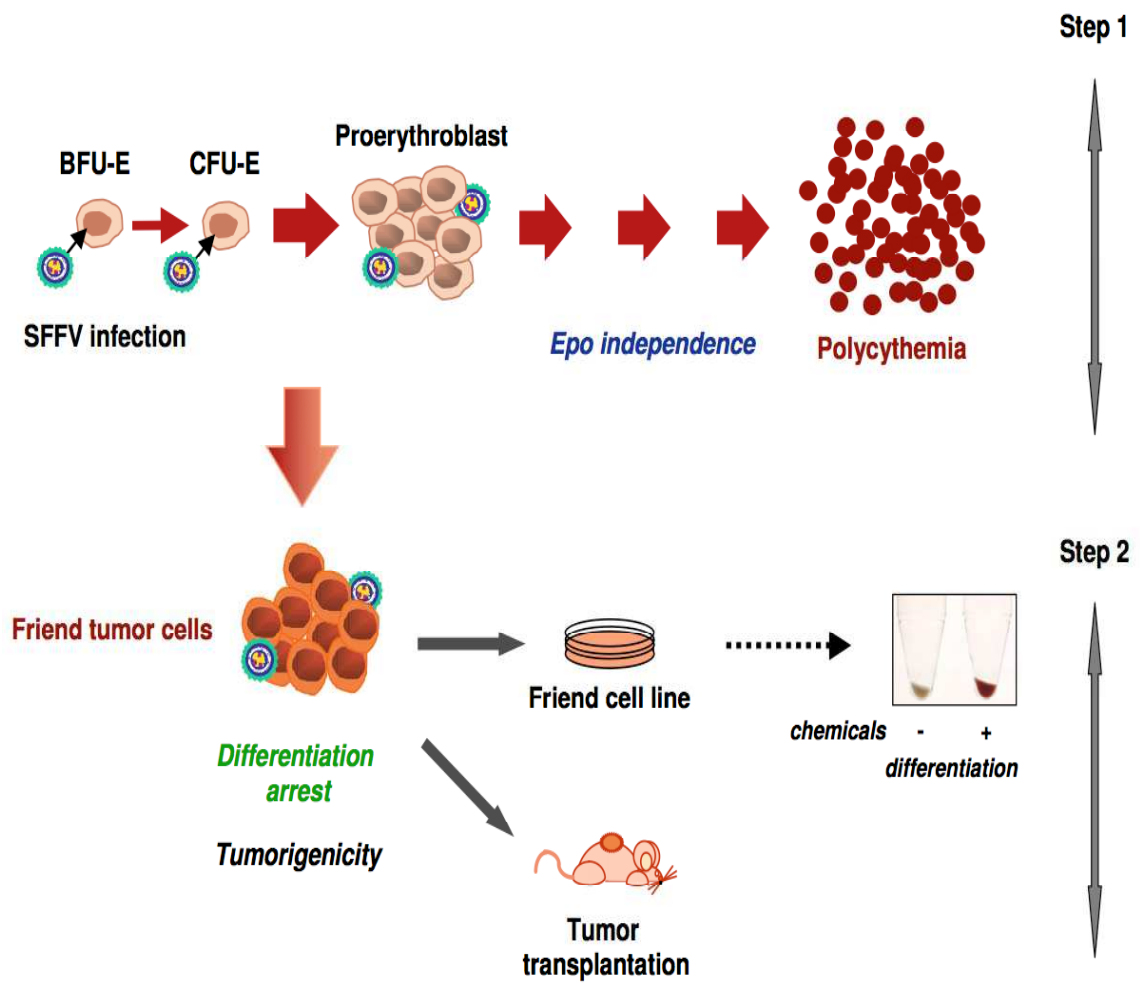


**Figure 22** : Régulation de l'épissage par les protéines SR indépendamment de l'exon (Graveley et al., 2005).

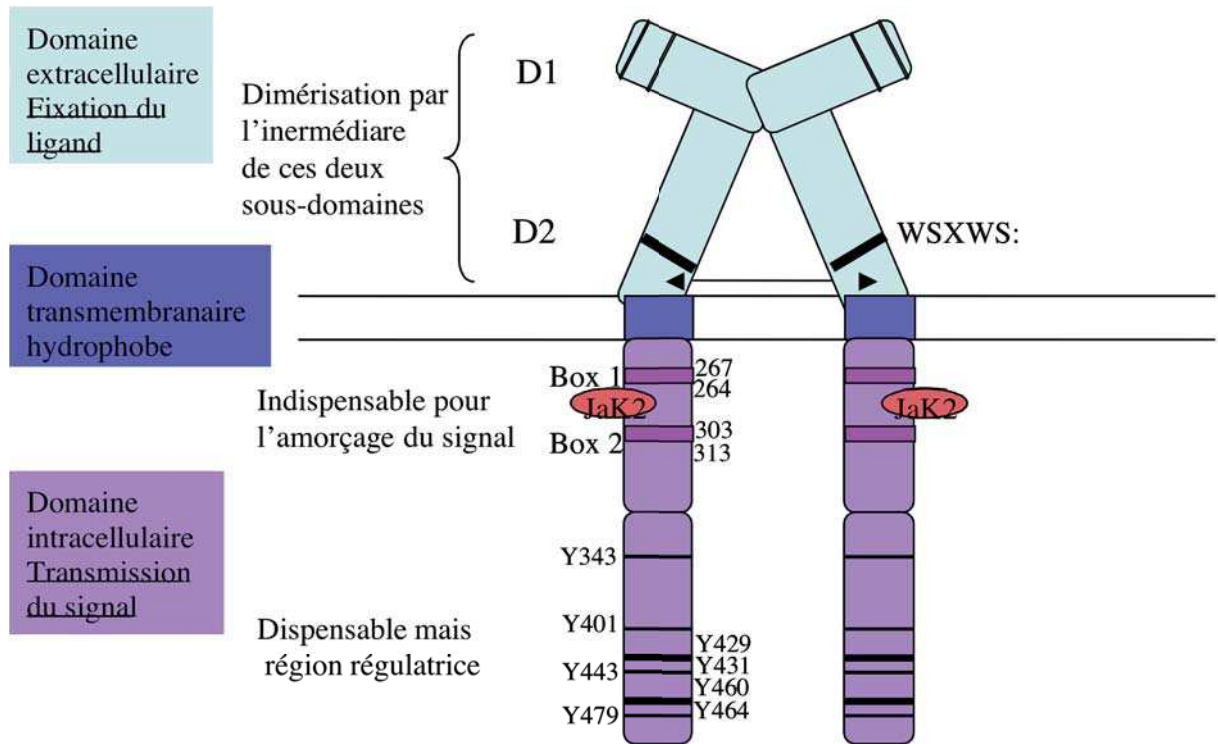


**Figure 25** : Schéma général de l'hématopoïèse. (Thèse Alexandre DOUABLIN ; LYON 2009).

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont caractérisées par leurs capacités d'auto-renouvellement et par la capacité de se différencier pour donner des progéniteurs multipotents (MPP). Ces progéniteurs (CMP et CLP) se différencient pour donner les différents précurseurs hématopoïétiques. LTR-CHS : Long term repopulating CSH ; STR-CHS : Short term repopulating CSH ; MPP : multipotent progenitors ; CMP : Common Myeloid Progenitors ; CLP : Common lymphoid Progenitors ; MEP : Megakaryocyte Erythroid Progenitors ; GMP : Granulo-Monocytic Progenitors

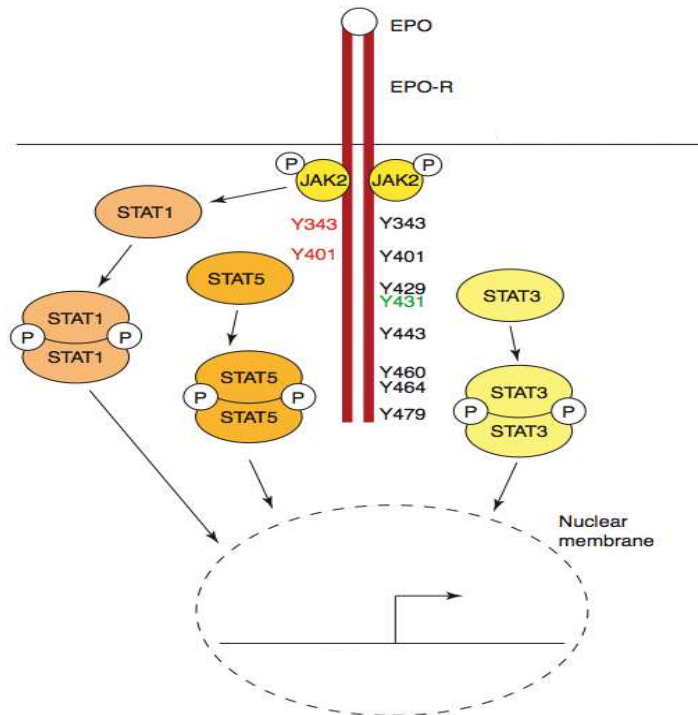


**Figure 27 :** Développement de l'érythroleucémie de Friend. Les érythroleucémies de Friend évoluent en deux étapes. Les précurseurs BFU-E et CFU-E sont les cibles du SFFV. L'infection par le SFFV induit la prolifération des proérythroblastes qui se différencient en érythrocytes en absence de l'EPO (infection par SFFVp). La deuxième étape est caractérisée par la formation des cellules cancéreuses bloquées au cours de leur différenciation. Ces cellules peuvent se différencier sous l'action d'un inducteur chimique (Moreau-Gachelin, 2008).

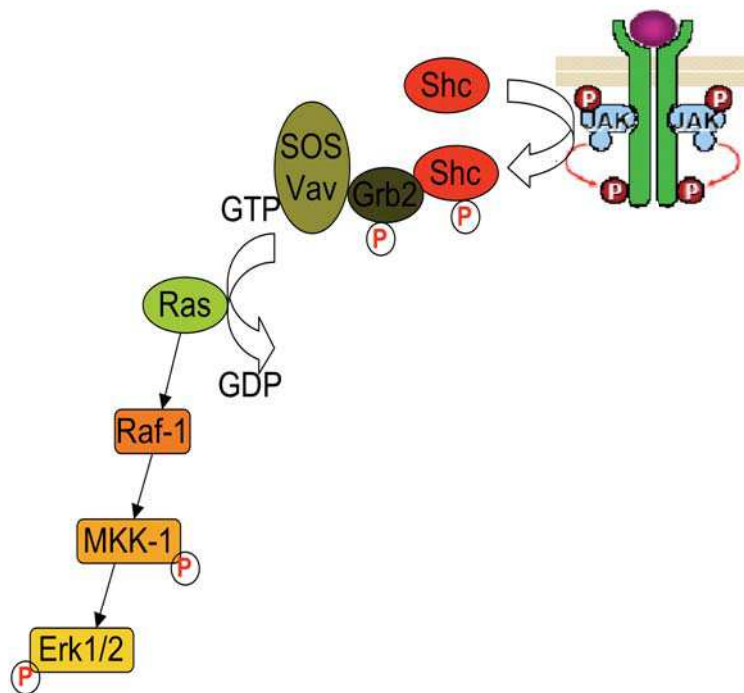


**Figure 28** : Représentation schématique de la structure d'un récepteur de l'érythropoïétine.

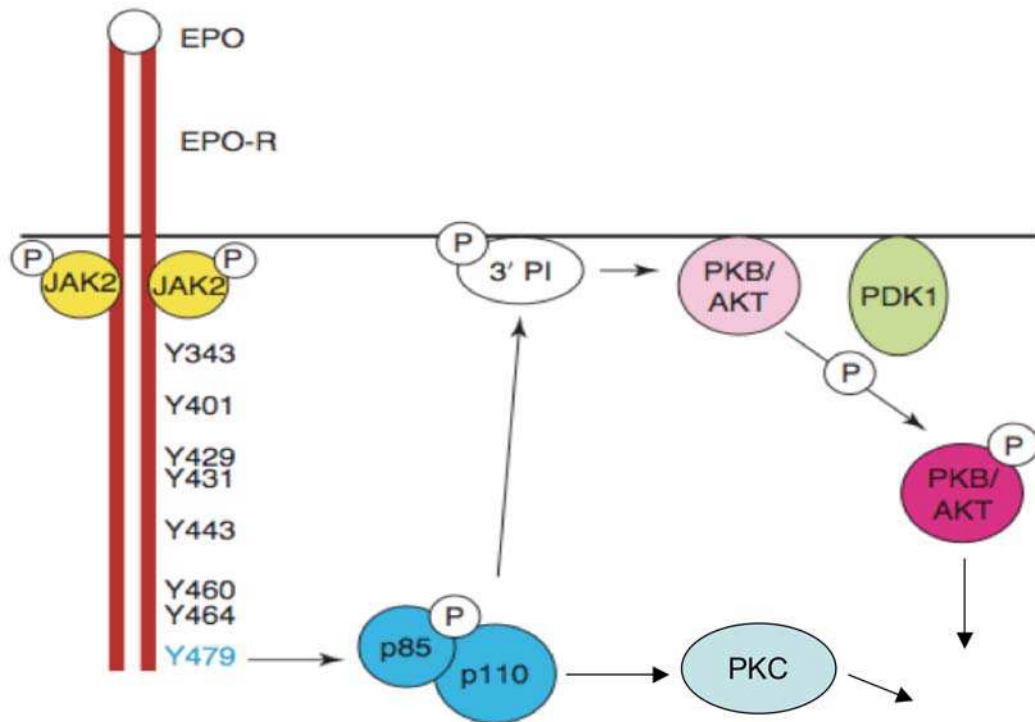




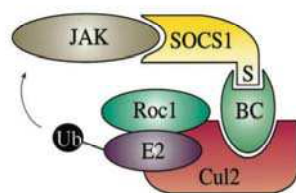
**Figure 29** : Représentation schématique de la voie de transduction de signal JAK-STAT initiée par l'activation de l'EPO-R (Richmond et al., 2005).



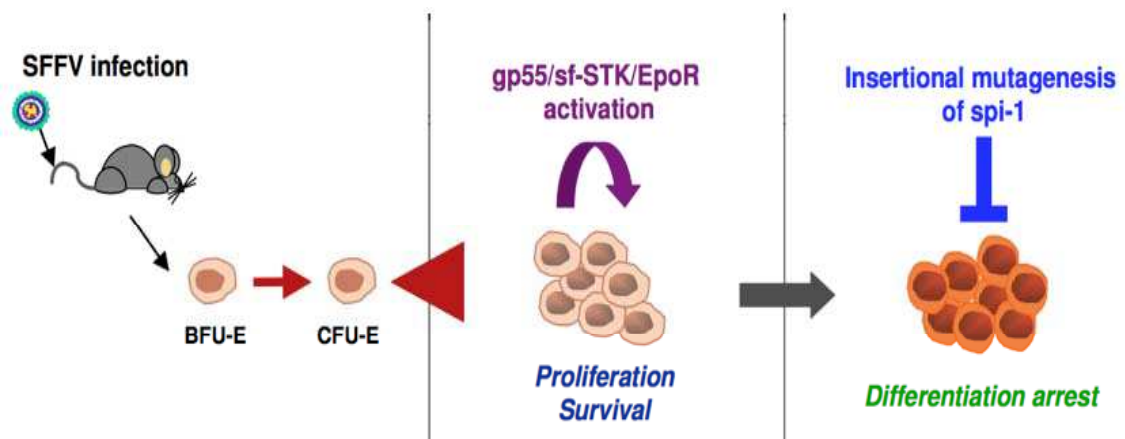
**Figure 30** : Cascades des MAP Kinases activées par l'Epo



**Figure 31** : Activation de la voie PI3K par l'Epo-R (Richmond et al., 2005).



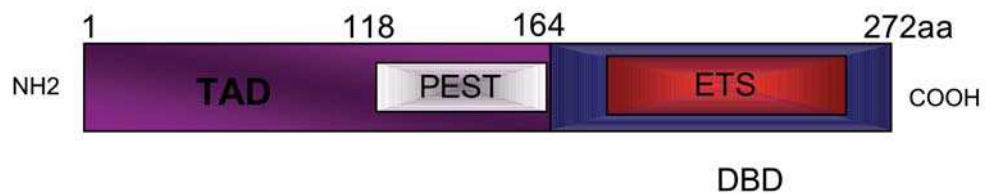
**Figure 32** : Modèle d'inhibition de la transduction du signal par SOCS. SOCS-1 interagit avec d'autres protéines pour rapprocher l'enzyme E2 pour ubiquitiner JAK. JAK sera dégradé par le protéasome (Kile & Alexander, 2001).



**Figure 33** : Événements caractérisant les érythroleucémie de Friend : l'activation constitutive de l'EPO-R et la surexpression de Spi-1/PU.1 (Moreau-Gachelin, 2008).

<b>Facteurs</b>	<b>Séquences de fixation à l'ADN</b>	<b>Partenaires essentiels</b>	<b>Fonctions</b>
<b>GATA-1</b>	T/AGATTA/G	FOG-1, EKLF, SP1, LMO2, CBP/p300 et Spi.1/PU.1...	Activateurs de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire
<b>FOG</b>	Séquence GATA?	GATA-1, CBP	Régulation de l'activité GATA-1
<b>EKLF</b>	CACCC	GATAs	Activateurs de la différenciation, régulation des gènes de globines
<b>NF-E2</b>	T/CGCTGAG/CTCAT/C	Mafs	Régulation des gènes de globines+ gènes codant pour protéines membranaires
<b>Fli-1</b>	ACCGGAAG/AT/C	Spi.1/PU.1, Tel, hnRNPs	Inhibiteur de la différenciation érythroïde
<b>Spi.1/PU.1</b>	AAAAGGAGAAG	GATA-1, p54nrb, TLS	Inhibiteur de la différenciation érythroïde (rôle dans l'épissage)

**Tableau 1** : Les principaux facteurs qui régulent la différenciation érythroïde.



**Figure 34** : Représentation schématique de la structure primaire de Spi-1/PU.1

## RESUME en français

L'épissage alternatif des ARNs pré-messagers est le mécanisme majeur de diversification de l'information génétique chez les eucaryotes supérieurs. Près de 70% des gènes sont concernés par ce mécanisme. Au cours de la différenciation érythroïde, l'inclusion de l'exon 16 du pré-messager 4.1R représente un événement majeur pour la fonction érythrocytaire normale de la protéine 4.1R. Cet événement d'épissage est bloqué dans les cellules MEL surexprimant l'oncoprotéine Spi.1/PU.1.

Mon travail de thèse avait pour but de comprendre ce mécanisme de blocage en étudiant le rôle de la voie de signalisation de la PI3K en relation avec la phosphorylation de Spi.1/PU.1 d'une part, et celle des facteurs d'épissage de la famille des protéines SR d'autre part.

J'ai montré que l'inhibition de la PI3K active la production d'hémoglobine ainsi que l'épissage de l'exon 16 4.1R. Ensuite j'ai montré que la phosphorylation de Spi-1/PU.1 par la PI3K est nécessaire pour son activité d'inhibition de la différenciation et de l'épissage de l'exon 16 4.1R.

Enfin, j'ai montré que le facteur d'épissage Srp40 de la famille des protéines SR est un activateur stade spécifique de l'inclusion de l'exon 16. La surexpression de Srp40 dans les cellules MEL active l'inclusion de l'exon 16 indépendamment de la différenciation

---

## TITRE en anglais

Alternative splicing regulation of the 4.1R pre-mRNA during erythroïde differentiation :  
Implication of the PI3-kinase signaling pathway

---

## RESUME en anglais

Pre-mRNA alternative splicing is a major mechanism of diversification of genetic information in evolved eukaryotes. The expression of about 70% of genes is regulated by this mechanism. During late erythroid development, the inclusion of exon 16 in the mature 4.1R mRNA is a major event that is essential for the corresponding protein function. This process is inhibited in MEL cells overexpressing the oncoprotein Spi-1/PU.1.

My thesis work aims to understand the mechanism of this inhibition by studying the role of PI3K signal transduction pathway and its effects on Spi-1/PU.1 in the first place, then its effects on the SR protein family.

I showed that PI3K inhibition leads to the activation of hemoglobin synthesis and to the inclusion of exon 16. Moreover, I showed that the phosphorylation mediated by the PI3K pathway is necessary for both the differentiation-inhibiting activity of Spi-1/PU.1 and concurrent inclusion of exon 16. Finally, I showed that the Srp40 splicing factor is an activator of the exon 16 inclusion. Overexpression of Srp40 in MEL cells lineage activates exon 16 inclusion independently of the differentiation.

---

## DISCIPLINE

Biologie moléculaire et cellulaire

---

## MOTS-CLES

Epissage alternatif, différenciation érythroïde, PI3K, Spi-1/PU.1, Srp40.

---

## INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire (CGMC). UMR 5534. 16 rue Raphaël Dubois.  
69622 VILLEURBANNE.