

Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I

> Discipline!: Biologie Cellulaire et Moléculaire par Alexis Dumortier

# Analyse des dérégulations d'expression génique associées au développement de lymphomes T chez des souris déficientes pour le gène Ikaros

Soutenue publiquement le 16 décembre 2003

Membres du jury!:

Directeur de thèse!: Dr. Philippe Kastner Rapporteur interne!: Pr. Pierre Oudet Rapporteur externe!: Dr. Freddy Radtke Rapporteur externe!: Pr. François Sigaux Je tiens à remercier, en premier lieu, Susan et Philippe pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et pour m'avoir accompagné tout au long de ces 4 années de thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, le Docteur Freddy Radtke, le Professeur François Sigaux et le Professeur Pierre Oudet, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Merci à tous les membres du labo, Peggy, Corinne, MacLean (qui sont malheureusement partis!!!), Sabrina, Robin et Eva. Je n'oublierai pas Mr Jonathan. Un grand merci donc à Jonathan, pour toutes les discussions scientifiques, gastronomiques, sportives, philosophiques et musicales que nous avons partagées. Une chose me manquera......la douce mélopée de ton métal-lyric-prog et je ne sais plus quoi encore.....

Merci à Christelle T., pour la relecture de ce manuscrit et tout le reste, à l'équipe des DNA chips, aux magiciens du FACS, Claudine et Jochen.....que de longs moments passés ensemble!!!

Merci à Bertrand, Romain, Guillaume, Omar et tous les autres pour toutes les soirées plus ou moins mouvementées.....je ne me souviens plus très bien!!?

Merci au groupe Headlight pour tous les bons concerts que nous avons réalisés!!

Merci à mes parents, mes frères et à Sigrid, pour leur patience, leur soutien et leur aide lors de ces années de thèse.

### Avant propos

Le système hématopoïétique des mammifères se renouvelle continuellement tant au cours de la vie embryonnaire que de la vie adulte, ce qui en fait un modèle développemental très intéressant. Au cours de leur maturation, les cellules hématopoïétiques doivent choisir entre la prolifération et la différenciation. Ces deux évènements sont régulés par différentes voies de signalisation et différents facteurs de transcription. Des perturbations de l'équilibre entre différenciation et prolifération peuvent être à l'origine de la transformation néoplastique des cellules hématopoïétiques.

Le facteur de transcription Ikaros est un des régulateurs importants du développement des cellules hématopoïétiques, et plus particulièrement des cellules du lignage lymphoïde. Des perturbations de l'expression d'Ikaros peuvent être à l'origine du développement de leucémies aiguës lymphoblastiques T et B.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé au rôle d'Ikaros dans le contrôle de la différenciation des neutrophiles. Une première partie de l'introduction décrira brièvement la maturation des neutrophiles dans la moelle osseuse et les résultats obtenus sur le rôle d'Ikaros dans la différenciation des neutrophiles seront uniquement présentés dans la partie résultats sous la forme d'un article.

J'ai choisi d'axer le thème de ce manuscrit autour des rôles de la voie Notch et du facteur de transcription Ikaros dans le contrôle de la différenciation des lymphocytes T. Ainsi, une seconde partie de l'introduction présentera le développement des lymphocytes T dans le thymus, la voie de signalisation Notch et le facteur de transcription Ikaros. La deuxième section des résultats présentera les données obtenues sur le rôle d'Ikaros et de la voie Notch dans le développement de lymphomes thymiques chez les souris Ik<sup>L/L</sup>.

Enfin, la discussion sera centrée sur la fonction de Notch et Ikaros et leur implication dans l'initiation et la progression de lymphomes thymiques chez les souris Ik<sup>L/L</sup>.

## SOMMAIRE

### Introduction.

I- Le système hématopoïétique murin.	1
$I_1$ - Les différentes cellules hématopoïétiques.	2
II- Le compartiment myéloïde.	3
$II_1$ - Identification du progéniteur commun au lignage myéloïde.	3
$II_2$ - Différenciation des neutrophiles dans la moelle osseuse.	3
a- Caractéristiques morphologiques.	3
b- Caractéristiques phénotypiques.	4
c- Le rôle du G-CSF et de son récepteur.	5
d- Le contrôle transcriptionnel de la granulopoïèse.	6
III- Le compartiment lymphoïde T.	8
III <sub>1</sub> - Identification du progéniteur commun au lignage lymphoïde.	8
$III_{2}$ - Développement des cellules T.	8
a- La différenciation des cellules DN1 en cellules DN4.	10
b- Le réarrangement de la chaîne $\beta$ du TCR.	11
Organisation du locus de la chaîne $\beta$ du TCR.	11
Les enzymes de la recombinaison.	12
L'exclusion allélique.	13
c- La signalisation par le pré-TCR.	13
d- La différenciation des cellules DN4 en cellules DP.	15
Organisation du locus de la chaîne $\alpha$ du TCR.	15
e- La sélection des cellules DP et la maturation en cellules SP.	16
Le modèle instructif.	17
Le modèle sélectif.	18
Le concept de force du signal.	18
f- La signalisation par le TCR $\alpha\beta$ dans le thymus.	20

IV- La voie de signalisation	Notch dans le lignage lymphoïde.	22
It Du voie de Signanbacion	Toten duns ie ngnuge tympholde.	

IV <sub>1</sub> - La voie Notch.	22
a- Notch et l'engagement vers la lignée T.	25
b- Notch et le développement des thymocytes.	26
c- Notch et le développement de lymphomes T.	29
V- Le facteur de transcription Ikaros.	32
V <sub>1</sub> - La structure du gène Ikaros.	32
V <sub>2</sub> - L'expression du gène Ikaros.	33
V <sub>3</sub> - Fonctions d'Ikaros <i>in vivo</i> .	34
a- La mutation nulle du gène Ikaros (Ik-/-).	34
b- La mutation dominante négative du gène Ikaros (DN <sup>-/-</sup> ).	35
c- La mutation Ik <sup>plstc</sup> (plastic).	36
d- La mutation hypomorphe du gène Ikaros (Ik <sup>L/L</sup> ).	37
V <sub>4</sub> - Propriétés moléculaires d'Ikaros.	37
a- Ikaros, un activateur de la transcription.	38
b- Ikaros, un répresseur de la transcription.	39
V <sub>5</sub> - Ikaros, un gène suppresseur de tumeurs.	41

### Résultats.

Fonction d'Ikaros dans la différenciation des neutrophiles.	
Résumé de l'article "Ikaros regulates neutrophil differentiation".	44
Fonction d'Ikaros dans l'initiation et le développement de lymphomes thymiques.	
I- Développement d'une puce cDNA dédiée à l'analyse des lymphocytes T.	46
II- Analyse du transcriptome de thymocytes Ik <sup>L/L</sup> pré-tumoraux.	46
III- L'activation de la voie de signalisation Notch constitue un événement précoce	
dans le développement de lymphomes T chez des souris déficientes pour le gène Ikaros.	48
$\text{III}_{1}$ - Le développement de lymphomes thymiques chez les souris $\text{Ik}^{L/L}$ nécessite un	
environnement thymique.	48
$III_2$ - Les tumeurs Ik <sup>L/L</sup> se développent-elles à partir d'un stade précoce de différenciation!?	51
$III_3$ - La maturation de cellules DP en cellules CD8 <sup>+</sup> est incomplète.	54

III <sub>4</sub> - Les thymocytes Ik <sup>L/L</sup> tumoraux ont une signature transcriptionnelle spécifique.	55
$\text{III}_{5^-}$ Dérégulation de la voie de signalisation Notch dans les thymocytes Ik <sup>L/L</sup> .	57
a- Analyse des gènes Notch dans les populations DN, DP et SP contrôles et $Ik^{L/L}$ .	57
b- Analyse des gènes Notch dans les tumeurs Ik <sup>L/L</sup> précoces.	58
IV- Etablissement de lignées cellulaires à partir de tumeurs Ik <sup>L/L</sup> .	59
IV <sub>1</sub> - Caractérisation des lignées cellulaires.	59
a- Phénotype des lignées cellulaires.	59
b- Expression d'Ikaros et des gènes Notch dans les lignées Tik.	60
V- Fonction d'Ikaros dans les lignées cellulaires Tik.	61
V <sub>1</sub> - Ikaros module l'expression des gènes Notch <i>in vitro</i> .	61
V <sub>2</sub> - Ikaros induit l'expression de CD8 dans les lignées Tik.	64
$V_3$ - Ikaros réduit la prolifération des cellules tumorales <i>in vitro</i> .	65

### Matériels & Méthodes.

I- Anticorps et cytométrie en flux.	68
II- RT-PCR des gènes de la voie Notch.	68
III- Essai de retardation électrophorétique.	69
IV- Analyse des réarrangements D <sub>β</sub> 2-J <sub>β</sub> 2 par PCR.	70
Extraction de l'ADN génomique.	70
$PCR D_{\beta}2$ - $J_{\beta}2$ .	70
V- Culture des lignées cellulaires Tik et infections avec les vecteurs rétroviraux.	70
VI- Marquage par immunofluorescence.	71
VII- Hybridation des puces à oligonucléotides Affymetrix.	71
VIII- Analyse des données générées par les puces Affymetrix.	72
Sélection des gènes de la figure 22A.	72
Sélection des gènes de la figure 22B.	72

IX- Activation des cellules et mesure de la prolifération.

# Discussion & Perspectives.

I- Les tumeurs Ik <sup>L/L</sup> .	73
II- Analyse du transcriptome de thymocytes $\mathbf{Ik}^{\scriptscriptstyle L/L}$ non-tumoraux.	75
III- Les tumeurs Ik <sup>L/L</sup> !dérivent-elles d'un stade immature de différenciation?	75
IV- Le rôle de Notch dans la transformation des cellules Ik <sup>L/L</sup> .	76
$IV_1$ -Les gènes Hes1 et Deltex1.	76
IV <sub>2</sub> - La voie E2A.	77
IV <sub>3</sub> - La voie NF-kB.	77
$IV_4$ - Notch, un facteur anti-apoptotique.	78
V- Rôle de la voie Notch dans le maintien du phénotype tumoral dans les lignées $\mathbf{Ik}^{\!\scriptscriptstyle L\!\!/\!L}$ .	78
VI- Fonction de la protéine Ik*.	79
VI <sub>1</sub> -Propriétés moléculaires d'Ikaros*.	79
VI <sub>2</sub> - Ikaros, un régulateur de l'expression des gènes Notch.	80
VII- Un modèle de régulation de l'expression des gènes de la voie Notch par Ikaros	
et CSL!; implication dans la transformation des cellules Ik <sup>L/L!</sup> ?	82
VIII- Des évènements génétiques additionnels participent-ils à la transformation des	
cellules Ik <sup>L/L!</sup> ?	83
IX- Ikaros et Notch au cours de la différenciation des thymocytes.	84
IX <sub>1</sub> - La signalisation par le pré-TCR.	84
IX <sub>2</sub> - Le stade DP et la signalisation par le TCR $\alpha\beta$ .	85

### Annexe I

Bibliographie

### Abréviations

ADAM !: "a disintegrin and metalloprotease" ADN!: Acide Désoxyribonucléique Ag!: Antigène **ARN**!: Acide Ribonucléique C/EBP!: "CCAAT/Enhancer Binding Protein" CFSE !: 5,6-carboxyfluoresceine diacetate succinimidyl ester CMH!: Complexe Majeur d'Histocompatibilité CLP!: Progéniteurs des cellules lymphoïdes CMP!: Progéniteurs des cellules myéloïdes **CPA**!: cellule présentatrice d'antigène CSL!: "CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1" CtBP!: "C-terminal Binding Protein" Ct!: C-terminal **DN**!: Double-Négative **DP**!: Double-Positive DSL!: "Delta, Serrate, Lag-2" DZ!: Doigt de zinc **ECN**!: Domaine Extracellulaire (Notch) EGF!: "Epidermal Growth Factor" GMP!: Progéniteurs des cellules myélo-monocytaires G-CSF!: "Granulocyte-Colony Stimulating Factor" GCFR !: "Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor" GFP!: "Green Fluorescent Protein" HC-PC!: Hétérochromatine-Péricentromérique HDAC!: Histone Déacétylase HSC!: cellule souche hématopoïétique IL!: Interleukine ISP!: "Immature Single Positive cell" LAL-T/B!: Leucémie Aiguë Lymphoblastique LAT!: "Linker of Activated T cells" MAM!: Mastermind MEP!: Progéniteurs des cellules myéloérythroïdes **MO**!: moelle osseuse NCR!: "Notch Cytokine Response" NFAT !: "Nuclear Factor of Activated T cells" NIC!: Domaine Intracellulaire (Notch) NK!: "Naturel Killer" Ntl: N-terminal Pré-TCR !: Récepteur des cellules pré-T RAG!: "Recombinase Activating Gene" **RSS**!: "Recombination Signal Sequences" SCF!: "Stem Cell Factor" SCID!: "Severe Combined Immunodeficiency" STAT !: "Signal Transducer and Activator of Transcription" **SP**!: Simple positive TCR!: Récepteur des cellules T Tdt!: "Terminal deoxynucleotidyl Transferase" 7 AAD!: 7-Amino-Actinomicyne D

#### I- Le système hématopoïétique murin.

Le système hématopoïétique des mammifères se développe continuellement tant au cours de la vie embryonnaire que de la vie adulte. À l'origine de celui-ci se trouve une population de cellules pluripotentes, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) qui se développent dans les différents organes hématopoïétiques (le foie fœtal, la moelle osseuse (MO) et la rate chez l'adulte). Elles sont capables de se renouveler de manière autonome ou de s'engager dans la voie de maturation d'un des trois lignages hématopoïétiques : myéloïde, lymphoïde ou érythroïde (Figure 1). Chacun de ces lignages est constitué de différents types cellulaires, présentant des caractéristiques propres sur les plans morphologiques et fonctionnels.



#### Figure 1: Le système hématopoïétique

Un modèle de différenciation des cellules hématopoïétiques à partir des cellules souches hématopoïétiques est représenté en relation avec les différents tissus hématopoïétiques. CLP!: Progéniteurs des cellules Lymphoïdes!; CMP!: Progéniteurs des cellules Myéloïdes!; GMP!: Progéniteurs des cellules Myélo-monocytaires!; MEP!: Progéniteurs des cellules Myélo-érythroïdes (Figure basée sur Morrison *et al.*, 1995).

#### I<sub>1</sub>- Les différentes cellules hématopoïétiques.

Les cellules hématopoïétiques regroupent au moins neuf types cellulaires, distincts par leurs morphologies et leurs fonctions. Ainsi, les lymphocytes T et les lymphocytes B orchestrent la réponse immunitaire spécifique. Les cellules NK participent à la réponse innée contre les virus, les bactéries et les parasites mais également à l'élimination des cellules tumorales. Les cellules dendritiques sont les plus efficaces dans la fonction de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les macrophages, les granulocytes neutrophiles, éosinophiles et basophiles ont la charge d'anéantir tout agent pathogène ayant pénétré l'organisme. Les mastocytes sont les cellules effectrices de l'hypersensibilité immédiate et possèdent également deux propriétés physiologiques majeures comme CPA et comme cellules impliquées dans la défense anti-infectieuse. Les plaquettes sanguines sont essentielles dans la fonction réparatrice de l'hémostase. Enfin, les érythrocytes assurent le transport et la diffusion de l'oxygène dans tout l'organisme.

#### II- Le compartiment myéloïde.

#### II<sub>1</sub>- Identification du progéniteur commun au lignage myéloïde.

La moelle osseuse (MO) est le principal site hématopoïétique chez l'adulte. La MO est colonisée juste avant la naissance par les HSC originaires du foie fœtal (site majeur de l'hématopoïèse fœtale). Les HSC dans le foie fœtal et la moelle osseuse peuvent se différencier en progéniteur commun aux cellules myélo-érythroïdes (CMP) de phénotype Lin<sup>-</sup>FcyR<sup>lo</sup>CD34<sup>+</sup> (Akashi et al., 2000). Ces CMPs peuvent ensuite se différencier en progéniteur myélo-monocytaire (GMP) de phénotype FcyR<sup>hi</sup>CD34<sup>+</sup>, ou en progéniteur restreint au lignage érythro-mégacaryocytaire (MEP) de phénotype FcyR<sup>10</sup>CD34<sup>-</sup>. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont permis de déterminer le potentiel de différenciation de chacune de ces trois populations. Ainsi, des cellules FcyR<sup>10</sup>CD34<sup>+</sup> injectées dans une souris irradiée de façon létale sont capables de générer des cellules myélo-monocytaires Gr1<sup>+</sup>Mac1<sup>+</sup> (marqueurs de différenciation spécifiques des cellules myeloïdes), mais également des cellules érythroïdes exprimant le marqueur érythroïde spécifique TER119. De plus, ces CMPs peuvent se différencier in vitro en cellules B avec une fréquence de 1/2780. Les cellules FcγR<sup>hi</sup>CD34<sup>+</sup> quant à elles, donnent des cellules myéloïdes Gr1<sup>+</sup>Mac1<sup>+</sup>. Par ailleurs, une étude de Manz et al., (2001) suggère que les GMPs peuvent aussi se différencier en cellules myéloïdes dendritiques. Enfin, les cellules FcyR<sup>10</sup>CD34<sup>-</sup> ne se différencient qu'en cellules érythroïdes TER119<sup>+</sup>. De façon intéressante, les descendances de chacune de ces populations ont disparu des souris reconstituées après environ 4 semaines, indiquant leur très faible potentiel d'autorenouvelement.

Une population équivalente a également été isolée dans la moelle osseuse chez l'homme (Manz *et al.*, 2002). Les CMPs d'origine humaine sont de phénotype lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> et se différencient en granulocytes/macrophages, et en mégacaryocytes/érythrocytes.

#### II<sub>2</sub>- Différenciation des neutrophiles dans la moelle osseuse.

a- Caractéristiques morphologiques.

La différenciation des précurseurs myéloïdes en neutrophiles est accompagnée par des modifications morphologiques de la cellule, en particulier du noyau, et par l'apparition de protéines spécifiques des granules primaires et secondaires (Borregaard, 1997). La figure 2A représente des cellules myéloïdes à différents stades de maturation dans la MO. Chronologiquement, le promyélocyte, caractérisé par un noyau volumineux, évolue en myélocyte. Cette étape du

développement est marquée par l'arrêt des divisions cellulaires. Ces deux types cellulaires peuvent être identifiés par la présence de constituants des granules primaires (myélopéroxidase, cathepsine G, élastase) dans le cytoplasme. Le myélocyte se différencie en métamyélocyte, dont le noyau commence à s'invaginer, pour finalement donner les neutrophiles matures, qui présentent la particularité d'avoir un noyau segmenté. Ces étapes finales de différenciation sont marquées par l'apparition de composants des granules secondaires (lactoferrine, gélatinase) dans le cytoplasme des cellules.



Figure 2!: Les différentes étapes de différenciation des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse. (A) Cellules de la moelle osseuse après coloration au May-Grünwald Giemsa. pm!: promyélocyte, my!: myélocyte, mt!: métamyélocyte, bn!: "band neutrophil", sn!: "segmented neutrophil". (B) Analyse par cytométrie en flux des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse à l'aide des marqueurs de différenciation Gr-1 et Mac-1.

#### b- Caractéristiques phénotypiques.

La différenciation des neutrophiles peut également être suivie à l'aide de l'expression de marqueurs de surface tels que Mac-1 et Gr-1. Mac-1 (CD11b), associé à CD18 (intégrine  $\beta$ 2), intervient dans différentes fonctions importantes des leukocytes comme la phagocytose, l'adhésion aux cellules endothéliales ou encore la chémotaxie (pour revue, Arnaout, 1990). Gr-1 est le produit du gène Ly-6G (Fleming *et al.*, 1993a). Bien que les protéines Ly-6 présentent des homologies avec des neurotoxines isolées à partir de venins de serpent, leur fonction dans les neutrophiles demeure encore inconnue (Fleming *et al.*, 1993b). Cependant, il a été montré que le niveau d'expression de Gr-1 augmente en même temps que les progéniteurs myéloïdes se différencient en neutrophiles matures (Hestdal *et al.*, 1991). Ainsi, comme le montre la figure 2B, la population de cellules Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>lo</sup> est majoritairement constituée de myéloblastes et de myélocytes, la population Mac-1<sup>+</sup>Gr-

1<sup>int</sup> est constituée de métamyélocytes et de quelques neutrophiles et la population Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>hi</sup> est composée principalement de neutrophiles à noyaux segmentés.

c- le rôle du G-CSF et de son récepteur.

Le G-CSF ("Granulocyte-Colony Stimulating Factor") est l'un des principaux facteurs de croissance hématopoïétique régulant la production de neutrophiles. Il a été initialement identifié comme étant capable d'induire la différenciation d'une lignée cellulaire leucémique myélomonocytique murine (WEHI-3B) (Burgess, 1980). Cette glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 25kD est produite par différents types cellulaires comme les macrophages, les cellules vasculaires endothéliales et les fibroblastes. Le G-CSF a trois fonctions majeures!: (i) régulation de la production et de la libération de neutrophiles de la moelle osseuse!; (ii) mobilisation de progéniteurs hématopoïétiques de la MO dans le sang!; (iii) modulation de certaines fonctions des neutrophiles matures (de Haas et al., 1994; Bober et al., 1995; Welte et al., 1996; Carulli, 1997, Hoglund et al., 1997). L'activité du G-CSF est relayée par le récepteur au G-CSF (G-CSFR), appartenant à la superfamille des récepteurs aux cytokines (Bazan, 1989; Cosman, 1993). Le niveau d'expression du G-CSFR augmente avec la maturation des myéloblastes en neutrophiles matures. La liaison du G-CSF à son récepteur induit la prolifération ou la différenciation des cellules. Il a été proposé que la réponse proliférative est contrôlée par la voie de signalisation Ras-MAP kinase. La différenciation est quant à elle associée à l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT (pour revue, Avalos, 1996), et plus particulièrement l'activation du facteur de transcription STAT3, principale protéine STAT à être activée par le G-CSF (Tian et al., 1994).

L'importance des rôles joués par le G-CSF et son récepteur dans la granulopoïèse a été mis en évidence par différentes approches. En effet, des souris chez lesquelles les gènes codant pour le G-CSF et le G-CSFR ont été inactivés par recombinaison homologue développent des neutropénies sévères (Lieschke *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996). Par ailleurs, des souris irradiées de façon létale, reconstituées avec des cellules de MO préalablement infectées avec un rétrovirus exprimant le G-CSF, développent une importante neutrophilie dans le sang périphérique ainsi qu'une infiltration de neutrophiles dans différents organes (Chang *et al.*, 1989). d- Le contrôle transcriptionnel de la granulopoïèse.

Parmi les nombreux facteurs de transcription impliqués dans la myélopoïèse, C/EBPα, C/EBPε et PU.1 ont un rôle crucial pour la différenciation normale des précurseurs myéloïdes en neutrophiles matures.

#### $C/EBP\alpha!$ :

C/EBP $\alpha$  appartient à la famille des facteurs de transcription C/EBP "CCAAT/Enhancer Binding Protein". Il est exprimé dans les myéloblastes immatures et son niveau d'expression diminue au cours de la différenciation en neutrophiles matures (Scott *et al.*, 1992). L'analyse de nouveau-nés déficients pour C/EBP $\alpha$  montre une absence de neutrophiles dans le foie (Zhang et al., 1997), probablement due à une réduction du niveau d'expression du G-CSFR. Une telle réduction est également observée dans des cellules de foie fœtal C/EBP $\alpha^{-/-}$  (Smith *et al.*, 1996). Ces observations sont en accord avec le rôle de C/EBP $\alpha$  comme transactivateur du gène du G-CSFR. De façon intéressante, des cellules de foie fœtal C/EBP $\alpha^{-/-}$  ré-exprimant le G-CSFR sont capables de se différencier *in vitro* en neutrophiles matures (Zhang *et al.*, 1998). De plus, il a été montré que C/EBP $\alpha$  régulait positivement l'expression de PU.1 et C/EBP $\epsilon$  (Wang *et al.*, 1999; Wang et Friedman, 2002), deux gènes déterminants pour les étapes finales de différenciation. Ces données montrent un rôle crucial de C/EBP $\alpha$  dans la myélopoïèse.

#### *PU.1*!:

La protéine PU.1 est un membre de la famille des facteurs de transcription ets. Son expression est restreinte au système hématopoïétique. PU.1 est fortement exprimé dans le compartiment myéloïde, où son taux d'expression augmente parallèlement à la maturation (Olson *et al*, 1995; Chen *et al*, 1995). Des lignées de souris déficientes pour le gène PU.1 ont été générées (Scott *et al.*, 1994!; McKercher *et al.*, 1996). L'une des caractéristiques communes à ces deux mutations est l'absence de neutrophiles matures. Cependant, après la naissance, des cellules présentant des caractéristiques de neutrophiles se développent après 2 à 3 jours de traitement par antibiotiques (McKercher *et al.*, 1996). Plusieurs études ont également révélé un rôle clé de PU.1 dans les étapes finales de différenciation des neutrophiles. En effet, des neutrophiles isolés de nouveau-nés PU.1<sup>-/-</sup> n'expriment pas de composants des granules secondaires comme la lactoferrine ou la neutrophile-gélatinase (Anderson *et al.*, 1998), dont l'apparition dans le cytoplasme est associée à la maturation terminale normale des neutrophiles au delà du stade promyélocyte. De plus, des fonctions primordiales comme la phagocytose, la chémotaxie sont altérées dans les neutrophiles déficients pour PU.1. Ces observations suggèrent donc que PU.1 n'est pas essentiel pour l'engagement des précurseurs dans la

voie de différenciation granulocytaire, mais pour leur différenciation normale en neutrophiles matures.

#### $C/EBP\varepsilon$ :

C/EBP  $\varepsilon$  appartient également à la famille des C/EBPs. Comme il a été mentionné plus tôt, C/EBP $\varepsilon$  opère en aval de C/EBP $\alpha$ . C/EBP $\varepsilon$  est exclusivement exprimé dans les cellules myéloïdes et particulièrement au cours des derniers stades de maturation. Des souris pour lesquelles le gène C/EBP $\varepsilon$  a été inactivé par recombinaison homologue ont été produites (Yamanaka *et al.*, 1997). Ces souris présentent une augmentation du nombre de progéniteurs myéloïdes dans la MO ainsi qu'une augmentation du nombre de neutrophiles hyposegmentés dans le sang périphérique. Les fonctions effectrices (chémotaxie, production de superoxyde, phagocytose de bactérie) des neutrophiles produits dans les souris C/EBP $\varepsilon$ <sup>-/-</sup> sont grandement altérées. Enfin, l'expression d'ARNm codant pour des protéines des granules secondaires comme la lactoferrine ou la neutrophile-gélatinase est sévèrement diminuée dans les neutrophiles C/EBP $\varepsilon$ <sup>-/-</sup> (Lekstrom-Himes *et al.*, 1999). Ces données montrent que C/EBP $\varepsilon$  est un acteur clé de la maturation terminale des cellules myéloïdes en neutrophiles matures.

#### III- Le compartiment lymphoïde T.

#### III<sub>1</sub>- Identification du progéniteur commun au lignage lymphoïde.

Un progéniteur clonal commun au lignage lymphoïde (CLP) a été identifié dans la MO par Kondo *et al* (1997). Les CLPs sont de phénotype Lin<sup>-</sup>IL-7Rα<sup>+</sup>Thy-1.1<sup>-</sup>Sca-1<sup>lo</sup>cKit<sup>lo</sup> et représentent environ 0,02% des cellules totales de la MO. Des expériences de reconstitution compétitive de souris létalement irradiées avec les CLPs montrent que ces progéniteurs peuvent se différencier en cellules T, B et NK, mais pas en cellules du lignage myéloïde. Dans des souris transplantées avec ces CLPs, le nombre de cellules T et B dérivé du donneur diminue après 4 à 6 semaines, suggérant que cette population de cellules possède une capacité de renouvellement limitée. L'équivalent des CLPs a également été isolé dans la MO chez l'homme (Galy *et al.*, 1995). Les CLPs d'origine humaine, de phénotype CD45RA<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>Thy-1.1<sup>-</sup>, se différencient en cellules B, T, NK et dendritiques dans des essais de reconstitution de souris SCID ("Severe Combined Immunodeficiency") ainsi qu'en culture.

Les progéniteurs thymiques (TP) les plus immatures identifiés sont de phénotype  $CD4^{lo}cKit^+CD44^+CD25^-$  et sont capables de se différencier en cellules T, B, NK et dendritiques (Wu *et al.*, 1991). Quelle est l'origine de ces cellules!? Sont-elles directement dérivées des CLPs décrits par Kondo *et al*, ou existe-t-il un stade de différenciation intermédiaire entre les CLPs et les TPs? Jusqu'à très récemment, aucune donnée ne permettait d'établir un lien direct entre les CLPs et les TPs. Cependant, une étude récente a montré l'existence dans la MO de précurseurs restreints au lignage lymphoïde, qui représenteraient un stade de différenciation intermédiaire entre les CLPs originaires de la MO et les précurseurs thymiques immatures. Ces précurseurs, de phénotype B220<sup>+</sup>cKit<sup>-</sup>IL-7Ra<sup>+</sup>, peuvent être générés en culture à partir de CLPs et sont capables de se différencier en cellules T, B, NK et dendritiques (Martin *et al.*, 2003; Gounari *et al.*, 2002).

Par ailleurs, une autre étude (Allman *et al.*, 2003) suggère l'existence dans le thymus d'un progéniteur précoce du lignage T (ETP), de phénotype CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>cKit<sup>hi</sup>Il-7R $\alpha^{neg/lo}$ . Ces ETPs, capables de produire des cellules T et B, seraient dérivés d'une population de progéniteurs lymphoïdes distincte des CLPs.

#### III<sub>2</sub>- Développement des cellules T.

Le thymus est le site majeur de développement et de maturation des cellules T ou thymocytes. Les précurseurs des cellules T gagnent le thymus par la circulation sanguine et

pénètrent le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire (Figure 3). La différenciation des thymocytes peut être divisée en plusieurs étapes, en fonction de l'expression des marqueurs CD4 et CD8. Les cellules immatures CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (double-négative, DN) se différencient en thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (double-positive, DP), puis évoluent vers les stades CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (simplepositive, SP). Les cellules DN peuvent être subdivisées en 4 populations selon l'expression des marqueurs CD44 et CD25 (Godfrey et al., 1993). La séquence de différenciation de ces cellules est!: CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (DN1), CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (DN2), CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (DN3) et CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> (DN4). Les cellules DN1 entament leur programme de différenciation dans le cortex interne, migrent vers le cortex externe et progressent vers les stades DN2 et DN3. Au cours de la transition DN2-DN3, les cellules T réarrangent l'ADN des loci des chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$ et  $\beta$  du récepteur des cellules T (TCR), et se différencient en cellules T $\alpha\beta$  ou en cellules T $\alpha\beta$ . Dès que la chaîne  $\beta$  est synthétisée, elle est assemblée en un récepteur appelé pré-TCR ("pre-T cell receptor"). Le réarrangement réussi de la chaîne β et son assemblage correct en un complexe pré-TCR permet la transition du stade DN3 au stade DN4. Les cellules DN4 progressent alors vers le stade double positif (DP), ou le locus de la chaîne  $\alpha$  du TCR est réarrangé. Une fois la chaîne  $\alpha$  produite, elle est couplée à la chaîne  $\beta$  du TCR pour former le TCRaß. Les cellules sont alors soumises au processus de sélection positive et négative, et achèvent leur maturation en cellules simple-positives (SP) dans la medulla.



Figure 3!: Représentation schématique du développement des cellules T dans le thymus. Les stades de différenciation des cellules T sont associés à des localisations précises dans le thymus. CLP!: progéniteur lymphoïde commun, TP!: progéniteur thymique, DN!: double-négative, DP!: doublepositive, SP!: simple-positive, CE!: cellule épithéliale. a- La différenciation des cellules DN1 en cellules DN4.

La population DN1 représente la population de thymocytes la plus immature dans le thymus. Les cellules DN1 ne sont pas encore restreintes au lignage T et peuvent se différencier en cellules T, B et NK. Elles progressent ensuite vers le stade DN2. Les stades DN1 et DN2 sont caractérisés par l'expression des récepteurs du "stem cell factor" (c-Kit) et de l'IL-7, qui assurent la survie et la croissance des thymocytes (Zlotnik et Moore, 1995!; Peschon et al., 1994!; Von Freeden-Jeffry et al., 1995). À partir du stade DN2, les thymocytes expriment également le marqueur HSA (Godfrey et al., 1993). La transition DN2-DN3 marque l'engagement irréversible des cellules T dans le lignage lymphoïde T. Cette étape est caractérisée par la diminution du niveau d'expression de c-Kit et de CD44, et par l'initiation du réarrangement de l'ADN des loci des chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$  du TCR. Les cellules qui réussissent à réarranger les gènes  $\gamma$  et  $\delta$  du TCR et à exprimer un TCR $\gamma\delta$  fonctionnel se développent en cellules Ty $\delta$ . À l'inverse, le réarrangement productif de la chaîne  $\beta$  du TCR conduit à la formation du pré-TCR, composé de la chaîne  $\beta$  du TCR, de la chaîne invariante pT $\alpha$  et de molécules CD3 associées (Saint-Ruf et al., 1994!; von Boehmer et Fehling, 1997). Les cellules n'ayant pas réussi un réarrangement productif de la chaîne β sont éliminées par apoptose. La signalisation par le pré-TCR assure la survie, la prolifération et la progression des cellules DN3 au stade DN4 (Figure 4).



**Figure 4!: La différenciation des cellules T dans le thymus.** L'expression des différents marqueurs de surface est représentée en fonction du stade de maturation des cellules. L'analyse par cytométrie en flux des différentes populations est également représentée.

b- Le réarrangement de la chaîne  $\beta$  du TCR.

Organisation du locus de la chaîne  $\beta$  du TCR.

La chaîne  $\beta$  du TCR est codée par quatre segments de gènes!:  $C_{\beta}$  ("constant"),  $V_{\beta}$ ("variable"),  $D_{\beta}$  ("diversity") et  $J_{\beta}$  ("joining"). Le domaine variable du TCR $\beta$  est codé par les segments  $V_{\beta}$ ,  $D_{\beta}$  et  $J_{\beta}$ . Ces segments sont assemblés les uns aux autres par un processus de recombinaison somatique, appelé recombinaison VDJ. La figure 5 montre l'organisation du locus de la chaîne  $\beta$  du TCR (TCR $\beta$ ) chez la souris. Le locus du TCR $\beta$  comprend environ 28 segments de gènes  $V_{\beta}$  fonctionnels et deux groupes de gènes  $D_{\beta}J_{\beta}C_{\beta}$ . Le locus du TCR $\beta$  est présent dans les cellules DN1 et DN2 dans une configuration native. C'est au cours de la transition DN2-DN3 qu'est initié le réarrangement des gènes de la chaîne  $\beta$  (Godfrey *et al.*, 1993). Le réarrangement du locus du TCR $\beta$  débute par la juxtaposition d'un segment  $D_{\beta}$  à un segment  $J_{\beta}$ , puis par le réarrangement du segment  $D_{\beta}J_{\beta}$  néo-formé avec un segment  $V_{\beta}$  (Tourigny *et al.*, 1997). Les éléments situés entre les segments réarrangés sont excisés. Le réarrangement productif d'un allèle du locus du TCR $\beta$  entraîne l'arrêt des réarrangements sur le second allèle par exclusion allélique (voir plus bas).



Figure 5!: Représentation schématique du locus de la chaîne  $\beta$  du TCR. Le locus du TCR $\beta$  est réarrangé par juxtaposition d'un segment  $D_{\beta}$  et d'un segment  $J_{\beta}$ , puis par la juxtaposition d'un segment  $V_{\beta}$  au segment  $D_{\beta}J_{\beta}$ . Lors du réarrangement  $D_{\beta}-J_{\beta}$ , le segment  $D_{\beta 1}$  peut être joint à un segment  $J_{\beta 1}$  ou à un segment  $J_{\beta 2}$ , alors que le segment  $D_{\beta 2}$  n'est réarrangé qu'avec les segments  $J_{\beta 2}$ . Les traits horizontaux représentent les différentes possibilités de réarrangement  $D_{\beta}J_{\beta}$ .

#### Les enzymes de la recombinaison.

Le mécanisme de recombinaison somatique est médié par l'action d'enzymes spécifiques des cellules lymphoïdes, codées par les gènes RAG1 et RAG2 ("Recombinase Activating Gene"). Elles assemblent les divers segments de gènes  $V_{\beta}$ ,  $D_{\beta}$  et  $J_{\beta}$  par recombinaison de l'ADN. Chaque segment de gènes V<sub>β</sub>, D<sub>β</sub> et J<sub>β</sub> est flanqué de séquences spécifiques "Recombination Signal Sequences" (RSS) conservées au cours de l'évolution (Tonegawa, 1983; Hesse et al., 1989). Les RSSs sont des heptamères et des nonamères qui sont séparés par une séquence "spacer" de 12 ou 23 nucléotides. Les recombinases RAG reconnaissent ces séquences RSSs et effectuent le réarrangement des segments en excisant les séquences d'ADN entre les segments. Le réarrangement se fait selon la règle "12/23", c'est à dire entre un segment flanqué d'un "spacer" de 12 nucléotides qui recombine en cis avec un segment flanqué d'un "spacer" de 23 nucléotides. Le produit du gène codant pour la "Terminal deoxynucleotidyl Transferase" (TdT) est aussi impliqué dans le processus de réarrangement du locus du TCRB. TdT est responsable de l'addition de nucléotides (N) supplémentaires au niveau des jonctions  $D_{\beta}J_{\beta}$  et  $V_{\beta}DJ_{\beta}$  lors de la recombinaison, augmentant ainsi la diversité de la région variable du récepteur. Des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN double brin (Ku 70, 80, DNA-PKcs, ligase IV) sont également nécessaires au processus de réarrangement de la chaîne β du TCR. En effet, des altérations de la fonction de ces protéines peuvent entraîner un blocage dans le développement des cellules T (pour revue, Notarangelo et al., 1999).

Les gènes RAG sont exprimés dans les populations DN2 et DN3 lors de la recombinaison des gènes du TCR $\beta$  (Wilson *et al.*, 1994). L'expression de la chaîne  $\beta$  du TCR et la formation du complexe pré-TCR induisent l'exclusion allélique du TCR $\beta$  et la prolifération des cellules (Uematsu *et al*, 1988!; Fehling *et al.*, 1995). La diminution de l'expression des gènes RAG coïncide avec ces deux évènements. Les gènes RAG ont un rôle crucial dans le développement des cellules T. En effet, l'inactivation de RAG1 ou RAG2 entraîne un blocage de la différenciation des cellules au stade DN (Mombaerts *et al.*, 1992!; Shinkai *et al.*, 1992), et plus particulièrement au stade DN3 (Yannoutsos *et al.*, 2001). De plus, l'analyse par PCR du locus de la chaîne  $\beta$  du TCR montre que celui-ci est dans une configuration native. Contrairement aux gènes RAG1 et RAG2, le gène TdT n'est pas essentiel au développement des cellules T (Komori *et al.*, 1993). En effet, chez des souris déficientes pour le gène TdT, on observe le développement de cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> SP matures. Toutefois, le nombre de ces cellules SP est augmenté, suggérant un biais au moment de la sélection positive des cellules DP en cellules SP (Gilfillan *et al.*, 1994).

#### L'exclusion allélique.

L'analyse de l'expression des gènes  $V_{\beta}$  au cours du réarrangement du TCR $\beta$  dans des clones de cellules T matures montrent que les cellules contiennent un seul réarrangement productif de la chaîne  $\beta$ , tandis que le second allèle est non-réarrangé ou que le segment  $V_{\beta}$  est dans une configuration native (Casanova *et al.*, 1991). Par ailleurs, l'introduction d'un transgène réarrangé du TCR $\beta$  permet de bloquer les réarrangements endogènes des gènes  $V_{\beta}$  (Uematsu *et al.*, 1988). Ainsi, l'expression d'une chaîne  $\beta$  (au sein du complexe pré-TCR) exerce un contrôle négatif qui empêche le réarrangement du second allèle de la chaîne  $\beta$ . Ce mécanisme d'exclusion allélique assure qu'une cellule T individuelle n'exprime qu'une seule chaîne  $\beta$ .

#### c- La signalisation par le pré-TCR.

Le pré-TCR est exprimé à la surface des cellules DN3 et DN4. La formation du pré-TCR par l'association de la chaîne  $\beta$  du TCR avec la chaîne invariante pT $\alpha$  et différentes molécules de signalisation CD3 ( $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$ ) (Saint-Ruf *et al.*, 1994; von Boehmer *et al.*, 1997) (Figure 6) représente un point de contrôle critique lors de la différenciation des cellules T appelé la sélection  $\beta$ . La signalisation par le pré-TCR assure la prolifération et la survie des cellules DN, l'arrêt des réarrangements des gènes du TCR $\beta$ , la transition du stade DN au stade DP et l'initiation du réarrangement du locus de la chaîne  $\alpha$  du TCR.



Figure 6!: Représentation schématique du complexe pré-TCR. La chaîne  $pT\alpha$  est couplée à la chaine  $\beta$  du TCR. Les molécules de signalisation associées sont assemblées en dimères CD3 $\epsilon\gamma$ , CD3 $\epsilon\delta$  et CD3 $\zeta\zeta$ .

L'analyse de souris déficientes pour CD3γ et ε a montré que l'absence de ces molécules provoque un arrêt de la différenciation des cellules T au stade DN3 (Malissen *et al.*, 1995; Haks *et* 

*al.*, 1998). Un blocage similaire, mais moins sévère, est observé dans le thymus de souris CD3 $\zeta^{-t}$ , indiquant que l'assemblage et/ou la fonction du pré-TCR sont compromis mais pas abolis en absence de la sous-unité  $\zeta$  (Love *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1993). La sous-unité CD3 $\delta$ , quant à elle, ne semble pas être essentielle pour la fonction du pré-TCR (Berger *et al.*, 1997). D'autre part, le développement de thymocytes TCR $\beta^{-t}$  ou pT $\alpha^{-t}$  est bloqué au stade DN, bien que quelques cellules DP parviennent à se différencier (Mombaerts *et al.*, 1992; Fehling *et al.*, 1995). La chaîne pT $\alpha$  intervient également dans le processus d'exclusion allélique (Aifantis *et al.*, 1997). En effet, l'analyse des réarrangements du TCR $\beta$  dans les cellules DN3 pT $\alpha^{-t}$  par PCR sur cellule unique montre qu'il n'y a pas d'inhibition du réarrangement du second allèle, alors qu'un seul réarrangement productif est observé en présence de la chaîne pT $\alpha$ . Par ailleurs, l'expression de formes mutées de la chaîne pT $\alpha$  dans des thymocytes DN affecte la prolifération et la survie de ces cellules. Ces données suggèrent un contrôle par pT $\alpha$  de la prolifération et de la survie des cellules DN (Aifantis *et al.*, 2002).

L'expression du complexe pré-TCR à la surface des cellules est essentielle pour l'activation du pré-TCR, bien que cette dernière ne requiert pas d'interaction spécifique avec un ligand. En effet, des thymocytes TCR $\beta^{-/-}$  exprimant une chaîne  $\beta$  du TCR couplée à un signal de rétention dans le reticulum endoplasmique, sont bloqués au stade DN3 (O'Shea *et al.*, 1997). De plus, des cellules DN3 exprimant un pré-TCR amputé des domaines extracellulaires peuvent franchir le cap de la sélection  $\beta$  (Irving *et al.*, 1998). Il a donc été proposé que le complexe pré-TCR est spontanément intégré à la membrane cellulaire, au niveau de domaines membranaires appelés "lipid rafts" (Saint-Ruf *et al.*, 2000). La colocalisation du pré-TCR et de molécules de signalisation au sein des "lipid rafts" crée alors un environnement propice à l'induction de la signalisation par le pré-TCR (Dustin *et al.*, 2000). Cependant, la capacité d'induire un signal d'activation, indépendamment d'une interaction avec un ligand, serait plus une propriété inhérente des cellules DN, plutôt qu'une caractéristique unique du complexe pré-TCR (Haks *et al.*, 2003).

Les molécules impliquées dans la voie de signalisation du pré-TCR ont été découvertes par l'étude de souris déficientes pour des molécules de signalisation affectant la transition du stade DN au stade DP. Ainsi, des cellules T déficientes pour la protéine kinase p56<sup>lck</sup> sont bloquées au stade DN3 (Wallace *et al.*, 1995). De plus, l'expression dans des thymocytes d'une forme dominante négative de la protéine p56<sup>lck</sup> (sous contrôle du promoteur lck) conduit à l'arrêt de la différenciation des cellules au stade DN (Levin *et al.*, 1993). Les protéines tyrosine kinase ZAP-70 et syk ont également un rôle important dans la signalisation par le pré-TCR puisque des souris déficientes pour

ces deux gènes révèlent un blocage de la maturation au stade DN3 (Cheng *et al.*, 1997). Les principales cibles des kinases ZAP-70 sont les molécules SLP-76 et LAT. De la même façon, des déficiences pour SLP-76 ou LAT conduisent à un blocage au stade DN3 (Zhang *et al.*, 1999; Clements *et al.*, 1998). L'activation de LAT et SLP-76 induit plusieurs évènements!: la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire!; l'activation de la voie Ras, impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation (Swat *et al.*, 1996)!; l'activation de la protéine kinase C, impliquée dans la régulation de l'exclusion allélique (Michie *et al.*, 2001). D'autre part, l'augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire conduit à l'activation des facteurs de transcription NFAT et NF- $\kappa$ B impliqués dans le contrôle de la survie et de la différenciation des cellules DN3 (Voll *et al.*, 2000; Aifantis *et al.*, 2001).

#### d- La différenciation des cellules DN4 en cellules DP.

Suite à l'activation par le pré-TCR, les cellules DN3 perdent le marqueur CD25, expriment de façon transitoire le marqueur d'activation CD69 (Levelt *et al.*, 1995), entrent dans le cycle cellulaire et accomplissent plusieurs divisions cellulaires (Shortman *et al.*, 1990). Les cellules DN4, également appelées cellules pré-DP vont alors progresser vers le stade DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Plusieurs études ont montré l'existence d'une population de cellules intermédiaires entre les stades DN et DP (Paterson et Williams, 1987; MacDonald *et al.*, 1988; Shortman *et al.*, 1988). Ces cellules, de phénotype CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>CD3<sup>lo</sup>CD24<sup>+</sup>, ressemblent aux cellules DN4. Toutefois, elles expriment les marqueurs CD4 ou CD8 en l'absence d'un TCR mature, et sont appelées cellules simple-positives immatures (ISP). La transition entre cellules ISP et cellules DP est très rapide. Au stade DP, les cellules sortent du cycle cellulaire et diminuent de taille, expriment à leur surface les marqueurs CD4 et CD8, réarrangent le locus  $\alpha$  de la chaîne du TCR et expriment un TCR $\alpha\beta$  fonctionnel.

#### Organisation du locus de la chaîne $\alpha$ du TCR.

La chaîne  $\alpha$  du TCR (TCR $\alpha$ ) est codée par trois segments de gènes!: C<sub> $\alpha$ </sub>, V<sub> $\alpha$ </sub> et J<sub> $\alpha$ </sub>. Le locus de la chaîne  $\alpha$  a la particularité de partager le même locus génétique que les gènes de la chaîne  $\delta$  du TCR, les segments des gènes du TCR $\delta$  étant situés entre les segments de gènes V<sub> $\alpha$ </sub> et J<sub> $\alpha$ </sub> (Figure 7). Le réarrangement du TCR $\alpha$  est initié sur les deux allèles au cours de la transition des cellules ISP vers les cellules DP, en même temps que les enzymes RAG1 et RAG2 sont ré-éxprimées (Wilson *et al.*, 1996). Il est produit par juxtaposition d'un segment V<sub> $\alpha$ </sub> à un segment J<sub> $\alpha$ </sub>, entraînant la délétion des gènes du TCR $\delta$ . Cependant, le réarrangement productif d'un allèle

n'entraîne pas l'arrêt des réarrangements sur le second allèle. Ainsi, le réarrangement du TCR $\alpha$  ne se fait pas dans un contexte d'exclusion allélique. C'est seulement lorsqu'une cellule est positivement sélectionnée que les réarrangements au niveau du TCR $\alpha$  cessent (Brandle *et al.*, 1992; Kouskoff *et al.*, 1995). Un mécanisme de contrôle post-traductionnel assure que les thymocytes matures n'expriment à leur surface qu'une chaîne  $\alpha$  unique (Alam *et al.*, 1998), bien qu'il ait été observé que des cellules T périphériques expriment deux chaînes  $\alpha$  (Padovan *et al.*, 1993; Heath *et al.*, 1995). La recombinaison de l'ADN au niveau du locus de la chaîne  $\alpha$  du TCR est également médiée par les enzymes RAG1, RAG2 et TdT.



Figure 7!: Représentation schématique du locus de la chaîne  $\alpha$  du TCR. Le locus du TCR $\alpha$  est réarrangé par juxtaposition d'un segment  $V_{\alpha}$  et d'un segment  $J_{\alpha}$ .

e- La sélection des cellules DP et la maturation en cellules SP.

Les cellules DP expriment les marqueurs CD4 et CD8 ainsi qu'un TCR $\alpha\beta$  nouvellement formé. Elles représentent environ 85% des cellules dans le thymus. Après un délai d'environ 3 jours, intervalle au cours duquel les cellules sont sélectionnées ou éliminées, seul 3 à 5% des cellules auront franchi le cap de la sélection (Shortman *et al.*, 1991; Huesmann *et al.*, 1991). À ce stade clé du développement, les thymocytes DP se soumettent à deux processus développementaux distincts pour devenir des cellules T matures fonctionnelles et compétentes. Les cellules T CD4 SP, ou cellules T "helper" sont activées par des antigènes (Ag) exogènes. Leur fonction principale est de stimuler d'autres cellules comme les cellules B mais aussi les macrophages qui prendront part à la réponse immunitaire. Les cellules CD8 SP ou "cytotoxiques" sont elles, activées par des Ag endogènes et participent à la lyse de cellules infectées par des virus, des pathogènes intracellulaires et des cellules tumorales.

Le premier processus correspond à la sélection du répertoire (Figure 8). Cette étape assure que les cellules T matures reconnaissent des Ag étrangers présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), mais qu'elles ne soient pas activées lors d'une rencontre avec un Ag du soi présenté par le CMH. Il a été démontré que l'affinité du TCR pour le complexe Ag/CMH avec lequel il interagit influence l'intensité du signal produit par le TCR, intensité dont dépend l'issue de cette étape de sélection (Alam *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1999). Ainsi, une interaction faible, mais suffisante, entre le TCR et le complexe Ag/CMH génère un signal faible qui induit la sélection positive des cellules. Au contraire, une interaction trop forte entre le TCR et le complexe Ag/CMH engendre une activation importante qui conduit à la sélection négative et à l'élimination de la cellule potentiellement auto-réactive. Un dernier cas, où aucune interaction TCR-Ag/CMH ne se produit, mène à la mort de la cellule par négligence, autrement dit par défaut de sélection positive (Suhr *et al.*, 1994).



Figure 8!: La sélection du répertoire. Le complexe Ag/CMH est exprimé à la surface des cellules stromales du thymus. L'avidité du TCR pour le complexe Ag/CMH détermine le destin de la cellule.

Le second processus correspond à l'engagement des cellules vers la voie CD4 SP ou CD8 SP. L'utilisation de souris transgéniques pour un TCR a permis de montrer que des cellules DP exprimant un TCR restreint au CMH I se différencient en cellules CD8 SP (Teh *et al.*, 1988; Sha *et al.*, 1988), alors que des cellules DP exprimant un TCR restreint au CMH II se différencient en cellules CD4 SP (Berg *et al.*, 1989; Kaye *et al.*, 1989). Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme qui gouverne le choix entre l'acquisition du phénotype CD4 SP ou CD8 SP (Figure 9).

#### Le modèle instructif

Dans ce modèle, la décision de s'engager dans la voie CD4 ou CD8 est prise au stade DP. Un thymocyte DP qui exprime un TCR spécifique du CMH II est capable d'engager son TCR et le corécepteur CD4 avec le complexe Ag/CMH II exprimé à la surface des cellules stromales. Dans ce cas, la cellule est instruite pour éteindre l'expression du corécepteur CD8 et se différencier en

thymocyte CD4 SP. De façon similaire, si une cellule DP exprime un TCR restreint au CMH I, alors elle peut engager son TCR et le corécepteur CD8 avec le complexe Ag/CMH I, ce qui entraîne une diminution de l'expression du corécepteur CD4 et permet la différenciation en cellule CD8 SP. Ce modèle s'appuie sur des données provenant de systèmes transgénique et non-transgénique (Ohashi *et al.*, 1990; Borgulya *et al.*, 1991; Shortmann *et al.*, 1991) dans lesquels une population de cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup> peut être observée seulement lorsqu'un complexe Ag/CMH approprié est présent, confirmant que la décision CD4 vs CD8 est prise au stade DP.

#### Le modèle sélectif

Ce modèle suggère que l'engagement dans l'une ou l'autre voie de différenciation se fait au moment de la sélection positive des cellules. Ainsi, une cellule DP éteint de manière aléatoire l'expression du corécepteur CD4 ou du corécepteur CD8, indépendamment de la spécificité (CMH I vs CMH II) de son TCR. Si la cellule peut alors engager le complexe Ag/CMH (I ou II) avec son TCR et le corécepteur (CD8 ou CD4) approprié, elle continue alors sa maturation en cellule SP, sinon elle meurt par apoptose. Ce modèle s'appuie sur l'observation de populations intermédiaires de thymocytes CD4<sup>med</sup>CD8<sup>hi</sup> présentes dans des souris CMH I<sup>-/-</sup>. Cette population de cellules représentent un stade de transition qui, selon le modèle instructif, n'est pas attendu en absence de molécule du CMH I (Chan *et al.*, 1993; van Meerwijk *et al*!., 1993).

#### Le concept de force du signal

Selon ce modèle, l'engagement vers le lignage CD4 ou CD8 dépend de l'intensité ou de la durée du signal émis par le TCR. Un signal de courte durée conduit à la différenciation des thymocytes DP en thymocytes CD8 SP, alors qu'un signal prolongé induit la différenciation vers le lignage CD4. Par ailleurs, des cellules dont le TCR interagit faiblement avec une molécule du CMH II vont recevoir un signal de courte durée et s'engager de façon inappropriée dans le lignage CD8. Dans le cas présent, lors d'une seconde interaction TCR/CMH II, l'absence du corécepteur CD4 ne permet pas une signalisation adéquate par le TCR et conduit la cellule à la mort par apoptose (Matechak *et al.*, 1996). À l'inverse, une cellule dont le TCR interagit très fortement avec une molécule CMH I est dirigée vers le lignage CD4. L'inadéquation entre molécule CMH I et corécepteur CD4 entraîne l'élimination de la cellule par apoptose. Ce modèle émergea d'expériences où il a été observé que des thymocytes exprimant un TCR restreint au CMH II peuvent se différencier en cellule CD8 SP, en absence de CD4, reflétant la possibilité qu'un faible signal soit

généré lorsque CD4 est absent. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que CD4 recrute p56<sup>lck</sup> plus efficacement que CD8 lors de l'engagement du TCR (Campbell *et al.*, 1995; Wiest *et al.*, 1993).



**Figure!9!: Représentation des différents modèles de sélection.** (A) le modèle instructif!; (B) le modèle sélectif!; (C) le concept de force du signal. † représente la mort par apoptose.

Le processus de sélection est accompagné par des modifications phénotypiques des cellules positivement sélectionnées. L'augmentation du niveau d'expression du TCR $\alpha\beta$ , suivie d'une réduction du niveau d'expression du marqueur CD24 (Lucas *et al.*,1993) représentent deux évènements précoces. Suite à l'activation des cellules, le marqueur d'activation CD69 est exprimé de façon transitoire par les cellules SP (Swat *et al.*, 1993). D'autre part, l'activation par le TCR induit l'expression de CD5, un marqueur des cellules T matures. Le niveau d'expression de CD5 est relatif à l'intensité du signal transmis par le TCR (Azzam *et al.*, 1998). CD5 fonctionnerait comme un régulateur négatif de la signalisation par le TCR (Azzam *et al.*, 2001).

f- La signalisation par le TCR $\alpha\beta$  dans le thymus.

Le complexe TCR $\alpha\beta$  est exprimé par les cellules DP et SP. Il est formé par l'association d'une chaîne  $\beta$ , d'une chaîne  $\alpha$  et des molécules de signalisation CD3 ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ )(Figure 10). L'interaction avec le ligand (complexe Ag/CMH) est attribuée à l'hétérodimère  $\alpha\beta$ , alors que la signalisation incombe aux molécules CD3 associées. La formation d'un complexe TCR $\alpha\beta$  complet et fonctionnel est essentielle pour la maturation des cellules DP en cellules SP et joue un rôle primordial dans le processus de sélection des cellules DP.



**Figure 10!: Représentation schématique du complexe TCRαβ.** La chaîne  $\alpha$  est couplée à la chaine  $\beta$  du TCR. Les molécules de signalisation associées sont assemblées en dimères CD3ε $\gamma$ , CD3ε $\delta$  et CD3ζ $\zeta$ .

La plupart des études qui se sont intéressées au(x) rôle(s) des différentes sous-unités nécessaires à l'assemblage d'un TCR $\alpha\beta$  complet ont été conduites *in vitro* dans des modèles de lignées cellulaires ou d'hybridomes de cellule T (pour revue, Klausner *et al.*, 1990). La génération et la caractérisation de lignées cellulaires déficientes pour les chaînes CD3 ont démontré la nécessité de chacune de ces sous-unités pour l'assemblage et l'expression normale du TCR $\alpha\beta$  à la surface des cellules.

L'étude du rôle des différentes sous-unités *in vivo* a parfois été rendue difficile puisque leur inactivation conduit à des arrêts précoces du développement des thymocytes (cf § c). Cependant, plusieurs informations intéressantes ont pu être dégagées. Des cellules DP sont présentes dans le thymus de souris déficientes pour CD3 $\zeta$ , bien que cette mutation affecte la signalisation par le pré-TCR. De plus, un nombre faible de cellules SP CD4<sup>+</sup>TCR<sup>10</sup> et CD8<sup>+</sup>TCR<sup>10</sup> est détecté dans ces souris (Love *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1993). Ces données indiquent donc que des cellules T peuvent se développer, bien qu'assez inefficacement, en l'absence de la sous-unité CD3 $\zeta$ . D'autre part, l'inactivation par recombinaison homologue de la sous-unité CD3 $\delta$  entraîne un arrêt de la maturation des thymocytes au stade DP CD3<sup>10</sup> (Dave *et al.*, 1997), stade auquel les thymocytes sont positivement ou négativement sélectionnés. Le nombre de cellules DP est normal mais le nombre de cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> SP est réduit, suggérant une fonction de CD3 $\delta$  dans l'assemblage correct et/ou la signalisation normale par le complexe TCR $\alpha\beta$ . La chaîne  $\alpha$  du TCR est également un élément critique du complexe TCR. En effet, des cellules n'exprimant pas la chaîne  $\alpha$  du TCR sont bloquées au stade DP (Mombaerts *et al.*, 1992). Plus particulièrement, un motif spécifique ( $\alpha$ -CPM) a été identifié dans la chaîne  $\alpha$  du TCR. Ce motif est nécessaire pour la sélection positive des cellules et pour l'interaction avec la sous-unité CD3 $\delta$  (Backstrom *et al.*, 1998).

L'engagement du complexe TCR active une cascade de signalisation dont l'issue est la sélection positive ou négative des cellules DP (pour revue, Starr *et al.*, 2003). Les acteurs les plus en amont de cette cascade regroupent en autre les protéines tyrosine-kinases p56<sup>lck</sup>, ZAP70, Itk. L'inactivation de ces différentes protéines *in vivo* a montré qu'elles régulent les mécanismes de sélection positive et/ou négative des cellules DP (Hashimoto *et al.*, 1996; Negishi *et al.*, 1995; Liao *et al.*, 1995; Schaeffer *et al.*, 1999). Ces kinases vont relayer le signal du TCR en activant différentes protéines adaptatrices comme LAT, SLP-76, Gads. Cette signalisation aboutit à l'activation de différentes familles de facteurs de transcription!; NFAT, important pour la sélection positive!(Oukka *et al.*, 1998); NF- $\kappa$ B, essentiel à la sélection positive (Esslinger *et al.*, 1997; Hettmann *et al.*, 2000) mais aussi négative (Hettmann *et al.*, 1999). D'autre part, l'induction de la sélection positive ou négative semble refléter des fonctions différentielles des cascades MAPK dans le mécanisme de sélection. Ainsi, l'activation de la voie de signalisation ERK/MAPK est requise pour la sélection positive (Alberola-Ila *et al.*, 1996; O'Shea *et al.*, 1996) tandis que l'engagement des voies de signalisation JNK et p38 MAPK contrôle la sélection négative (Sugawara *et al.*, 1998; Rincon *et al.*, 1998).

#### IV- La voie de signalisation Notch dans le lignage lymphoïde.

Les protéines Notch appartiennent à une famille de récepteurs transmembranaires très conservée. La voie Notch régule le choix du destin cellulaire au cours du développement de divers types cellulaires chez les invertébrés comme chez les vertébrés (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995). Elle contrôle aussi plusieurs aspects du développement normal des cellules T et est impliquée dans l'émergence de leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T).

#### IV<sub>1</sub>- La voie Notch

Les homologues de Notch identifiés chez les mammifères sont au nombre de 4, Notch (1-4) (Artanavis-Tsakonas, 1995; 1999). Les récepteurs Notch sont des protéines transmembranaires qui sont clivées au cours de leur transit dans l'appareil de Golgi par une sérine-protéase (furine). Ceci conduit à l'expression d'un récepteur hétérodimérique à la surface des cellules, composé d'un domaine extracellulaire (ECN) et d'un domaine intracellulaire (NIC) (Figure 11). La portion extracellulaire est constituée de 29 à 36 répétitions de motifs EGF ("epidermal growth factor") qui assurent la liaison du récepteur à son ligand, et de 3 répétitions LIN qui inhibent toute signalisation en absence de ligand. La partie intracellulaire, responsable de la transduction du signal par Notch contient plusieurs domaines!: les répétitions RAM et ankyrin qui interagissent avec le facteur de transcription CSL (<u>CBF1(RBP-JK)</u>, <u>Suppressor of Hairless</u>, <u>Lag-1</u>)!; 2 séquences de localisation nucléaire!; une séquence NCR ("Notch cytokine response")!; un domaine TAD (domaine de transactivation) nécessaire pour l'activation de la transcription des gènes cibles de Notch 1-2 possèdent un domaine de transactivation, absent de Notch 3-4. Enfin, Notch 4 est le seul membre des récepteurs Notch dépourvu de la région NCR.

L'activation de la voie Notch est induite par l'interaction du récepteur avec un ligand de la famille Delta ou Jagged. Il existe 5 ligands de Notch connus chez les mammifères, Jagged (1, 2) et Delta-like (1, 3 et 4). De façon similaire aux protéines Notch, ces ligands sont des protéines transmembranaires dont le domaine extracellulaire est composé de répétitions EGF et d'un domaine N-terminal DSL (Delta, Serrate, Lag2) unique. Dans le thymus, les gènes codant pour les ligands de Notch (Jagged1-2, Delta-like 1-4) sont principalement exprimés par les cellules épithéliales (Anderson *et al.*, 2001!; Schmitt *et al.*, 2002).



**Figure 11. Représentation schématique de la structure des récepteurs Notch chez la drosophile et chez l'homme.** ECN!: domaine extracellulaire!; NIC!: domaine intracellulaire!; EGFR!: répétitions "epidermal growth facto"!; LIN!: répétitions "Lin12 Notch"; RAM : domaine RAM23; ANK : répétitions ankyrin; NCR : "Notch cytokine response"; TAD : domaine d'activation de la transcription. DTM: domaine transmembranaire.

L'interaction d'un récepteur Notch à son ligand induit la protéolyse, en deux étapes, du récepteur (pour revue, Fortini, 2001) (Figure 12). Le premier évènement correspond au clivage du récepteur dans sa partie extracellulaire par des protéases de la famille ADAM ("a disintegrin and metalloprotease"). La seconde étape implique la protéolyse du récepteur dans sa partie cytoplasmique par des protéines  $\gamma$ -sécrétase (préseniline, nicastrine), qui libère le domaine intracellulaire de Notch (NIC). Après translocation nucléaire, NIC interagit avec le facteur de transcription CSL, principal effecteur de la voie Notch. En absence de signalisation par la voie Notch, CSL est incorporé dans un complexe multiprotéique en présence des corépresseurs SMRT ("silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor"), N-CoR ("nuclear receptor corepressor") (Lai, 2002). Ces différentes protéines recrutent alors d'autres facteurs comme Sin3A et/ou des histones déacétylases (HDAC), conférant ainsi une activité de répresseur transcriptionnel au complexe. La translocation de NIC dans le noyau induit un changement d'activité du complexe CSL, qui passe d'un état de répresseur à un état d'activateur de la transcription. NIC déplace les corépresseurs et recrute des coactivateurs de la famille mastermind (MAM). MAM stabilise le complexe CSL/NIC/MAM et assure le recrutement de coactivateurs comme p300/CBP (Oswald et al., 2001; Fryer et al., 2002). Plusieurs gènes cibles de la voie Notch ont été identifiés!: pTα, Hes1, Deltex1, Meltrinβ, Ifi204 ou encore Cycline D1 (Deftos et al., 2000; Ronchini et Capobianco, 2001). La fonction de pT $\alpha$  a été définie dans le chapitre précédent. Hes1 est un facteur de transcription de la famille "basic Helix-Loop-Helix" exprimé dans les populations DN. Des souris Hes1<sup>-/-</sup> présentent un blocage du développement des thymocytes au stade DN (Tomita et al., 1999). Il a également été proposé que Hes1 soit un régulateur négatif de l'expression de CD4 (Kim et Siu, 1998). Deltex1 est une protéine "doigts de zinc", capable d'interagir avec NIC (Matsuno et al., 1995). Sa fonction dans les thymocytes n'est cependant pas connue. Meltrinß est une métalloprotéase de la famille ADAM (a disintegrin and metalloprotease) qui est exprimée dans divers tissus (Inoue et al., 1998]; Kurisaki et al., 1998). De façon intéressante, une autre protéine de la même famille, ADAM10 (orthologue murin de Kuzbanian) est impliquée dans la signalisation par Notch (Sotillos et al., 1997; Lieber et al., 2002). Ifi204 appartient à une famille de protéines nucléaires impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et de la transcription (Johnstone et Trapani, 1999). La Cycline D1 est un régulateur du cycle cellulaire impliqué dans le contrôle de la transition entre les phases G1 et S (Stacey, 2003). Toutefois, une régulation directe de l'expression de certains de ces gènes par Notch in vivo reste à démontrer. Par ailleurs, il est probable que la signalisation par Notch s'effectue de façon indépendante du facteur de transcription CSL (Zecchini et al., 1999; Bush et al., 2001). La voie Notch peut être régulée par des protéines comme Fringe, qui modifient les récepteurs Notch et modulent la signalisation par Notch. D'autres protéines comme Numb et Deltex 1 régulent également la signalisation par Notch. Une caractéristique importante de la voie de signalisation Notch réside dans le fait que l'activation de la voie Notch conduit à une autorégulation positive et à une expression de Notch1 (Deftos et al., 1998).



**Figure 12!: La voie de signalisation Notch.** Le récepteur Notch est clivé par une sérine-protéase (furine) lors du transit dans l'appareil de Golgi, puis est exprimé à la surface des cellules. La liaison de Notch avec son ligand (Dll-1!: Delta like-1!; J-1!:Jagged-1!) conduit à la translocation du domaine intracellulaire de Notch (NIC) dans le noyau. L'interaction entre NIC et CSL déplace les corépresseurs (CoR), permet le recrutement de coactivateur (CoA) et entraîne l'activation des gènes cibles de Notch.

#### a- Notch et l'engagement vers la lignée T.

Les cellules T se développent dans le thymus à partir d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP) aux cellules T et B. L'étude de la voie de signalisation Notch a montré que Notch1 exerce un rôle primordial dans la décision d'un CLP à adopter un phénotype T ou B.

L'inactivation du gène Notch1 dans les cellules précurseurs de MO, par une cre-recombinase inductible par l'interféron  $\alpha$ , conduit à l'arrêt du développement des cellules T dans le thymus au stade DN1 et au développement ectopique de cellules B dans le thymus (Radtke *et al.*, 1999). Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris pour lesquelles le facteur de transcription CSL est inactivé dans des cellules de MO (Han *et al.*, 2002). La voie Notch peut être régulée par différents mécanismes. Ainsi, les protéines Fringe, qui sont des glycosyltransférases, peuvent modifier les récepteurs Notch et moduler la signalisation par Notch. Des thymocytes exprimant Lunatic fringe sous le contrôle du promoteur du gène lck montrent un blocage du développement des cellules T et une apparition de cellules B dans le thymus (Koch *et al.*, 2001). De la même manière, la protéine Deltex1 est un antagoniste de Notch dans les cellules de MO. Ainsi, des souris reconstituées avec des cellules de MO exprimant Deltex1 développent des cellules B dans le thymus aux dépends des cellules T (Izon *et al.*, 2002). Des expériences de surexpression de Notch1 ont également montré son implication dans l'engagement des CLPs vers le lignage T. En effet, l'expression d'une forme constitutivement active de Notch1 dans des cellules de MO aboutit au développement ectopique de cellules T DP dans la MO des animaux transplantés (Pui *et al.*, 1999).

D'autres arguments en faveur d'un rôle de Notch dans l'engagement des CLPs vers le lignage T proviennent de l'étude de ligands de Notch comme Delta-like1 (Dll-1). Dll-1 est exprimé par les cellules stromales du thymus mais pas par les cellules de la MO, suggérant un rôle décisif de Dll-1 dans l'engagement des précurseurs lymphoïdes dans le lignage T (Schmitt *et al.*, 2002). Jaleco *et al.*, (2001) et Schmitt *et al.*, (2002) ont ainsi montré que la culture de progéniteurs lymphoïdes, en présence de cellules stromales exprimant Dll-1, favorise le développement de cellules T et induit un blocage de la différenciation des cellules B. D'autre part, l'entrée des progéniteurs des cellules T dans le thymus correspond à l'activation de la voie Notch dans ces cellules, visualisée par l'expression des gènes Hes1 et Deltex1 (Harman *et al.*, 2003). L'ensemble de ces études établit donc clairement une fonction de la voie de signalisation Notch dans l'engagement des CLPs vers le lignage T.

#### b- Notch et le développement des thymocytes.

L'expression des gènes Notch1 et Notch3 est régulée de façon dynamique dans les différentes sous-populations de thymocytes. Plus précisément, Notch1 est fortement exprimé dans les cellules DN, faiblement dans les cellules DP et de façon intermédiaire dans les cellules SP (Hasserjian *et al.*, 1996; Izon *et al.*, 2002). En comparaison avec Notch1, Notch3 est très fortement exprimé dans les thymocytes DN et DP, mais est quasiment indétectable dans les thymocytes SP (Felli *et al.*, 1999; Bellavia *et al.*, 2002). Les différences observées dans le patron d'expression des gènes Notch1 et Notch3 reflètent probablement des propriétés différentes de ces deux gènes dans la régulation du développement des cellules T.

La fonction de Notch1 a été étudiée par différentes approches. Des souris létalement irradiées et reconstituées avec des cellules de MO Notch1<sup>+/+</sup> et Notch1<sup>+/-</sup> montrent que la contribution au lignage T $\alpha\beta$  est moindre pour les cellules Notch1<sup>+/-</sup> que pour les cellules Notch1<sup>+/+</sup> (Washburn *et al.*, 1997). De plus, les auteurs de cette étude ont montré que l'expression du domaine intracellulaire de Notch1 (NIC1), sous le contrôle du promoteur lck, favorise le développement de cellules DP dans des souris déficientes pour la chaîne  $\beta$  du TCR, mais pas dans des souris RAG1<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent que Notch1 influence la différenciation du précurseur vers le lignage  $\alpha\beta$ . De façon similaire, Allman *et al.*, (2001) ont montré que l'expression de NIC1 dans des cellules de MO

RAG2<sup>-/-</sup> ne permet pas le développement de cellules DP dans les souris récipients. Toutefois, l'introduction d'un TCR $\beta$  transgénique autorise la différenciation de cellules DP. Ces données sousentendent qu'il existe une étroite collaboration entre la voie Notch et la signalisation par le pré-TCR dans le développement normal des cellules DN.

Dans une étude complémentaire, l'inactivation conditionnelle de Notch1, juste avant l'étape de la sélection  $\beta$ , affecte le développement des cellules T $\alpha\beta$ , bien que le nombre des cellules T $\gamma\delta$  ne soit pas altéré (Wolfer *et al.*, 2002). Cette étude a par ailleurs permis de mettre en évidence une fonction de Notch1 dans le mécanisme de réarrangement VDJ<sub> $\beta$ </sub>.

La régulation précise de l'expression de Notch1 au cours du développement des thymocytes suppose une fonction de Notch1 dans le contrôle de la transition DP-SP. Afin d'élucider le rôle de Notch1 dans la transition DP-SP, des expériences de surexpression ont été conduites. Une première étude propose que Notch1 confère une résistance à la mort cellulaire, induite par les glucocorticoïdes, au travers de l'activation du gène anti-apoptotique bcl-2 (Deftos et al., 1998). Ainsi, Notch1 favoriserait la survie des cellules sélectionnées au cours de leur maturation en cellules SP. L'expression de NIC1 (sous le contrôle du promoteur lck) dans les thymocytes entraîne une augmentation de la population de cellules CD8 SP par rapport aux cellules CD4 SP (Robey et al., 1996). Une autre étude a cependant montré que l'expression de NIC1 (également sous le contrôle du promoteur lck) entraînait une augmentation des populations CD4 et CD8 SP (Deftos et al., 2000). Toutefois, ces dernières souris développent rapidement des lymphomes T (4 semaines), ce qui pourrait masquer l'effet de Notch1 dans le développement des cellules CD4 et CD8 SP. Les différences observées dans ces deux études proviennent peut-être des modèles transgéniques utilisés. En effet, le transgène NIC1 utilisé par Deftos et al contient un domaine de transactivation entier, qui est partiellement délété dans le transgène NIC1 de Robey et al. Pour clarifier la fonction de Notch1 dans le développement des cellules CD4 et CD8 SP, Fowlkes et Robey (2002) ont ré-analysé les modèles transgéniques NIC1 avant l'émergence de lymphomes T. Les auteurs de cette étude sont arrivés à la conclusion que l'expression de NIC1 dans les thymocytes conduit au développement d'une population plus importante de cellules CD8 SP au détriment des cellules CD4 SP. Il a par ailleurs été observé que des souris reconstituées avec des cellules de MO préalablement infectées avec un rétrovirus exprimant NIC1 développent des thymocytes jusqu'au stade DP et que la maturation en cellules SP dans le thymus est bloquée (Izon et al., 2001). De plus, les auteurs proposent que Notch1 régule le développement des cellules T en modulant la signalisation par le TCR. En effet, l'expression forcée de NIC1 dans les thymocytes conduit à un faible niveau d'expression des marqueurs CD5 et CD69, ainsi qu'à une inhibition de la signalisation en aval du TCR (voie NFAT). Ces résultats sont en apparente contradiction avec le phénotype décrit par Fowlkes et Robey. Il est possible que les différences observées soient dues aux différents systèmes utilisés pour surexprimer NIC1 dans les thymocytes. La fonction de Notch1 dans la transition DP-SP a également été abordée à l'aide de système de perte de fonction. Ainsi, l'expression d'un ARN antisens pour Notch1 dans des cellules de foie fœtal, placées dans un système de culture d'organe de lobes de thymus foetaux, montre un blocage du développement des cellules CD8 SP, alors que les cellules CD4 SP se différencient normalement (Yasutomo *et al.*, 2000). Par contre, une autre étude où Notch1 est inactivé dans les thymocytes immatures ne révèle aucune anomalie de développement des cellules CD4 SP et CD8 SP (Wolfer *et al.*, 2001). Une fois encore, deux études livrent deux résultats différents. Ceci peut être en partie expliqué par des différences du développement des cellules T adultes et fœtales ainsi que par les différents systèmes expérimentaux utilisés.

La fonction de Notch3 n'a pour le moment été étudiée que par des expériences de surexpression du domaine intracellulaire (NIC3) de ce gène. Bellavia *et al.*, 2000 ont remarqué que la surexpression de Notch3 (sous contrôle du promoteur lck) affecte le stade de sélection par le pré-TCR. En effet, des souris transgéniques exprimant NIC3 présentent une augmentation du nombre de cellules DN2 et DN3 (CD25<sup>+</sup>), ainsi qu'une augmentation du niveau d'expression de la chaîne invariante pT $\alpha$  et CD25 dans les cellules post-DN et périphériques. De façon intéressante, la surexpression de NIC3 n'entrave pas le réarrangement du locus de la chaîne  $\alpha$  du TCR, ni la différenciation normale des populations CD4 et CD8 SP.

Les phénotypes obtenus à partir de la surexpression de NIC1 et NIC3 sont clairement différents, et suggèrent ainsi que ces deux récepteurs ont des fonctions distinctes dans le contrôle de la différenciation des cellules DN vers les stades ultérieurs.

L'influence de la voie Notch sur le développement des thymocytes a également été mise en évidence par l'analyse des dérégulations de gènes cibles de la voie Notch (Hes1, pT $\alpha$ ), ou par l'analyse des effets de l'inhibition des présenilines sur le développement des thymocytes. pT $\alpha$  a été identifié comme un gène cible de Notch1 (Deftos *et al.*, 2000!; Reizis et Leder 2002), et son expression coïncide avec celle des gènes Notch dans les cellules DN. Or, comme il a été décrit dans le chapitre précédent, les thymocytes pT $\alpha^{-/-}$  sont bloqués au stade DN3. Par ailleurs, Hes1, également caractérisé comme une cible de Notch1 (Deftos *et al.*, 2000), est aussi un régulateur important du développement des cellules DN. En effet, la reconstitution de souris RAG2<sup>-/-</sup> avec des cellules de foie fœtal Hes1<sup>-/-</sup> montre un arrêt de la différenciation des cellules T au stade DN2.
Les présenilines sont responsables de la protéolyse des protéines Notch au niveau du domaine cytoplasmique, autorisant la translocation du domaine intracellulaire dans le noyau. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des  $\gamma$ -sécrétases entraîne un blocage dose-dépendant du développement de cellules CD8 SP (Hadland *et al.*, 2001; Doerfler *et al.*, 2001). Bien que certaines différences existent entre les études décrites ci-dessus, l'ensemble des résultats laisse apparaître une fonction probable des gènes Notch dans le contrôle du développement des thymocytes (Figure 13). Plus précisément, il semble que Notch intervienne au niveau de différents points de contrôle, comme la sélection  $\beta$  et la sélection positive et négative. Aussi, une dérégulation de cette propriété pourrait être liée à l'émergence de lymphomes des cellules T.



Figure 13!: Le rôle de Notch dans la différenciation des cellules T.

c- Notch et le développement de lymphomes T.

Des altérations de la voie de signalisation Notch ont été impliquées dans l'étiologie des leucémies lymphoblastiques aiguës (LAL-T) chez l'homme. En effet, une fraction des LAL-T possède une translocation chromosomique fusionnant le locus Notch1 au locus de la chaîne  $\beta$  du TCR (Ellisen *et al.*, 1991). La fusion de ces deux loci, t(7;9)(q34;q34.3), place les séquences du gène Notch1 codant pour le domaine intracellulaire (NIC) sous le contrôle du promoteur du TCR $\beta$ . Ceci a pour conséquence l'expression d'une forme constitutivement active de Notch. Différentes approches chez la souris ont permis de confirmer le potentiel oncogénique des gènes Notch.

L'expression du gène c-myc dans des souris transgéniques montre que les animaux développent des lymphomes T avec 100% de pénétrance (Paquette *et al.*, 1992). Par ailleurs, l'expression d'un transgène codant pour une protéine de fusion E2A-PBX1 conduit aussi à l'apparition de LAL-T (Dedera *et al.*, 1993). Le temps de latence relativement long d'apparition des

tumeurs (100 jours pour c-myc, 150 jours pour E2A-PBX1), suggère que la dérégulation de l'expression de ces oncogènes seule n'est pas suffisante pour induire la formation des tumeurs, et que des évènements génétiques additionnels sont nécessaires à la transformation complète de la cellule. L'utilisation de la technique de mutagenèse par insertion rétrovirale a permis d'identifier Notch1 comme un collaborateur de c-myc et de la protéine chimérique E2A-PBX1 dans l'induction de lymphomes T (Girard et *al.*, 1996; Feldman *et al.*, 2000). En effet, les auteurs de ces études ont montré que le locus du gène Notch est une cible fréquente d'insertion du virus (MMuLV). L'insertion du virus au niveau du locus Notch1 conduit à la production de formes aberrantes de Notch1, majoritairement NIC1, ce qui contribue à l'accélération du développement des tumeurs dans les souris transgéniques.

Il est aussi intéressant de noter que des souris transgéniques exprimant NIC1 sous le contrôle du promoteur lck, de même que des souris reconstituées avec des cellules de MO exprimant NIC1 développent des lymphomes T (Robey *et al.*, 1996!; Deftos *et al.*, 2000!; Pear *et al.*, 1996). Le phénotype de ces tumeurs est associé à un profil CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>10</sup>CD8<sup>+</sup> et à un niveau d'expression du TCR faible ou intermédiaire. De façon similaire, l'expression de NIC3 conduit également au développement de LAL-T (Bellavia *et al.*, 2000), caractérisées par une expression soutenue de la chaîne pT $\alpha$  et du marqueur CD25.

Les mécanismes précis par lesquels l'activation de la voie Notch conduit au développement de lymphomes T restent encore mal compris. Cependant, il a été montré que l'expression de NIC1 inhibe l'expression des gènes E2A (E47, E12) (Pui *et al.*, 1999), et celle de NIC3 conduit à une réduction de l'activité de la protéine E2A (Talora *et al.*, 2003). Ceci est d'un intérêt particulier puisqu'il a été reporté que des souris déficientes pour les gènes E2A développent des lymphomes T similaires (Bain *et al.*, 1997). D'autre part, l'expression de NIC3 conduit à une activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, dont le potentiel oncogénique a été préalablement établi (Rayet et Gélinas, 1999). De plus, des souris transgéniques exprimant v-Rel (un membre de la famille de facteur de transcription NF- $\kappa$ B) développent des lymphomes comparables à ceux observés dans les souris NIC3 (Carrasco *et al.*, 1996). Une caractéristique commune aux souris transgéniques NIC1 et NIC3 est que le développement de ces lymphomes est inhibé en l'absence d'un complexe pré-TCR fonctionnel. En effet, la délétion de la chaîne pT $\alpha$  dans les souris NIC3 empêche la formation des LAL-T (Bellavia *et al.*, 2002). De façon analogue, l'expression de NIC1 dans des cellules de MO RAG2<sup>-/-</sup> n'est pas suffisante pour l'induction de LAL-T. En outre, l'introduction d'un transgène de la chaîne  $\beta$  du TCR dans ces cellules entraîne la formation subséquente de LAL-T (Allman *et al.*, 2001). Ces deux études montrent donc que la transformation des cellules T par l'expression de NIC1 et NIC3 est dépendante d'une signalisation appropriée par le complexe pré-TCR. Ceci est en adéquation avec l'implication probable de la voie Notch dans le contrôle de la transition DN DP SP, elle-même dépendante d'une signalisation par le complexe pré-TCR ou TCR.

Par ailleurs, dans un étude récente, Weng *et al.*, 2003 ont démontré qu'une activation continue de la voie Notch est requise pour la prolifération de lignées tumorales murines dérivées de lymphomes T exprimant NIC1. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé un peptide dominant-négatif provenant de la protéine Mastermind-like-1 (dnMAML1). Ce peptide permet la formation d'un complexe ternaire Notch1/CSL/MAML1, mais empêche l'activation de la transcription des gènes cibles de Notch par une activité dominante négative. De cette façon, l'expression du peptide dnMAML1 induit l'arrêt de la prolifération des lignées cellulaires tumorales.

Il apparaît donc clairement qu'une activation inappropriée de la voie de signalisation Notch constitue un des évènements importants pour l'émergence de lymphomes des cellules T.

# V- Le facteur de transcription Ikaros.

Le gène Ikaros code pour un facteur de transcription à doigts de zinc (DZ)  $C_2H_2$  apparenté à la protéine Hunchback chez *Drosophila melanogaster* (Tautz *et al.*, 1987). Ikaros a été initialement caractérisé par son interaction avec des séquences régulatrices des gènes lymphoïdes CD3 $\delta$  (Georgopoulos *et al.*, 1992) et TdT (Lo *et al.*, 1991; Hahm *et al.*, 1994), et il est le membre fondateur d'une sous-famille de protéines à doigts de zinc se liant à l'ADN. Ikaros est exclusivement exprimé dans le système hématopoïétique. Sa fonction probable est de réguler l'expression de ses gènes cibles par des mécanismes de remodelage de la chromatine. Par ailleurs, Ikaros est un régulateur clé du développement des cellules T et se comporte comme gène suppresseur de tumeur dans ces cellules.

#### V<sub>1</sub>- La structure du gène Ikaros.

Le gène Ikaros comprend sept exons et permet, par épissage alternatif de l'ARN prémessager, l'expression de plusieurs isoformes protéiques différentes (Figure 14) (Molnar et Georgopoulos, 1994!; Hahm *et al.*, 1994!; Payne *et al.*, 2001). Ces protéines contiennent six motifs DZ organisés en deux domaines fonctionnels distincts. La partie N-terminale (Nt) contient de un à quatre motifs DZ, assurant la liaison à l'ADN (Molnar *et al.*, 1994) et reconnaissant la séquence consensus TGGGAA. La combinaison des différents doigts de zinc dans le domaine Nt détermine la spécificité et l'affinité de la protéine à se lier à l'ADN. Des mutations ciblées des différents DZ du domaine Nt d'Ikaros ont permis de montrer que les DZ 2 et 3 interagissent physiquement avec l'ADN (Cobb *et al.*, 2000; Koipally *et al.*, 2002). Le domaine C-terminal (Ct) contient 2 motifs DZ et permet les interactions protéine-protéine entre les différentes isoformes d'Ikaros (Sun *et al.*, 1996), mais aussi avec d'autres protéines de la même famille : Aiolos, Hélios, Eos, Pegasus (Morgan *et al.*, 1997; Hahm *et al.*, 1998; Perdomo *et al.*, 2000). Juste en amont des motifs "doigts de zinc" Ct se trouve également un domaine d'activation (Sun *et al.*, 1996).

Des différentes isoformes Ikaros connues, seules les isoformes Ik-1, 2, 3 et 4 possèdent le domaine Nt capable de se fixer à l'ADN. Cependant, toutes les isoformes de la protéine contiennent le domaine de dimérisation. Ainsi, les homo- ou hétérodimères formés avec les isoformes 1, 2, 3, 4 peuvent se fixer à l'ADN et exercer leur fonction alors que les hétérodimères composés d'isoformes, avec et sans domaine de liaison à l'ADN, en sont incapables. Par conséquent, les isoformes sans

domaine de liaison à l'ADN peuvent interférer avec la fonction des autres isoformes par un mécanisme dominant négatif.



Figure 14: Représentation schématique de plusieurs isoformes d'Ikaros. Le domaine de liaison à l'ADN contient 4 motifs doigts de zinc, le domaine de dimérisation en possède 2. Le domaine d'activation est représenté en bleu.

# V<sub>2</sub>- L'expression du gène Ikaros.

L'expression d'Ikaros est détectée très tôt au cours du développement embryonnaire (8,5 jpc), au niveau des sites où se produisent l'hématopoïèse primitive (sac vitellin) et définitive (foie fœtal) (Georgopoulos *et al.*, 1992). Chez l'adulte, Ikaros est exprimé dans l'ensemble des cellules hématopoïétiques (HSC de phénotype Lin<sup>-</sup>cKit<sup>+</sup>Scal<sup>+</sup>, cellules myéloïdes et érythroïdes, lymphocytes T et B) (Morgan *et al.*, 1997; Kelley *et al.*, 1998; Klug *et al.*, 1998; Kirstetter *et al.*, 2002). Cependant, la régulation de l'expression d'Ikaros varie d'un lignage cellulaire à l'autre. En effet, le niveau d'expression d'Ikaros diminue parallèlement à la différenciation des cellules myéloïdes et érythroïdes (Klug *et al.*, 1998; Dumortier *et al.*, 2003). À l'inverse, le niveau d'expression d'Ikaros augmente au cours de la différenciation des cellules T (Morgan *et al.*, 1997, Kelley *et al.*, 1998). Ceci reflète probablement des fonctions différentes d'Ikaros dans ces divers lignages.

Des différentes isoformes décrites jusqu'à maintenant, Ik-1 et Ik-2 sont les isoformes les plus abondamment exprimées dans les cellules hématopoïétiques (Morgan *et al.*, 1997; Molnar et

Georgopoulos, 1994). Ainsi, la plupart des protéines Ikaros produites dans les cellules hématopoïétiques normales sont capables de se lier à l'ADN.

Les mécanismes de régulation de l'expression d'Ikaros sont encore très mal connus. Toutefois, une étude récente a permis de mettre en évidence l'existence de sites hypersensibles à la DNase I et de cartographier plusieurs sites promoteurs dans le locus Ikaros (Kaufmann *et al.*, 2003). L'identification de ces éléments régulateurs est d'un intérêt particulier, puisqu'elle devrait permettre la mise en évidence de facteurs de transcription impliqués dans la régulation du gène Ikaros. C'est d'ailleurs par cette approche qu'Ikaros a été identifié.

## V<sub>3</sub>- Fonctions d'Ikaros *in vivo*.

Le rôle du facteur de transcription Ikaros au cours du développement des cellules hématopoïétiques a été analysé par la production de différentes mutations pour ce gène.

# a- La mutation nulle du gène Ikaros (Ik<sup>-/-</sup>).

La mutation  $Ik^{-t}$  a été réalisée par délétion de l'exon 7, codant la partie C-terminale de la protéine, incluant le domaine d'activation et de dimérisation (Wang *et al.*, 1996). Les souris  $Ik^{-t}$  n'expriment pas de protéines Ikaros. L'analyse des cellules hématopoïétiques chez les souris  $Ik^{-t}$  révèle une réduction du nombre de progéniteurs hématopïétiques (Nichogiannopoulou *et al.*, 1999). De plus, l'analyse de l'expression de gènes dans une population de précurseurs hématopoïétiques (Lin'c-Kit<sup>+</sup>) montre une dérégulation de deux types de récepteurs tyrosine-kinase, importants pour le contrôle de la taille des populations de précurseurs hématopoïétiques. En effet, le récepteur Flk-2 ("Fetal liver kinase 2") est absent, tandis que c-Kit a un niveau d'expression 5 à 10 fois inférieur à la normale (Nichogiannopoulou *et al.*, 1999). D'autre part, l'expression de GATA-3, un facteur de transcription nécessaire à la différenciation précoce des cellules T (Kuo et Leiden, 1999), est diminuée dans ces cellules précurseurs.

Les souris Ik<sup>-/-</sup> ne développent aucune cellule B, ni dans le foie fœtal, ni dans les organes hématopoïétiques adultes (MO, rate et péritoine). Ces résultats suggèrent qu'Ikaros est nécessaire pour le développement normal des cellules B.

Les cellules T fœtales sont également absentes et le thymus des souris Ik<sup>-/-</sup> est dépourvu de cellules T jusqu'à la naissance. Les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> SP se développent cependant dans le thymus quelques semaines après la naissance. Néanmoins, la population de cellules CD4<sup>+</sup> SP est augmentée dans le thymus des souris Ik<sup>-/-</sup> comparée aux souris normales. De plus, la population des

cellules Tyo est très réduite dans les souris Ik<sup>-/-</sup>, suggérant un rôle d'Ikaros dans la différenciation normale des cellules Τyδ. Par ailleurs, des cellules T DN Ik<sup>-/-</sup>xRAG1<sup>-/-</sup>, n'exprimant pas de complexe pré-TCR fonctionnel, sont capables de se différencier en cellules T DP (Winandy et al., 1999), mais cette différenciation n'est pas accompagnée par la prolifération normalement observée. Ces résultats suggèrent que l'absence de la protéine Ikaros permet la différenciation des cellules T immatures en absence de pré-TCR, mais pas leur prolifération. Il a également été montré que les cellules T Ik<sup>-/-</sup> prolifèrent plus en réponse à une stimulation par le TCR (Wang et al., 1996). Cette réponse hyperproliférative est d'ailleurs accompagnée par une accélération de la transition entre les phases G0/G1 et S du cycle cellulaire (Avitahl et al., 1999). Ces résultats suggèrent une fonction probable d'Ikaros dans la signalisation par le TCR. Cette hypothèse est en outre appuyée par le fait que des cellules DP Ik<sup>-/-</sup>xTCR $\alpha^{-/-}$ , n'exprimant pas de TCR à leur surface, sont capables de se différencier en cellules CD4<sup>10</sup> et CD8<sup>10</sup>, un stade intermédiaire entre les stades DP et SP. Ces cellules intermédiaires ne sont pourtant pas capables de se développer en cellules T matures (Winandy et al., 1999). De plus, les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> présentes dans les souris Ik<sup>-/-</sup> n'expriment le marqueur d'activation CD69 que très faiblement, suggérant qu'elles franchissent cette étape de développement sans avoir été positivement sélectionnées. L'ensemble de ces données suggèrent que les cellules T Ik-/- ont un seuil d'activation réduit par rapport aux cellules T de type sauvage.

La protéine Ikaros, indispensable au développement des cellules T et B, est également nécessaire aux autres cellules du lignage lymphoïde. En effet, les cellules NK et les cellules dendritiques  $CD8\alpha^+$  sont absentes et les cellules dendritiques thymiques sont réduites chez les souris Ik<sup>-/-</sup>. La MO des souris Ik<sup>-/-</sup> contient un nombre réduit de précurseurs érythropoïétiques et un nombre à peu près normal de précurseurs myéloïdes. Cependant, l'expression du marqueur Gr-1, spécifique des granulocytes, est diminuée (Wang *et al.*, 1996). Cette dernière observation indique une fonction probable d'Ikaros dans la régulation de gènes spécifiques des granulocytes, mais non essentiels à leur développement.

# b- La mutation dominante négative du gène Ikaros (DN-/-).

Historiquement, la première mutation du gène Ikaros décrite délète les exons 3 et 4 codant pour le domaine de fixation à l'ADN (Georgopoulos *et al.*, 1994). Les protéines produites par cette mutation sont dépourvues du domaine de fixation à l'ADN, mais gardent la capacité d'interagir avec les autres isoformes d'Ikaros, ainsi qu'avec les protéines Aiolos, Hélios. Ainsi, les protéines Ik DN peuvent interférer avec l'activité normale de ces protéines par un mécanisme dominant négatif. Le phénotype des souris Ik DN<sup>-/-</sup> est beaucoup plus sévère que celui des souris Ik<sup>-/-</sup>. Les embryons Ik DN<sup>-/-</sup> se développent normalement, puis meurent une à trois semaines après la naissance, à la suite d'infections opportunistes diverses. L'activité et le nombre de cellules hématopoïétiques immatures Ik DN<sup>-/-</sup> sont affectés. En effet, les cellules Ik DN<sup>-/-</sup> sont dépourvues de toute activité de reconstitution à long terme du système hématopoïétique (Nichogiannopoulou *et al.*, 1999). De la même façon que pour les souris Ik<sup>-/-</sup>, les cellules Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup> des souris Ik DN<sup>-/-</sup> n'expriment pas Flk-2, GATA3 et expriment c-Kit à un niveau réduit.

Les souris Ik DN<sup>-/-</sup> présentent un blocage précoce et complet du développement des cellules du lignage lymphoïde pendant l'hématopoïèse fœtale et adulte. Le thymus de ces animaux reste rudimentaire et les organes lymphoïdes périphériques secondaires sont absents.

Au contraire des effets sévères observés dans le lignage lymphoïde, les lignages érythroïde et myéloïde sont intacts dans les souris Ik DN<sup>-/-</sup>. Les populations de cellules érythroïdes et myéloïdes sont réduites dans la MO, mais cette réduction est compensée par une augmentation de l'hématopoïèse extra-médullaire dans la rate des souris Ik DN<sup>-/-</sup> (Wu *et al.*, 1997). Il a été proposé que les effets plus sévères observés dans les cellules Ik DN<sup>-/-</sup> reflètent les effets combinés de l'absence d'activité de la protéine Ikaros, et des interférences des protéines Ik DN avec les autres protéines de la famille Ikaros (Georgopoulos *et al.*, 1997).

# c- La mutation Ik<sup>plstc</sup>(plastic).

La mutation Ik<sup>plste</sup> a été isolée après utilisation de la méthode de mutagenèse chimique par l'agent éthylant N-Ethyl-N-nitroso-urée (ENU). La mutation Ik<sup>plste</sup> résulte d'une mutation ponctuelle (A G) au niveau de la séquence codant pour le DZ 3 de la protéine Ikaros (Papathanasiou *et al.*, 2003). Cette mutation abolie la capacité d'Ikaros à se fixer à l'ADN, mais préserve sa faculté à se dimériser avec les autres isoformes. La mutation homozygote Ik<sup>plste</sup> conduit à une létalité embryonnaire entre 15,5 jpc et 17,5 jpc, due à une anémie sévère. L'analyse des cellules dans le foie fœtal des souris Ik<sup>plste</sup> révèle un phénotype très similaire à celui décrit pour les mutations précédentes!: absence d'activité de reconstitution à long terme du système hématopoïétique, absence totale de cellules T et B. D'autre part, les mutants Ik<sup>plste</sup> ne produisent pas de cellules érythroïdes matures, bien que le nombre de précurseurs érythropoïètiques soit normal dans le foie fœtal. De la même façon, les granulocytes Gr-1<sup>+</sup> sont absents des foies fœtaux Ik<sup>plste</sup>, bien que le nombre de précurseurs érythropoïètiques soit normal dans le foie fœtal. De la

d- La mutation hypomorphe du gène Ikaros (Ik<sup>L/L</sup>).

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon travail de thèse a généré sa propre mutation pour le gène Ikaros. Cette mutation a été obtenue par l'introduction du gène rapporteur de la  $\beta$ galactosidase dans l'exon 2 du locus Ikaros, exon conservé dans toutes les isoformes de la protéine Ikaros (Kirstetter *et al.*, 2002). L'allèle produit n'est pas un allèle nul, car une quantité résiduelle de protéine est présente, issue probablement de transcrits produits par épissage alternatif omettant l'exon 2. Les protéines Ikaros produites contiennent donc le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de dimérisation. Le phénotype des souris Ik<sup>L/L</sup> est moins sévère que pour les souris Ik<sup>-/-</sup>, reflétant le caractère hypomorphe de la mutation. De façon très intéressante, la mutation Ik<sup>L/L</sup> est permissive au développement de cellules B chez l'adulte à partir d'un groupe de précurseurs réduits. *In vivo*, les cellules B Ik<sup>L/L</sup> sont bloquées au stade de différenciation pro/pré-B dans la MO et présentent une dérégulation de l'expression des marqueurs de surface et des gènes TdT, RAG1, RAG2 et  $\lambda$ 5. En périphérie, les cellules B ont un seuil d'activation réduit mais forment peu de centres germinaux en réponse à une stimulation antigénique. Ces résultats montrent donc qu'Ikaros régule de multiples aspects de la différenciation et de la fonction des cellules B.

De façon similaire à ce qui est observé dans les souris Ik<sup>-/-</sup> et Ik DN, le niveau d'expression de Gr-1 des cellules de la MO des souris Ik<sup>L/L</sup> est diminué. Nous avons donc tiré partie de cette observation pour étudier la différenciation des neutrophiles dans les souris Ik<sup>L/L</sup>. Les résultats de cette étude sont présentés dans la section suivante (Dumortier *et al.*, 2003).

Le lignage lymphoïde T est aussi affecté par la mutation Ik<sup>L/L</sup> et les données concernant les cellules T seront exposées dans la section "Résultats" de ce manuscrit.

Les premières mutations du gène Ikaros (Ik<sup>-/-</sup> et Ik DN<sup>-/-</sup>) avaient surtout permis de mettre en évidence un rôle clé d'Ikaros dans le contrôle de la différenciation des cellules du lignage lymphoïde. Néanmoins, les autres mutations (Ik<sup>L/L</sup> et Ik<sup>plstc</sup>) ont permis de confirmer le rôle clé d'Ikaros dans le compartiment lymphoïde, mais également de mieux définir sa fonction dans l'ensemble des cellules du système hématopoïétique.

# V<sub>4</sub>- Propriétés moléculaires d'Ikaros.

Les différentes mutations du gène Ikaros ont permis de comprendre le rôle de la protéine dans les cellules lymphoïdes et les cellules hématopoïétiques. Les mécanismes d'action moléculaire d'Ikaros ont été le centre de diverses études, dont il ressort apparemment une fonction duale pour Ikaros, à la fois activateur et répresseur de la transcription.

a- Ikaros, un activateur de la transcription.

*In vitro*, la protéine Ikaros possède une modeste activité d'activation de gène rapporteur (Georgopoulos *et al.*, 1992!; Sun *et al.*, 1996). Le motif consensus de liaison à l'ADN d'Ikaros (TGGGAA) a été identifié dans plusieurs régions promotrices ou "enhancer" restreintes au lignage lymphoïde (Georgopoulos *et al.*, 1994!; Molnar et Georgopoulos, 1994!; Molnar *et al.*, 1996). De façon non exhaustive, on trouve parmi ces gènes, CD3ô,  $\varepsilon$ ,  $\gamma$ ; RAG-1, RAG-2!; IL2-Rc!; TCR $\beta$ !; mb-1, B29!; NF- $\kappa$ B!; CMH II. Cependant, une régulation directe *in vivo* de ces gènes par Ikaros reste à établir.

D'autre part, le profil d'expression des gènes Flk2 et GATA-3 dans les précurseurs hématopoïétiques  $Ik^{-t}$  et Ik DN<sup>-t-</sup> argumente en faveur d'un rôle d'Ikaros comme activateur de la transcription (Nichogiannopoulou *et al.*, 1999). Il a aussi été montré qu'une fraction des protéines Ikaros s'associe au complexe SWI/SNF (Kim *et al.*, 1999!; O'Neill *et al.*, 2000). Le complexe SWI/SNF fonctionne comme un moteur moléculaire, responsable du remodelage de la chromatine de façon ATP-dépendante, et rend les gènes accessibles à la machinerie transcriptionnelle (Figure 16 C). Une autre étude a montré qu'Ikaros peut activer l'expression de gènes de façon inhabituelle, en potentialisant l'activité d'autres facteurs de transcription (Koipally *et al.*, 2002). Cette potentialisation par Ikaros nécessite la présence de domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation intacts, nécessaires à la localisation d'Ikaros au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique (HC-PC). Ces résultats suggèrent qu'il existe une corrélation entre la localisation d'Ikaros au niveau de l'HC-PC et l'activation de l'expression des gènes (Figure 15).



Figure 15!: Représentation de deux modèles présumés pour le rôle d'activateur d'Ikaros (d'après Koipally *et al.*, 2002). (A) En absence d'Ikaros, le complexe Mi-2/HDAC réduit le nombre d'activateurs transcriptionnels fixés sur les sites promoteurs. En présence d'Ikaros, le complexe Mi-2/HDAC est relocalisé au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique (HC-PC), facilitant ainsi la fixation des activateurs transcriptionnels. (B) L'association d'Ikaros avec le complexe Mi-2/HDAC remanie l'accessibilité des sites de liaison environnants et permet aux activateurs de se fixer sur leur site et d'activer la transcription.

# b- Ikaros, un répresseur de la transcription.

Plusieurs études ont montré que les protéines Ikaros sont localisées en abondance au niveau de l'HC-PC de lymphocytes activés. Dans le même temps, Ikaros colocalise au niveau des foci de réplication de l'ADN (Brown *et al.*, 1997!; Wang *et al.*, 1998; Avitahl *et al.*, 1999). D'autre part, il existe une association étroite entre l'état d'activité d'un locus et sa colocalisation avec les domaines contenant Ikaros : seuls les loci non exprimés colocalisent avec Ikaros (Brown *et al.*, 1997). Il a ainsi été montré que les gènes TdT et RAG sont relocalisés au niveau de l'HC-PC dans des cellules en division, suite à l'activation de leur TCR (Brown *et al.*, 1999). L'HC-PC est une région très riche en séquences (Cobb *et al.*, 2000). L'ensemble de ces résultats suggère qu'Ikaros pourrait être impliqué dans la propagation d'un état réprimé d'expression génique au cours de la réplication et/ou dans la transition entre états d'expression génique actifs et inactifs.

Dans les lymphocytes, Ikaros est présent dans un complexe d'environ 2MDa. La caractérisation de ce complexe révèle la présence des protéines Mi-2β, HDAC1, protéines avec lesquelles Ikaros peut interagir (Kim *et al.*, 1999). Ces protéines sont parties intégrantes du complexe NURD ("Nucleosome Remodeling and Deacetylation"). Ce complexe est actif dans le remodelage de la chromatine et la déacétylation des histones, deux mécanismes impliqués dans la répression de l'expression génique. Par ailleurs, Ikaros est capable d'interagir avec les protéines co-répresseurs mSin3A et B (Koipally *et al.*, 1999). Ces facteurs sont impliqués dans le recrutement des HDACs. Néanmoins, une fraction des protéines Ikaros peut interagir, avec le co-répresseur CtBP ("C-terminal binding protein"). Cette interaction est médiée par le motif PEDLS codé par l'exon 2 du gène Ikaros. Dans ce cas, la répression de la transcription s'effectue indépendamment de l'activité HDAC (Koipally et Georgopoulous, 2000).

À partir de ces résultats, il a été proposé que la fixation d'Ikaros sur des séquences d'ADN de ses gènes cibles (accessibles pendant la réplication) conduit, via le recrutement du complexe NURD, à l'inactivation de ces gènes par condensation en structures chromatiniennes closes (Figure 16 A, B).

Ikaros a été identifié comme un régulateur potentiel du gène TdT (Hahm *et al.*, 1994). Par la suite, il a été montré que le site de fixation d'Ikaros dans le site promoteur du gène TdT est également un site de fixation pour la protéine de la famille ets, Elf-1 (Ernst *et al.*, 1996). L'inactivation des sites de liaison spécifique à Ikaros révèle que Elf-1 est responsable de l'activation de la transcription du gène TdT. Lorsque les cellules T DP sont stimulées par leur TCR, la protéine Ikaros se fixe sur ces séquences régulatrices, la transcription du gène TdT est réprimée. Dans ce cas de figure, Ikaros joue un rôle de répresseur de la transcription.

A. Recrutement au niveau de la chromatine accessible et remodelage en chromatine inaccessible



B. Maintenance de la chromatine inaccessible/ réprimée au travers des divisions cellulaires



C. Remodelage de la chromatine inaccessible/réprimée en chromatine accessible

SWI/SNF	SWISNE	
ՠ֎֍ՠ		 ┍╾᠓

Figure 16!: Représentation de trois modèles du rôle de la protéine Ikaros dans le remodelage de la chromatine (Kim *et al.*, 1999). (A) La liaison d'Ikaros au niveau de la chromatine accessible, en association avec le complexe Mi-2/HDAC conduit au remodelage de la chromatine en un état inaccessible. (B) L'association d'Ikaros avec le complexe Mi-2/HADC au niveau de la chromatine inaccessible maintient cet état réprimé au cours des divisions cellulaires. (C) La liaison d'Ikaros au niveau de la chromatine inaccessible, en association avec le complexe SWI/SNF conduit au remodelage de la chromatine inaccessible, en association avec le complexe SWI/SNF conduit au remodelage de la chromatine en un état accessible.

#### V<sub>5</sub>- Ikaros, un gène suppresseur de tumeurs.

Plusieurs études ont impliqué Ikaros comme un gène suppresseur de tumeurs pour les lymphomes T. Ainsi, les souris hétérozygotes pour des mutations dominantes négatives (Ik  $DN^{+/-}$ ,  $Ik^{+/plstc}$ ) développent toutes des lymphomes thymiques quelques mois après la naissance (Winandy *et al.*, 1995, Papathanasiou *et al.*, 2003). Ces lymphomes thymiques sont en général de phénotype CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>+</sup>, phénotype très semblable à celui observé dans le thymus de souris exprimant une forme constitutivement active du récepteur Notch1 (cf chapitre précédent). L'analyse des cellules tumorales dans les souris Ik  $DN^{+/-}$  révèle une perte de l'allèle normal, suggérant un rôle direct d'Ikaros dans le processus de transformation des cellules. Ce rôle majeur d'Ikaros comme gène suppresseur de tumeurs pour les lymphomes thymiques est renforcé par l'observation de pertes d'hétérozygocité fréquentes dans les lymphomes induits par irradiation (Okano *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 2000) ou par l'action d'un agent mutagène chimique (Karlsson *et al.*, 2002). Des dérégulations

de l'expression du gène Ikaros sont également associées au développement de leucémies aiguës lymphoblastiques B et T (LAL-B/T) chez l'homme. En effet, pour 70 cas de LAL-B ou T pédiatriques étudiés, le groupe de F. Uckun a détecté la présence systématique de formes protéiques dominantes négatives d'Ikaros, localisées principalement dans le cytoplasme (Sun *et al.*, 1999, a, b, c). Cependant, d'autres études n'ont pas retrouvé cette fréquence élévée de formes protéiques anormales d'Ikaros, mais semblent néanmoins s'accorder sur la présence de formes dominantes négatives chez environ 15 à 30% des patients étudiés (Nakase *et al.*, 2000; Takanashi *et al.*, 2002; Nishii *et al.*, 2002). Bien que des différences existent entre ces différentes études, des altérations sont donc également présentes dans les tumeurs lymphoïdes humaines. L'ensemble des données obtenues chez l'homme et la souris suggère fortement qu'Ikaros est un gène suppresseur de tumeurs important, impliqué dans le développement de lymphomes.

Les mécanismes moléculaires qui conduisent au développement de lymphomes, lorsque l'expression de la protéine Ikaros est altérée, demeurent encore inconnus. Cependant, les études conduites à l'aide des souris Ik<sup>-/-</sup> et Ik DN<sup>+/-</sup> permettent d'avancer certaines hypothèses. En effet, les cellules Ik<sup>-/-</sup> et Ik DN<sup>+/-</sup> présentent une réponse hyperproliférative suite à une stimulation par leur TCR. Il a donc été proposé que cette hyperprolifération constitue une première étape vers la transformation des cellules normales en cellules tumorales. De façon intéressante, il a été montré que des cellules T Ik DN<sup>+/-</sup>xRAG1<sup>-/-</sup> ne développent pas de lymphomes. Cependant, l'introduction d'un TCR transgénique restreint au CMH I conduit à la transformation des cellules (Winandy et al., 1999). Ces résultats suggèrent donc que l'expression d'un pré-TCR ou d'un TCR fonctionnel est nécessaire pour l'acquisition du phénotype tumoral. D'autre part, une fonction probable d'Ikaros consiste à recruter ses gènes cibles au niveau de l'HC-PC, via une interaction avec le complexe NURD. Une réduction de l'activité des protéines Ikaros pourrait entraîner un défaut de recrutement des HDAC au niveau de l'HC-PC, ce qui conduirait à l'apparition d'aberrations chromosomiques. En accord avec cette hypothèse, de telles aberrations sont observées dans des cellules T activées de souris mutantes pour Ikaros (Avitahl et al., 1999). Des effets secondaires à cette propagation anormale du matériel génétique pourraient alors contribuer au développement rapide des lymphomes T chez les souris mutantes pour le gène Ikaros.

Une étude récente (Beverly *et al.*, 2003) a mis en évidence un rôle pour Ikaros dans le développement de lymphomes T chez des souris transgéniques exprimant une forme constitutive de Notch1. En utilisant une méthode de mutagenèse par insertion rétrovirale, les auteurs ont pu identifier le locus Ikaros comme étant un site privilégié d'insertion du virus. Cet événement conduit

à la production de formes protéiques dominantes négatives d'Ikaros et à l'accélération du développement tumoral. De plus, les auteurs ont montré qu'Ikaros pouvait inhiber la transcription Notch-dépendante lors d'expériences de transfections transitoires. Cette étude révèle donc une possible convergence fonctionnelle entre Notch et Ikaros dans le processus de transformation des cellules T.

Des mutations nulle ou dominante négative pour Ikaros montrent une absence de cellules myéloïdes matures Gr-1<sup>+</sup>Mac-1<sup>+</sup> dans la MO. D'autre part, une diminution du niveau d'expression du marqueur de différenciation Gr-1 est observée dans les cellules de MO des souris Ik<sup>L/L</sup> et Ik DN. Ces observations suggèrent un défaut au cours de la différenciation des neutrophiles en absence d'Ikaros. J'ai donc entrepris d'étudier la fonction d'Ikaros au cours de la différenciation des neutrophiles.

#### Expression d'Ikaros dans les cellules myéloïdes.

Dans les cellules myéloïdes issues de MO de souris de type sauvage, j'ai montré que le niveau d'expression d'Ikaros est plus élevé dans les cellules immatures de phénotype Gr-1<sup>h</sup>Mac-1<sup>+</sup> (myélocytes, métamyélocytes) que dans les cellules matures de phénotype Gr-1<sup>+</sup>Mac-1<sup>+</sup> (neutrophiles). Ces données montrent donc une régulation de l'expression d'Ikaros au cours de la différenciation des neutrophiles et suggèrent un rôle prépondérant au cours des stades de maturation immatures.

# Populations myéloïdes affectées dans les souris Ik<sup>L/L</sup>.

La mutation Ik<sup>L/L</sup> affecte de façon significative les populations myéloïdes tant au niveau des organes hématopoïétiques fœtaux qu'adultes. En effet, j'ai pu observer une augmentation importante du nombre de cellules Gr-1<sup>+</sup>Mac-1<sup>+</sup> dans le foie fœtal de souris mutantes par rapport au foie fœtal de souris de type sauvage. Cette augmentation est probablement due à une augmentation du nombre de précurseurs myéloïdes dans cet organe, puisque des essais clonogéniques *in vitro* ont permis de montrer la présence d'un nombre plus grand de précurseurs myéloïdes dans le foie fœtal des mutants. Une augmentation de la proportion de cellules myéloïdes est également observée dans la moelle osseuse et la rate des souris adultes. Paradoxalement, le nombre de neutrophiles sanguins est réduit, montrant que les neutrophiles mutants sont incapables d'adopter une localisation géographique correcte.

# Croissance et différenciation des neutrophiles Ik<sup>L/L</sup>.

Les colonies granulocytaires formées en milieu semi-solide en présence de G-CSF et de SCF sont très clairement différentes du point de vue de leur morphologie. Contrairement aux colonies contrôles formées d'un petit nombre de gros "clusters" cellulaires, les colonies mutantes sont formées d'un nombre élevé de petits amas cellulaires. De plus, la différenciation des cellules mutantes semble également ralentie comme le montre l'analyse par cytométrie en flux avec les marqueurs Gr-1 et Mac-1 dont l'expression augmente avec la différenciation. Un phénotype similaire de différenciation anormale a pu être mis en évidence *in vivo*, après traitement des souris par le G-CSF. Ces données montrent qu'Ikaros régule la différenciation des neutrophiles.

# Fonction normale des neutrophiles matures.

J'ai par ailleurs analysé plusieurs types de fonctions des neutrophiles matures: migration vers un site de stimulation inflammatoire; migration à travers une membrane poreuse en réponse à l'IL8; phagocytose de bactéries; "burst oxydatif" après phagocytose. Ces diverses analyses n'ont pas montré d'anomalies chez les neutrophiles mutants.

En conclusion, l'ensemble de mes résultats montre qu'Ikaros joue un rôle dans le contrôle de la différenciation des neutrophiles, mais pas dans le contrôle des fonctions effectrices des neutrophiles matures. Ces résultats présentent un rôle important d'Ikaros dans une lignée hématopoïétique non lymphoïde. Ikaros est un régulateur important de la différenciation des lymphocytes T et un candidat comme gène suppresseur de tumeurs pour ces cellules. Mon hypothèse est qu'une réduction de l'activité d'Ikaros rend les thymocytes succeptibles au développement tumoral. Pour élucider les bases moléculaires de cette fonction de suppresseur de tumeur, j'ai entrepris d'étudier les changements d'expression génique consécutifs à l'inactivation d'Ikaros dans les thymocytes prétumoraux, et également dans des tumeurs établies. J'ai choisi de mener cette étude en utilisant la technologie des microarrays, qui permet une analyse à grande échelle du transcriptome.

## I- Développement d'une puce cDNA dédiée à l'analyse des lymphocytes T.

Au cours de ma première année de thèse, j'ai participé, en collaboration avec la plate-forme "DNA Chips" et d'autres équipes de l'institut, au développement d'une puce à ADN contenant 5000 cDNA murins (puce 5k). Ces cDNA regroupent des gènes importants pour la biologie du développement des cellules neuronales et environ 1500 gènes importants pour la biologie des lymphocytes T: oncogènes; suppresseurs de tumeurs; gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose; la transduction du signal; gènes codant pour des cytokines et leurs récepteurs. J'ai pu choisir, à l'aide de différents outils bioinformatiques (bases de données, alignement de séquences...), des clones EST (clones IMAGE), représentant chacun des 1500 gènes. Des produits PCR ont été ensuite générés à partir de ces clones, quantifiés puis déposés sur lame de verre. Ces étapes de préparation en masse des produits PCR et leur contrôle qualité, ont nécessité de nombreuses mises au point qui ont beaucoup retardé la disponibilité de la puce. Ainsi, le retard important pris pour la fabrication de cette puce nous a conduit à utiliser le système Affymetrix, qui nous a permis de mettre en évidence plusieurs propriétés intéressantes du transcriptome des thymocytes mutants (voir plus bas). La puce 5k, dans laquelle j'ai investi un travail important, n'a donc pas été utilisée pour le projet initialement prévu. Néanmoins, cette puce constitue un outil de qualité qui sera utilisée pour d'autres applications dans le laboratoire.

# II- Analyse du transcriptome de thymocytes Ik<sup>L/L</sup> pré-tumoraux.

Dans le but d'élucider les mécanismes moléculaires pouvant être impliqués dans l'initiation du processus tumoral, j'ai analysé le profil d'expression génique de populations totales de thymocytes de 4 souris contrôles et de 6 souris Ik<sup>L/L</sup>. Le stade étudié, 3 semaines, correspond à un

stade où les thymocytes mutants ont un phénotype d'apparence normale, bien que l'on puisse noter une réduction de la population DP et une augmentation des populations CD4 et CD8 SP (Figure 20C). Cependant, le stade 3 semaines précède largement l'émergence de clones de cellules tumorales. J'ai utilisé les puces à oligonucléotides Affymetrix Mu11kB qui permettent d'analyser l'expression d'environ 6500 gènes. Les gènes différentiellement exprimés entre les échantillons contrôles et Ik<sup>L/L</sup> ont été sélectionnés par les critères suivant!: AD (AD="Average Difference", intensité du signal pour chaque gène)  $\geq$  200, (permet d'éliminer les gènes dont le niveau d'expression est semblable à celui du bruit de fond de la puce)!; ratio Ik<sup>L/L</sup>/contrôle > 1,7!ou < 0,58; sélection par le t-test de Student ( $p \le 0.05$ ). Cette analyse permet d'identifier environ 20 gènes (Table 1). On pourra noter que l'amplitude des variations entre échantillons contrôles et Ik<sup>L/L</sup> n'est pas très importante (de 0,27 à 2,5). L'utilisation de la méthode de classification hiérarchique (Eisen et al., 1998) avec la liste des 20 gènes sélectionnés permet de regrouper les échantillons contrôles dans un groupe et les échantillons Ik<sup>L/L</sup> dans un second groupe (Figure 17A). Pour tester la fiabilité de ces résultats, j'ai procédé au même type de sélection (AD  $\ge$  200!, ratio Ik<sup>L/L</sup> /contrôle > 1,7 ou< 0,58!; sélection par le t-test de Student ( $p \le 0.05$ )), mais en excluant de façon aléatoire 2 échantillons Ik<sup>L/L</sup> (1 groupe de 4 contrôles et 1 groupe de 4 Ik<sup>L/L</sup>). J'ai ensuite utilisé la méthode de classification hiérarchique, pour laquelle j'ai employé les gènes sélectionnés, mais avec les 10 échantillons. Ceci permet le regroupement correct des 4 échantillons contrôles et des 6 échantillons Ik<sup>L/L</sup> (4+2) dans deux groupes distincts (Figure 17B). Plusieurs analyses de ce type ont été réalisées et des résultats similaires ont été obtenus, quelque soit les échantillons mutants omis. Ces observations suggèrent que les thymocytes Ik<sup>L/L</sup> non-tumoraux possèdent une signature transcriptionnelle suffisamment robuste pour prédire le génotype de populations totales de thymocytes provenant de souris Ik<sup>L/L</sup> âgées de 3 semaines. Pour évaluer la part de bruit dans cette analyse, j'ai effectué des comparaisons en mélangeant les échantillons contrôles et Ik<sup>L/L</sup>. Ceci m'a permis d'évaluer qu'environ 50% des gènes différentiellement exprimés provenaient du bruit de fond de l'expérience.





В



**Figure 17!:Signature transcriptionnelle des thymocytes Ik<sup>L/L</sup> non- tumoraux.** (A) Classification hiérarchique des 4 échantillons contrôles et des 6 échantillons Ik<sup>L/L</sup>. (B) Les échantillons 56 et 68 (omis de l'analyse) sont regroupés avec les échantillons Ik<sup>L/L</sup>.

ref.	Nom de la sonde	Ratio Ik <sup>L/L</sup> /contrôle
w20721_s_at	clone 336668	2,5
x81627_s_at	24p3 gene.	2,4
X67469_s_at	AM2 receptor.	2,4
w12941_s_at	clone 317869 5 similar to INTERFERON-INDUCIBLE PROTEIN 1-8U	2,3
Msa.2385.0_f_at	insulin like growth factor binding protein 4	2,2
Msa.2981.0_s_at	intracellular calcium-binding protein (MRP8)	2,1
Msa.17338.0_s_at	CLEAVAGE STIMULATION FACTOR, 50 KD SUBUNIT	2,0
w48135_s_at	clone 355336 similar toCYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VIB	2,0
Msa.2704.0_at	substance K receptor	2,0
Msa.2889.0_s_at	PNG protein	2,0
X62940_s_at	TSC-22 mRNA.	1,8
Msa.24305.0_f_at	INTERFERON-INDUCIBLE PROTEIN 1-8D.	1,8
Msa.5712.0_s_at	B-MYC TRANSFORMING PROTEIN	1,8
X67914_s_at	PD-1 mRNA.	1,8
x94353_s_at	cathelin-like protein.	1,8
Msa.16075.0_s_at	CREATINE KINASE, B CHAIN	1,7
Msa.21649.0_s_at	CALTRACTIN (CENTRIN)	0,55
Msa.206.0_s_at	alpha 1 type XVIII collagen (COL18A1)	0,52
Msa.5864.0_f_at	TUBULIN BETA CHAIN (FRAGMENT).	0,5
Msa.3176.0_s_at	procathepsin E	0,4
Msa.26238.0 s at	TUBULIN BETA-3 CHAIN.	0,27

Table 1!: Liste des gènes différentiellement exprimés dans les thymocytes Ik<sup>L/L</sup> non-tumoraux.

III- L'activation de la voie de signalisation Notch constitue un événement précoce dans le développement de lymphomes T chez des souris déficientes pour le gène Ikaros.

# $III_1$ - Le développement de lymphomes thymiques chez les souris $Ik^{L/L}$ nécessite un environnement thymique.

Toutes les souris Ik<sup>L/L</sup> développent des lymphomes thymiques, et succombent à ces lymphomes entre l'âge de 3 et 6 mois. Dans certains cas, les tumeurs restent confinées au thymus, et tuent la souris par étouffement, le thymus occupant la totalité du volume de la cage thoracique (Figure 18A). Dans d'autres cas, les animaux développent des métastases dans d'autres organes comme la rate, les ganglions lymphatiques ou encore les reins (Table 2). Pour la majorité des animaux étudiés, les tumeurs sont composées de populations de cellules de phénotype CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>+</sup> (Table 2, Figure 18B), bien que des tumeurs de phénotype CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>lo</sup> aient été également observées (Table 2). Dans l'ensemble, le phénotype des tumeurs Ik<sup>L/L</sup> est très similaire à celui décrit pour les tumeurs développées par les souris Ik DN<sup>+/-</sup> et Ik<sup>plste</sup> (Winandy *et al.*, 1995!; Papathanasiou *et al.*, 2003).

		Phénotype des tumeurs					
	âge (sem)	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>lo</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	niveau d'expression chaîne du TCR détectée de CD3		métastases
T 68	32	+			int	V <sub>β</sub> 8 (36.6%)	ra
T 44	13	+	+		int	aucune	0
T 36	14	+	+		int	$V_{\beta}8~(89\%)$	0
T 76	16	+			int	aucune	0
Т 29	28	+	+		faible	ND	ra, gl, f, re
T 64	20	+	+		int	ND	0
Т 33	14		+		haut	ND	0
T 78	25	+	+		int	ND	0
T 140	5 27	+	+		int	$V_{\beta}10 \ (82\%)$	ra, f
Т 126	5 27			+	int	$V_{\beta}8~(80\%)$	0
Т 90	30	+			int	aucune	0
T 21	23		+		int/haut	aucune	0
T 77	30	+	+		int	V <sub>β</sub> 5 (42.7%)	ra, gl
T 22	18	+	+		faible/int	$V_{\alpha} 8 (85\%)$	0
T 161	27			+	haut	V <sub>β</sub> 8 (74%)	ra, gl, f
T 163	3 21	+	+		faible	$V_{\beta}11 (11,5\%), V_{\beta}2 (12.55\%), V_{\beta}8 (12.25\%)$	ra, f

Table 2!: Phénotype de tumeurs Ik<sup>L/L</sup>.

Les chiffres entre parenthèses indiquent le pourcentage de cellules tumorales exprimant la chaîne  $V_{\beta}$  détectée. ral: ratel; gl!: ganglions lymphatiques!; fl: foiel; rel: rein!; ND!: non déterminé!; + phénotype observé.

Α

В

Figure 18!: Phénotype des tumeurs  $Ik^{L/L}$ . (A) Photographies de la cage thoracique de souris contrôle ( $Ik^{+/+}$ ), de souris







Afin de déterminer si les cellules T périphériques, sont enclines au développement de tumeur dans les souris Ik<sup>L/L</sup>, nous avons procédé à la thymectomie d'un groupe de 10 souris Ik<sup>L/L</sup>, âgées de 5 semaines (expériences réalisées par P. Kirstetter). Sur une période de 1 an, aucune souris Ik<sup>L/L</sup>

thymectomisée n'a développé de tumeurs, tandis que toutes les souris Ik<sup>L/L</sup> non-thymectomisées sont mortes au cours des 8 premiers mois suivant la thymectomie (Figure 19A). Un an après l'ablation du thymus, les souris Ik<sup>L/L</sup> thymectomisées maintiennent cependant une population importante de cellules T périphériques (Figure 19B). Cette observation indique que les cellules T périphériques Ik<sup>L/L</sup> ne sont pas sujettes au développement de tumeurs, et que les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> sont peut-être originaires d'un stade de différenciation immature des cellules T et/ou que leur formation nécessite un environnement thymique. La prolifération des cellules T périphériques a été visualisée par la dilution successive d'un marqueur fluorescent (CFSE) avec lequel les cellules ont été préalablement marquées. De façon intéressante, les cellules T périphériques Ik<sup>L/L</sup> prolifèrent plus en réponse à une stimulation avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 que des cellules T périphériques contrôles (Figure 19C). Il a été proposé que le développement des tumeurs Ik DN<sup>+/-</sup> soit dû au seuil d'activation réduit des thymocytes et des cellules T périphériques Ik DN<sup>+/-</sup>. Toutefois, nos résultats montrent que cette propriété seule n'est pas suffisante pour conduire à la transformation des cellules T périphériques.





**Figure 19: Analyse des souris Ik**<sup>L/L</sup> **thymectomisées.** (A) Les souris ont été thymectomisées à l'âge de 5 semaines. Le nombre de souris vivantes a été évalué tous les mois sur une période de 1 an. (B) Analyse par cytométrie en flux des populations de cellules T périphériques dans les souris Ik<sup>L/L</sup> thymectomisées. Les nombres représentent le pourcentage de chaque population. (C) Analyse de la prolifération des cellules T périphériques. Les cellules T ont été marquées avec le CFSE, stimulées *in vitro* avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, puis analysées après 3 jours par cytométrie en flux.

# III<sub>2</sub>- Les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> se développent-elles à partir d'un stade précoce de différenciation!?

Les cellules dérivées de tumeurs Ik<sup>L/L</sup> expriment un TCR $\alpha\beta$  (Figure 18B). Dans ces tumeurs, l'analyse du répertoire des chaînes  $\beta$  du TCR (avec différents anticorps dirigés contre différents segments V<sub> $\beta$ </sub>) montre que les cellules tumorales expriment une ou quelques chaînes V<sub> $\beta$ </sub> (Table 2). Cette observation suggère que les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> sont d'origine mono- ou oligoclonale.

Des cellules TCR<sup>-</sup> ne sont pas détectables dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. J'ai donc cherché à identifier des cellules tumorales immatures en analysant des tumeurs Ik<sup>L/L</sup> à un stade peu avancé de leur formation. Pour cela, j'ai analysé le phénotype de thymocytes de plusieurs (>10) souris Ik<sup>L/L</sup> âgées de 2 à 4 mois. Les thymus des souris Ik<sup>L/L</sup> sont souvent de taille comparable à celle des thymus de souris contrôles. Cependant, les 2 lobes du thymus d'une même souris diffèrent souvent par leur taille et aussi par leur profil CD4/CD8, biaisé vers le phénotype CD8<sup>+</sup> (Figure 20A). L'analyse du répertoire des chaînes  $\beta$  du TCR dans ces lobes montre l'usage de plusieurs chaînes V<sub> $\beta$ </sub>, voire l'usage d'une chaîne  $V_{\beta}$  unique (Table 3), suggérant que les tumeurs se développent à partir de populations mono- ou oligoclonales. De plus, la clonalité des populations de cellules T a été analysée par l'étude des réarrangements  $D_{\beta}2$ - $J_{\beta}2$  de la chaîne  $\beta$  du TCR dans ces cellules (Figure 20B). Sept réarrangements D<sub>b</sub>2-J<sub>b</sub>2 sont détectés dans les populations totales de thymocytes contrôles et Ik<sup>L/L</sup> non-tumoraux (Figure 20B). Ces résultats reflètent la nature polyclonale normale des populations de cellules T dans le thymus. Contrairement à ce qui est observé dans les populations de cellules T non-tumorales, l'analyse des réarrangements D<sub>6</sub>2-J<sub>6</sub>2 dans les populations de thymocytes d'un lobe du thymus de souris Ik<sup>L/L</sup> âgées de 2 à 4 mois révèle, soit un réarrangement  $D_{\beta}2$ - $J_{\beta}2$  unique (99L1, L2), soit le réarrangement prédominant de certains segments  $D_{\beta}2$ - $J_{\beta}2$ (104L1, L2!; 18L1). De façon intéressante, on notera que deux lobes d'un même thymus ne présentent pas forcément le même patron de réarrangement  $D_{\beta}2$ - $J_{\beta}2$ . Ceci indique que différents clones de cellules tumorales peuvent émerger indépendamment l'un de l'autre dans les deux lobes d'un même thymus. La bande observée à 1850 paires de bases correspond à la configuration native du gène de la chaîne  $\beta$  du TCR. La présence de cette bande dans certains échantillons Ik<sup>L/L</sup> suggère l'existence de populations de thymocytes n'ayant pas réarrangé le TCR<sup>β</sup>. Ces résultats suggèrent que la population de thymocytes d'un lobe est composée de populations mono- ou oligoclonales. Ces populations pourraient représenter un ou plusieurs clones de cellules tumorales à un stade précoce de leur développement. La figure 20A montre deux lobes pour lesquels une chaîne  $V_{\beta}$  unique est exprimée ( $V_{\beta}8$  et  $V_{\beta}13$ , respectivement).

Echantillon n°	Chaîne V <sub>β</sub> exprimée
62L1	$V_{\beta}2 (30\%); V_{\beta}8 (44\%)$
62L2	$V_{\beta}10 (15\%); V_{\beta}11 (11\%)$
64L1	$V_{\beta}4 (90\%); V_{\beta}11 (8\%)$
64L2	V <sub>β</sub> 5 (17%)
79L1	V <sub>B</sub> 13 (31%)
79L2	V <sub>B</sub> 5 (85%)
80L1	V <sub>B</sub> 8 (80%)
80L2	aucune

Table 3. L'expression des chaînes  $\beta$  du TCR dans les populations totales de thymocytes Ik<sup>L/L</sup> analysée par cytométrie en flux.

Pour chacun de ces deux lobes, la population  $CD4^{-h}CD8^+$  peut être divisée en deux populations contenant des cellules TCR<sup>-</sup> et TCR<sup>+</sup>!; les cellules TCR<sup>-</sup> étant enrichies en cellules  $CD8^{hi}$ et les cellules TCR<sup>+</sup> étant enrichies en cellules  $CD8^{int}$ . L'ensemble des cellules  $CD4^{-h}CD8^+$  sont de grande taille (selon le paramètre "forward scatter") et sont des cellules en prolifération (Figure 20A). À contrario, les cellules DP dans ces tumeurs en cours d'expansion sont de plus petite taille et prolifèrent moins que les cellules  $CD4^{-h}CD8^+$ . La détection de cellules DP qui ne prolifèrent pas et qui n'expriment qu'une chaîne  $V_{\beta}$  unique suggère que l'expansion de ces cellules s'est produite en amont du stade DP. L'ensemble de ces données suggère que les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> pourraient émerger d'une population de thymocytes à un stade immature de différenciation. Ces populations de cellules immatures gardent cependant quelques caractéristiques de cellules normales. En effet, elles sont capables de se différencier en cellules DP, stade auquel elles diminuent de taille et arrêtent de proliférer. L'expression d'un TCR au stade DP entraînerait alors la prolifération des cellules et leur maturation partielle vers le stade CD8<sup>+</sup>. Cette transition DP CD8<sup>+</sup> pourrait représenter une étape cruciale pour la transformation complète des cellules.



**Figure 20!:** Les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> sont originaires de populations de cellules immatures. (A) Les thymocytes de deux lobes thymiques de deux tumeurs Ik<sup>L/L</sup> en cours d'expansion sont marqués avec les anticorps anti-CD4, anti-CD8 et anti-TCRαβ, puis analysés par cytométrie en flux. Pour chaque lobe, 3 populations sont définies (CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>hi</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>int/+</sup>). Les histogrammes représentent les niveaux d'expression du TCRαβ, la taille relative des cellules (paramètre "forward scatter") et le contenu en ADN des cellules (7AAD). Pour l'analyse du cycle cellulaire, les nombres indiquent le pourcentage de cellules en phases S-G2/M. (B) Analyse des réarrangements D<sub>β</sub>2-J<sub>β</sub>2 par PCR sur de l'ADN génomique extrait de différents lobes thymiques de souris Ik<sup>L/L</sup> âgées de 15 semaines. Le produit de PCR à 1850 pb correspond à la configuration native du gène du TCRβ. (C) Les thymocytes contrôles et Ik<sup>L/L</sup> non-tumoraux sont marqués avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8. Les populations doubles négatives sont marquées avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8. Les populations doubles négatives sont marquées avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8. Les populations doubles négatives sont marquées avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8. Les populations doubles négatives sont marquées avec les anticorps anti-CD4.

L'analyse de souris Ik<sup>L/L</sup> non-tumorales révèle une augmentation de la population de cellules DN4 (Figure 20C). Ainsi, une augmentation du taux de prolifération, consécutive à la signalisation par le pré-TCR, pourrait entraîner une augmentation de la population de cellules immatures. C'est à partir de cette population de cellules immatures que pourraient émerger les clones de cellules tumorales.

# III<sub>3</sub>- La maturation des cellules DP en cellules CD8<sup>+</sup> est incomplète.

Les cellules DP positivement sélectionnées se différencient normalement en cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> SP. Cette étape de maturation est accompagnée par l'expression transitoire de CD69, l'augmentation de l'expression de CD5 et par la diminution de l'expression de CD24. L'analyse de l'expression des marqueurs CD69, CD5 et CD24 à la surface des thymocytes contrôles et Ik<sup>L/L</sup> non-tumoraux montre une régulation normale de ces différents marqueurs au cours de la transition DP CD8<sup>+</sup> (Figure 21). De façon intéressante, les thymocytes CD8<sup>+</sup> d'une tumeur Ik<sup>L/L</sup> en cours d'expansion ne régulent pas CD69, CD5 et CD24 de la même manière. En effet, on peut noter que l'expression de CD24 n'est pas diminuée sur ces cellules et que l'augmentation de l'expression de CD69 n'est pas aussi importante que pour les thymocytes CD8<sup>+</sup> contrôles. Ces données suggèrent que les thymocytes DP ont pu se différencier en cellules CD8<sup>+</sup>, mais que leur maturation est incomplète. D'autre part, l'augmentation du niveau d'expression de CD5 est moins importante sur les thymocytes issus de tumeurs en cours d'expansion, comparée aux thymocytes contrôles. Le niveau d'expression de CD5 à la surface des cellules T est relatif à l'intensité du signal transmis par le TCR. Il est donc possible que les thymocytes DP issus de tumeurs en cours d'expansion aient pu se différencier en cellules CD8 SP, bien que le signal reçu par leur TCR soit plus faible.

Les défauts de régulation des marqueurs CD69 et CD5 suggèrent que les cellules CD8 SP présentent dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> en cours d'expansion ont franchi cette étape de maturation sans avoir été positivement sélectionnées et/ou qu'elles présentent un seuil d'activation réduit en réponse à l'activation par leur TCR.



Figure 21 : La maturation des cellules CD8<sup>+</sup> est incomplète dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. Les populations totales de thymocytes sont marquées avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8. L'expression des marqueurs CD24, CD69 et CD5 est analysée pour les populations CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (histogrammes gris) et CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (histogrammes blancs).

# III<sub>4</sub>- Les thymocytes Ik<sup>L/L</sup> tumoraux ont une signature transcriptionnelle spécifique.

Dans le but d'élucider les mécanismes pouvant participer au développement tumoral, j'ai comparé les profils d'expression génique de cellules Ik<sup>L/L</sup> tumorales et de thymocytes non-tumoraux. Pour cette étude, dix échantillons d'ARN ont été utilisés!: 6 ARN de thymocytes dérivés de tumeurs thymiques, et 4 ARN provenant de populations totales de thymocytes contrôles et Ik<sup>L/L</sup>, de souris âgées de 3 semaines (2 contrôles et 2 Ik<sup>L/L</sup>). J'ai utilisé les puces à oligonucléotides Affymetrix MG-U74Av2 qui permettent de couvrir l'expression d'environ 12500 gènes. Pour évaluer les similarités dans les profils d'expression génique des différents échantillons, j'ai tout d'abord utilisé la méthode de classification hiérarchique non-supervisée, pour laquelle j'ai utilisé tous les gènes présentant des variations d'expression dans les 10 échantillons (3000 gènes) (pour la sélection des gènes, cf matériels et méthodes). Cette analyse a permis de révéler un groupe distinct de 5 tumeurs. Les échantillons contrôles et Ik<sup>L/L</sup> sont également rassemblés dans un groupe distinct, et ne peuvent être séparés les uns des autres. Un seul échantillon tumoral (T90), n'est cependant pas présent dans le groupe des 5 tumeurs et semble plutôt être apparenté aux échantillons non-tumoraux (figure 22A). Cette observation est peut-être relative au phénotype DP de cette tumeur!; en effet, les populations totales de thymocytes contrôles sont majoritairement constituées de cellules DP. De façon intéressante, certaines tumeurs arborent des profils transcriptionnels très semblables, la distance entre 2 tumeurs étant similaire à celle observée entre 2 échantillons contrôles ou Ik<sup>L/L</sup> (comparer par exemple les distances entre T21 et T77 à celles entre les 2 échantillons contrôles). Cette observation montre que la plupart des tumeurs arborent des programmes d'expression très similaires, et suggère que des mécanismes communs peuvent être impliqués dans leur développement. Bien que la tumeur T90 ait un comportement différent des 5 autres tumeurs, il est cependant possible d'isoler une liste assez importante de gènes différentiellement exprimés entre les 6 échantillons tumoraux et les 4 échantillons contrôles, suggérant que les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> présentent une signature transcriptionnelle distincte (Figure 22B). L'annexe I donne une liste de gènes présentant les plus grandes variations dans les tumeurs.

Parmi les gènes différentiellement exprimés dans les tumeurs, plusieurs d'entre eux pourraient avoir un rôle direct dans l'établissement du phénotype tumoral. Ainsi, le niveau d'expression de c-myc est augmenté. Le récepteur nucléaire orphelin RORγ, dont une perte de fonction est associée au développement de lymphomes thymiques, voit son expression décrue dans certaines tumeurs. L'expression du gène suppresseur de tumeur p19<sup>arf</sup> est également diminuée. Pbx3, codant pour un partenaire transcriptionnel des gènes Hox est augmenté. Si l'on considère que le gène Pbx1 est impliqué dans le développement de lymphomes thymiques chez la souris et que les gènes Hox sont fréquemment impliqués dans le développement de lymphomes, cette augmentation de l'expression de Pbx3 met en exergue un rôle potentiel des complexes Pbx/Hox dans le développement des tumeurs Ik<sup>L/L</sup>.

Les dérégulations les plus marquées concernent cependant plusieurs gènes de la voie de signalisation Notch. En effet, les récepteurs Notch1 et Notch3, ainsi que les gènes cibles de la voie Notch, Deltex1, Hes1, Ifi204 et pT $\alpha$  ont tous des niveaux d'expression augmentés dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> (Table 4). Cette surexpression a été indépendamment confirmée par RT-PCR, et a été observée dans d'autres tumeurs n'ayant pas servies à l'analyse du transcriptome (Figure 22C). L'activation de la voie de signalisation Notch est impliquée dans le développement de lymphomes des cellules T chez l'homme comme chez la souris. Cette observation suggère un rôle de la voie Notch dans la formation des tumeurs Ik<sup>L/L</sup>.

A











Figure 22!: Les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> signature ont une transcriptionnelle spécifique. (A) Classification hiérarchique non-supervisée des 4 échantillons contrôles et des 6 échantillons tumoraux. Noter 1e comportement marginal de la tumeur T90. (B) Signature transcriptionnelle spécifique des tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. 4 échantillons contrôles et 4 échantillons tumoraux sont représentés. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque cette analyse a été réalisée avec différentes combinaisons d'échantillons tumoraux (pour la sélection des gènes, cf matériels et méthodes). (C) Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes de la voie

Notch dans différentes tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. Les histogrammes représentent les niveaux relatifs d'expression (moyenne de chaque groupe d'échantillons) après quantification des produits PCR (cf matériels et méthodes).

NAME	17 WT	83 WT	57 KO	192 KO	21T	77T	90T	126T	146T	163T	Ratio T/cont
Z11886 Notch gene homolog 1	1801	1428	1787	1410	4474	5349	4103	5745	4528	7675	3,3
X74760 Notch gene homolog 3	551	516	330	518	576	1153	1786	1434	1178	1183	2,5
D16464 Hes1	169	197	243	199	619	841	848	857	944	877	4,1
U38252 Deltex1	247	594	244	321	3120	2888	3547	4742	4362	6591	12,0
U16958 pTα	508	667	772	466	946	1646	1596	1284	1472	2269	2,5
M31419 Ifi204	127	112	72	159	315	310	680	307	228	198	2,9

Table 4!: Niveaux d'expression des gènes de la voie Notch dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup>.

# III<sub>5</sub>- Dérégulation de la voie de signalisation Notch dans les thymocytes Ik<sup>L/L</sup>.

Pour déterminer si la dérégulation des gènes de la voie Notch pourrait être la cause, plutôt que la conséquence, du développement tumoral, j'ai analysé leurs expressions dans les populations DP et  $CD4^{lo}CD8^+$ , purifiées à partir de tumeurs  $Ik^{L/L}$  en cours d'expansion; ainsi que dans les populations DN, DP,  $CD4^+$  et  $CD8^+$ , isolées à partir de thymocytes contrôles et  $Ik^{L/L}$  non-tumoraux (Figure 23). Les gènes analysés sont Notch1, Notch3, Hes1, Deltex1, Ifi204, pT $\alpha$  ainsi que Cycline D1 et Meltrin $\beta$ , bien que l'expression du gène Cycline D1 ne soit pas altérée sur les puces MG-U74Av2 et que le gène Meltrin $\beta$  ne figure pas sur ces dernières.

a- Analyse des gènes Notch dans les populations DN, DP et SP contrôles et Ik<sup>L/L</sup>.

À l'exception de Notch1, tous les gènes analysés présentent une régulation dynamique au cours du développement thymique normal, caractérisée par des transitions abruptes entre états actifs et inactifs (Figure 23, col a-d). De plus, leur patron d'expression dans ces différentes sous-populations est distinct. Par exemple, Hes1 est fortement exprimé dans la population la plus immature DN, puis s'éteint lors des stades plus matures!; alors que le gène Meltrinβ n'est exprimé que dans les populations SP. Comme il a été précédemment reporté, Deltex1 est exprimé dans les populations DN et SP, mais est éteint dans les cellules DP. De façon intéressante, certaines de ces transitions sont moins nettes chez les mutants Ik<sup>L/L</sup> (Figure 23, col e-h.), avec des expressions résiduelles significatives dans des populations où les gènes sont normalement éteints ou très faiblement exprimés chez les souris contrôles. Ainsi, l'expression du gène Hes1 est clairement détectée dans la population DP et CD4 SP des mutants Ik<sup>L/L</sup>, et Deltex1 est exprimé dans la population DP par rapport aux souris contrôles. D'autres gènes, comme, la Meltrinβ, Notch3 ont cependant conservé un profil d'expression normal. Ces observations suggèrent qu'Ikaros pourrait être impliqué dans la régulation des transitions entre états actifs et inactifs pour certaines cibles de Notch lors de la différenciation des lymphocytes T. De plus, ces résultats laissent entendre qu'une

dérégulation de certains gènes de la voie Notch pourrait avoir lieu avant l'apparition du phénotype tumoral.

b- Analyse des gènes Notch dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> précoces.

L'analyse de l'expression des gènes de la voie Notch dans les populations DP et CD8 SP, issues de tumeurs Ik<sup>LL</sup> en cours d'expansion, révèle un profil d'expression très différent (Figure 23, col i-r). Certains gènes comme Deltex1, Hes1, Cycline D1, Notch3 et pT $\alpha$  sont très fortement exprimés dans toutes les sous-populations analysées. Bien que les sous-populations tumorales ne soient pas exactement équivalentes à leurs homologues contrôles, l'expression de certains gènes apparaît clairement ectopique. L'exemple le plus frappant est celui du gène Hes1, dont l'expression est normalement confinée au stade DN. La nature ectopique de l'expression est également probante dans la population DP pour les gènes Meltrin $\beta$ , Deltex1 ou Ifi204 (col i, 1), ainsi que dans la population CD8<sup>+</sup> pour les gènes pT $\alpha$  (col k, m) et Ifi204 (col k, m, o et r). Il est toutefois intéressant de noter que certains gènes sont régulés de façon quasi normale. C'est en effet le cas pour la Meltrin $\beta$  dans les cellules DP de la tumeur précoce 6L2 (col p), et pour Ifi204 dans la population CD8<sup>+</sup>CD3<sup>th</sup> de la tumeur précoce 11 (col k). Dans la tumeur 11, la Meltrin $\beta$  est plus faiblement exprimée dans les populations DP et CD8<sup>+</sup>CD3<sup>th</sup> que dans la population CD8<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, indiquant seulement une dérégulation partielle de ce gène. Ces observations suggèrent que certains gènes cibles de Notch sont plus susceptibles d'être dérégulés que d'autres.



**Figure 23!:** Dérégulation de l'expression des gènes de la voie Notch dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> en cours d'expansion. Les cellules ont été marquées avec les anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-CD3 et les différentes populations ont été purifiées par cytométrie en flux. Régions a, el: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>!; régions b, f :CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>!; régions i, l, n, pl: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>int</sup>!; régions c, gl: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>!; régions d, h, kl: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, régions j, m, o, ql: CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>int</sup>!; régions r!: CD4<sup>lo</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>lo</sup>. L'expression des gènes de la voie Notch a été analysée dans chaque population par RT-PCR. Les histogrammes gris représentent le niveau d'expression de CD3 sur les cellules DP de souris contrôles.

Pour déterminer si la dérégulation de l'expression des gènes Notch est spécifique aux lymphocytes T se différenciant dans le thymus, j'ai analysé leur expression dans les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> matures, purifiées à partir des ganglions lymphatiques inguinaux. La figure 24 ne montre pas de différence dans l'expression des gènes Notch entre cellules T matures Ik<sup>+/+</sup> et Ik<sup>L/L</sup>. Il a par ailleurs déjà été reporté que Notch3 et Hes1 ne sont normalement pas exprimés dans les cellules T périphériques (Bellavia *et al.*, 2002). Cette observation suggère que la dérégulation de l'expression des gènes Notch est intrinsèque aux lymphocytes au cours de leur maturation dans le thymus.



Figure 24!: Analyse de l'expression des gènes Notch dans les cellules T matures. Les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ont été purifiées par cytométrie en flux et l'expression des gènes Notch a été analysée par RT-PCR.

# IV- Etablissement de lignées cellulaires à partir de tumeurs Ik<sup>L/L</sup>.

Les souris Ik<sup>L/L</sup> développent des tumeurs entre l'âge de 3 et 6 mois. J'ai établi différentes lignées cellulaires à partir de ces tumeurs. Elles constituent un outil de grand intérêt pour étudier le rôle et la fonction d'Ikaros dans le maintien du phénotype tumoral.

#### IV<sub>1</sub>- Caractérisation des lignées cellulaires.

a- Phénotype des lignées cellulaires.

Les lignées cellulaires, appelées Tik64, 29, 153 et 68, sont dérivées de tumeurs Ik<sup>L/L</sup> primaires. Ces lignées poussent dans un milieu simple, sans apport extérieur de cytokines, reflétant la transformation complète de ces cellules. Le phénotype des 4 lignées cellulaires est représenté dans

la figure 25A. Les lignées sont composées de populations assez homogènes (selon le profil CD4/CD8), à l'exception de la lignée Tik29, composée de plusieurs populations différentes. Ces lignées expriment toutes un niveau intermédiaire (Tik64, 29, 153) ou élevé (Tik68) de TCR $\alpha\beta$ . D'autre part, les 4 lignées sont CD69<sup>+</sup>, suggérant qu'elles arborent un phénotype de cellules activées. Les cellules Tik peuvent être entretenues en culture pendant de longue période (Figure 25B). On notera toutefois que les lignées (Tik64, 29) ont un taux de prolifération plus important que les lignées Tik153 et 68.



Figure 25!: Phénotype des lignées cellulaires Tik. (A) Les lignées cellulaires ont été marquées avec les anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-CD69 et anti-TCR $\alpha\beta$ , puis analysées par cytométrie en flux. Les niveaux d'expression de CD69 et du TCR $\alpha\beta$ sont représentés pour des populations totales de thymocytes contrôles (histogramme gris) et pour les cellules Tik (histogramme blanc). (B) La croissance des cellules *in vitro* a été évaluée par comptage des cellules sur une période de 9 jours.

b- Expression d'Ikaros et des gènes Notch dans les lignées Tik.

Le développement de lymphomes dans les modèles animaux portant des mutations pour le gène Ikaros est souvent associé à l'apparition de formes dominantes négatives de la protéine Ikaros. J'ai donc analysé par RT-PCR l'expression d'Ikaros dans les lignées cellulaires Tik. Les isoformes Ik1 et Ik2 sont majoritairement exprimées dans les thymocytes totaux contrôles et Ik<sup>L/L</sup> (Figure 26A). On notera cependant l'expression plus faible de transcrits de taille réduite dans les thymocytes Ik<sup>L/L</sup>. Ces isoformes Ik1\* et Ik2\* sont produits par épissage alternatif des ARN prémessagers omettant l'expression des isoformes d'Ikaros dans les lignées cellulaires montre que

ces lignées expriment principalement Ik1\* et Ik2\* à un niveau plus élevé que dans les thymocytes contrôles. Il a par ailleurs déjà été observé que l'expression de Ikaros augmente suite à l'activation des cellules T (Brown *et al.*, 1999). Ceci renforce l'idée que les lignées cellulaires ont un phénotype de cellules activées. Cette augmentation de l'expression d'Ikaros a également été observée par un marquage immunofluorescence avec un anticorps polyclonal spécifique anti-Ikaros (Figure 26B). Le niveau d'expression des gènes de la voie Notch (Notch1, 3; Deltex1, Hes1, Ifi204) est augmenté dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. J'ai donc analysé l'expression des gènes Notch dans les lignées cellulaires. Comme le montre la figure 26C, toutes les lignées Tik expriment les récepteurs Notch1 et 3, ainsi que les gènes cibles Deltex1, Hes1, Ifi204 à des niveaux plus élevés que dans les thymocytes contrôles. Il a été montré que l'activation de la voie Notch est nécessaire pour la prolifération de lignées cellulaires issues de lymphomes T exprimant NCI1. Il est alors probable qu'un haut niveau d'expression des gènes Notch dans les lignées cellulaires Tik participe au maintien du phénotype tumoral.



**Figure 26!: Expression d'Ikaros et des gènes Notch dans les lignées cellulaires Tik.** (A) Analyse par RT-PCR de l'expression des différentes isoformes de Ikaros dans des thymocytes totaux contrôles,  $Ik^{L/L}$  et dans les 4 lignées cellulaires Tik. (B) Les thymocytes totaux de souris contrôles ou  $Ik^{L/L}$  et les cellules des lignées Tik64 et Tik29 sont marqués avec un anticorps anti-Ikaros (rouge). L'ADN du noyau des cellules est marqué au Hoechst (bleu). (C) Analyse par RT-PCR de plusieurs gènes de la voie Notch dans les 4 lignées cellulaires Tik.

#### V- Fonction d'Ikaros dans les lignées cellulaires Tik.

#### V<sub>1</sub>- Ikaros module l'expression des gènes Notch in vitro.

Pour déterminer si Ikaros exerce une influence directe sur l'expression des gènes cibles de Notch, l'expression de ces gènes a été analysée après sur-expression d'Ikaros dans les lignées cellulaires Tik. Les lignées ont été transduites avec un vecteur rétroviral permettant d'exprimer un messager bicistronique codant à la fois pour Ik1 ou Ik1\*, et la GFP (qui permet de visualiser les cellules exprimant le génome rétroviral), ou avec un vecteur contrôle MigR, ne codant que pour la GFP (Figure 27A). Dans ces expériences, les cellules infectées peuvent être facilement distinguées des cellules non-infectées grâce à l'expression de la GFP. Les cellules GFP<sup>-</sup> et GFP<sup>+</sup> ont été purifiées 48h après l'infection avec l'un des 3 virus (MigR, Ik1 et Ik1\*), et l'expression des gènes de la voie Notch a été analysée dans ces populations (Figure 27B). De façon très frappante, l'expression d'Ik1 ou Ik1\* dans les lignées cellulaires conduit à une diminution importante de l'expression des gènes cibles de Notch (pT $\alpha$ , Meltrin $\beta$ , Cycline D1, Hes1, Ifi2O4), ainsi qu'à celle, plus modeste, des gènes Notch1, Notch3 et Deltex1. Ces observations suggèrent qu'Ikaros peut directement réprimer l'expression de gènes cibles de la voie Notch.



**Figure 27!: Régulation de l'expression des gènes de la voie Notch par Ikaros.** (A) Représentation schématique des vecteurs rétroviraux utilisés. LTR!: Long Terminal Repeat!; IRES!:Internal Ribosomal Entry Site!; GFP!: Green Fluorescent Protein. (B) Les cellules infectées avec les différents vecteurs rétroviraux ont été purifiées par cytométrie en flux, selon le niveau d'expression de GFP. Pour Ik1 et Ik1\*, les cellules exprimant fortement la GFP ont été purifiées (histogrammes à gauche). L'expression des gènes de la voie Notch a été analysée par RT-PCR dans les différentes populations purifiées. Le graphe à droite représente la quantification des produits de RT-PCR (pour la quantification, cf matériels et méthodes).

Une possible convergence fonctionnelle entre Ikaros et Notch a récemment été proposée par Beverly et Capobianco (2003), qui ont remarqué des similarités dans la séquence des sites de liaison à l'ADN d'Ikaros et de CSL. Ces auteurs ont d'ailleurs montré que CSL peut se lier à plusieurs séquences cibles d'Ikaros, et réciproquement, qu'Ikaros peut se lier à certaines séquences cibles de CSL. Ces auteurs ont donc proposé une interaction entre Notch et Ikaros, interaction au cours de laquelle le complexe Notch/CSL pourrait empêcher la répression par Ikaros de ses gènes cibles.

Ces résultats suggèrent que la régulation de l'expression des gènes cibles de Notch par Ikaros observée dans les souris Ik<sup>L/L</sup>, pourrait s'opèrer par un mécanisme de compétition directe entre Ikaros et Notch au niveau des séquences régulatrices des gènes cibles de la voie Notch. Il est toutefois surprenant de noter que Beverly et Capobianco (2003) n'aient pas observé de liaison d'Ikaros avec les séquences des gènes Hes1 et pTa, remettant alors en question la validité d'un modèle de compétition entre Ikaros et CSL au niveau des séquences cibles de Notch. J'ai cependant remarqué que la séquence régulatrice du gène Hes1 utilisée par ces auteurs n'était pas complète, puisqu'elle ne contenait que le motif le plus en 5' des deux motifs TGGGAA présents dans cette région du promoteur du gène Hes1 (Figure 28A). Ces deux motifs sont impliqués dans la régulation de l'expression de Hes1 par Notch (Jarriault et al., 1995). J'ai donc ré-analysé par retardation électrophorétique, la liaison d'Ikaros aux séquences régulatrices de Hes1 en utilisant un site complet du promoteur de Hes1. De plus, j'ai utilisé trois sites mutés pour lesquels des mutations ont été introduites dans chaque motif (Figure 28A). Ces expériences montrent qu'Ik1 et Ik1\* peuvent efficacement se lier au site Hes1 intact, mais également au site où le motif le plus en 5' (A) est muté. La liaison d'Ik1 ou Ik1\* est abrogée lorsque le site en 3'(B), ou les deux 2 sites (A et B) sont mutés. J'ai également testé la liaison d'Ikaros sur les séquences régulatrices du gène pTa. Pour cela, j'ai utilisé un site contenant un motif TGGGAA, qui a été caractérisé comme étant impliqué dans la régulation de pTa par Notch (Reizis et Leder, 2002). Contrairement à ce que j'ai pu observé pour Hes1, ni Ik1, ni Ik1\* ne se fixent au site pTa (Figure 28B), résultats en accord avec ceux de Beverly (2003). Ces donnéess suggèrent qu'Ikaros peut réguler de façon directe ou indirecte l'expression de gènes cibles de la voie Notch.



**Figure 28!: Analyse par retardation électrophorétique de la liaison d'Ikaros au site de fixation de CSL.** (A) Fixation d'Ikaros au promoteur de Hes1. Deux sites de liaison A et B sont représentés. AmB!: site A muté!; ABm!: site B muté!; AmBm!: sites A et B mutés. Les flèches indiquent différents complexes Ikaros. (B) Fixation de Ikaros au promoteur de pTα. Un site de liaison est représenté. IkBS4 correspond à un site de fixation optimal pour Ikaros (Molnar et Georgopoulos, 1994). Les sites de liaison sont représentés en caractères gras. Les nucléotides mutés sont en italiques.

# V<sub>2</sub>- Ikaros induit l'expression de CD8 dans les lignées Tik.

Il a été montré qu'Ikaros peut avoir une fonction d'activateur de la transcription pour le gène CD8 $\alpha$  (Harker *et al.*, 2002). J'ai donc analysé par cytométrie en flux l'expression de CD8 $\alpha$  dans les lignées cellulaires réexprimant Ikaros. De façon très intéressante, on peut observer une augmentation de l'expression de CD8 $\alpha$  par les cellules GFP<sup>+</sup>, c'est à dire les cellules qui expriment Ik1 ou Ik1\* (Figure 29). Ces résultats concordent avec ce qui avait été précédemment décrit, et confirme qu'Ikaros est un activateur du gène CD8 $\alpha$ . On peut également noter que les cellules exprimant Ik1 ou Ik1\* ou Ik1\* commencent à réguler positivement l'expression de CD4!; peut-être est-ce une conséquence de la diminution de l'expression du gène Hes1 dans ces cellules (Hes1 étant un régulateur négatif de CD4 (Kim et Siu, 1998)).


**Figure 29!: Induction de l'expression de CD8α par Ikaros.** Les cellules de la lignée Tik64 ont été infectées avec les différents virus, puis les profils CD4/CD8 des populations GFP<sup>-</sup> et GFP<sup>+</sup> ont été analysés par cytométrie en flux. Les nombres représentent le pourcentage de cellules dans chaque cadran.

#### V<sub>3</sub>- Ikaros réduit la prolifération des cellules tumorales *in vitro*.

L'infection des cellules Tik avec un virus exprimant Ik1 ou Ik1\* conduit à une diminution progressive de la proportion de cellules GFP<sup>+</sup> sur une période de 4 jours après l'infection (Figure 30A). Ce phénotype a été observé avec les 4 lignées cellulaires. De plus les cellules GFP<sup>+</sup> qui subsistent expriment la GFP à un niveau plus faible, montrant la perte sélective des cellules exprimant les niveaux d'Ikaros et de GFP les plus élevés. L'expression d'Ik1 ou Ik1\* réduit ainsi l'amplification des cellules tumorales *in vitro*.



Figure 30 : Réduction de la prolifération des cellules Tik en culture. (A) Les cellules de la lignée Tik29 ont été infectées avec les vecteurs MigR, Ik1 et Ik1\*. Le niveau d'expression de la GFP dans les cultures a été analysé par cytométrie en flux de 48h à 120h après l'infection. Les nombres indiquent les pourcentages de cellules GFP et GFP<sup>+</sup> présentes à chaque point dans les cultures. (B) Analyse de la quantité de phosphatidylsérines présente à la surface des cellules GFP-(histogrammes gris) et GFP<sup>+</sup>

(histogrammes blancs) 72h après l'infection. (C) Analyse du cycle cellulaire (7AAD) et de la taille des cellules (paramètre FS "forward scatter") 72h après l'infection. Les cellules ont été purifiées selon le niveau d'expression de la GFP (Figure 27B). Les nombres indiquent les pourcentages de cellules en phase G0 (rectangle bas, gauche), G1 (rectangle haut, gauche) et G2/M (rectangle droite). Des résultats similaires sont obtenus avec les autres lignées.

La perte progressive des cellules exprimant Ik1 ou Ik1\* peut provenir soit d'une augmentation de la mort cellulaire, soit d'une diminution de la prolifération de ces cellules. Le taux de mort cellulaire peut être analysé en mesurant la quantité de phosphatidylsérines (PS) présente à la surface des cellules. J'ai donc marqué les cellules infectées avec l'annexineV (qui reconnaît les PS). Cette analyse ne montre aucune différence entre les cellules GFP<sup>+</sup> et GFP<sup>-</sup> (Figure 30B). Il semble peu probable que la perte des cellules GFP<sup>+</sup> soit dûe à une augmentation de l'apoptose de ces cellules. Par ailleurs, l'analyse du contenu en ADN, (marquage 7AAD) et de la taille des cellules (selon le paramètre "forward scatter") montre une augmentation importante de la proportion de cellules de petite taille, dont le contenu en ADN est diploïde (Figure 30C). Ainsi, l'expression d'Ik1 ou Ik1\* crée un handicap sélectif, corrélé à une réduction de la taille d'une fraction importante des

cellules et un arrêt de la prolifération. Ces résultats sont confortés par des analyses dans lesquelles les cellules Tik ont été marquées 48h après l'infection avec le pkh26. Le pkh26 est un fluorochrome qui est dilué de façon linéaire au cours des divisions cellulaires, et qui permet de suivre la prolifération des cellules. Comme le montre la figure 31A, après une période de culture de 3 jours, le niveau de pkh26 diminue plus faiblement dans les cellules exprimant Ik1 ou Ik1\* que dans les cellules transduites avec le vecteur contrôle. La figure 31B montre également la croissance ralentie des cellules exprimant Ik1 (GFP<sup>+</sup>) ou Ik1\* (GFP<sup>+</sup>). L'ensemble de ces données suggèrent que l'expression d'Ikaros affecte l'amplification des cellules tumorales *in vitro* et que la réduction de l'expression d'Ikaros résultant de la mutation Ik<sup>L/L</sup> continue à jouer un rôle prépondérant pour maintenir la capacité de prolifération des cellules tumorales.



**Figure 31!: Diminution de l'amplification des cellules Tik** *in vitro*. (A) Les cellules de la lignée Tik29 ont été marquées avec le pkh26 48h après l'infection avec les différents vecteurs rétroviraux. Les divisions cellulaires ont été analysées sur une période de 3 jours. (B) Le nombre de cellules GFP<sup>-</sup> et GFP<sup>+</sup> a été établi par rapport au pourcentage de cellules GFP<sup>-</sup> et GFP<sup>+</sup> présent dans les cultures.

#### I- Anticorps et cytométrie en flux.

Les différentes populations de thymocytes analysées sont marquées avec les anticorps suivants: anti-CD8 $\alpha$ -FITC, anti-CD4-PE (Caltag), anti-CD69-FITC (Pharmingen), anti-CD5-FITC (Pharmingen), anti-CD3-Cy5 (Jackson Immunoresearch), anti-IgM-TxRd (Jackson Immunoresearch); anti-H57 (TCR $\alpha\beta$ ), anti-CD24-biotin, and streptavidin Cy5 (Jackson Immunoresearch), streptavidin PerCP (Pharmingen) ou anti-rat IgG-Cy5 (Jackson Immunoresearch). Le répertoire des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR est analysé avec différents anticorps anti-IgG (rat) ou anti-IgG (souris). Pour l'analyse du cycle cellulaire, les cellules sont marquées avec le 7AAD (Sigma) à une concentration finale de 10 $\mu$ l/ml. Les cellules sont fixées dans de l'éthanol 70% pendant 1 heure, lavées 2 fois dans du PBS puis incubées sur glace avec une solution de 7AAD contenant 25 $\mu$ g/ml de RnaseA pendant 30 min. Pour l'analyse de l'apoptose, les cellules sont marquées avec l'AnnexineV-FITC (Caltag). Les cellules marquées sont analysées sur un Epics Elite (Coulter) ou un FACSCalibur (Becton Dickinson BioSciences). Les tris cellulaires sont pratiqués sur un FACS Vantage SE option DiVa (Becton Dickison BioSciences). La pureté des tris est supérieure à 95%.

#### II- RT-PCR des gènes de la voie Notch.

Les ARN sont extraits avec le kit RNeasy de Qiagen, à partir de populations totales de thymocytes ou de sous-populations purifiées par cytométrie en flux (de  $250 \times 10^3$  à  $2 \times 10^6$  cellules). La réaction de transcription inverse est réalisée dans un volume final de 20 µl et  $1/20^e$  des produits de RT sont utilisés pour les PCR. Les PCR sont réalisées dans les conditions suivantes : 1 cycle de 5 min à 94°C, 25 cycles (Actine  $\beta$ ), 28 cycles (Notch1, Notch3), 30 cycles (pT $\alpha$ , c-myc), 35 cycles (Deltex1, Hes1, Ifi204, Meltrin $\beta$ , Cycline D1) ; composés de 1 min à 94°C, 1 min aux températures d'hybridation indiquées dans la table1, 1 min à 72°C. Les produits de PCR sont quantifiés avec un analyseur Typhoon 8600 (Amersham) et le logiciel ImageQuant (Amersham).

Table1 : amorces PCR utilisés.

			Τ°
	sens	antisens	d'hybridation
actine β	GTGACGAGGCCCAGAGCAAGAG	AGGGGCCGGACTCATCGTACTC	60
c-myc	CTCAGTGGTCTTTCCCTACCCG	TGTCCAACTTGGCCCTCTTGGC	60
Meltrinβ	AGTCCCAGGGATGCCAAGTGTGG	ATCACGGGACCCACACTCTTAGG	55
Ifi204	AGGCAACCAAAGTTAGTGTG	GTTCTCCCGACTGAGTCTGG	55
Notch1	CGGTGTGAGGGTGATGTCAATG	GAATGTCCGGGCCAGCGCCACC	60
Notch3	GACCACTTTGCAGATGGCCG	GCGAGATGATCCAGCAGCAG	65
Deltex1	CACTGGCCCTGTCCACCCAGCCTTGGCAGG	ATGCGAATTC GGGAAGGCGG GCAACTCAGG	55
Hes1	GCCTCTGAGCACAGAAAGTC	CCACTGGAAGGTGACACTGC	60
рТα	CACACTGCTGGTAGATGGAAGGC	GTCAGGAGCACATCGAGCAGAAG	60
Cycline D1	GCGTGCAGAAGGAGATTGTG	CCGGATAGAGTTGTCAGTGT	60
Ikaros	GGAATTCTTAGCTCAGGTGGTAACGATGCT	ATGAATTCGGAGGCACAAGTCTGTTGAT	55

#### III- Essai de retardation électrophorétique.

Les protéines Ik1 et Ik1\* ont été produites dans des cellules Cos-7. Les extraits nucléaires sont préparés en resuspendant  $10^7$  de cellules dans 500µl de tampon de lyse (10 mM HEPES, pH 7.9!; 1.5 mM MgCl2!; 10 mM KCl!; 0.5 mM dithiothreitol [DTT]) 10 min sur glace. Les noyaux sont récupérés par centrifugation et resuspendus dans 50µl du tampon suivant!: 20 mM HEPES, pH 7.9!; 25% glycerol!; 420 mM NaCl!; 1.5 mM MgCl2!; 0.2 mM EDTA!; 0.5 mM DTT!; cocktail d'inhibiteur de protéases. Après centrifugation, les extraits nucléaires ont été quantifiés avec la méthode colorimétrique de Bradford. 3µg d'extraits nucléaires ont été incubés pendant 25 min à température ambiante dans du tampon HGDE (20 mM HEPES pH 7,9!; 0,2 mM EDTA, 20% glycérol, 100 mM KCl et 1 mM DTT), en présence de 2µg de polydIdC, 1µg de BSA, 10 µM de ZnCl<sub>2</sub>. La sonde marquée à l'ATP $\gamma^{32P}$  (50x10<sup>3</sup> cpm) est alors ajoutée pour une incubation supplémentaire de 25 min sur glace. Les complexes ADN-protéines sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 5%.

Les sondes utilisées sont : Les sites de liaison d'Ikaros sont en gras, les sites mutés sont en italiques.

Hes1:

## AB :TGAAAGTTACTG**TGGGAA**AGAAAGTT**TGGGAA**GTTCACACGAG AmB :TGAAAGTTACTG**TGCTGC**AGAAAGTT**TGGGAA**GTTCACACGAG ABm :TGAAAGTTACTG**TGGGAA**AGAAAGTT**TG***CTGC***GTTCACACGAG AmBm :TGAAAGTTACTG<b>TGCTGC**AGAAAGTT**TGCTGC**GTTCACACGAG Ptα :

pTα: GCAGGGCC**TGGGAA**CACGTGGAGCCCACAG pTαm: GCAGGGCCT*CTGC*ACACGTGGAGCCCACAG IkBS4 : TCAGCTTT**TGGGAAT**GTATTCCCTGTCA

IV- Analyse des réarrangements D<sub>6</sub>2-J<sub>6</sub>2 par PCR.

#### Extraction de l'ADN génomique.

10<sup>7</sup> cellules sont incubées dans 500µl de tampon de lyse (100 mM Tris.HCl, pH8,5 ; 5 mM EDTA ; 0,2% SDS ; 200 mM NaCl ; 100µg/ml Protéinase K) pendant 4-5 heures à 37°C sous agitation. 1 volume d'ispropanol est ajouté et les échantillons sont délicatement mélangés jusqu'à formation complète d'un précipité. L'ADN est récupéré et séché, puis resuspendu dans 200µl de TrisHCl 10 mM, EDTA 0,1 mM.

*PCR D<sub>\beta</sub>2-J<sub>\beta</sub>2 (voir Figure 5, p11).* 

1µl d'ADN est utilisé pour la PCR dans les conditions suivantes : 1 cycle de 5 min à 94°C, 30 cycles, composés de 30 sec à 94°C, 45 sec à 60°C, 1 min à 72°C. Les amorces utilisées sont :

5'-GTAGGCACCTGTGGGGGAAGAAACT-3' ( $D_{\beta}2.1$ )

5'-TGAGAGCTGTCTCCTACTATCCATT-3' ( $J_{\beta}$ 2.7).

#### V- Culture des lignées cellulaires Tik et infections des cellules avec les vecteurs rétroviraux.

Les lignées cellulaires sont dérivées de tumeurs  $Ik^{L/L}$  primaires. Les cellules poussent à une concentration optimale de 500x10<sup>3</sup> cellules/ml dans le milieu suivant : RPMI 1640 + 10% FCS + 2 mM L-Glutamine.

Les vecteurs rétroviraux MigR, Ik1 et Ik1\* ont été produits dans les cellules d'empaquetage Eco-Phoenix.  $10^6$  cellules Tik sont infectées avec 0,5 ml de surnageant (contenant les virus) par centrifugation pendant 90 min à 2600 rpm. Après infection, les cellules sont repiquées toutes les 24h à une concentration de 500x10<sup>3</sup> cellules/ml dans du milieu frais.

#### VI- Marquage par immunofluorescence.

Les cellules des lignées Tik sont centrifugées sur lame pendant 5 min à 1200 rpm. Les cellules sur lame sont ensuite fixées pendant 1 heure avec du PBS 3% paraformaldéhyde à 4°C. Les cellules sont ensuite marquées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps polyclonal de lapin (produit par notre équipe), dirigé contre les parties N-terminale et C-terminale de la protéine Ikaros, dilué 500 fois!; puis 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé au Cy3 (Jackson Immunoresearch) dilué 1000 fois!; et enfin pendant 2 min à température ambiante avec du Hoechst (Sigma) dilué 200 fois. Les lames sont analysées au microscope à fluorescence au grossissement x40.

#### VII- Hybridation des puces à oligonucléotides Affymetrix.

Le profil d'expression génique des populations de thymocytes totales contrôles et Ik<sup>L/L</sup> de souris âgées de 3 semaines a été analysé à l'aide des puces Affymetrix Mu11kB (6500 gènes). Le profil transcriptionnel des tumeurs Ik<sup>L/L</sup> a été analysé à l'aide des puces à oligonucléotides MG-U74Av2. La synthèse des ADN complémentaires, ARN complémentaires, ainsi que l'hybridation ont été réalisés selon les protocoles Affymetrix avec 10µg d'ARN total. Le promoteur de l'ARN polymérase T7 est incorporé au cours de la synthèse des ADNc doubles brins. L'ADN complémentaire ainsi produit est utilisé pour la transcription *in vitro* des ARNc, avec le kit ENZO BioArray High Yield IVT kit, et l'incorporation de ribonucléotides biotinylés. La qualité des ARNc est vérifiée par spectrophotométrie et électrophorèse capillaire sur un Bioanalyser Agilent 2100 avec le kit RNA 6000 LabChip. 10µg d'ARN biotinylés et fragmentés sont hybridés sur les puces Affymetrix pendant 16h à 45°C. Les lavages et le marquage des puces avec la streptavidine-PE sont effectués avec la station fluidique GeneChip 400. Les puces sont scannées avec le scanner GeneArray d'Affymetrix.

#### VIII- Analyse des données générées par les puces Affymetrix.

Les données brutes ont été analysées avec le logiciel MicroArray Suite v5.0 pour déterminer les valeurs "d'Average Difference" de chaque gène. L'"Average Difference" correspond au niveau d'expression des gènes sur la puce.

#### Sélection des gènes de la figure 22A.

Un paramètre Absent (A) ou Présent (P) est attribué pour chaque gène présent sur la puce. Dans un premier temps, j'ai éliminé les gènes étant A, c'est à dire non exprimés, dans les 10 échantillons (2 Ik<sup>+/+</sup>, 2 Ik<sup>L/L</sup> non-tumoraux et 6 tumeurs Ik<sup>L/L</sup>). J'ai ensuite calculé un coefficient de variation cv pour chaque gène, avec cv= (écart-type des 10 échantillons) / (moyenne des 10 échantillons). J'ai ensuite sélectionné les gènes en imposant les critères suivants!: moyenne (des 10 échantillons)>150, cv>0,3. Cette analyse permet d'isoler les 3000 gènes variants le plus entre les 10 échantillons. J'ai ensuite procédé à une classification hiérarchique non supervisée (méthode de Eisen, 1998) avec cette liste de 3000 gènes pour observer les corrélations entre les profils transcriptionnels des différents échantillons.

#### Sélection des gènes de la figure 22B.

Pour cette analyse, les gènes ont été sélectionnés selon les critères suivants!: AD>100,

ratio tumeur/contrôles >2 ou <0,5. Le ratio (tumeurs/contrôles)= (moyenne  $AD_{tumeurs}$ )/(moyenne  $AD_{contrôles}$ ). J'ai ensuite procédé à une classification hiérarchique non supervisée avec la liste de gènes produite. Plusieurs analyses ont été réalisées avec un groupe de 4 échantillons contrôles (2 Ik<sup>+/+</sup> et 2 Ik<sup>L/L</sup> non tumoraux) et un groupe de 4 échantillons tumoraux, de façon à éviter un biais (lors des calculs de moyenne) vers le groupe des échantillons tumoraux. Ces différentes analyses, avec différentes groupes de 4 tumeurs Ik<sup>L/L</sup> m'ont permis d'obtenir des résultats similaires.

#### IX- Activation des cellules et mesure de la prolifération.

Le fond des plaques de cultures sont recouverts avec les anticorps anti-CD3 (10µg/ml) et anti-CD28 (25µg/ml), pendant une nuit à 37°C. Avant d'être mises en culture, 10<sup>6</sup> cellules sont incubées en présence de CFSE (20µg/ml) (5,6-carboxyfluoresceine diacetate succinimidyl ester; Molecular Probes), puis lavé deux fois. Après trois jours de culture, les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

Les souris Ik<sup>L/L</sup> développent des lymphomes T entre l'âge de 3 et 6 mois. Des pathologies lymphoïdes similaires sont observées dans d'autres modèles animaux où le locus du gène Ikaros est altéré (par exemple Ik DN<sup>+/-</sup> et Ik<sup>plstc</sup>), établissant clairement une fonction de gène suppresseur de tumeur pour Ikaros. Les mécanismes moléculaires conduisant à la formation de telles tumeurs restent cependant mal connus. L'analyse du transcriptome des tumeurs Ik<sup>L/L</sup> montre une augmentation de l'expression de plusieurs gènes de la voie de signalisation Notch. Cette expression anormale des gènes de la voie Notch est également observée dans des tumeurs plus jeunes en cours d'expansion, suggérant qu'une altération de la voie de signalisation Notch constitue un événement précoce dans l'établissement des tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. D'autre part, la ré-expression d'une forme normale de la protéine Ikaros dans des lignées cellulaires établies à partir de cellules tumorales conduit à une diminution du niveau d'expression de plusieurs gènes cibles de la voie Notch. Par ailleurs, la ré-expression d'Ikaros dans ces lignées inhibe l'amplification des cellules tumorales tumorales *in vitro*.

Mes résultats montrent qu'une réduction de l'activité d'Ikaros dans les thymocytes peut être favorable à l'initiation du développement tumoral, et qu'il pourrait exister une convergence fonctionnelle entre Ikaros et Notch dans le processus de transformation des lymphocytes T.

### I- Les tumeurs Ik<sup>L/L</sup>.

Les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> expriment un TCR $\alpha\beta$  à leur surface mais l'analyse du répertoire des chaînes  $\beta$  utilisées montrent l'usage d'une ou de quelques chaînes  $\beta$ , suggérant que les populations de cellules tumorales sont d'origine mono- ou oligoclonales. D'autre part, l'usage de différentes chaînes  $\beta$  dans les différentes tumeurs analysées suggèrent que la transformation des cellules T est un évènement stochastique. Contrairement à d'autres modèles animaux (Ik DN<sup>+/-</sup>) développant des lymphomes T, où les populations de cellules sont monoclonales, les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> sont, dans la plupart des cas, composées de populations oligoclonales. Trois hypothèses pourraient expliquer cette observation. (i) la fréquence de transformation des thymocytes pourrait être plus importante pour les souris Ik<sup>L/L</sup>, ce qui conduirait à l'apparition de plusieurs clones distincts. Cependant, cette hypothèse semble être difficile à réconcilier avec le caractère hypomorphe de la mutation. (ii) Une cellule T pourrait commencer à acquérir certaines propriétés tumorales avant l'étape de réarrangement de la

chaîne  $\beta$  du TCR. Cette cellule pourrait subir un nombre limité de divisions cellulaires et engendrer plusieurs cellules filles, dont chacune réarrangerait une chaîne  $\beta$  distincte. Ces cellules pourraient alors être à l'origine des populations tumorales oligoclonales observées dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. (iii) Le développement d'une tumeur est initié simultanément et de façon indépendante dans les deux lobes du thymus d'une même souris. L'observation de populations polyclonales dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> serait alors le reflet des populations provenant de chaque lobe du thymus.

L'ablation du thymus empêche la formation des tumeurs dans les souris Ik<sup>L/L</sup>, bien que des cellules T matures sont présentes dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques. Les cellules T périphériques Ik<sup>L/L</sup> prolifèrent plus que les cellules T contrôles en réponse à une stimulation avec un anticorps anti-CD3 (mime l'activation par le TCR). Le groupe de K. Georgopoulos avait également reporté une réponse hyperproliférative des cellules T Ik DN<sup>+/-</sup> suite à une stimulation par le TCR et proposé que le développement des tumeurs dans les souris Ik DN<sup>+/-</sup> Les données obtenues avec les cellules T Ik<sup>L/L</sup> montrent cependant que cette propriété seule n'est pas suffisante pour induire la formation de tumeurs. Par ailleurs, la dérégulation des gènes de la voie Notch semble être une caractéristique propre aux thymocytes, puisque les cellules T Ik<sup>L/L</sup> périphériques contrôles. L'ensemble de ces observations suggèrent fortement qu'un environnement thymique est nécessaire au développement des tumeurs Ik<sup>L/L</sup>, et que des mécanismes moléculaires intrinsèques aux thymocytes sont impliqués dans le processus de transformation des thymocytes Ik<sup>L/L</sup>.

J'ai pu établir des lignées cellulaires à partir des tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. Ces lignées peuvent être cultivées dans un milieu simple sur de longues périodes, sans apport extérieur de cytokines. De plus, de récentes expériences conduites au laboratoire ont montré que les cellules issues des lignées cellulaires sont capables de former rapidement de nouvelles métastases dans des organes comme le foie et les reins, lorsqu'elles sont injectées dans des souris irradiées avec une dose sub-létale (6 Gy). Ces données montrent une transformation complète des cellules Ik<sup>L/L</sup>.

## II- Analyse du transcriptome de thymocytes Ik<sup>L/L</sup> non-tumoraux.

L'analyse du transcriptome de souris  $Ik^{L/L}$  non tumorales suggèrent que les thymocytes de ces souris possèdent une signature transcriptionnelle spécifique. Il est assez surprenant de constater qu'aucun des gènes dérégulés dans les thymocytes  $Ik^{L/L}$  non-tumoraux ne l'est dans les tumeurs  $Ik^{L/L}$ . Cette différence peut s'expliquer par le fait que les deux expériences ont été effectuées sur des puces Affymetrix différentes qui ne contiennent pas le même nombre de gènes. D'autre part, l'analyse des variations d'expression génique d'une population totale de thymocytes peut masquer des changements présents dans des sous-populations de thymocytes immatures peu représentées (populations DN, ISP par exemple). Il pourrait donc être intéressant d'analyser le transcriptome de différentes sous-populations issues de souris  $Ik^{L/L}$  non-tumorales et de le comparer à celui de tumeurs  $Ik^{L/L}$ . Ce type d'analyse pourrait mettre en évidence des variations d'expression génique similaires entre sous-populations immatures non-tumorales et tumeurs  $Ik^{L/L}$ , ce qui permettrait d'avancer l'hypothèse que des stades immatures de différenciation des cellules T constituent un terrain plus propice au développement de tumeurs.

## III- Les tumeurs Ik<sup>L/L</sup>!dérivent-elles d'un stade immature de différenciation?

Les LAL-T induites par l'expression de NIC3 expriment fortement les gènes cibles de Notch!: Hes1 et pT $\alpha$  (Bellavia, 2002). De plus, dans cette même étude, l'expression anormale de Notch3, Hes1 et pT $\alpha$  a été observée dans plusieurs cas de LAL-T humaines. Ainsi, l'expression de ces 3 gènes semble être une caractéristique des LAL-T. D'autre part, Notch3, Hes1 et pT $\alpha$  ne sont normalement exprimés que dans les populations immatures du thymus (DN3-4). L'expression soutenue de ces gènes dans les LAL-T sous-entend qu'elles sont originaires d'une population de cellules immatures. Les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> en cours d'expansion que j'ai analysé présentent également une dérégulation de l'expression des gènes Notch3, Hes1 et pT $\alpha$ , suggérant qu'elles pourraient elles aussi émerger d'un stade immature de différenciation.

Au cours de la transition entre les stades DN et DP, les cellules passent par un stade intermédiaire de différenciation caractérisé par le phénotype CD8<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup> (cellules ISP). L'analyse de plusieurs tumeurs Ik<sup>L/L</sup> en cours d'expansion (âgées de 15 semaines) montre une augmentation du nombre de cellules CD8<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup>. Il est probable que l'expansion de ces cellules se produise suite à la

signalisation par le pré-TCR (voir plus bas) et que cette population de cellules en prolifération constitue un terrain propice à la transformation des cellules. Je n'ai cependant pas réussi à observer cette population de cellules CD8<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup> dans d'autres souris Ik<sup>L/L</sup> analysées par la suite. Cette différence peut s'expliquer par le fait que pour ces dernières souris, la mutation Ik<sup>L/L</sup> était introduite sur un fond génétique C57Bl/6 plus pur (10<sup>e</sup> génération de croisement en retour contre 2<sup>e</sup> génération de croisement en retour pour les premières souris analysées). Ainsi, il est possible qu'un fond génétique C57Bl/6 pur accélère le développement des tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une létalité plus précoce pour les souris C57Bl/6 pures par rapport aux souris ayant un fond génétique mixte. L'âge de 15 semaines étant trop avancé pour observer l'amplification d'une population immature CD8<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup>, il serait important d'analyser les populations cellulaires de thymus de souris Ik<sup>L/L</sup> plus jeunes, afin de confirmer l'expansion éventuelle des cellules ISP.

#### IV- Le rôle de Notch dans la transformation des cellules Ik<sup>L/L</sup>.

Les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> sont caractérisées par une augmentation de l'expression de plusieurs gènes de la voie de signalisation Notch. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels la voie de signalisation Notch pourrait conduire à la transformation des cellules demeurent encore mal connus.

#### IV<sub>1</sub>-Les gènes Hes1 et Deltex1.

Hes1 est préférentiellement exprimé dans les thymocytes DN et semble être important pour l'expansion de cette population (Tomita *et al.*, 1999). Un rôle potentiel du gène Hes1 dans le processus de leucémogenèse provient de l'observation qu'il est surexprimé dans un modèle de lymphome T murin où NIC1 est exprimé de façon constitutive après insertion provirale (Lee *et al.*, 1999). De plus, l'expression de Hes1 est également augmentée dans des souris transplantées avec des cellules de MO transduites avec un rétrovirus exprimant NIC1 (Aster, 2000) et dans les souris transgéniques NIC3 (Bellavia, 2000). La fonction de Deltex1 pendant le développement des thymocytes reste, quant à elle, peu connue. L'expression de Deltex1 est augmentée dans les souris transgéniques NIC1 (Deftos *et al.*, 2000), mais également dans différents thymomes murins (Pampeno *et al.*, 1996). En accord avec ces différentes données, les gènes Hes1 et Deltex1 sont également surexprimés dans les lymphomes T des souris Ik<sup>L/L</sup>. L'ensemble de ces résultats suggère que Hes1 et Deltex1 pourraient jouer un rôle important dans la transformation néoplastique des cellules. Cependant, il a été observé que l'expression ectopique de ces 2 gènes n'est pas suffisante pour induire le développement de lymphomes T (Kawamata *et al.*, 2002; Izon *et al.*, 2002), suggérant qu'une dérégulation plus générale de la voie de signalisation Notch est requise pour le développement de lymphomes T.

#### IV<sub>2</sub>- La voie E2A

Une autre cible de la voie de signalisation Notch est le complexe E2A. Les facteurs de transcription codés par E2A (E12 et E47) sont importants pour les stages précoces de différenciation des thymocytes, et l'activité de E2A est diminuée suite à l'activation du pré-TCR. Des souris déficientes pour E2A développent des lymphomes des cellules T, suggérant que ce gène possède une fonction de suppresseur de tumeurs. D'autre part, l'activité du complexe E2A est inhibée par!Notch1 (Kawamata *et al.*, 2002), mais également par Notch3 (Talora *et al.*, 2003). Cette observation suggère que l'activation de la voie Notch dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> en cours d'expansion pourrait entraîner une inhibition de l'activité du complexe E2A dans ces cellules. Il serait donc intéressant de tester l'activité du complexe E2A dans les cellules T Ik<sup>L/L</sup>. Une réduction de l'activité de E2A dans les cellules Ik<sup>L/L</sup> pourrait, en partie, être impliquée dans le développement des tumeurs Ik<sup>L/L</sup>.

#### IV<sub>3</sub>- La voie NF-κB

Notch1 et Notch3 sont également capables de réguler positivement l'activité de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, qui confère des propriétés anti-apoptotiques et prolifératives aux cellules T. Des dérégulations de l'expression de gènes de la voie NF- $\kappa$ B sont associées à la transformation néoplastique des cellules. Ainsi, des souris transgéniques exprimant v-rel développent des lymphomes T. L'augmentation de l'expression des gènes Notch1 et Notch3 dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> en cours d'expansion suggère que la voie NF- $\kappa$ B est également activée dans ces cellules. Il serait donc intéressant d'étudier la voie NF- $\kappa$ B dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. Il est cependant important de noter qu'une activation de la voie NF- $\kappa$ B n'a pas été reportée dans les souris exprimant NIC1, contrairement aux souris transgéniques NIC3. Cette dernière observation suggère que les récepteurs Notch1 et Notch3 peuvent avoir des fonctions différentes dans le processus de différenciation normale des cellules T. À cet égard, il est intéressant de noter que Notch1 est capable de réguler positivement l'expression de Notch3 (Luo *et al.*, 1997). Il est donc possible qu'une dérégulation dans la séquence d'activité des récepteurs Notch et/ou qu'un déséquilibre dans la coopération des récepteurs Notch au cours de la différenciation des cellules T soient impliqués dans la transformation de ces cellules.

#### IV<sub>4</sub>- Notch, un facteur anti-apoptotique.

Une fonction probable de Notch dans la résistance à l'apoptose est médiée, en partie, par l'activation de la voie NF-κB. Il a par ailleurs été montré que Notch1 pouvait induire une résistance à l'apoptose dans des lignées cellulaires T, ainsi que dans des thymocytes DP (Deftos *et al.*, 1998), en régulant positivement l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2.

Le récepteur nucléaire orphelin Nur77 induit l'apoptose des cellules T suite à la signalisation par le TCR (*Liu et al.*, 1994). Notch1 est capable d'interagir avec Nur77 et d'inhiber sa fonction, mais peut également réguler négativement l'expression de Nur77 (Jehn *et al.*, 1999). Nur77 est exprimé dans les cellules DN et dans les cellules DP. Les cellules DP étant soumises à la sélection négative, la réduction de l'expression de Notch1 au stade DP pourrait donc rendre les cellules sensibles à l'apoptose induite par le TCR. Ainsi, l'expression anormale de Notch1 au stade DP pourrait rendre ces cellules résistantes à l'apoptose, en inhibant la fonction pro-apoptotique de Nur77.

Ces observations suggèrent que l'expression anormale de Notch1 dans les thymocytes Ik<sup>L/L</sup> pourrait avoir une fonction anti-apoptotique dans les tumeurs IK<sup>L/L</sup>. Cette résistance des cellules Ik<sup>L/L</sup> à l'apoptose pourrait participer à leur transformation.

#### V- Rôle de la voie Notch dans le maintien du phénotype tumoral dans les lignées Ik<sup>L/L</sup>.

De façon très intéressante, plusieurs gènes impliqués dans la voie de signalisation Notch voient leur niveau d'expression augmenté dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. Mes résultats montrent que l'expression d'Ikaros dans les lignées cellulaires entraîne une réduction de la prolifération des cellules tumorales, concomitante à une réduction du niveau d'expression des gènes de la voie Notch. Ces données suggèrent que l'activation de la voie Notch joue un rôle central dans le maintien du phénotype tumoral. Il serait donc intéressant d'inhiber directement la voie Notch dans les lignées cellulaires Tik. L'expression d'une forme dominante négative de la protéine Mastermind 1 (dnMAML1) permet d'inhiber la prolifération de lignées cellulaires issues de lymphomes T exprimant NIC1 (Weng *et al.*, 2003). Il sera intéressant de déterminer si l'inhibition de Notch par dnMAML1 dans ces cellules conduit également à une réduction de la prolifération. Cependant, de tels résultats ne permettraient pas de conclure que l'inhibition de la prolifération induite par l'expression de dnMAML1 ou Ik1 met en jeu les mêmes mécanismes moléculaires. C'est pourquoi, dans le cas où dnMAML1 inhibe au moins partiellement la prolifération des lignées Tik, il sera

important d'analyser les effets combinés de l'expression de dnMAML1 et d'Ikaros dans les cellules Tik. Ces expériences permettront peut-être de mettre en évidence une synergie entre Ikaros et dnMAML1, ce qui renforcerait l'hypothèse que le contrôle de la prolifération cellulaire par Ikaros implique la voie Notch.

#### VI- Fonction de la protéine Ik\*

Pour comprendre le rôle du gène Ikaros dans le développement de lymphomes T dans les souris Ik<sup>L/L</sup>, il est important de savoir si la fonction de la protéine Ik\* est normale, ou si celle-ci possède une fonction altérée qui pourrait éventuellement être à l'origine des défauts observés.

#### VI<sub>1</sub>- Propriétés moléculaires d'Ikaros\*.

Les protéines Ikaros (Ik\*) produites en faible quantité dans les souris Ik<sup>L/L</sup> sont dépourvues du domaine codé par l'exon 2 du gène Ikaros (Kirstetter *et al.*, 2002). L'absence de ce domaine protéique entrave-t-elle la fonction de la protéine Ik\*!? Les expériences de surexpression des protéines Ik1 ou Ik1\* dans les lignées cellulaires Tik montrent qu'Ik1\*, à l'instar d'Ik1, est capable de corriger, au moins partiellement, le phénotype tumoral des lignées Tik. D'autre part, les tests de liaison d'Ikaros à un site de fixation optimal (IkBS4) montrent qu'Ik1\* se lie tout aussi efficacement qu'Ik1 à ses séquences cibles. Ces données suggèrent fortement que les protéines Ik\* ont une fonction normale, et qu'une réduction de l'activité d'Ikaros rend les thymocytes susceptibles au développement de lymphomes.

Il a été montré que l'exon 2 du gène Ikaros code pour un motif PEDLS, responsable de l'interaction d'Ikaros avec le corépresseur CtBP (Koipally et Georgopoulos, 2000). Le mécanisme de répression du complexe Ikaros-CtBP s'opère indépendamment d'une activité histone déacétylase. D'autre part, Ikaros peut réprimer l'expression de ses gènes cibles par un mécanisme histone déacétylase dépendant. J'ai montré que la surexpression d'Ik1 et Ik1\* dans les lignées cellulaires Tik entraîne une régulation négative de l'expression des gènes de la voie Notch. Ces données suggèrent que l'inhibition de l'expression des gènes cibles de Notch par Ikaros ne nécessite pas le recrutement de CtBP. L'analyse de l'expression des gènes Notch dans les lignées cellulaires infectées avec Ik1 ou Ik1\*, et traitées avec la trichostatine A (un inhibiteur des histones déacétylases) permettrait d'appréhender si la régulation négative de l'expression des gènes Notch par Ikaros est dépendante d'une activité HDAC. Ceci n'exclurait pas que l'interaction Ikaros-CtBP est importante pour la

régulation de l'expression d'autres gènes cibles d'Ikaros, mais suggèrerait que le mode de répression par Ikaros (CtBP vs HDAC) soit spécifique du promoteur du gène cible et/ou du contexte cellulaire.

#### VI<sub>2</sub>- Ikaros, un régulateur de l'expression des gènes Notch.

L'expression d'Ik1 dans les lignées cellulaires Tik montre une réduction plus ou moins importante de l'expression des gènes de la voie Notch. Cette observation suggère une régulation directe des gènes de la voie Notch par Ikaros. Des expériences *in vitro* ont montré qu'Ik1 peut efficacement se lier aux séquences cibles de Notch présentes dans le promoteur du gène Hes1, contrairement à ce qui avait été reporté par Beverly et Capobianco (2003). Cependant, la liaison d'Ik1 aux séquences cibles de Notch présentes dans l'enhancer du gène pT $\alpha$  n'a pas été observée. Il est possible que la séquence utilisée pour le gène pT $\alpha$  ne corresponde pas aux sites d'action d'Ikaros. En accord avec cette hypothèse, 2 sites de liaison potentiel TGGGAA, situés respectivement à 79 et 27 paires de bases en amont du codon d'initiation de la transcription, sont présents dans une région promotrice potentielle du gène pT $\alpha$ . De façon alternative, il est possible que la régulation négative de l'expression de pT $\alpha$  par Ikaros s'opère de façon indirecte, et qu'elle soit une conséquence de la réduction de l'expression d'autres gènes de la voie Notch. Il serait néanmoins intéressant de tester la liaison d'Ikaros au niveau du promoteur de pT $\alpha$  (décrit plus haut), ainsi qu'aux séquences régulatrices des gènes Notch1 et Deltex1, dans la mesure où ces dernières peuvent être identifiées.

Il a été reporté qu'Ikaros peut avoir une activité transcriptionnelle duale, à la fois comme activateur ou répresseur de la transcription. Mes données montrent que dans les thymocytes, Ikaros agit comme un répresseur transcriptionnel pour les gènes de la voie Notch étudiés. Une fonction probable d'Ikaros est de réguler la transition entre états actifs et inactifs de ses gènes cibles, en localisant les loci de ces gènes au niveau de l'hétérochromatine péri-centromérique. L'analyse de l'expression des gènes Notch dans la population DP Ik<sup>L/L</sup> non-tumorale montre une expression persistante de Hes1 et Deltex1, alors qu'ils ne sont pas détectés dans la population DP contrôle. Ces résultats suggèrent que (i) la transition entre état actif et inactif ne s'effectue pas de façon normale dans les thymocytes Ik<sup>L/L</sup> suite à la signalisation par le pré-TCR (ii) la dérégulation de certains gènes de la voie Notch (Deltex1 par exemple) lors de stades précédents l'émergence des tumeurs est une conséquence directe de la mutation Ik<sup>L/L</sup>. De plus, les données obtenues *in vitro* suggèrent qu'Ikaros peut se fixer sur aux séquences régulatrices de certains gènes de la voie Notch. Il serait donc important de confirmer cette interaction *in vivo*, et d'analyser spécifiquement dans les cellules T si

(i) Ikaros est associé aux loci de certains gènes de la voie Notch, (ii) l'extinction de plusieurs gènes, comme Hes1 et Deltex1 par exemple, au cours de la transition entre les cellules DN et DP est associée à un changement dans la conformation chromatinienne de ces gènes.

Les gènes Hes1 et Deltex1 sont dérégulés de façon très précoce dans les thymocytes  $lk^{LL}$  non-tumoraux, mais sont modestement réprimés suite à la ré-expression d'Ikaros dans les lignées cellulaires Tik. À l'inverse, des gènes comme Ifi204 et Meltrinß ne sont pas dérégulés dans les thymocytes  $lk^{LL}$  non-tumoraux, mais sont très fortement réprimés par Ikaros dans les lignées Tik. Ces observations suggèrent qu'Ikaros pourrait avoir, relativement à CSL, des affinités différentes pour plusieurs gènes de la voie Notch (Figure 31). En effet, dans le cas où Ikaros a une forte affinité pour les séquences régulatrices d'un gène, le niveau résiduel de protéines Ikaros exprimées dans les thymocytes  $lk^{LL}$  pourrait être suffisant pour assurer sa fonction de répresseur. Par contre, en situation de surexpression dans les lignées Tik, la répression par Ikaros serait d'autant plus efficace (cas de Ifi204, Meltrinß par exemple). Au contraire, si Ikaros possède une faible affinité, alors, la quantité de protéines produites dans les thymocytes  $lk^{LL}$  ne suffirait plus à maintenir sa fonction de répresseur et conduirait à une activation transcriptionnelle basale (cas de Deltex1, Hes1 par exemple). La surexpression d'Ikaros dans les lignées n'entrainerait alors qu'une réduction partielle de l'expression de ces gènes.



#### Lignées cellulaires ik Tik + Ik1



🔲 Ik	<mark>○</mark> CSL
Affinité	$\Box$ < Affinité $\bigcirc$
Affinité	$\square$ >Affinité $\bigcirc$

Figure 31!: Un modèle d'activité d'Ikaros en fonction de son affinité relative pour les séquences régulatrices de ses gènes cibles. Cf texte.

## VII- Un modèle de régulation de l'expression des gènes de la voie Notch par Ikaros et CSL!; implication dans la transformation des cellules Ik<sup>L/L!</sup>?

Comment une réduction de l'activité d'Ikaros peut-elle conduire à la transformation des cellules T!? D'après les données obtenues *in vitro* pour le gène Hes1, il est possible d'avancer une hypothèse selon laquelle une compétition entre Ikaros et CSL régule l'activité transcriptionnelle de certains gènes de la voie Notch (Figure 32). Dans des conditions biologiques normales, il existe probablement un équilibre fragile, entre l'occupation des séquences cibles de Notch par Ikaros et CSL. Ainsi, l'occupation de ces sites par Ikaros inhibe la transcription de ses gènes cibles. Au cours de la différenciation des cellules T, l'équilibre peut être déplacé en faveur de CSL. Cependant, en absence de signalisation par Notch, le complexe CSL agit également comme un répresseur de la transcription. Suite à l'activation de la voie de signalisation Notch, le complexe CSL est converti en activateur de la transcription.

Quels évènements régulent l'occupation des séquences régulatrices par Ikaros ou par CSL!? Beverly et Capobianco (2003) ont émis l'hypothèse suivante!: l'expression de formes DN (Ik6 par exemple) pendant le développement des thymocytes pourrait entraîner le déplacement d'Ikaros des séquences régulatrices des gènes cibles de Notch, autorisant ainsi la liaison de CSL. Cependant, s'il a été reporté que les isoformes Ik1 et Ik2 sont majoritairement exprimées tout au long du développement des thymocytes, peu d'informations sont disponibles concernant l'expression des différentes isoformes dominante-négatives d'Ikaros dans les différentes sous-populations de thymocytes. Il serait donc important de caractériser de façon précise l'expression des isoformes d'Ikaros dans les thymocytes.

La réduction de l'activité de la protéine Ikaros dans les cellules T Ik<sup>L/L</sup> pourrait conduire à une transcription basale de certains gènes de la voie Notch. Or, il a été reporté dans plusieurs types cellulaires que l'activation de la voie de signalisation Notch entraîne une sur-activation de Notch par une boucle de rétroaction positive (Wilkinson *et al.*, 1994; Weinmaster *et al.*, 1997). Par un mécanisme similaire, il est possible que l'activité transcriptionnelle basale des gènes Notch conduise à une augmentation de l'expression des gènes Notch dans les thymocytes. L'activation constitutive de la voie de signalisation Notch induirait alors en partie la transformation des cellules T Ik<sup>L/L</sup>.



**Figure 32:** La réduction de l'activité d'Ikaros entraîne une activation constitutive de la voie de signalisation Notch et le développement de lymphome T. (cf texte). CSL: CBF1(RBP-Jκ), Suppressor of Hairless, Lag-1; CoR: corépresseur; CoA: coactivateur!; NIC: domaine intracellulaire de Notch.

# VIII- Des évènements génétiques additionnels participent-ils à la transformation des cellules Ik<sup>L/L!</sup>?

La transformation progressive d'une cellule normale en une cellule tumorale maligne est un processus complexe qui nécessite de multiples changements dans l'expression de différents gènes (oncogènes, suppresseurs de tumeurs). L'activation constitutive de la voie de signalisation Notch, dûe à une réduction de l'activité de Ikaros, semble être un événement clé du développement des tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. Il est cependant vraisemblable que la transformation complète des cellules Ik<sup>L/L</sup> implique la dérégulation d'autres facteurs importants dans le contrôle de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose. À cet égard, il est intéressant de noter que différents gènes comme ROR $\gamma$ , p19<sup>arf</sup> ou c-myc sont dérégulés dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup>. ROR $\gamma$  est un récepteur nucléaire de la famille des récepteurs orphelins et une perte de fonction de ROR $\gamma$  est associée au développement de lymphomes T chez la souris (Ueda *et al.*, 2002). p19<sup>arf</sup> est un inhibiteur du cycle cellulaire, et il a été montré que le gène codant pour p19<sup>arf</sup> pouvait être délété dans plusieurs cas de LAL-T humaine (Gardie *et al.*, 1998). c-myc est un proto-oncogène dont la surexpression conduit au développement de lymphomes thymiques chez la souris (Stewart *et al.*, 1993; Rajan *et al.*, 2000). Les dérégulations de ces gènes

constituent-elles des évènements secondaires dans l'acquisition du phénotype tumoral, ou sont-elles nécessaires pour l'initiation de celui-ci!? Il est intéressant de noter que la délétion du gène codant pour p19<sup>arf</sup> dans les LAL-T est produite à la suite de réarrangements chromosomiques. D'autre part, un gain du chromosome 15, contenant le locus du gène c-myc, peut-être observé dans des souris déficientes pour le facteur de transcription E2A (Bain *et al.*, 1997) ou pour la DNA méthyltransférase Dnmt1 (Gaudet *et al.*, 2003). Le gain du chromosome 15 pourrait en partie contribuer à l'augmentation du niveau d'expression de c-myc et conférer un avantage sélectif aux cellules exprimant un niveau plus élevé de c-myc. Une étude a montré qu'une réduction de l'activité d'Ikaros pouvait entraîner l'apparition d'aberrations chromosomiques dans des cellules T en prolifération (Avitahl *et al.*, 1999), suggérant un mécanisme par lequel la transformation des cellules T se produit. À ce titre, il pourrait être intéressant de déterminer si des évènements similaires se produisent dans les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> en cours d'expansion.

#### IX- Ikaros et Notch au cours de la différenciation des thymocytes.

#### IX<sub>1</sub>- La signalisation par le pré-TCR.

L'une des étapes clé du développement des thymocytes correspond à la transition entre les stades DN et DP, dépendante d'une signalisation appropriée par le complexe pré-TCR. La signalisation par le pré-TCR entraîne la prolifération des cellules et leur maturation en cellules DP.

Plusieurs études ont montré que la formation de lymphomes dans les souris transgéniques NIC1 et NIC3 nécessite la présence d'un complexe de signalisation par le pré-TCR intact. En effet, l'expression de NIC1 sur un fond génétique RAG2<sup>-/-</sup> (ou SLP76<sup>-/-</sup>) et de NIC3 sur un fond génétique pT $\alpha^{-/-}$  (n'exprimant pas de pré-TCR) abrogent le développement des lymphomes T dans ces souris. Ces données montrent clairement l'importance du complexe pré-TCR dans l'établissement des tumeurs et suggèrent que des évènements génétiques additionnels médiés par le pré-TCR sont requis pour la transformation des cellules T par Notch.

De façon similaire à ce qui est observé pour Notch, la transformation des cellules Ik DN<sup>+/-</sup> requière une signalisation appropriée par le pré-TCR. En effet, des cellules T Ik DN<sup>+/-</sup>xRAG1<sup>-/-</sup> sont capables de se différencier du stade DN au stade DP, mais cette étape de différenciation n'est pas associée à la prolifération des cellules (Winandy *et al.*, 1999). Ces données suggèrent que les signaux transmis par le pré-TCR contrôlent la prolifération des cellules et que la signalisation par le pré-TCR est un événement important pour la transformation des cellules Ik DN<sup>+/-</sup>. De plus, Winandy

*et al* (1999) ont montré que des souris Ik  $DN^{+/-}xTCR\alpha^{-/-}$  (n'exprimant pas de  $TCR\alpha\beta$ ) développent des lymphomes T deux fois plus rapidement que des souris Ik $DN^{+/-}xTCR\alpha^{+/-}$ , renforçant l'hypothèse que les tumeurs Ik pourraient émerger d'un stade de différenciation immature.

Dans les cellules T matures, Ikaros est un régulateur négatif de la réponse proliférative médiée par le TCR (Avitahl *et al.*, 1999). Une réduction de l'activité d'Ikaros dans les cellules T périphériques Ik<sup>-/-</sup>, comme dans les cellules T périphériques Ik<sup>L/L</sup> conduit à une réponse hyperproliférative de ces cellules. De façon similaire, il est probable qu'Ikaros régule négativement la signalisation médiée par le pré-TCR. Ainsi, une réduction de l'activité d'Ikaros pendant cette étape de différenciation des cellules T pourrait entraîner une prolifération accrue de ces cellules. En accord avec cette hypothèse, il est intéressant de noter une augmentation de la population DN4 dans le thymus des souris Ik<sup>L/L</sup>.

Dans l'ensemble, ces observations suggèrent une coopération entre Ikaros et la voie Notch dans le contrôle de la différenciation des cellules DN en cellules DP, une étape dépendante de la signalisation par le complexe pré-TCR. Ainsi, une réduction de l'activité d'Ikaros dans les cellules T Ik<sup>LA</sup> pourrait conduire à une augmentation de l'activité de la voie de signalisation Notch, qui agirait alors à différents niveaux!: (i) l'augmentation de l'activité de la voie Notch entraînerait une résistance à l'apoptose et une réponse proliférative, contribuée en partie par l'activation de NF-kB, et par l'inhibition concomitante du complexe E2A. (ii) L'activation de Notch conduit à une augmentation de l'expression de la chaîne pT $\alpha$  du pré-TCR, et probablement à une augmentation du nombre de complexe pré-TCR formé. Cet événement pourrait induire une signalisation par le pré-TCR accrue, qui, combinée à un seuil d'activation réduit (en raison de la réduction de l'activité d'Ikaros), provoquerait une réponse hyperproliférative des cellules T. Cette série d'évènements pourrait alors constituer une première étape vers la transformation des cellules Ik<sup>LA</sup>.

#### IX<sub>2</sub>- Le stade DP et la signalisation par le TCR $\alpha\beta$ .

Le stade DP est caractérisé par l'étape de sélection positive ou négative des cellules T exprimant un TCRαβ. J'ai pu observé que les cellules CD8 SP lk<sup>L/L</sup> ne régulent pas l'expression du marqueur CD69 aussi efficacement que des cellules CD8 SP contrôles. De façon intéressante, ce défaut de régulation de CD69 par les cellules CD8 SP est également observé pour les souris lk<sup>-/-</sup> (Winandy *et al.*, 1999), ainsi que pour les souris exprimant NIC1 (Izon *et al.*, 2001). Mes résultats suggèrent que les cellules Ik<sup>L/L</sup> progressent vers le stade CD8 SP, sans avoir été pour autant

positivement sélectionnées. Plusieurs études ont analysé le rôle de Notch1 dans l'engagement des cellules DP vers les lignages CD4 SP et CD8 SP (Robey *et al.*, 1996, Deftos *et al.*, 2000, Izon *et al.*, 2001), mais elles apportent des conclusions contradictoires. Les tumeurs Ik<sup>L/L</sup> en cours d'expansion (15 sem), dans lesquelles la voie de signalisation Notch est activée, sont caractérisées par une augmentation de la population CD8 SP. Ainsi, l'expression de Notch1 dans les cellules DP Ik<sup>L/L</sup> semble favoriser l'engagement de ces cellules vers le lignage CD8 SP, ce qui serait en accord avec les études de Robey (1996) et Deftos (2000). On ne peut toutefois pas exclure la possibilité que l'augmentation de la population CD8 SP dans le thymus des souris Ik<sup>L/L</sup> soit également une conséquence de la réduction de l'activité d'Ikaros. En accord avec cette hypothèse, des données du laboratoire montrent le développement de cellules CD8 SP dans les thymus de souris Ik<sup>L/L</sup>xCMH I<sup>-/-</sup>

Comme je l'ai mentionné un peu plus tôt, Ikaros est un régulateur négatif de la prolifération induite par le TCR et établi un seuil d'activation pour les cellules T. Ainsi, lors de la signalisation par le TCR, une réduction de l'activité d'Ikaros dans les cellules T Ik<sup>L/L</sup> pourrait faciliter l'activation des cellules T et constituer un deuxième évènement (après la signalisation par le pré-TCR) qui pourrait conduire à la transformation complète des cellules.

Mes résultats montrent que le facteur de transcription Ikaros exerce différentes fonctions dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes. Ces différences sont probablement dûes aux contextes cellulaires différents ainsi qu'à la présence d'autres facteurs spécifiques des lignages myéloïdes et lymphoïdes. Il est intéressant de noter que seuls les lymphocytes T sont susceptibles de développer des lymphomes dans les souris Ik<sup>L/L</sup>, démontrant ainsi que la fonction de gène suppresseur de tumeurs pour Ikaros est spécifique aux cellules T.

Les cellules T sont sensibles aux variations de la quantité de protéines Ikaros exprimée. Ceci suggère qu'une balance très fine des différents facteurs de transcription est nécessaire pour la différenciation des cellules T. Le déplacement de cet équilibre fragile entraîne l'apparition de transformations néoplastiques.

Des dérégulations de l'expression d'Ikaros et de la voie de signalisation Notch sont associées au développement de LAL-T humaines, mais les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus sont mal connus. Mes résultats suggèrent qu'il existe une coopération entre Ikaros et Notch dans le développement de lymphomes T chez les souris Ik<sup>L/L</sup>, et qu'Ikaros pourrait être un modulateur de la voie Notch dans les thymocytes. La compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels des dérégulations d'Ikaros et de la voie Notch participent au développement de lymphomes des cellules T pourrait permettre de définir des cibles thérapeutiques précises pour le traitement de ces pathologies.

Aifantis, I., Borowski, C., Gounari, F., Lacorazza, H.D., Nikolich-Zugich, J. and von Boehmer, H. (2002) A critical role for the cytoplasmic tail of pT in T lymphocyte development. Nat Immunol 3, 483-8.

Aifantis, I., Buer, J., von Boehmer, H. and Azogui, O. (1997) Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor  $\beta$  locus. Immunity 7, 601-7.

**Aifantis, I., Gounari, F., Scorrano, L., Borowski, C. and von Boehmer, H. (2001)** Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca2+ mobilization and activation of NF-κB and NFAT. Nat Immunol 2, 403-9.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman, I.L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature 404, 193-7.

**Alam, S.M. and Gascoigne, N.R. (1998)** Posttranslational regulation of TCR Vα allelic exclusion during T cell differentiation. J Immunol 160, 3883-90.

Alam, S.M., Travers, P.J., Wung, J.L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S.C. and Gascoigne, N.R. (1996) T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. Nature 381, 616-20.

Alberola-Ila, J., Hogquist, K.A., Swan, K.A., Bevan, M.J. and Perlmutter, R.M. (1996) Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. J Exp Med 184, 9-18.

Allman, D., Karnell, F.G., Punt, J.A., Bakkour, S., Xu, L., Myung, P., Koretzky, G.A., Pui, J.C., Aster, J.C. and Pear, W.S. (2001) Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. J Exp Med 194, 99-106.

Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A. and Bhandoola, A. (2003) Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. Nat Immunol 4, 168-74.

Anderson, G., Pongracz, J., Parnell, S. and Jenkinson, E.J. (2001) Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. Eur J Immunol 31, 3349-54.

Anderson, K.L., Smith, K.A., Pio, F., Torbett, B.E. and Maki, R.A. (1998) Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. Blood 92, 1576-85.

Arnaout, M.A. (1990) Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. Blood 75, 1037-50.

Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. and Fortini, M.E. (1995) Notch signaling. Science 268, 225-32.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. and Lake, R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science 284, 770-6.

Aster, J., Xu, L., Karnell, FG., Patriub, V., Pui, JC., Pear, WS. (2000) Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by Notch1. Mol Cell Biol 20, 7505-15.

**Avalos, B.R. (1996)** Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. Blood 88, 761-77.

Avitahl, N., Winandy, S., Friedrich, C., Jones, B., Ge, Y. and Georgopoulos, K. (1999) Ikaros sets thresholds for T cell activation and regulates chromosome propagation. Immunity 10, 333-43.

Azzam, H.S., DeJarnette, J.B., Huang, K., Emmons, R., Park, C.S., Sommers, C.L., El-Khoury, D., Shores, E.W. and Love, P.E. (2001) Fine tuning of TCR signaling by CD5. J Immunol 166, 5464-72.

Azzam, H.S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E.W. and Love, P.E. (1998) CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. J Exp Med 188, 2301-11.

Backstrom, B.T., Muller, U., Hausmann, B. and Palmer, E. (1998) Positive selection through a motif in the  $\alpha\beta$  T cell receptor. Science 281, 835-8.

Bain, G., Engel, I., Robanus Maandag, E.C., te Riele, H.P., Voland, J.R., Sharp, L.L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D. and Murre, C. (1997) E2A deficiency leads to abnormalities in  $\alpha\beta$  T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. Mol Cell Biol 17, 4782-91.

**Bazan, J.F. (1989)** A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. Biochem Biophys Res Commun 164, 788-95.

Bellavia, D., Campese, A.F., Alesse, E., Vacca, A., Felli, M.P., Balestri, A., Stoppacciaro, A., Tiveron, C., Tatangelo, L., Giovarelli, M., Gaetano, C., Ruco, L., Hoffman, E.S., Hayday, A.C., Lendahl, U., Frati, L., Gulino, A. and Screpanti, I. (2000) Constitutive activation of NF-κB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. Embo J 19, 3337-48.

Bellavia, D., Campese, A.F., Checquolo, S., Balestri, A., Biondi, A., Cazzaniga, G., Lendahl, U., Fehling, H.J., Hayday, A.C., Frati, L., von Boehmer, H., Gulino, A. and Screpanti, I. (2002) Combined expression of pTα and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 3788-93. Berg, L.J., Pullen, A.M., Fazekas de St Groth, B., Mathis, D., Benoist, C. and Davis, M.M. (1989) Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. Cell 58, 1035-46.

**Berger, M.A., Dave, V., Rhodes, M.R., Bosma, G.C., Bosma, M.J., Kappes, D.J. and Wiest, D.L. (1997)** Subunit composition of pre-T cell receptor complexes expressed by primary thymocytes: CD3ð is physically associated but not functionally required. J Exp Med 186, 1461-7.

**Beverly, L.J. and Capobianco, A.J. (2003)** Perturbation of Ikaros isoform selection by MLV integration is a cooperative event in Notch(IC)-induced T cell leukemogenesis. Cancer Cell 3, 551-64.

Bober, L.A., Grace, M.J., Pugliese-Sivo, C., Rojas-Triana, A., Waters, T., Sullivan, L.M. and Narula, S.K. (1995) The effect of GM-CSF and G-CSF on human neutrophil function. Immunopharmacology 29, 111-9.

**Borgulya, P., Kishi, H., Muller, U., Kirberg, J. and von Boehmer, H. (1991)** Development of the CD4 and CD8 lineage of T cells: instruction versus selection. Embo J 10, 913-8.

Borregaard, N. and Cowland, J.B. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood 89, 3503-21.

**Brandle, D., Muller, C., Rulicke, T., Hengartner, H. and Pircher, H. (1992)** Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 9529-33.

**Brown, K.E., Baxter, J., Graf, D., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G. (1999)** Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. Mol Cell 3, 207-17.

**Brown, K.E., Guest, S.S., Smale, S.T., Hahm, K., Merkenschlager, M. and Fisher, A.G.** (1997) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. Cell 91, 845-54.

**Burgess, A.W. and Metcalf, D. (1980)** The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. Blood 56, 947-58.

Bush, G., diSibio, G., Miyamoto, A., Denault, J.B., Leduc, R. and Weinmaster, G. (2001) Ligand-induced signaling in the absence of furin processing of Notch1. Dev Biol 229, 494-502.

Campbell, K.S., Buder, A. and Deuschle, U. (1995) Interactions between the aminoterminal domain of p56lck and cytoplasmic domains of CD4 and CD8 alpha in yeast. Eur J Immunol 25, 2408-12. **Carrasco, D., Rizzo, C.A., Dorfman, K. and Bravo, R. (1996)** The v-rel oncogene promotes malignant T-cell leukemia/lymphoma in transgenic mice. Embo J 15, 3640-50.

**Carulli, G. (1997)** Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on neutrophil phenotype and functions. Haematologica 82, 606-16.

**Casanova, J.L., Romero, P., Widmann, C., Kourilsky, P. and Maryanski, J.L. (1991)** T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a Plasmodium berghei nonapeptide: implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. J Exp Med 174, 1371-83.

Chan, S.H., Cosgrove, D., Waltzinger, C., Benoist, C. and Mathis, D. (1993) Another view of the selective model of thymocyte selection. Cell 73, 225-36.

**Chang, J.M., Metcalf, D., Gonda, T.J. and Johnson, G.R.** (1989) Long-term exposure to retrovirally expressed granulocyte-colony-stimulating factor induces a nonneoplastic granulocytic and progenitor cell hyperplasia without tissue damage in mice. J Clin Invest 84, 1488-96.

Chen, H.M., Zhang, P., Voso, M.T., Hohaus, S., Gonzalez, D.A., Glass, C.K., Zhang, D.E. and Tenen, D.G. (1995) Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. Blood 85, 2918-28.

Cheng, A.M., Negishi, I., Anderson, S.J., Chan, A.C., Bolen, J., Loh, D.Y. and Pawson, T. (1997) The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 9797-801.

Clements, J.L., Yang, B., Ross-Barta, S.E., Eliason, S.L., Hrstka, R.F., Williamson, R.A. and Koretzky, G.A. (1998) Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. Science 281, 416-9.

**Cobb, B.S., Morales-Alcelay, S., Kleiger, G., Brown, K.E., Fisher, A.G. and Smale, S.T.** (2000) Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. Genes Dev 14, 2146-60.

Cosman, D. (1993) The hematopoietin receptor superfamily. Cytokine 5, 95-106.

Dave, V.P., Cao, Z., Browne, C., Alarcon, B., Fernandez-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S. and Kappes, D.J. (1997) CD38 deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. Embo J 16, 1360-70.

de Haas M, K.J., van der Schoot CE, Calafat J, Hack CE, Nuijens JH, Roos D, van Oers RH, von dem Borne AE. Related Articles, Links (1994) Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. Blood 84, 3885-94.

Dedera, D.A., Waller, E.K., LeBrun, D.P., Sen-Majumdar, A., Stevens, M.E., Barsh, G.S. and Cleary, M.L. (1993) Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice. Cell 74, 833-43.

**Deftos, M.L., He, Y.W., Ojala, E.W. and Bevan, M.J.** (1998) Correlating notch signaling with thymocyte maturation. Immunity 9, 777-86.

**Deftos, M.L., Huang, E., Ojala, E.W., Forbush, K.A. and Bevan, M.J. (2000)** Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. Immunity 13, 73-84.

**Doerfler, P., Shearman, M.S. and Perlmutter, R.M. (2001)** Presenilin-dependent gammasecretase activity modulates thymocyte development. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 9312-7.

Dumortier, A., Kirstetter, P., Kastner, P. and Chan, S. (2003) Ikaros regulates neutrophil differentiation. Blood 101, 2219-26.

**Dustin, M.L. and Cooper, J.A. (2000)** The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. Nat Immunol 1, 23-9.

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 14863-8.

Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D. and Sklar, J. (1991) TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell 66, 649-61.

Ernst, P., Hahm, K., Trinh, L., Davis, J.N., Roussel, M.F., Turck, C.W. and Smale, S.T. (1996) A potential role for Elf-1 in terminal transferase gene regulation. Mol Cell Biol 16, 6121-31.

**Esslinger, C.W., Wilson, A., Sordat, B., Beermann, F. and Jongeneel, C.V. (1997)** Abnormal T lymphocyte development induced by targeted overexpression of IkappaB alpha. J Immunol 158, 5075-8.

Fehling, H.J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C. and von Boehmer, H. (1995) Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of  $\alpha\beta$  but not  $\gamma\delta$  T cells. Nature 375, 795-8.

**Feldman, B.J., Hampton, T. and Cleary, M.L. (2000)** A carboxy-terminal deletion mutant of Notch1 accelerates lymphoid oncogenesis in E2A-PBX1 transgenic mice. Blood 96, 1906-13.

Felli, M.P., Maroder, M., Mitsiadis, T.A., Campese, A.F., Bellavia, D., Vacca, A., Mann, R.S., Frati, L., Lendahl, U., Gulino, A. and Screpanti, I. (1999) Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. Int Immunol 11, 1017-25.

Fleming, T.J., Fleming, M.L. and Malek, T.R. (1993a) Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. J Immunol 151, 2399-408.

Fleming, T.J., O'HUigin, C. and Malek, T.R. (1993b) Characterization of two novel Ly-6 genes. Protein sequence and potential structural similarity to alpha-bungarotoxin and other neurotoxins. J Immunol 150, 5379-90.

**Fortini, M.E. (2001)** Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. Curr Opin Cell Biol 13, 627-34.

**Fowlkes, B.J. and Robey, E.A. (2002)** A reassessment of the effect of activated Notch1 on CD4 and CD8 T cell development. J Immunol 169, 1817-21.

**Fryer, C.J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C. and Jones, K.A. (2002)** Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. Genes Dev 16, 1397-411.

Galy, A., Travis, M., Cen, D. and Chen, B. (1995) Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. Immunity 3, 459-73.

Gardie, B., Cayuela, J.M., Martini, S. and Sigaux, F. (1998) Genomic alterations of the p19ARF encoding exons in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 91, 1016-20.

Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H. and Jaenisch, R. (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. Science 300, 489-92.

Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S. and Sharpe, A. (1994) The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. Cell 79, 143-56.

Georgopoulos, K., Moore, D.D. and Derfler, B. (1992) Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. Science 258, 808-12.

Georgopoulos, K., Winandy, S. and Avitahl, N. (1997) The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. Annu Rev Immunol 15, 155-76.

Gilfillan, S., Waltzinger, C., Benoist, C. and Mathis, D. (1994) More efficient positive selection of thymocytes in mice lacking terminal deoxynucleotidyl transferase. Int Immunol 6, 1681-6.

Girard, L., Hanna, Z., Beaulieu, N., Hoemann, C.D., Simard, C., Kozak, C.A. and Jolicoeur, P. (1996) Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. Genes Dev 10, 1930-44.

Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T. and Zlotnik, A. (1993) A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. J Immunol 150, 4244-52.

Gounari, F., Aifantis, I., Martin, C., Fehling, H.J., Hoeflinger, S., Leder, P., von Boehmer, H. and Reizis, B. (2002) Tracing lymphopoiesis with the aid of a pT $\alpha$ -controlled reporter gene. Nat Immunol 3, 489-96.

Hadland, B.K., Manley, N.R., Su, D., Longmore, G.D., Moore, C.L., Wolfe, M.S., Schroeter, E.H. and Kopan, R. (2001)  $\gamma$  -secretase inhibitors repress thymocyte development. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 7487-91.

Hahm, K., Cobb, B.S., McCarty, A.S., Brown, K.E., Klug, C.A., Lee, R., Akashi, K., Weissman, I.L., Fisher, A.G. and Smale, S.T. (1998) Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. Genes Dev 12, 782-96.

Hahm, K., Ernst, P., Lo, K., Kim, G.S., Turck, C. and Smale, S.T. (1994) The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. Mol Cell Biol 14, 7111-23.

Hahm, K., Ernst, P., Lo, K., Kim, G.S., Turck, C. and Smale, S.T. (1994) The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. Mol Cell Biol 14, 7111-23.

Haks, M.C., Belkowski, S.M., Ciofani, M., Rhodes, M., Lefebvre, J.M., Trop, S., Hugo, P., Zuniga-Pflucker, J.C. and Wiest, D.L. (2003) Low activation threshold as a mechanism for ligand-independent signaling in pre-T cells. J Immunol 170, 2853-61.

Haks, M.C., Krimpenfort, P., Borst, J. and Kruisbeek, A.M. (1998) The CD3 $\gamma$  chain is essential for development of both the TCR $\alpha\beta$  and TCR $\gamma\delta$  lineages. Embo J 17, 1871-82.

Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K. and Honjo, T. (2002) Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. Int Immunol 14, 637-45.

Harker, N., Naito, T., Cortes, M., Hostert, A., Hirschberg, S., Tolaini, M., Roderick, K., Georgopoulos, K. and Kioussis, D. (2002) The CD8α gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins. Mol Cell 10, 1403-15.

Harman, B.C., Jenkinson, E.J. and Anderson, G. (2003) Entry into the thymic microenvironment triggers Notch activation in the earliest migrant T cell progenitors. J Immunol 170, 1299-303.

Hashimoto, K., Sohn, S.J., Levin, S.D., Tada, T., Perlmutter, R.M. and Nakayama, T. (1996) Requirement for p56lck tyrosine kinase activation in T cell receptor-mediated thymic selection. J Exp Med 184, 931-43.

Hasserjian, R.P., Aster, J.C., Davi, F., Weinberg, D.S. and Sklar, J. (1996) Modulated expression of Notch1 during thymocyte development. Blood 88, 970-6.

Heath, W.R., Carbone, F.R., Bertolino, P., Kelly, J., Cose, S. and Miller, J.F. (1995) Expression of two T cell receptor  $\alpha$  chains on the surface of normal murine T cells. Eur J Immunol 25, 1617-23.

Hesse, J.E., Lieber, M.R., Mizuuchi, K. and Gellert, M. (1989) V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. Genes Dev 3, 1053-61.

Hestdal, K., Ruscetti, F.W., Ihle, J.N., Jacobsen, S.E., Dubois, C.M., Kopp, W.C., Longo, D.L. and Keller, J.R. (1991) Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. J Immunol 147, 22-8.

Hettmann, T., DiDonato, J., Karin, M. and Leiden, J.M. (1999) An essential role for nuclear factor kappaB in promoting double positive thymocyte apoptosis. J Exp Med 189, 145-58.

**Hettmann, T. and Leiden, J.M. (2000)** NF-κB is required for the positive selection of CD8+ thymocytes. J Immunol 165, 5004-10.

**Hoglund, M., Hakansson, L. and Venge, P. (1997)** Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers. Eur J Haematol 58, 195-202.

Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P. and von Boehmer, H. (1991) Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. Cell 66, 533-40.

Inoue, D., Reid, M., Lum, L., Kratzschmar, J., Weskamp, G., Myung, Y.M., Baron, R. and Blobel, C.P. (1998) Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. J Biol Chem 273, 4180-7.

**Irving, B.A., Alt, F.W. and Killeen, N. (1998)** Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. Science 280, 905-8.

Izon, D.J., Aster, J.C., He, Y., Weng, A., Karnell, F.G., Patriub, V., Xu, L., Bakkour, S., Rodriguez, C., Allman, D. and Pear, W.S. (2002) Deltex1 redirects lymphoid progenitors to the B cell lineage by antagonizing Notch1. Immunity 16, 231-43.

Izon, D.J., Punt, J.A., Xu, L., Karnell, F.G., Allman, D., Myung, P.S., Boerth, N.J., Pui, J.C., Koretzky, G.A. and Pear, W.S. (2001) Notch1 regulates maturation of CD4+ and CD8+ thymocytes by modulating TCR signal strength. Immunity 14, 253-64.

Jaleco, A.C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., Haury, M., Henrique, D. and Parreira, L. (2001) Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. J Exp Med 194, 991-1002.

Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R. and Israel, A. (1995) Signalling downstream of activated mammalian Notch. Nature 377, 355-8.

Jehn, B.M., Bielke, W., Pear, W.S. and Osborne, B.A. (1999) Cutting edge: protective effects of Notch-1 on TCR-induced apoptosis. J Immunol 162, 635-8.

Johnstone, R.W. and Trapani, J.A. (1999) Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins. Mol Cell Biol 19, 5833-8.

Karlsson, A., Soderkvist, P. and Zhuang, S.M. (2002) Point mutations and deletions in the znfn1a1/ikaros gene in chemically induced murine lymphomas. Cancer Res 62, 2650-3.

Kaufmann, C., Yoshida, T., Perotti, E.A., Landhuis, E., Wu, P. and Georgopoulos, K. (2003) A complex network of regulatory elements in Ikaros and their activity during hemolymphopoiesis. Embo J 22, 2211-23.

Kawamata, S., Du, C., Li, K., Lavau, C. (2002) Overexpression of the Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. Oncogene 21, 3855-63.

Kaye, J., Hsu, M.L., Sauron, M.E., Jameson, S.C., Gascoigne, N.R. and Hedrick, S.M. (1989) Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. Nature 341, 746-9.

Kelley, C.M., Ikeda, T., Koipally, J., Avitahl, N., Wu, L., Georgopoulos, K. and Morgan,B.A. (1998) Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. Curr Biol 8, 508-15.

Kim, H.K. and Siu, G. (1998) The notch pathway intermediate HES-1 silences CD4 gene expression. Mol Cell Biol 18, 7166-75.

Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R. and Georgopoulos, K. (1999) Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. Immunity 10, 345-55.

**Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P. and Chan, S. (2002)** Ikaros is critical for B cell differentiation and function. Eur J Immunol 32, 720-30.

Klausner, R.D., Lippincott-Schwartz, J. and Bonifacino, J.S. (1990) The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. Annu Rev Cell Biol 6, 403-31.

Klug, C.A., Morrison, S.J., Masek, M., Hahm, K., Smale, S.T. and Weissman, I.L. (1998) Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 657-62.

Koch, U., Lacombe, T.A., Holland, D., Bowman, J.L., Cohen, B.L., Egan, S.E. and Guidos, C.J. (2001) Subversion of the T/B lineage decision in the thymus by lunatic fringemediated inhibition of Notch-1. Immunity 15, 225-36.

**Koipally, J. and Georgopoulos, K. (2000)** Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. J Biol Chem 275, 19594-602.

Koipally, J., Heller, E.J., Seavitt, J.R. and Georgopoulos, K. (2002) Unconventional potentiation of gene expression by Ikaros. J Biol Chem 277, 13007-15.

Koipally, J., Renold, A., Kim, J. and Georgopoulos, K. (1999) Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. Embo J 18, 3090-100.

Komori, T., Okada, A., Stewart, V. and Alt, F.W. (1993) Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. Science 261, 1171-5.

Kondo, M., Weissman, I.L. and Akashi, K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell 91, 661-72.

Kouskoff, V., Vonesch, J.L., Benoist, C. and Mathis, D. (1995) The influence of positive selection on RAG expression in thymocytes. Eur J Immunol 25, 54-8.

**Kuo, C.T. and Leiden, J.M. (1999)** Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. Annu Rev Immunol 17, 149-87.

Kurisaki, T., Masuda, A., Osumi, N., Nabeshima, Y. and Fujisawa-Sehara, A. (1998) Spatially- and temporally-restricted expression of meltrin  $\alpha$  (ADAM12) and  $\beta$  (ADAM19) in mouse embryo. Mech Dev 73, 211-5.

Lai, E.C. (2002) Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. EMBO Rep 3, 840-5.

Lekstrom-Himes, J.A., Dorman, S.E., Kopar, P., Holland, S.M. and Gallin, J.I. (1999) Neutrophil-specific granule deficiency results from a novel mutation with loss of function of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein ε. J Exp Med 189, 1847-52.

Levelt, C.N., Mombaerts, P., Wang, B., Kohler, H., Tonegawa, S., Eichmann, K. and Terhorst, C. (1995) Regulation of thymocyte development through CD3: functional dissociation between p56lck and CD3 sigma in early thymic selection. Immunity 3, 215-22.

Levin, S.D., Anderson, S.J., Forbush, K.A. and Perlmutter, R.M. (1993) A dominantnegative transgene defines a role for p56lck in thymopoiesis. Embo J 12, 1671-80. Liao, X.C. and Littman, D.R. (1995) Altered T cell receptor signaling and disrupted T cell development in mice lacking Itk. Immunity 3, 757-69.

Lieber, T., Kidd, S. and Young, M.W. (2002) kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. Genes Dev 16, 209-21.

Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S., Zhan, Y.F. and Dunn, A.R. (1994) Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. Blood 84, 1737-46.

Liu, C.P., Ueda, R., She, J., Sancho, J., Wang, B., Weddell, G., Loring, J., Kurahara, C., Dudley, E.C., Hayday, A. and et al. (1993) Abnormal T cell development in CD3-ζ-/mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine. Embo J 12, 4863-75.

Liu, F., Wu, H.Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T. and Link, D.C. (1996) Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. Immunity 5, 491-501.

Liu, Z., Smith, SW., McLaughlin, KA., Schwartz, LM., Osborne, BA. (1994) Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. Nature 367, 281-4.

Lo, K., Landau, N.R. and Smale, S.T. (1991) LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes. Mol Cell Biol 11, 5229-43.

Love, P.E., Shores, E.W., Johnson, M.D., Tremblay, M.L., Lee, E.J., Grinberg, A., Huang, S.P., Singer, A. and Westphal, H. (1993) T cell development in mice that lack the  $\zeta$  chain of the T cell antigen receptor complex. Science 261, 918-21.

Lucas, B., Vasseur, F. and Penit, C. (1993) Normal sequence of phenotypic transitions in one cohort of 5-bromo-2'-deoxyuridine-pulse-labeled thymocytes. Correlation with T cell receptor expression. J Immunol 151, 4574-82.

Luo, B., Aster, JC., Hasserjian, RP., Kuo, F., Sklar, J. (1997) Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. Mol Cell Biol 17, 6057-67.

**MacDonald, H.R., Budd, R.C. and Howe, R.C. (1988)** A CD3- subset of CD4-8+ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of CD4+8+ cells. Eur J Immunol 18, 519-23.

Malissen, M., Gillet, A., Ardouin, L., Bouvier, G., Trucy, J., Ferrier, P., Vivier, E. and Malissen, B. (1995) Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3ε gene. Embo J 14, 4641-53.

Manz, M.G., Miyamoto, T., Akashi, K. and Weissman, I.L. (2002) Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 11872-7.

Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L. and Akashi, K. (2001) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. Blood 97, 3333-41.

Martin, C.H., Aifantis, I., Scimone, M.L., von Andrian, U.H., Reizis, B., von Boehmer, H. and Gounari, F. (2003) Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. Nat Immunol 4, 866-73.

Matechak, E.O., Killeen, N., Hedrick, S.M. and Fowlkes, B.J. (1996) MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. Immunity 4, 337-47.

Matsuno, K., Diederich, R.J., Go, M.J., Blaumueller, C.M. and Artavanis-Tsakonas, S. (1995) Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. Development 121, 2633-44.

McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J. and Maki, R.A. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. Embo J 15, 5647-58.

Michie, A.M., Soh, J.W., Hawley, R.G., Weinstein, I.B. and Zuniga-Pflucker, J.C. (2001) Allelic exclusion and differentiation by protein kinase C-mediated signals in immature thymocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 609-14.

Molnar, A. and Georgopoulos, K. (1994) The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. Mol Cell Biol 14, 8292-303.

Molnar, A., Wu, P., Largespada, D.A., Vortkamp, A., Scherer, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Bruns, G. and Georgopoulos, K. (1996) The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. J Immunol 156, 585-92.

Mombaerts, P., Clarke, A.R., Rudnicki, M.A., Iacomini, J., Itohara, S., Lafaille, J.J., Wang, L., Ichikawa, Y., Jaenisch, R., Hooper, M.L. and et al. (1992) Mutations in T-cell antigen receptor genes  $\alpha$  and  $\beta$  block thymocyte development at different stages. Nature 360, 225-31.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S. and Papaioannou, V.E. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. Cell 68, 869-77.

Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S. and Georgopoulos, K. (1997) Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. Embo J 16, 2004-13.

Morrison, S.J., Uchida, N. and Weissman, I.L. (1995) The biology of hematopoietic stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol 11, 35-71.

Nakase, K., Ishimaru, F., Avitahl, N., Dansako, H., Matsuo, K., Fujii, K., Sezaki, N., Nakayama, H., Yano, T., Fukuda, S., Imajoh, K., Takeuchi, M., Miyata, A., Hara, M., Yasukawa, M., Takahashi, I., Taguchi, H., Matsue, K., Nakao, S., Niho, Y., Takenaka, K., Shinagawa, K., Ikeda, K., Niiya, K. and Harada, M. (2000) Dominant negative isoform of the Ikaros gene in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res 60, 4062-5.

Negishi, I., Motoyama, N., Nakayama, K., Senju, S., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Chan, A.C. and Loh, D.Y. (1995) Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. Nature 376, 435-8.

Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C. and Georgopoulos, K. (1999) Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. J Exp Med 190, 1201-14.

Nishii, K., Katayama, N., Miwa, H., Shikami, M., Usui, E., Masuya, M., Araki, H., Lorenzo, F., Ogawa, T., Kyo, T., Nasu, K., Shiku, H. and Kita, K. (2002) Non-DNAbinding Ikaros isoform gene expressed in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 16, 1285-92.

Notarangelo, L.D., Villa, A. and Schwarz, K. (1999) RAG and RAG defects. Curr Opin Immunol 11, 435-42.

O'Neill, D.W., Schoetz, S.S., Lopez, R.A., Castle, M., Rabinowitz, L., Shor, E., Krawchuk, D., Goll, M.G., Renz, M., Seelig, H.P., Han, S., Seong, R.H., Park, S.D., Agalioti, T., Munshi, N., Thanos, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Bank, A. (2000) An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. Mol Cell Biol 20, 7572-82.

O'Shea, C.C., Crompton, T., Rosewell, I.R., Hayday, A.C. and Owen, M.J. (1996) Raf regulates positive selection. Eur J Immunol 26, 2350-5.

**O'Shea, C.C., Thornell, A.P., Rosewell, I.R., Hayes, B. and Owen, M.J. (1997)** Exit of the pre-TCR from the ER/cis-Golgi is necessary for signaling differentiation, proliferation, and allelic exclusion in immature thymocytes. Immunity 7, 591-9.
Ohashi, P.S., Pircher, H., Burki, K., Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H. (1990) Distinct sequence of negative or positive selection implied by thymocyte T-cell receptor densities. Nature 346, 861-3.

Okano, H., Saito, Y., Miyazawa, T., Shinbo, T., Chou, D., Kosugi, S., Takahashi, Y., Odani, S., Niwa, O. and Kominami, R. (1999) Homozygous deletions and point mutations of the Ikaros gene in γ-ray-induced mouse thymic lymphomas. Oncogene 18, 6677-83.

Olson, M.C., Scott, E.W., Hack, A.A., Su, G.H., Tenen, D.G., Singh, H. and Simon, M.C. (1995) PU. 1 is not essential for early myeloid gene expression but is required for terminal myeloid differentiation. Immunity 3, 703-14.

Oswald, F., Tauber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S. and Schmid, R.M. (2001) p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. Mol Cell Biol 21, 7761-74.

Oukka, M., Ho, I.C., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Grusby, M.J. and Glimcher, L.H. (1998) The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. Immunity 9, 295-304.

Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M. and Lanzavecchia,
A. (1993) Expression of two T cell receptor α chains: dual receptor T cells. Science 262, 4224.

Papathanasiou, P., Perkins, A.C., Cobb, B.S., Ferrini, R., Sridharan, R., Hoyne, G.F., Nelms, K.A., Smale, S.T. and Goodnow, C.C. (2003) Widespread failure of hematolymphoid differentiation caused by a recessive niche-filling allele of the Ikaros transcription factor. Immunity 19, 131-44.

Paquette, Y., Doyon, L., Laperriere, A., Hanna, Z., Ball, J., Sekaly, R.P. and Jolicoeur,
P. (1992) A viral long terminal repeat expressed in CD4+CD8+ precursors is downregulated
in mature peripheral CD4-CD8+ or CD4+CD8- T cells. Mol Cell Biol 12, 3522-30.

**Paterson, D.J. and Williams, A.F. (1987)** An intermediate cell in thymocyte differentiation that expresses CD8 but not CD4 antigen. J Exp Med 166, 1603-8.

**Payne, K.J., Nicolas, J.H., Zhu, J.Y., Barsky, L.W. and Crooks, G.M. (2001)** Cutting edge: predominant expression of a novel Ikaros isoform in normal human hemopoiesis. J Immunol 167, 1867-70.

Pear, W.S., Aster, J.C., Scott, M.L., Hasserjian, R.P., Soffer, B., Sklar, J. and Baltimore,
D. (1996) Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. J Exp Med 183, 2283-91.

**Perdomo, J., Holmes, M., Chong, B. and Crossley, M. (2000)** Eos and pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities. J Biol Chem 275, 38347-54.

Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B. and et al. (1994) Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. J Exp Med 180, 1955-60.

Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C. and Pear, W.S. (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. Immunity 11, 299-308.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R. and Aguet, M. (1999) Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. Immunity 10, 547-58.

**Rajan, L., Broussard, D., Lozano, M., Lee, C.G., Kozak, C.A. and Dudley, J.P. (2000)** The c-myc locus is a common integration site in type B retrovirus-induced T-cell lymphomas. J Virol 74, 2466-71.

**Rayet, B. and Gelinas, C. (1999)** Aberrant rel/NF-κB genes and activity in human cancer. Oncogene 18, 6938-47.

**Reizis, B. and Leder, P. (2002)** Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. Genes Dev 16, 295-300.

Rincon, M., Whitmarsh, A., Yang, D.D., Weiss, L., Derijard, B., Jayaraj, P., Davis, R.J. and Flavell, R.A. (1998) The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. J Exp Med 188, 1817-30.

Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G. and Salmon, P. (1996) An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. Cell 87, 483-92.

**Ronchini, C. and Capobianco, A.J. (2001)** Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). Mol Cell Biol 21, 5925-34.

Saint-Ruf, C., Panigada, M., Azogui, O., Debey, P., von Boehmer, H. and Grassi, F. (2000) Different initiation of pre-TCR and γδ TCR signalling. Nature 406, 524-7.

Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J. and von Boehmer,
H. (1994) Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. Science 266, 120812.

Schaeffer, E.M., Debnath, J., Yap, G., McVicar, D., Liao, X.C., Littman, D.R., Sher, A., Varmus, H.E., Lenardo, M.J. and Schwartzberg, P.L. (1999) Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. Science 284, 638-41.

Schmitt, T.M. and Zuniga-Pflucker, J.C. (2002) Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. Immunity 17, 749-56.

Schmitt, T.M. and Zuniga-Pflucker, J.C. (2002) Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. Immunity 17, 749-56.

Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J. and Singh, H. (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. Science 265, 1573-7.

Scott, L.M., Civin, C.I., Rorth, P. and Friedman, A.D. (1992) A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. Blood 80, 1725-35.

Sha, W.C., Nelson, C.A., Newberry, R.D., Kranz, D.M., Russell, J.H. and Loh, D.Y. (1988) Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. Nature 336, 73-6.

Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Okumoto, M., Shiroishi, T., Clifton, K.H. and Wakana, S. (2000) Radiation-associated loss of heterozygosity at the Znfn1a1 (Ikaros) locus on chromosome 11 in murine thymic lymphomas. Radiat Res 154, 293-300.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M. and et al. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell 68, 855-67.

Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G.J. and Scollay, R. (1990) The generation and fate of thymocytes. Semin Immunol 2, 3-12.

**Shortman, K., Vremec, D. and Egerton, M. (1991)** The kinetics of T cell antigen receptor expression by subgroups of CD4+8+ thymocytes: delineation of CD4+8+3(2+) thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells. J Exp Med 173, 323-32.

Shortman, K., Wilson, A., Egerton, M., Pearse, M. and Scollay, R. (1988) Immature CD4-CD8+ murine thymocytes. Cell Immunol 113, 462-79.

Smith, L.T., Hohaus, S., Gonzalez, D.A., Dziennis, S.E. and Tenen, D.G. (1996) PU.1 (Spi-1) and C/EBP  $\alpha$  regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. Blood 88, 1234-47.

**Sotillos, S., Roch, F. and Campuzano, S. (1997)** The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of Drosophila imaginal discs. Development 124, 4769-79.

**Stacey, D.W.** (2003) Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. Curr Opin Cell Biol 15, 158-63.

Starr, T.K., Jameson, S.C. and Hogquist, K.A. (2003) Positive and negative selection of T cells. Annu Rev Immunol 21, 139-76.

Stewart, M., Cameron, E., Campbell, M., McFarlane, R., Toth, S., Lang, K., Onions, D. and Neil, J.C. (1993) Conditional expression and oncogenicity of c-myc linked to a CD2 gene dominant control region. Int J Cancer 53, 1023-30.

Sugawara, T., Moriguchi, T., Nishida, E. and Takahama, Y. (1998) Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. Immunity 9, 565-74.

Sun, L., Crotty, M.L., Sensel, M., Sather, H., Navara, C., Nachman, J., Steinherz, P.G., Gaynon, P.S., Seibel, N., Mao, C., Vassilev, A., Reaman, G.H. and Uckun, F.M. (1999a) Expression of dominant-negative Ikaros isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Clin Cancer Res 5, 2112-20.

Sun, L., Goodman, P.A., Wood, C.M., Crotty, M.L., Sensel, M., Sather, H., Navara, C., Nachman, J., Steinherz, P.G., Gaynon, P.S., Seibel, N., Vassilev, A., Juran, B.D., Reaman, G.H. and Uckun, F.M. (1999b) Expression of aberrantly spliced oncogenic ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 17, 3753-66.

Sun, L., Heerema, N., Crotty, L., Wu, X., Navara, C., Vassilev, A., Sensel, M., Reaman, G.H. and Uckun, F.M. (1999c) Expression of dominant-negative and mutant isoforms of the antileukemic transcription factor Ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 680-5.

Sun, L., Liu, A. and Georgopoulos, K. (1996) Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. Embo J 15, 5358-69.

Surh, C.D. and Sprent, J. (1994) T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. Nature 372, 100-3.

Swat, W., Shinkai, Y., Cheng, H.L., Davidson, L. and Alt, F.W. (1996) Activated Ras signals differentiation and expansion of CD4+8+ thymocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 4683-7.

Takanashi, M., Yagi, T., Imamura, T., Tabata, Y., Morimoto, A., Hibi, S., Ishii, E. and Imashuku, S. (2002) Expression of the Ikaros gene family in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 117, 525-30.

Talora, C., Campese, A.F., Bellavia, D., Pascucci, M., Checquolo, S., Groppioni, M., Frati, L., Von Boehmer, H., Gulino, A. and Screpanti, I. (2003) Pre-TCR-triggered ERK

signalling-dependent downregulation of E2A activity in Notch3-induced T-cell lymphoma. EMBO Rep 4, 1067-71.

Tautz, D., Lehmann, R., Schnurch, H., Schuh, R., Seifert, E., Kienlin, A., Jones, K and Jäckle, H. (1987) Finger protein of novel structure encoded by hunchback, a second member of the gap clas Drosophila segmentation gens. Nature 327, 383-389.

Teh, H.S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Bluthmann, H. and von Boehmer, H. (1988) Thymic major histocompatibility complex antigens and the  $\alpha\beta$  T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. Nature 335, 229-33.

Tian, S.S., Lamb, P., Seidel, H.M., Stein, R.B. and Rosen, J. (1994) Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor. Blood 84, 1760-4.

Tomita, K., Hattori, M., Nakamura, E., Nakanishi, S., Minato, N. and Kageyama, R. (1999) The bHLH gene Hes1 is essential for expansion of early T cell precursors. Genes Dev 13, 1203-10.

Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. Nature 302, 575-81.

Tourigny, M.R., Mazel, S., Burtrum, D.B. and Petrie, H.T. (1997) T cell receptor (TCR)- $\beta$  gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. J Exp Med 185, 1549-56.

Trinh, L.A., Ferrini, R., Cobb, B.S., Weinmann, A.S., Hahm, K., Ernst, P., Garraway, I.P., Merkenschlager, M. and Smale, S.T. (2001) Down-regulation of TDT transcription in CD4(+)CD8(+) thymocytes by Ikaros proteins in direct competition with an Ets activator. Genes Dev 15, 1817-32.

Ueda, E., Kurebayashi, S., Sakaue, M., Backlund, M., Koller, B. and Jetten, A.M. (2002) High incidence of T-cell lymphomas in mice deficient in the retinoid-related orphan receptor RORγ. Cancer Res 62, 901-9.

Uematsu, Y., Ryser, S., Dembic, Z., Borgulya, P., Krimpenfort, P., Berns, A., von Boehmer, H. and Steinmetz, M. (1988) In transgenic mice the introduced functional T cell receptor  $\beta$  gene prevents expression of endogenous  $\beta$  genes. Cell 52, 831-41.

van Meerwijk, J.P. and Germain, R.N. (1993) Development of mature CD8+ thymocytes: selection rather than instruction? Science 261, 911-5.

Voll, R.E., Jimi, E., Phillips, R.J., Barber, D.F., Rincon, M., Hayday, A.C., Flavell, R.A. and Ghosh, S. (2000) NF- $\kappa$ B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. Immunity 13, 677-89.

**von Boehmer, H. and Fehling, H.J. (1997)** Structure and function of the pre-T cell receptor. Annu Rev Immunol 15, 433-52. von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E. and Murray, R. (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. J Exp Med 181, 1519-26.

Wallace, V.A., Kawai, K., Levelt, C.N., Kishihara, K., Molina, T., Timms, E., Pircher, H., Penninger, J., Ohashi, P.S., Eichmann, K. and et al. (1995) T lymphocyte development in p56lck deficient mice: allelic exclusion of the TcR beta locus is incomplete but thymocyte development is not restored by TCR  $\beta$  or TCR  $\alpha\beta$  transgenes. Eur J Immunol 25, 1312-8.

Wang, J.H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A.H., Bigby, M. and Georgopoulos, K. (1996) Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. Immunity 5, 537-49.

**Wang QF, F.A. (2002)** CCAAT/enhancer-binding proteins are required for granulopoiesis independent of their induction of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. Blood 99, 2276-85.

Wang, X., Scott, E., Sawyers, C.L. and Friedman, A.D. (1999) C/EBPα bypasses granulocyte colony-stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts. Blood 94, 560-71.

Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B.J., Cado, D. and Robey, E. (1997) Notch activity influences the  $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$  T cell lineage decision. Cell 88, 833-43.

Weinmaster, G. (1997) The ins and outs of notch signaling. Mol Cell Neurosci 9, 91-102.

Welte, K., Gabrilove, J., Bronchud, M.H., Platzer, E. and Morstyn, G. (1996) Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. Blood 88, 1907-29.

Weng, A.P., Nam, Y., Wolfe, M.S., Pear, W.S., Griffin, J.D., Blacklow, S.C. and Aster, J.C. (2003) Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of Notch signaling. Mol Cell Biol 23, 655-64.

Wiest, D.L., Yuan, L., Jefferson, J., Benveniste, P., Tsokos, M., Klausner, R.D., Glimcher, L.H., Samelson, L.E. and Singer, A. (1993) Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules. J Exp Med 178, 1701-12.

Wilkinson, H.A., Fitzgerald, K. and Greenwald, I. (1994) Reciprocal changes in expression of the receptor lin-12 and its ligand lag-2 prior to commitment in a C. elegans cell fate decision. Cell 79, 1187-98.

Williams, C.B., Engle, D.L., Kersh, G.J., Michael White, J. and Allen, P.M. (1999) A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex. J Exp Med 189, 1531-44.

Wilson, A., de Villartay, J.P. and MacDonald, H.R. (1996) T cell receptor delta gene rearrangement and T early alpha (TEA) expression in immature  $\alpha\beta$  lineage thymocytes: implications for alpha beta/gamma delta lineage commitment. Immunity 4, 37-45.

Wilson, A., Held, W. and MacDonald, H.R. (1994) Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. J Exp Med 179, 1355-60.

Winandy, S., Wu, L., Wang, J.H. and Georgopoulos, K. (1999) Pre-T cell receptor (TCR) and TCR-controlled checkpoints in T cell differentiation are set by Ikaros. J Exp Med 190, 1039-48.

Winandy, S., Wu, P. and Georgopoulos, K. (1995) A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. Cell 83, 289-99.

Wolfer, A., Bakker, T., Wilson, A., Nicolas, M., Ioannidis, V., Littman, D.R., Lee, P.P., Wilson, C.B., Held, W., MacDonald, H.R. and Radtke, F. (2001) Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. Nat Immunol 2, 235-41.

Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H.R. and Radtke, F. (2002) Inactivation of Notch1 impairs VDJβ rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. Immunity 16, 869-79.

Wu, L., Antica, M., Johnson, G.R., Scollay, R. and Shortman, K. (1991) Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. J Exp Med 174, 1617-27.

Wu, L., Nichogiannopoulou, A., Shortman, K. and Georgopoulos, K. (1997) Cellautonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. Immunity 7, 483-92.

Yamanaka, R., Barlow, C., Lekstrom-Himes, J., Castilla, L.H., Liu, P.P., Eckhaus, M., Decker, T., Wynshaw-Boris, A. and Xanthopoulos, K.G. (1997) Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein ε-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 13187-92.

Yannoutsos, N., Wilson, P., Yu, W., Chen, H.T., Nussenzweig, A., Petrie, H. and Nussenzweig, M.C. (2001) The role of recombination activating gene (RAG) reinduction in thymocyte development in vivo. J Exp Med 194, 471-80.

**Yasutomo, K., Doyle, C., Miele, L., Fuchs, C. and Germain, R.N. (2000)** The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. Nature 404, 506-10.

Zecchini, V., Brennan, K. and Martinez-Arias, A. (1999) An activity of Notch regulates JNK signalling and affects dorsal closure in Drosophila. Curr Biol 9, 460-9.

Zhang, D.E., Zhang, P., Wang, N.D., Hetherington, C.J., Darlington, G.J. and Tenen, D.G. (1997) Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ -deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 569-74.

Zhang, P., Iwama, A., Datta, M.W., Darlington, G.J., Link, D.C. and Tenen, D.G. (1998) Upregulation of interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor receptors by transcription factor CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$ (C/EBP  $\alpha$ ) is critical for granulopoiesis. J Exp Med 188, 1173-84.

Zhang, W., Sommers, C.L., Burshtyn, D.N., Stebbins, C.C., DeJarnette, J.B., Trible, R.P., Grinberg, A., Tsay, H.C., Jacobs, H.M., Kessler, C.M., Long, E.O., Love, P.E. and Samelson, L.E. (1999) Essential role of LAT in T cell development. Immunity 10, 323-32.

**Zlotnik, A. and Moore, T.A. (1995)** Cytokine production and requirements during T-cell development. Curr Opin Immunol 7, 206-13.