



Thèse

Soutenue publiquement le 03 décembre 2007

En vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université Louis Pasteur**

Mention Aspects Moléculaires et

Cellulaires de la Biologie

**Par Eva KLEINMANN**

Analyse du rôle du facteur Ikaros dans la répression du gène cible de Notch, Hes-1, au cours de la différenciation des lymphocytes T.

Membres du jury :

Directeur de thèse : Dr. Philippe KASTNER

Rapporteur interne : Pr. Jean-Louis PASQUALI

Rapporteur externe : Dr. Bruno CANQUE

Rapporteur externe : Dr. Pierre FERRIER

## Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier Susan et Philippe de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et d'avoir su me redonner du courage lorsque les résultats étaient loin d'être concluants.

J'aimerais exprimer ma reconnaissance aux membres de mon jury, le Professeur Jean-Louis PASQUALI, les docteurs Bruno CANQUE et Pierre FERRIER, qui ont accepté d'évaluer mon travail.

Après 4 ans, nos chemins vont se séparer. Je n'oublierais pas les BBQ, Thanksgiving, et la course contre le cancer. Travailler dans une bonne ambiance est toujours profitable. Alors, Robin, ne perd pas ton humour éléphantique, MacLean, I like when you turn red because of our jokes, Patricia tu es une technicienne d'enfer. Je remercie vivement les autres personnes du laboratoire, Alexis, Sabrina, Jonathan, Cai Qi, Peggy, Attila et Ivy. Petite mention particulière à mon binôme AnneSO, merci d'avoir toujours été là ces deux dernières années, dans les pires et les meilleurs moments, d'avoir supporter mes ralleries, mes coups de gueules, relu avec attention ce manuscrit... Ça vaut bien une coupe de champagne aux framboises (Promis Loulou, on ne prendra pas une bouteille de ta cave).

Un grand merci aux membres du labo REINA, Isa, Beena, Sarah, Vincent et Bernardo. Certes, vous avez élargi mes horizons sur le « class-switching ». Mais surtout, Isa, tu es mon exemple de calme. Beena, you have « golden hands ». Good luck.

Merci aux membres passés et présents des labos RIO et WASYLYK pour nos commérages intenses : Anne, Aurélie, Céline, Christian, Christina, Elena, Elisabeth, Emilie, Fabien, François, Gilles, Hélène, Jan, Romu, Samia, Seb, Valérie. Evidemment, je remercie les personnes qui ont permis d'alimenter le contenu de nos conversations. J'espère que leurs oreilles n'ont pas trop sifflées.

Toutes ces personnes avec qui j'ai échangé au détour des couloirs : Nassim, Seb, Romain, Marie, Benjamin, Anne-Laure, Sarah, Sandra, Anne-Sophie, Mariam, Aurélien, Marielle, Poney, David, Goliath, Yann, Johan, Javier, Nico, Constantin et les autres. Nombre d'entre eux sont des compagnons de rédaction.

Je remercie les services communs de l'institut et tout particulièrement la culture cellulaire avec Betty, Patricia, Karine, Noëlle, Aline et Chantal, le service de séquençage avec Serge, le tri cellulaire, dont j'ai été une fervente utilisatrice cette dernière année, avec Jochen et Claudine (hum les bons Bredele), l'animalerie avec Alex, William, Sylvie, la plateforme de microscopie avec Pascal, Didier et Yves. Merci pour votre soutien technique et votre bonne humeur. Merci à Maïté pour sa gentillesse, les chocolats « célébration », et sa disponibilité pour la reliure du manuscrit.

Le sport, le meilleur évacuateur de stress et de tension, en particulier la natation avec Audreyne puis Alain, même si le sport ça tue le corps.

Une petite pensée aussi pour mon ami Ctuluh la petite bête verte sans qui je ne connaîtrais ni Anneke, ni les Chuuls. Je me souviendrai des soirées chuulesques à l'Excalibur avec la bonne humeur de Marco, les planchettes et la Snake Bite.

De plus, même si la musique n'adoucit pas les mœurs : Aaron, Muse, Portishead, Pink Martini, Milù, Syd Matters, Coco Rosie, Björk, ... et j'en oublie, elle m'a aidée durant ces longues heures d'écriture.

Merci Marie Cécile pour ton amitié bavarde et surtout à Réglisse pour le saccage de mon appartement.

Merci Stef et Guillaume pour votre réconfort et votre présence au début de ma thèse quand bien souvent je me sentais très seule.

Céline, je ne t'oublie pas car tu es toujours là pour moi bien que 937,48 km nous séparent.

Merci à tous mes amis, qui sont toujours présents malgré le peu de temps que j'ai eu à leur consacrer ces dernières années : Audrey, Pauline, Guillaume et Angélique, Arnaud, Sylvain, Gaele, Astrid, Marianne, Snajena et Milos.

Je remercie tout particulièrement ma famille : grand-mère Alice, ma sœur Jo, mon frère Max et surtout mes parents qui ont toujours su me soutenir et croire en moi. Ce travail c'est un peu grâce à vous.

Eric, mon mélomane raleur, merci d'avoir su être présent au cours de ces trois années. Je sais que ça n'a pas été facile tous les jours.

# I. INTRODUCTION \_\_\_\_\_ 7

## I. Les différents types de cellules fonctionnelles du système hématopoïétique murin. \_\_\_\_ 10

## II. Le compartiment lymphoïde T. \_\_\_\_\_ 13

II.1	La génération des précurseurs lymphoïdes T dans la moelle osseuse et dans le sang	13
II.2	Les progéniteurs lymphoïdes T dans le thymus.	14
II.2.1.	Les différents marqueurs de la différenciation.	14
II.2.2.	Les différentes étapes de la maturation de thymocytes.	15
II.3	L'engagement vers le lignage T et la voie Notch.	17
II.3.1.	Notch et les progéniteurs.	17
II.3.2.	Notch et l'engagement vers le lignage $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ .	18
II.3.3.	Notch et les ETP.	19
II.3.4.	Notch et la maturation des thymocytes.	19
II.3.5.	Notch et l'engagement vers le lignage CD4 versus CD8.	20

## III. La voie de signalisation Notch. \_\_\_\_\_ 22

III.1	Le récepteur Notch.	22
III.2	Les ligands de Notch.	23
III.3	L'activation de la voie Notch.	24
III.4	CSL (CBF-1, Su(H), Lag-1) ou RBP-Jk.	25
III.5	Les gènes cibles de Notch dans les lymphocytes T.	25
III.5.1.	Hes-1.	26
III.5.2.	pT $\alpha$ .	26
III.5.3.	Meltrin $\beta$ .	26
III.5.4.	Ifi-204.	27
III.5.5.	Nrarp.	27
III.5.6.	Deltex-1.	27
III.5.7.	Lef1.	27
III.5.8.	c-myc.	28
III.6	Les maladies liées à un dysfonctionnement de la voie Notch.	28
III.6.1.	Les maladies génétiques	28
III.6.2.	Les cancers	28
III.6.3.	Les lymphomes T	29

## IV. Le facteur de transcription Ikaros \_\_\_\_\_ 31

IV.1	Identification et caractérisation du facteur de transcription Ikaros	31
IV.2	Ikaros, un gène suppresseur de tumeur impliqué dans les LAL-T.	33
IV.3	Expression, gènes cibles, régulation d'Ikaros.	34
IV.3.1.	L'expression d'Ikaros est essentiellement restreinte au système hématopoïétique.	34
IV.3.2.	Gènes cibles et mécanismes de régulation de la transcription par Ikaros.	34
IV.3.3.	Régulation de l'activité d'Ikaros.	36
IV.4	Régulation du développement hématopoïétique par Ikaros.	37
IV.4.1.	La mutation dominante négative du gène Ikaros (Ik <sup>DN/DN</sup> ) (Georgopoulos et al., 1994).	37
IV.4.2.	La mutation nulle du gène Ikaros (Ik <sup>-/-</sup> ) (Wang et al., 1996).	38
IV.4.3.	La mutation hypomorphe du gène Ikaros (Ik <sup>LL</sup> ) (Kirstetter et al., 2002)	38
IV.4.4.	La mutation Ik <sup>plstc</sup> (plastic) (Papathanasiou et al., 2003)	39

## V. La régulation épigénétique \_\_\_\_\_ 40

V.1	La structure de la chromatine	41
V.2	Les histones et leurs modifications post-traductionnelles.	42
V.3	Les mécanismes épigénétiques impliqués dans le développement des thymocytes	44
V.3.1.	Ikaros et le remodelage de la chromatine.	45
V.3.2.	Méthylation et répression de la transcription dans les lymphocytes	45

V.3.3.	Régulation de la méthylation du TCR.	45
V.3.4.	Régulation du locus Tdt dans les cellules T.	46
V.3.5.	Régulation épigénétique de l'expression de CD4.	47
V.3.6.	Régulation épigénétique de l'expression de CD8.	47
V.4	Les dérégulations épigénétiques et les leucémies.	48
<b>II.</b>	<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>50</b>
<b>I.</b>	<b>Essai gène rapporteur luciférase.</b>	<b>51</b>
<b>II.</b>	<b>Les vecteurs rétroviraux.</b>	<b>51</b>
<b>III.</b>	<b>Culture des lignées cellulaires IkL/L et infections des cellules avec les vecteurs rétroviraux.</b>	<b>52</b>
<b>IV.</b>	<b>Expérience de reconstitution de tumeurs.</b>	<b>52</b>
<b>V.</b>	<b>Immunoprécipitation Chromatinienne.</b>	<b>52</b>
<b>VI.</b>	<b>qPCR ou PCR quantitatives en temps réel.</b>	<b>53</b>
<b>VII.</b>	<b>Gel retard-Supershift.</b>	<b>54</b>
<b>VIII.</b>	<b>Alignement de séquences.</b>	<b>55</b>
<b>IX.</b>	<b>Anticorps et cytométrie en flux.</b>	<b>55</b>
<b>X.</b>	<b>RT-qPCR Ikaros et CSL.</b>	<b>55</b>
<b>XI.</b>	<b>Western blots.</b>	<b>56</b>
<b>XII.</b>	<b>Marquage par Immunofluorescence.</b>	<b>56</b>
<b>XIII.</b>	<b>« Single-cell »</b>	<b>57</b>
<b>III.</b>	<b>Résultats</b>	<b>58</b>
<b>1<sup>ère</sup> partie : L'activation précoce de la voie Notch est un événement majeur du développement de lymphomes thymiques dans les souris Ik<sup>L/L</sup>.</b>		<b>60</b>
I.1	Données publiées	61
I.2	Résultats complémentaires	62
I.3	La répression via Ikaros nécessite un site B intact.	62
I.4	La protéine Ikaros fusionnée au tag HA reconnaît le promoteur Hes-1 dans les lignées T29.	63
<b>2<sup>ème</sup> partie : Détermination du rôle de l'activation de la voie Notch dans le phénotype tumoral Ik<sup>L/L</sup>.</b>		<b>65</b>
II.1	Inhibition de la voie Notch grâce à la forme dominante négative de MAML1.	66
II.2	La réexpression d'Ikaros dans les lignées tumorales Ik <sup>L/L</sup> ne bloque pas la leucémogénèse <i>in vivo</i> .	68
<b>3<sup>ème</sup> partie : Détermination des mécanismes moléculaires de répression des gènes cibles de Notch par Ikaros.</b>		<b>73</b>
III.1	Expériences préliminaires.	74
III.1.1.	Ikaros se lie au promoteur Hes-1 dans les thymocytes.	74
III.1.2.	Données soumises à publication.	74
III.2	Résultats complémentaires.	76
III.2.1.	Ikaros et CSL sont en compétition pour la liaison de Hes-1 <i>in vitro</i> .	76
III.2.2.	CSL n'est pas capable de restaurer l'activité transcriptionnelle après l'inhibition par Ikaros.	77

<b>IV. Discussion et Perspectives</b>	<b>79</b>
<b>1<sup>ère</sup> partie. Le développement de lymphomes T chez les souris <i>Ik<sup>L/L</sup></i>.</b>	<b>81</b>
I.1 Quel est le lien entre la déficience en Ikaros et l'activation de la voie Notch dans les cellules T ?	82
I.2 Notch et la tumorigénèse	83
I.3 Quelles sont les cellules à l'origine de la tumeur chez les souris <i>IkL/L</i> ?	84
I.4 Le lien entre Ikaros et les modifications épigénétiques.	85
<b>2<sup>ème</sup> partie. Ikaros et la régulation de l'état chromatinien dans les cellules T.</b>	<b>86</b>
II.1 Ikaros et les modifications post-traductionnelles de l'histone H3.	87
II.2 Ikaros et HP1.	87
II.3 Ikaros et les complexes Polycomb.	88
<b>3<sup>ème</sup> partie. Ikaros au cours de la différenciation des cellules T : un facteur hautement régulé.</b>	<b>89</b>
III.1 Régulation de l'expression d'Ikaros au cours du développement des cellules T.	90
III.2 Régulation de l'activité d'Ikaros au cours du cycle cellulaire.	91
<b>4<sup>ème</sup> partie. La compétition via Ikaros : un mécanisme plus général ?</b>	<b>93</b>
IV.1 La compétition Ikaros/CSL joue-t-elle un rôle dans d'autres types cellulaires ?	94
IV.1.1. Dans le système hématopoïétique.	94
IV.1.2. Hors du système hématopoïétique.	96
IV.2 Les autres membres de la famille Ikaros peuvent-ils également réguler la voie Notch ?	97
IV.2.1. Aiolos.	98
IV.2.2. Helios.	98
IV.2.3. Eos et Pegasus.	98
IV.3 Ikaros peut-il être en compétition avec d'autres facteurs que Notch ?	99
IV.3.1. NF- $\kappa$ B.	99
IV.3.2. STAT5.	100
IV.3.3. La famille Ets.	101
<b>5<sup>ème</sup> partie. Conclusion : Ikaros, répresseur de la transcription.</b>	<b>102</b>

## Abréviations

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
bHLH	Basic Helix Loop Helix
CAT	Chloramphénicol Acétyl Transférase
CLP	Commun Lymphoïd Progenitor
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMP	Commun Myéloïd Progenitor
CSL	CBF-1 ; SuH ; Lag-1
DN	Double Négatif
DP	Double Positif
ECN	ExtraCellular Notch
EGF	Epidermal Growth Factor
ELP	Early Lymphoïd Prognitor
ETP	Early T cell Progenitor
HAT	Histones Acétyltransférase
HC-PC	HétéroChromatine PériCentromérique
HDAC	Hitones DÉAcétylase Complexe
HSC	Hematopoïetic Stem Cell
LAL-T	Leucémie Aigue Lymphoblastique T
MO	Moelle Osseuse
NCR	Notch Cytokine Response
NIC	Notch IntraCellular
NK	Cellule Natural Killer
NuRD	Nucleosome Remodeling Complex
RAM	RBP-Jk associated molecule
RBP-Jk	Recombining Binding Protein Jk
SP	Simple Positif
TAD	TransActivation Domain
Tc	Lymphocyte T cytotoxiques
TCR	T Cell Receptor
Th	Lymphocyte T helper
WT	Wild Type

# I. INTRODUCTION

# ON

L'hématopoïèse est le processus par lequel une cellule souche autorégénératrice multipotente devient progressivement restreinte en une série de progéniteurs intermédiaires dont le biais de différenciation vers un seul lignage est croissant. Cette série d'évènements cellulaires s'appuie sur des changements au niveau de la signature transcriptionnelle et/ou chromatinienne dans les populations de progéniteurs en cours de développements. L'activité de régulateurs nucléaires est essentielle à ces processus cellulaires et moléculaires, ils régulent les évènements épigénétiques et transcriptionnels qui supportent la plasticité et la différenciation des lignages.

J'ai étudié, au cours de ma thèse, l'implication du gène *Ikaros* dans le développement des cellules T chez la souris. Ce gène code pour un facteur de transcription qui joue un rôle clé dans le contrôle de la transcription au cours de l'engagement et de la différenciation de ce lignage. Mes résultats ont permis de montrer l'interférence, dans les thymocytes, d'Ikaros avec une voie de signalisation importante qui est la voie Notch. De plus, une analyse plus précise de la régulation dynamique d'Ikaros lui confère un rôle important dans la répression de gènes cibles spécifiques durant la différenciation des cellules T dans le thymus. En outre, mon étude confirme qu'Ikaros est un facteur impliqué dans la modification épigénétique des loci qu'il affecte. Par conséquent, afin d'introduire ces données et pouvoir discuter de leur implication, je présenterai le système hématopoïétique, je m'attarderai plus en détail sur le développement des cellules T dans le thymus, l'implication de la voie Notch à ce niveau, et je finirai par une vue non exhaustive des connaissances actuelles sur l'importance des régulations épigénétiques dans le système immunitaire.

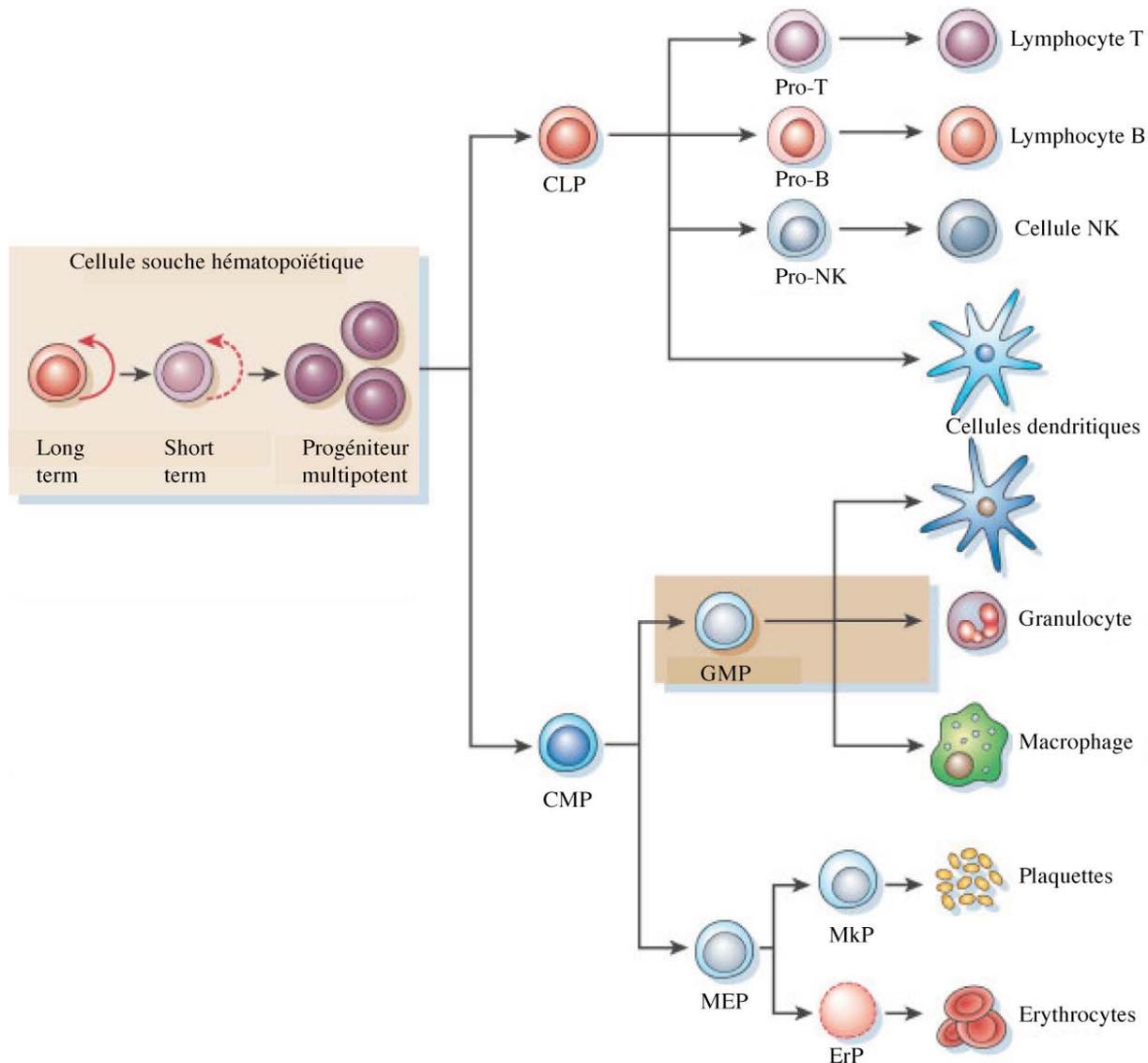
## **I. Les différents types de cellules fonctionnelles du système hématopoïétique murin.**

Le système hématopoïétique des mammifères est en perpétuelle évolution de la vie embryonnaire à la vie adulte. Il est composé de cellules matures spécialisées que l'on peut classer selon divers critères morphologiques et fonctionnels. Ainsi, on distingue deux grands groupes : les cellules possédant une activité immunitaire et les autres.

Tous ces éléments du sang dérivent des mêmes précurseurs pluripotents : les cellules souches hématopoïétiques (HSC) de la moelle osseuse. Ces cellules génèrent d'abord des cellules souches intermédiaires au potentiel plus limité qui sont les progéniteurs directs des lignées érythroïdes, myéloïdes et lymphoïdes. La figure II représente une vue globale communément admise de ce système. Les cellules comme les érythrocytes et les mégacaryocytes ne possédant pas d'activité immunitaire appartiennent au compartiment érythroïde. Les érythrocytes sont les cellules chargées du transport de l'oxygène dans l'ensemble de l'organisme. Les mégacaryocytes sont des cellules polyploïdes géantes qui, par fragmentation cytoplasmique, forment les plaquettes qui sont responsables de l'hémostase (réparation des vaisseaux sanguins). Par opposition à ces deux types cellulaires, toutes les autres cellules du système hématopoïétique possèdent une fonction immunitaire. On y distingue alors trois lignages : les cellules lymphoïdes, myéloïdes et dendritiques.

Le précurseur lymphoïde commun (CLP) donne les lymphocytes. Ce sont les composants de l'immunité adaptative. Il en existe deux types principaux : les lymphocytes B ou cellules B et les lymphocytes T ou cellules T. Les lymphocytes B, une fois activés, se différencient en plasmocytes sécrétant des anticorps. Ils peuvent aussi, lors d'une réaction immunitaire, acquérir un phénotype quiescent et devenir des lymphocytes B mémoire, qui seront réactivés lors d'une infection ultérieure par le même pathogène. Les lymphocytes T sont répartis en deux classes. L'activation du premier groupe conduit à leur différenciation en lymphocytes T cytotoxiques ( $T_c$ ) ou  $T\ CD8^+$ . Ces  $T_c$  éliminent les cellules infectées par des virus ou autres parasites et jouent un rôle dans la lyse des cellules tumorales. Le second groupe se différencie en T « helper » ( $T_h$ ) ou  $T\ CD4^+$  qui sont des cellules activatrices d'autres cellules comme les lymphocytes B et les macrophages. Ils modulent l'action du système immunitaire grâce à un panel de cytokine. Selon le type de pathogène rencontré et de réaction

immunitaire induite, le lymphocyte  $T_h$  va finir de se différencier en  $T_{h1}$  ou  $T_{h2}$  et sécréter un cocktail de cytokines spécifiques. Les cellules NK (« natural killer ») sont considérées comme des lymphocytes. Elles participent notamment à la réponse immunitaire innée contre les virus et comme les  $T_c$  jouent un rôle important dans l'élimination des cellules tumorales.



**Figure I1 : Le système hématopoïétique**

Modèle présentant la différenciation des principales cellules hématopoïétiques produites à partir des cellules souches et progéniteurs. L'engagement séquentiel des progéniteurs multipotents en progéniteurs lymphoïdes (CLP) et myéloïdes (CMP) n'est qu'une hypothèse adaptée de la représentation des diverses cellules du système hématopoïétique. cellule NK : cellule "natural killer".

Le progéniteur myéloïde (CMP) est le précurseur des granulocytes, macrophages, et de cellules dendritiques. Les cellules myéloïdes, présentes dans la plupart des tissus, jouent un rôle crucial dans l'immunité innée. Les granulocytes sont appelés ainsi car ils contiennent des granules denses dans leur cytoplasme ; ils sont parfois appelés leucocytes polynucléaires à

cause de la forme particulière de leurs noyaux. Les granulocytes ont une durée de vie courte, mais lors d'une réponse immune, ils sont produits en quantité croissante et migrent du sang vers les sites d'infection ou d'inflammation. Il en existe trois types : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les neutrophiles éliminent efficacement les pathogènes par phagocytose. Ce sont les composants les plus nombreux et les plus importants de la réponse immune innée. Les éosinophiles semblent être importants dans la défense contre les parasites. Les basophiles se différencient en mastocytes une fois dans les tissus et y libèrent des substances affectant la perméabilité vasculaire. Leur fonction est complémentaire à celle des éosinophiles dans la protection des muqueuses contre les pathogènes bien qu'ils soient surtout connus pour leur action au niveau de la réponse allergique. Les macrophages grâce à leur activité phagocytaire sont très efficaces dans l'élimination de pathogènes. Ils représentent la forme mature des monocytes, qui circulent dans le sang et se différencient en macrophages au cours de leur migration dans les tissus.

Il existe trois sous-types de cellules dendritiques. Les cellules dendritiques dites myéloïdes et les cellules dendritiques lymphoïdes partagent certains marqueurs de surface caractéristiques des cellules myéloïdes et lymphoïdes respectivement. Ces deux types sont spécialisés dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes et jouent un rôle central au cours de la réaction immunitaire. Quand elles sont immatures, elles circulent dans le sang pour atteindre les tissus où elles résident. Elles sont à la fois phagocytaires et macropinocytaires, intégrant une grande quantité de fluide extracellulaire. Lorsqu'elles rencontrent un pathogène, elles viennent rapidement à maturité et migrent vers les ganglions lymphatiques afin d'induire la réponse immunitaire adaptative. Le troisième type est représenté par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, elles ne possèdent pas la même morphologie que les autres cellules dendritiques (absence d'expansion cytoplasmiques ou dendrites). Elles ont été caractérisées comme les principales productrices d'interféron  $\alpha$  et  $\beta$ . Par ce biais, elles participent à la réaction immunitaire contre certaines infections virales et apparaissent comme un lien important entre la réponse innée et adaptative.

## II. Le compartiment lymphoïde T.

Chez les mammifères, le développement des lymphocytes nécessite l'environnement spécialisé des organes lymphoïdes centraux qui sont la moelle osseuse (MO) pour les cellules B et le thymus pour les cellules T. Au stade embryonnaire et jusqu'à 5 semaines après la naissance, l'interaction du stroma thymique avec les CLP induit des signaux qui dirigent l'engagement, la migration, la prolifération et la différenciation des progéniteurs thymiques précoces. Les cellules matures vont peupler les tissus lymphoïdes périphériques (rate, ganglions). Chez la souris adulte, le développement de nouveaux lymphocytes T se maintient par division de cellules T matures en dehors des organes lymphoïdes centraux. Les molécules qui sont impliquées dans la régulation de ces processus impliquent des facteurs de transcription, des cytokines, des chimiokines. D'autre part, l'engagement et le développement du lignage T dans le thymus nécessite la voie de signalisation Notch dont une présentation détaillée suivra.

### II.1 La génération des précurseurs lymphoïdes T dans la moelle osseuse et dans le sang

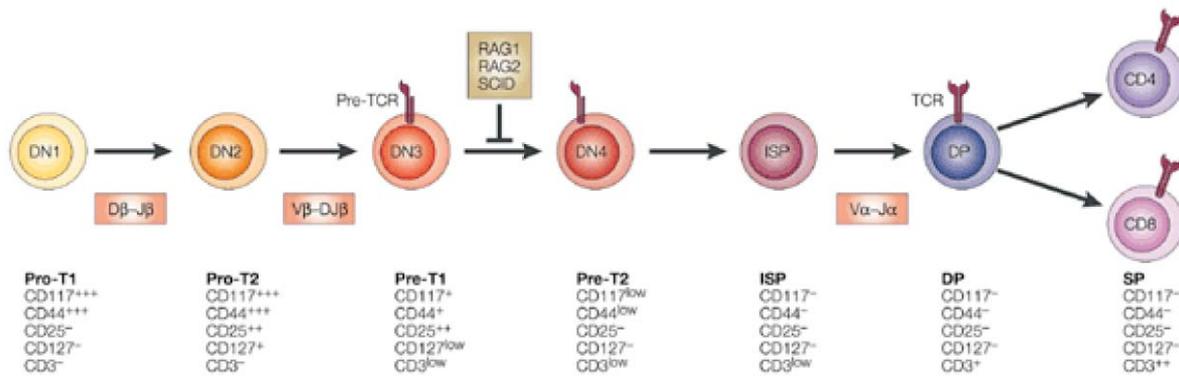
La différenciation des HSC en progéniteurs multi ou oligopotents, qui vont eux même engendrer des précurseurs lignage spécifique, est à l'origine des précurseurs lymphoïdes T. Dans la MO de souris adultes, il semble possible de séparer, les précurseurs engagés vers un lignage hématopoïétique, en sous-populations, en fonction de leur stade de différenciation par rapport aux HSC les plus primitives et ce grâce à divers marqueurs de surface. D'après la revue de Wu (Wu, 2006), la population de précurseurs émergeant directement des HSCs est définie par les marqueurs  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^{\text{hi}} \text{c-kit}^{\text{hi}}$  ou LSK. Elle va être à l'origine des précurseurs lymphoïdes précoces (ELP) caractérisés par les marqueurs de surface  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^{\text{c}} \text{c-kit}^{\text{c}} \text{Flt3}^{\text{c}} \text{CD27}^{\text{c}} \text{IL-7R}\alpha^{\text{c}}$  (Medina et al., 2001) aussi bien dans la MO que dans la circulation sanguine. Ces deux types de précurseurs très immatures semblent être ceux qui vont aller coloniser le thymus. Dans la MO, les ELPs se différencient en précurseur lymphoïde commun (CLP). Ces cellules sont  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^{\text{lo}} \text{c-kit}^{\text{lo}} \text{IL-7R}\alpha^{\text{c}}$  (Kondo et al., 1997) et sont capables de coloniser efficacement le thymus de souris irradiées. Elles possèdent toujours un potentiel de lignage T bien qu'on ne les retrouve pas naturellement dans la circulation sanguine.

## **II.2 Les progéniteurs lymphoïdes T dans le thymus.**

Les précurseurs thymiques migrent périodiquement de la MO vers le thymus par voie sanguine (Donskoy et al., 2003; Foss et al., 2001). La P-sélectine exprimée par les précurseurs circulants et son ligand PSGL-1 semblent jouer un rôle dans le recrutement des progéniteurs vers les niches du thymus. Dans le cortex extérieur, ils font proliférer activement avant d'effectuer leurs premières étapes de différenciation en contact avec les cellules épithéliales stromales spécialisées afin de donner toutes les populations thymiques qui deviendront actives dans la périphérie.

### **II.2.1. Les différents marqueurs de la différenciation.**

La différenciation des lymphocytes T est phénotypiquement assez bien caractérisée. Les étapes successives du développement des thymocytes ont lieu dans le thymus et se traduisent par des changements d'activité des gènes et du récepteur de la cellule T ainsi que de l'expression des protéines de surface cellulaire, comme le complexe CD3 et les protéines coréceptrices CD4 et CD8 (cf. Figure I2). Ces changements reflètent l'état de maturation fonctionnel de la cellule. Ce processus permet de générer des cellules T exprimant un récepteur des cellules T (ou TCR) avec une spécificité unique. Les deux lignées de cellules T,  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  sont produites tôt au cours du développement. Elles diffèrent par leur type de récepteur T. Par la suite, les cellules T  $\alpha\beta$  se développent en deux sous-populations distinctes, les cellules T CD4 et T CD8. Deux nomenclatures ont été proposées pour caractériser les différentes étapes du développement des cellules T, l'une calquée sur l'une des nomenclatures des cellules B (Rolink et al., 1994), l'autre basée sur l'expression des marqueurs de surface (Ceredig and Cummings, 1983; Godfrey and Zlotnik, 1993). Lors de mon étude, c'est cette dernière que j'ai utilisée. Les différentes étapes de différenciation lymphoïde T dans le thymus, ainsi que les marqueurs spécifiques de ces stades de différenciation sont décrits dans la figure I2.



**Figure I2 : Les différents stades de différenciation des thymocytes.**

Les rectangles oranges montrent les étapes de réarrangements des gènes. L'expression des marqueurs de surfaces est mentionnée sous chaque stade de développement. DN : double positive ; ISP : immature single positive ; DP : double positif ; RAG : recombination-activating gene ; SCID severe combined immunodeficiency ; TCR : T-cell receptor.

## II.2.2. Les différentes étapes de la maturation de thymocytes.

### II.2.2.a. Le stade « double négatif » ou DN.

Quand les progéniteurs de la MO entrent dans le thymus, ils n'expriment aucun marqueur de surface caractéristique des cellules T matures et les gènes de leur récepteur ne sont pas réarrangés. Ces cellules donnent naissance à une population majoritaire et minoritaire, respectivement les cellules T $\alpha\beta$  et les cellules T $\gamma\delta$ . Les interactions avec le stroma thymique déclenchent une phase initiale de différenciation de la lignée T suivie par une prolifération cellulaire, et l'expression des premières molécules de surface spécifiques des cellules T (Th-1 par exemple). A la fin de cette phase, les thymocytes portent des marqueurs distinctifs de la lignée T, mais ils n'expriment ni le complexe récepteur T/CD3, ni les corécepteurs CD4 et CD8 qui sont les trois marqueurs de surface qui définissent les cellules T matures. A cause de l'absence de CD4 et de CD8, de telles cellules sont appelées thymocytes « double négatifs » ou DN.

Le stade DN peut-être subdivisé en 4 stades suivant l'expression de la molécule d'adhérence CD44, la chaîne du récepteur de l'IL-2 (CD25), et c-Kit, qui est le récepteur pour la cytokine hématopoïétique appelé facteur de cellules souches. Les précurseurs intrathymiques les plus immatures et possédant le plus de potentiel prolifératif sont les DN1. Ils expriment c-Kit et CD44 mais pas CD25. Dans ces cellules, les gènes codant pour les deux

chaînes du récepteur de la cellule T sont dans la configuration germinale (Ceredig and Rolink, 2002; Porritt et al., 2004). Ensuite au stade DN2, les thymocytes commencent à exprimer CD25 à leur surface, ainsi que de nombreux gènes spécifiques au lignage T. Cependant, bien que le complexe Rag1-Rag2 recombinaise soit faiblement exprimé, peu de recombinaisons du TCR sont observées. Les cellules prolifèrent intensivement aux stades DN1 et DN2, cette prolifération est stoppée au stade DN3. A ce stade, l'expression de c-Kit et CD44 diminue. C'est dans cette sous-population CD44<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup> que s'achève le réarrangement des loci des chaînes  $\beta$ , ou  $\gamma$  et  $\delta$  du récepteur de la cellule T. Bien que les cellules DN3 expriment certains gènes caractéristiques des stades immatures, elles expriment également tous les gènes requis pour la signalisation des cellules T. Les cellules qui n'aboutissent pas à un réarrangement productif des loci  $\beta$  ou  $\gamma\delta$  restent au stade CD44<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup> et meurent rapidement, tandis que les cellules qui réalisent des réarrangement de gènes perdent à nouveau l'expression de CD25.

Les cellules exprimant le pre-TCR $\alpha\beta$  vont continuer leur différenciation vers le stade DP du lignage  $\alpha\beta$ . Au contraire, les cellules possédant un TCR $\gamma\delta$  vont devenir des cellules fonctionnelles qui produiront des cytokines de façon TCR-dépendante.

### ***II.2.2.b. Le stade « double positif » ou DP.***

Les chaînes  $\beta$  exprimées par les cellules CD44<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup> s'apparient avec une chaîne substitutive appelée pT $\alpha$ , qui leur permet d'assembler un récepteur de cellule pré-T à la surface cellulaire sous forme d'un complexe avec des molécules CD3, assurant ainsi la signalisation du récepteur des cellules T. La formation du complexe du récepteur CD3/pré-T conduit à la prolifération cellulaire, à l'arrêt de nouveaux réarrangements de gènes de chaîne  $\beta$ , et à l'expression des gènes *CD4* et *CD8*. Les cellules exprimant les deux marqueurs CD4 et CD8 sont appelées cellules « double positives ». Elles constituent la vaste majorité des thymocytes présents dans le thymus. Ces cellules, après avoir proliféré, vont réarranger le locus de la chaîne  $\alpha$ . Les DP qui auront un récepteur T $\alpha\beta$  capable de reconnaître les molécules de CMH du soi, vont être sélectionnées de manière positive, ce qui conduira à la maturation et à l'expression de hauts taux de récepteur de cellule T. Parallèlement, elles cessent d'exprimer une des deux molécules coréceptrices, devenant des thymocytes « simple

positifs » ou SP, de lignage CD4 ou CD8. Vient alors la sélection négative des cellules capables de reconnaître les antigènes du soi.

### **II.3 L'engagement vers le lignage T et la voie Notch.**

L'engagement vers le développement du lignage T a lieu après l'entrée des précurseurs colonisateurs dans le thymus. L'une des voies de signalisation majeure requise pour l'engagement vers le lignage T est l'activation de la voie Notch. Son mécanisme d'action est décrit plus en détail dans le chapitre suivant (cf. Introduction III).

Au coté de Notch, les facteurs de transcription GATA3, TCF-1, Stat-5 ainsi que pT $\alpha$  sont des molécules jouant un rôle primordial dans le contrôle de l'engagement et du développement des cellules T. Cependant, leur interaction avec la voie Notch n'est pas clairement défini.

#### **II.3.1. Notch et les progéniteurs.**

Les cellules T se développent dans le thymus à partir d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP) aux cellules T et B. Les études de gain et de perte de fonction de la voie Notch ont montré que Notch1 exerce une influence critique dans l'orientation des CLP vers le lignage B ou le lignage T. L'inactivation spécifique des gènes Notch-1 ou CSL dans les cellules précurseurs de la MO de souris adultes, grâce à une cre-recombinase inductible, conduit à l'arrêt prématuré du développement des lymphocytes T au stade DN1 et à l'apparition ectopique d'une population de cellules B dans le thymus (Han et al., 2002; Radtke et al., 1999). L'absence de cellules T n'est pas due à un problème de « homing » (Wilson et al., 2001). Des résultats semblables ont été obtenus en surexprimant de façon ectopique Lunatic Fringe, un régulateur du signal de Notch-1, dans les thymocytes (Koch et al., 2001). Ces études bloquant la voie de signalisation Notch ont permis de mettre en évidence que la voie de signalisation Notch est nécessaire au développement précoce des lymphocytes T. Le fait du développement par défaut de cellules B, plutôt que de cellules T, dans ce type de souris et le fait que les ligands de Notch soient exprimés par les cellules

épithéliales du thymus (Anderson et al., 2001; Felli et al., 1999; Kaneta et al., 2000; Schmitt et al., 2004) confortent l'idée que la signalisation par Notch joue un rôle crucial dans la détermination du lignage pour les précurseurs possédant le double potentiel T-B entrant dans le thymus. A l'inverse, l'expression rétrovirale de la forme constitutivement active de Notch-1, dans les progéniteurs de la MO, induit l'arrêt du développement des lymphocytes B et le développement ectopique de cellules T immatures dans la MO (Pui et al., 1999). Par ailleurs, la culture de progéniteurs hématopoïétiques multipotents sur des cellules stromales exprimant le ligand de Notch Delta-like1 (OP9-D11) inhibe le développement de cellules B au profit du développement de cellules T (Jaleco et al., 2001 2002, Hozumi, 2004, Schmitt, 2004).

Des expériences de transplantation ont montré que l'orientation du lignage T versus B a lieu avant le stade des ETP. Même une faible activité de Notch suffit à inhiber la différenciation ectopique de cellules B, tandis que la génération des ETP requiert une forte activité Notch (Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2005; Tan et al., 2005). Cependant, la controverse de savoir si l'engagement vers le lignage T a lieu avant ou après l'entrée dans le thymus persiste. Les fonctions des produits du gène E2A sont indispensables à la différenciation des cellules B (Ordentlich et al., 1998), et la surexpression de Hes1 bloque partiellement le développement de cellules B à partir des HSC (Hoebeke et al., 2006). Bien que le stade auquel l'engagement vers lignage T versus B ne soit pas clairement défini, toutes les analogies de fonctions entre les protéines de mammifères et celles de la drosophile laissent à penser que la signalisation Notch est le signal inducteur de la détermination cellulaire du lignage T sur les précurseurs T-B bipotents et que simultanément elle inhibe l'engagement vers le lignage B induit par E2A.

### **II.3.2. Notch et l'engagement vers le lignage $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ .**

La signalisation par Notch peut induire le choix cellulaire dans les neurones (Morrison et al., 2000). Le thymus étant le site majeur de maturation et de différenciation des cellules T, le développement de ces cellules semble le système idéal pour l'étude du rôle de la voie Notch au cours de ces processus. Pour cette raison, de nombreuses études se sont attachées à élucider comment Notch régule l'engagement des ETP vers le lignage  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . Il a été suggéré que l'expression du TCR $\gamma\delta$  et du pré-TCR $\alpha\beta$  influençait différenciellement la

capacité des ETP à activer la voie Notch (Washburn et al., 1997). Il semble donc que le développement des cellules T est régulé parallèlement par l'expression et l'activation du récepteur des cellules T et par la voie Notch de manière spécifique tout au long du processus de différenciation.

### **II.3.3. Notch et les ETP.**

Les différents lignages de lymphocytes T sont issus des ETP qui représentent une petite fraction des cellules DN1 du thymus (Bhandoola and Sambandam, 2006; Porritt et al., 2004; Wu et al., 1991). Les ETP exprimant c-Kit prolifèrent activement et se différencient en DN2 puis en DN3. Le réarrangement des gènes du TCR, *TCRb*, *TCRg*, *TCRd* et *Ptcra*, est initié aux stades DN2-DN3 du développement. Ainsi, les cellules DN3-DN4 expriment soit le TCR $\gamma\delta$ , soit le pré-TCR $\alpha\beta$ , et quelques cellules expriment le TCR $\alpha\beta$  à leur surface (Aifantis et al., 2006). La sous-population DN4 est composée de cellules proliférant énormément (Rodewald and Fehling, 1998). Les cellules qui n'expriment pas de TCR à cause d'un réarrangement non productif à l'un des locus meurent rapidement (Mombaerts et al., 1992; Schuler et al., 1986; Shinkai et al., 1992).

### **II.3.4. Notch et la maturation des thymocytes.**

On peut subdiviser le lignage de cellules T $\alpha\beta$  en 4 sous-groupes majeurs sur la base de l'expression des marqueurs CD4 et CD8. La nécessité de l'activation de Notch pour l'engagement de progéniteurs lymphoïdes vers le lignage T est un événement bien établi (Deftos et al., 1998; Hasserjian et al., 1996; Maillard et al., 2005; Radtke et al., 2004). De plus, au cours de la maturation des thymocytes WT lors des transition DN vers DP vers SP, les gènes de la voie Notch sont strictement régulés dans le temps (Deftos et al., 2000; Dumortier et al., 2006). L'inactivation tissu spécifique de Notch-1 au stade DN2, grâce à une cre-recombinase régulée par le promoteur Lck, montre une sévère déficience de développement des cellules T $\alpha\beta$ , due à une altération du réarrangement du TCR $\beta$  et à un blocage partiel de la différenciation au pré-TCR « checkpoint » (Radtke et al., 1999). Des résultats semblables ont été observés lorsque CSL est inactivé au stade DN2 (Tanigaki et al.,

2004). De plus, des études de co-culture, avec des cellules stromales OP9 exprimant le ligand Delta-like1, ont démontré que la signalisation par Notch est un facteur nécessaire à la survie des cellules DN3 exprimant un TCR ou un pré-TCR fonctionnel (Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2002). Ces résultats suggèrent que la signalisation Notch joue un rôle au cours de la sélection  $\beta$ . La voie de signalisation Notch est donc indispensable lors de la transition DN3-DN4, mais n'est pas nécessaire pour le développement ultérieur des thymocytes SP (Tanigaki et al., 2004). Ainsi, la délétion de CSL au stade DP ne perturbe pas la différenciation (Tanigaki et al., 2004). Ces résultats suggèrent un rôle important de Notch lors de la transition DN3/DN4 qui peut être pré-TCR indépendante, et requiert peut-être une interaction entre les membres de la voie Notch et d'autres molécules effectrices. La signalisation intracellulaire induite par Notch pendant la différenciation des thymocytes à ces stades précoces reste encore mal comprise, tout comme les potentielles interactions entre Notch et d'autres facteurs comme E2A, GATA-3, cyclin D3 ou NF- $\kappa$ B (Aifantis et al., 2001; Engel et al., 2001; Pai et al., 2003; Sicinska et al., 2003; Voll et al., 2000).

### **II.3.5. Notch et l'engagement vers le lignage CD4 versus CD8.**

Le rôle de Notch dans l'engagement vers le lignage CD4 versus CD8 a longtemps été sujet à controverse. L'activation constitutive de la voie Notch affecte le développement des thymocytes DP à différents niveaux : différenciation, prolifération, survie (Izon et al., 2001; Robey et al., 1996). Cependant, la délétion conditionnelle de Notch1 au stade DP (Wolfer et al., 2001) n'induit aucun problème de développement des populations SP. Des résultats similaires ont été obtenus chez les souris délétées pour CSL dans les cellules DP (Tanigaki et al., 2004). Ces données suggèrent que la signalisation canonique de Notch via CSL n'est pas un régulateur de l'engagement des cellules vers le lignage CD4 versus le lignage CD8.

L'ensemble de ces données est récapitulé sur la figure I3.

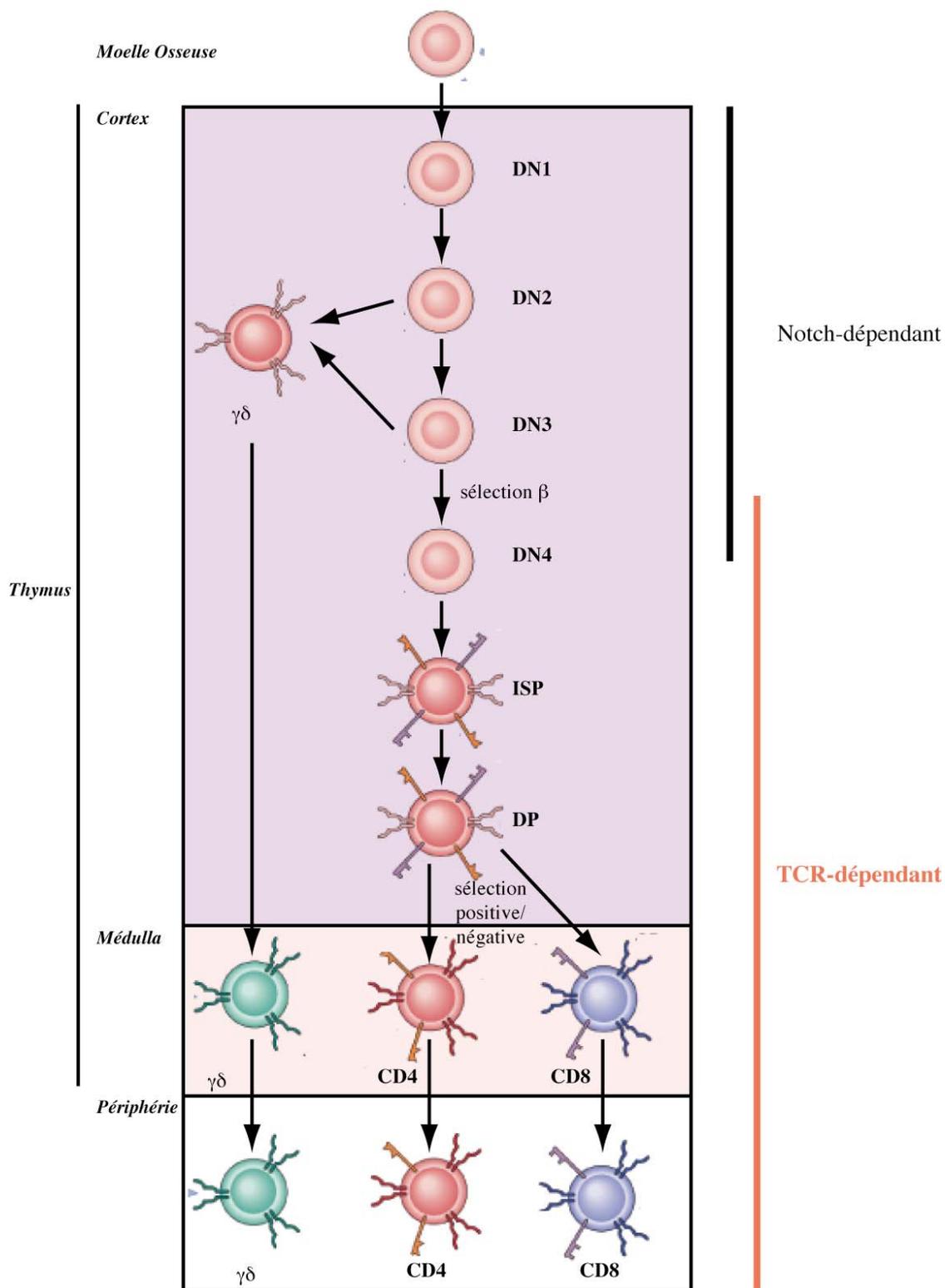


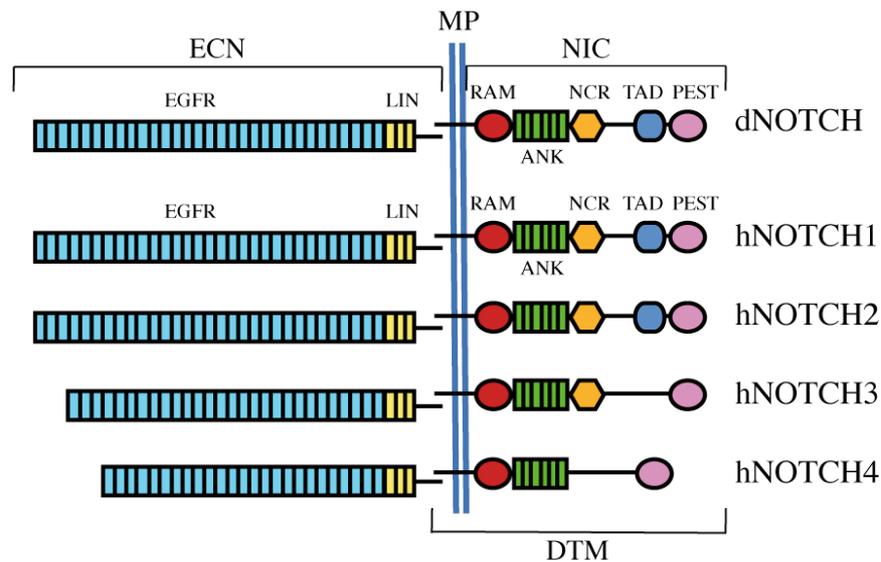
Fig.13 : Voies de signalisation requises au développement des cellules T.

### III. La voie de signalisation Notch.

Les protéines Notch appartiennent à une famille de récepteurs membranaires très conservés au cours de l'évolution de *Caenorhabditis elegans* aux mammifères en passant par la *Drosophile*. La voie de signalisation Notch contrôle de nombreux aspects fondamentaux de la vie chez les invertébrés et chez les vertébrés, comme la prolifération cellulaire, la maintenance des cellules souches, l'engagement vers un lignage cellulaire, la différenciation et la mort cellulaire (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Ces fonctions impliquent que les gènes de la voie Notch soient largement exprimés dans les tissus foetaux et adultes, mais que cette expression soit étroitement contrôlée pour le bon développement de ces organes.

#### III.1 Le récepteur Notch.

Le gène *Notch* code pour un récepteur transmembranaire de 300kD (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Les 4 homologues mammaliens de Notch (Notch 1-4) possèdent une structure protéique bien conservée. Lors de sa maturation dans l'appareil de Golgi, le récepteur Notch est clivé par une sérine-protéase de type furine, ce qui conduit à l'expression d'un récepteur hétérodimérique à la surface des cellules. Celui-ci est composé d'un domaine extracellulaire (ECN) et d'un domaine intracellulaire (NIC) (cf Figure I4). La partie extracellulaire contient 29 à 36 répétitions en tandem de motifs de type EGF (« epidermal growth factor ») qui permettent l'interaction avec le ligand, et de trois répétitions LIN, riches en cystéines, qui empêchent toute signalisation en absence de ligand (Maillard et al., 2005). Le domaine intracellulaire est constitué de séquences nécessaires à la transduction du signal. Il comporte le domaine RAM (« RBP-Jk associated molecule ») et sept répétitions ankyrin (O'Neill et al.) qui interagissent avec les protéines effectrices, deux séquences de localisations nucléaires (NLS), une séquence NCR (« Notch cytokine response ») (Bigas et al., 1998 1999), un domaine TAD (« transactivation domain ») contenant des sites de phosphorylation qui permettraient la modulation de l'activité de Notch et un domaine PEST dans la région C-terminale qui régule la stabilité de la protéine. Le domaine de transactivation est spécifique des récepteurs Notch 1-2. Le récepteur Notch 4 ne possède pas de séquence NCR.



**Figure I.4 : Représentation schématique de la structure des récepteurs Notch chez la drosophile et chez l'homme.**

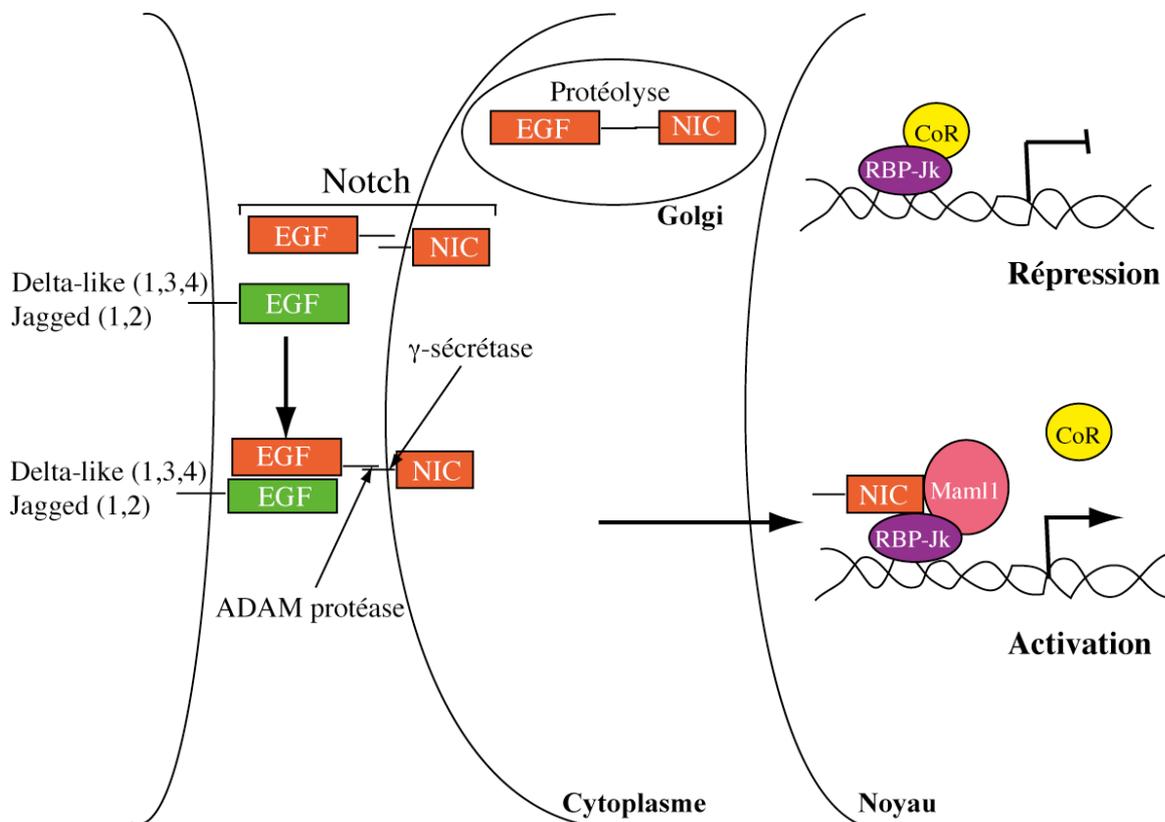
ECN : domaine extracellulaire ; NIC : domaine intracellulaire ; DTM domaine transmembranaire ; EGFR : répétitions "epidermal growth factor" ; LIN : répétitions "Lin12 Notch" ; RAM : domaine RAM 23 ; ANK : répétitions ankyrin ; NCR : "Notch cytokine response" ; TAD : domaine de transactivation de la transcription ; PEST : séquence PEST. (adapté de Allman et al, 2002)

### III.2 Les ligands de Notch.

L'activation de ces récepteurs est induite par l'interaction avec des ligands de la famille DSL (Delta, Serrate, Lag2) exprimés par les cellules voisines (Fleming, 1998; Le Borgne et al., 2005). Chez les mammifères, cinq ligands DSL ont été identifiés : trois sont liés structurellement aux ligands Delta et sont donc appelés Delta-like 1, 3 et 4. Les deux autres sont plus proches des ligands Serrate, et sont connus sous le nom de Jagged 1 et 2. Ces cinq ligands sont des protéines transmembranaires composées de domaines spécifiques variables en taille. Leur partie intracellulaire est peu conservée. Cependant, ils possèdent tous, dans leur partie extracellulaire, un motif DSL N-terminal unique impliqué dans l'interaction avec Notch ainsi qu'un nombre variable de répétitions EGF. Dans le thymus, les gènes codant pour les ligands de Notch (Jagged 1-2, Delta-like 1-4) sont principalement exprimés par les cellules épithéliales (Anderson and Jenkinson, 2001; Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2002).

### III.3 L'activation de la voie Notch.

L'interaction d'un récepteur Notch avec son ligand induit une protéolyse en deux étapes (Fortini, 2001) (cf. Figure I5). Le premier clivage par des protéases de la famille ADAM/TACE (disintegrin et metalloprotéase) dissocie le domaine extracellulaire du récepteur Notch générant ainsi une forme activée de Notch toujours liée à la membrane. Rapidement, cette forme activée est clivée dans sa partie cytoplasmique par le complexe  $\gamma$ -sécrétase (préséniline 1-2, nicastrin, Aph-1, Pen-2) (Haapasalo et al., 2007) et libère le domaine intracellulaire de Notch (NIC). NIC est alors transloqué vers le noyau où il va interagir avec le principal effecteur de la voie Notch, le facteur de transcription CSL afin de réguler la transcription de ces gènes cibles.



**Figure I.5 : La voie de signalisation Notch.** Le récepteur Notch est clivé par une sérine-protéase (furine) lors de son transit dans l'appareil de Golgi, puis est exprimé à la surface des cellules. La liaison de Notch avec son ligand (Delta-like, Jagged) exprimé par les cellules voisines conduit à deux nouveaux clivages qui libèrent le domaine intracellulaire de Notch (NIC). Celui-ci va être transloqué dans le noyau où il interagit avec RBP-Jk, déplaçant ainsi les corépresseurs (CoR), et permettant le recrutement de Mastermind-like 1 (MamI-1) et de coactivateur afin d'entraîner l'activation des gènes cibles de Notch.

### III.4 CSL (CBF-1, Su(H), Lag-1) ou RBP-Jk.

Les protéines CSL sont des facteurs de transcription contenant un domaine de liaison à l'ADN unique (Lai, 2002). Ces protéines sont les effecteurs majeurs de la voie de signalisation Notch. En l'absence de signalisation Notch, CSL agit comme répresseur transcriptionnel, mais devient activateur de la transcription lorsqu'il interagit avec NIC. Lors de son activité de répression, CSL interagit directement avec des co-répresseurs comme SMRT (« Signaling Mediator for Rétinoid and thyroid receptor »), N-CoR (« nuclear receptor co-repressor »), CIR (« CBF-interacting repressor ») (Hsieh et al., 1999), permettant le recrutement d'autres facteurs comme Sin3, et/ou des histones déacétylases (HDAC), SHARP (SMRT/HDAC-1-associated repressor protein), CtIP/CtBP (Oswald et al., 2002; Oswald et al., 2005). La translocation dans le noyau de NIC induit un changement d'activité de CSL, il passe d'un état de répresseur à un état d'activateur de la transcription. NIC déplace les co-répresseurs et permet le recrutement de coactivateurs dont le plus important s'apparente à la famille mastermind (MAML). Il existe trois MAML chez les mammifères : MAML 1-3. Leur domaine N-terminal stabilise l'interaction CSL/NIC sur l'ADN. En C-terminal, elles comportent un site de liaison à CBP/p300 et à d'autres coactivateurs (Fryer et al., 2002; Oswald et al., 2001). D'autres facteurs dont les histones acétyltransférases (HAT) PCAF et GCN5 sont présentes dans le complexe d'activation (Kurooka and Honjo, 2000) ainsi que l'enzyme de remodelage de la chromatine BRM du complexe SWI/SNF (Bray, 2006; Kadam and Emerson, 2003).

### III.5 Les gènes cibles de Notch dans les lymphocytes T.

Seulement très peu de gènes cibles du complexe CSL/NIC/MAM ont été rapportés dans la littérature. *Hes1*, *Deltex1*, *Ifi-204*, *Meltrine- $\beta$* , *pT $\alpha$* , *Nrarp*, *Lef1*, *c-myc* et la *cycline D1* sont quelques uns de ces gènes cibles identifiés dans les lymphocytes T. Toutefois, la régulation directe de l'expression de la majorité des gènes par Notch reste à démontrer *in vivo*.

### **III.5.1. Hes-1.**

Les gènes HES codent pour une famille des facteurs de transcription bHLH (« basic helix-loop-helix ») de Hairy/Enhancer of Split (HES) (Iso et al., 2003). Hes-1 et Hes-5 ont été impliqués dans la voie Notch (Davis and Turner, 2001). Les protéines HES répriment la transcription de façon active en se liant à leur séquence consensus appelée E box, et de façon passive en séquestrant des activateurs de la transcription dans le cytoplasme. Hes-1 joue un rôle important dans la maintenance des cellules souches, dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la différenciation (Baek et al., 2006). L'étude des souris Hes1<sup>-/-</sup> a montré que l'expression de ce gène est essentielle pour l'engagement vers le lignage T $\alpha\beta$  et pour la progression vers le stade DN4 au cours du développement précoce des cellules T (Tomita et al., 1999) aux mêmes stades où la signalisation par Notch est requise. Cependant, à l'inverse de cellules déficientes pour Notch1, les CLP de souris Hes-1<sup>-/-</sup> initient un développement thymique. Ce qui suggère l'existence d'autres gènes cibles de Notch indéterminés qui participent au développement précoce des cellules T dans le thymus. Il a également été proposé que Hes1 soit un régulateur négatif de l'expression de CD4 (Kim and Siu, 1998).

### **III.5.2. pT $\alpha$ .**

pT $\alpha$  est un composant du pre-TCR qui joue un rôle primordial au cours du développement précoce des cellules T (Saint-Ruf et al., 1994). Il a été identifié comme un gène cible de Notch dans les cellules T (Defetos et al., 2000). Son expression, dépendante de sites CSL présents au sein de son promoteur, est finement régulée au cours du développement des thymocytes (Reizis and Leder, 2002).

### **III.5.3. Meltrin $\beta$ .**

Meltrin  $\beta$  est une métalloprotéase de la famille ADAM (Inoue et al., 1998) exprimée dans divers tissus, dont le gène semble régulé par Notch dans les thymocytes (Defetos et al., 2000). Il est intéressant de noter que ADAM 10, une autre protéine de la même famille, est impliquée dans la signalisation par Notch (Lieber et al., 2002; Sotillos et al., 1997).

#### **III.5.4. Ifi-204.**

La famille de protéines Ifi-200 est impliquée dans la régulation de la transcription et le contrôle du cycle cellulaire (Johnstone and Trapani, 1999). Deftos et al (Deftos et al., 2000) ont identifié *Ifi-204* comme gène cible de Notch dans les thymocytes.

#### **III.5.5. Nrarp.**

L'expression de *Nrarp* est induite de façon NIC spécifique dans les cellules T (Krebs et al., 2001). La surexpression de *Nrarp* conduit à l'inhibition du développement des cellules T (Yun and Bevan, 2003). Les études, chez le Xénope, ont montré que *Nrarp* interagissait avec NIC et CSL pour inhiber NIC (Lamar et al., 2001). La caractérisation de sites de liaison à CSL dans le promoteur de *Nrarp* nécessaire à l'induction de ce gène par NIC (Pirot et al., 2004) laisse penser que *Nrarp* est un gène cible direct de la voie Notch dans les cellules T.

#### **III.5.6. Deltex-1.**

Deltex fonctionne comme un régulateur positif de la signalisation par Notch et se lie directement à NIC (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Cependant le mécanisme de régulation de Notch par Deltex n'est pas clair. L'activation de Notch dans les thymocytes induit l'expression de *Deltex-1* (Deftos et al., 1998; Deftos et al., 2000). Il semblerait que Deltex-1 agisse comme un régulateur négatif de Notch dans les progéniteurs lymphoïdes (Izon et al., 2002).

#### **III.5.7. Lef1.**

Une étude récente a montré que *Lef1* (Lymphoid enhancer factor 1) est un gène cible de Notch dans certains lymphomes de type T (Spaulding et al., 2007). Son expression est requise pour la survie des cellules et elle permet de retarder la mort cellulaire induite par l'inhibition de la voie Notch. Ainsi l'expression contrôlée de *Lef1* par Notch contribue à la survie et à l'expansion des lymphomes T.

### **III.5.8. *c-myc*.**

*c-myc* est un gène impliqué dans la prolifération cellulaire et plus particulièrement dans la progression du cycle cellulaire en promouvant l'entrée en phase S. Trois études de transcriptome distinctes ont identifié *c-myc* comme un gène régulé par Notch. (Palomero et al., 2006; Sharma et al., 2006; Weng et al., 2006). Le rôle de Notch à ce niveau a été confirmé par la fixation de NIC au niveau de séquences promotrices de ce gène.

Cette liste de gènes régulés par Notch est loin d'être exhaustive. En outre, elle met en évidence la complexité de la régulation de la voie Notch qui induit l'expression des certains de ces régulateurs négatifs : Nrp1, Deltex-1 ; et positifs : Notch1 lui-même, Deltex-1 (selon les études). Par ailleurs, toute la signalisation Notch dépendante-CSL indépendante (Bush et al., 2001; Zecchini et al., 1999) , que je n'ai pas abordée ici, est également à prendre en considération.

## **III.6 Les maladies liées à un dysfonctionnement de la voie Notch.**

### **III.6.1. Les maladies génétiques**

La perturbation d'une voie de signalisation aussi importante que la voie Notch est impliquée dans l'émergence de maladies. Des mutations de Notch ont été impliquées dans 4 maladies génétiques : la tétralogie de Fallot, le syndrome d'Alagille, la dysostose spondylocostale, et la CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) (Gridley, 2003).

### **III.6.2. Les cancers**

La signalisation par Notch contrôle le devenir cellulaire dans plusieurs tissus et à différents moments lors de la différenciation. De ce fait il n'est pas étonnant que la dérégulation de la fonction de Notch soit impliquée dans l'émergence de différents types de cancers. Les mutations qui induisent l'apparition de formes activées de Notch sont à l'origine

de leucémies de type T (Ellisen et al., 1991) et de cancer du sein (Jhappan et al., 1992). Des variations dans le taux d'expression de Notch est observé dans certains cancers des poumons (Dang et al., 2000) et cervicaux (Zagouras et al., 1995).

### III.6.3. Les lymphomes T

L'activation excessive de la voie Notch est un mécanisme important de la transformation des cellules T. Chez l'homme, des mutations activatrices de Notch ont été impliquées dans plus de 50% des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL-T) et constituent les anomalies génétiques prépondérantes de ce type de leucémie (Weng et al., 2004). En effet, une fraction des LAL-T possède une translocation chromosomique t(7;9) fusionnant le locus Notch1 à celui de la chaîne  $\beta$  du TCR ce qui induit l'expression d'une série d'ARNm tronqués codant pour des formes constitutives de Notch (Ellisen et al., 1991).

L'équipe de Capobianco a également démontré la présence de complexes nucléaires de haut poids moléculaire contenant NIC, MAML1 et CSL dans des lignées de LAL-T ayant la translocation t(7;9) précédemment décrite (Jeffries et al., 2002). L'inhibition de la voie Notch au niveau du clivage par la  $\gamma$ -sécrétase ou par l'expression d'une forme dominante négative de Maml-1 induit l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'entrée en apoptose de lignées de LAL-T. Cela indique que le complexe d'activation intact NIC/CSL/MAML est probablement requis pour la transmission de signaux de croissance et de survie cellulaire (Weng et al., 2003). Par ailleurs, une suppression de Notch3 est souvent détectée dans les LAL-T (Bellavia et al., 2002).

NIC1, NIC2 (Rohn et al., 1996) et NIC3 sont à l'origine de développement de LAL-T. Cela suggère que chaque variant régule un groupe commun de gènes potentiellement transformants. Deux gènes cibles potentiels sont Hes1 et Hes5. Cependant, la surexpression de Hes1 ou de Hes5 bloque partiellement le développement des cellules B mais ce n'est pas suffisant pour induire la leucémogénèse (Kawamata et al., 2002).

Le rôle direct de l'activation de la voie Notch dans le développement de lymphomes/leucémies T a été confirmé dans différents modèles murins (Bellavia et al., 2002;

Pear et al., 1996). De plus l'importance de l'intensité et du timing du signal de Notch pour la transformation des cellules T a été étudié chez la souris. L'expression de NIC dans les progéniteurs de la MO conduit à l'inhibition du développement des cellules B (Pui et al., 1999), au développement ectopique de cellules T dans la MO (Radtke et al., 1999) puis à l'apparition de LAL-T uniquement lorsque la signalisation est forte (Aster et al., 2000).

Ces études suggèrent que l'inhibition de la voie Notch aux stades tardifs de la différenciation T joue un rôle physiologique important pour empêcher la transformation tumorale. Les mécanismes de cette inhibition restent cependant peu compris. Ma thèse vise à caractériser le rôle du facteur de transcription Ikaros dans ce processus.

## IV. Le facteur de transcription Ikaros

Le contrôle de la différenciation et la prolifération de souches cellules hématopoïétiques (HSC) pluripotentes vers le phénotype de cellules sanguines matures est finement régulé tout au long de la vie d'un organisme. Cette régulation se fait en partie au niveau transcriptionnel, où un nombre important de complexes multiprotéiques coopèrent afin de réguler l'expression des gènes appropriés. Le facteur de transcription Ikaros semble essentiel au développement normal des lymphocytes (Cortes et al., 1999; Georgopoulos, 1997; Georgopoulos et al., 1997; Nichogiannopoulou et al., 1998). Cette protéine est conservée de la lamproie jusqu'à l'humain (Georgopoulos, 2002). Elle est le membre fondateur d'une famille de protéines à doigts de zinc (C2H2) hautement homologues qui sont : Aiolos, Helios, Eos, et Pegasus. Cependant, je me concentrerai uniquement sur le rôle de la protéine Ikaros au cours du développement des lymphocytes T.

### IV.1 Identification et caractérisation du facteur de transcription Ikaros

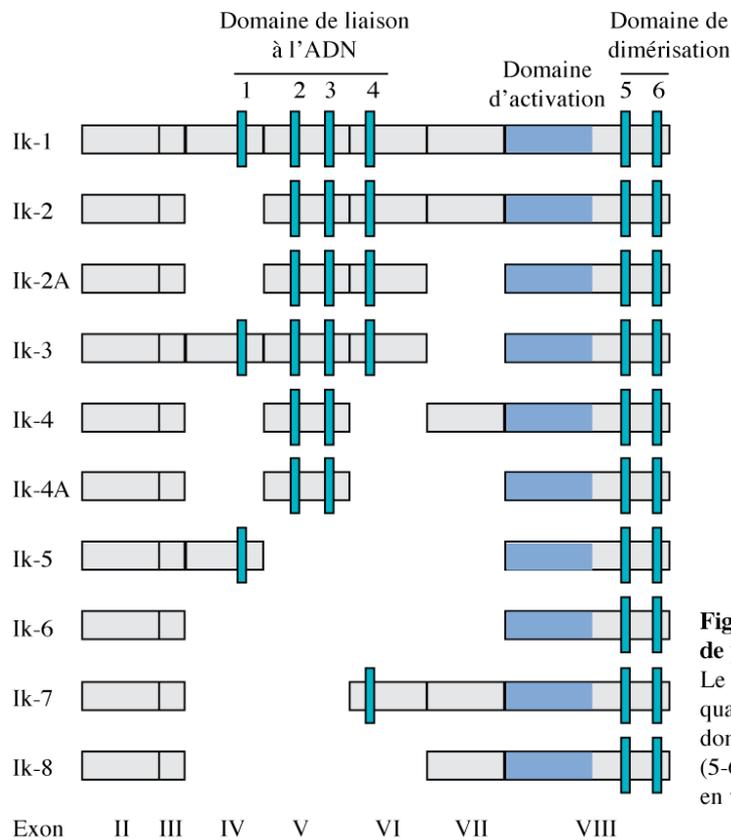
Ikaros a été identifié comme un facteur interagissant avec les régions régulatrices de gènes comme *TdT* et *CD3δ* (Ernst et al., 1993 1992; Lo et al., 1991). Au cours du développement embryonnaire de la souris, l'ARNm d'Ikaros est exprimé dès l'apparition du foie foetal à 9.5 jours de gestation, puis son expression décroît pour se retrouver dans les rudiments de thymus à partir de 12 jours de gestation. Le thymus est le site majeur d'expression du gène *Ikaros*. La quantité de messenger détectée dans la médulla est plus élevée que celle détectée dans le cortex. Chez la souris adulte, l'ARNm d'Ikaros est exprimé exclusivement dans le thymus et dans la rate (Georgopoulos et al., 1992).

Bien que la régulation du gène *Ikaros* soit un événement critique pour l'hématopoïèse et le développement des lymphocytes, peu d'éléments concernant ce phénomène sont connus. Cependant, une étude de cartographie des sites hypersensibles à la DNaseI a permis d'identifier plusieurs sites promoteurs dans le locus *Ikaros* (Kaufmann et al., 2003).

Le gène *Ikaros* est composé de 8 exons dont seulement les 7 derniers sont codants. Un mécanisme d'épissage alternatif du transcrit primaire permet de générer de multiples

isoformes de la protéine Ikaros (Hahm et al., 1994; Molnar and Georgopoulos, 1994). La forme majeure d'Ikaros (Ik1) détectée dans les thymocytes possède un site de liaison à l'ADN dans sa partie N-terminale constitué de 4 doigts de zinc de type Krüppel-like et un domaine de dimérisation dans sa région C-terminale constitué de 2 doigts de zinc apparenté à la famille Hunchback (cf Figure I6).

Les autres isoformes de la protéines Ikaros sont plus courtes et diffèrent dans leur nombre de doigts de zinc N-terminaux constituant le site de liaison à l'ADN. Les isoformes d'Ikaros contenant au moins trois doigts de zinc N-terminaux sont capables de se lier avec une forte affinité au motif GGGAA, tandis que toutes les autres isoformes ne le peuvent pas (Koipally and Georgopoulos, 2002). Elles conservent cependant leur capacité à former des homodimères (avec Ikaros) ou des hétérodimères (avec d'autres protéines de la famille Ikaros) (Sun et al., 1996). Elles agissent alors comme des formes dominantes-négatives inhibant la liaison de Ik1 et Ik2 avec l'ADN.



**Figure I.6 : Représentation schématique de plusieurs isoformes d'Ikaros.**

Le domaine de liaison à l'ADN contient quatre motifs à doigts de zinc (1-4), le domaine de dimérisation en possède deux (5-6). Les doigts de zinc sont représentés en vert, le domaine d'activation en bleu.

## **IV.2 Ikaros, un gène suppresseur de tumeur impliqué dans les LAL-T.**

La perte de fonction d'Ikaros dans les souris hétérozygotes pour ce gène contribue au développement de tumeurs lymphoïdes (Winandy et al., 1995). De plus, dans des cas de leucémies lymphoblastiques infantiles humaines, des isoformes dominantes-négatives de Ikaros sont souvent surexprimées (Sun et al., 1999a Sun 1999, Hosokawa, 1999; Sun et al., 1999b Sun 1999, Hosokawa, 1999; Sun et al., 1999c Sun 1999, Hosokawa, 1999)

Un lien coopératif entre une déficience d'Ikaros et l'activation de la voie Notch dans les lymphomes de type T a été suggéré par Beverly et Capobianco (Beverly and Capobianco, 2003). Dans leur étude, le gène Ikaros est une cible privilégiée de mutation par insertion provirale induisant l'expression de formes dominantes-négatives dans des cellules exprimant une forme constitutive de NIC1 accélérant ainsi le développement de leucémies T chez ces souris. Des travaux de mon équipe d'accueil ont par ailleurs montré que l'activation des gènes de la voie Notch a lieu à un stade très précoce du développement tumoral induit par la perte d'Ikaros (souris IkL/L ; Dumortier, 2006). De plus de façon intéressante, la combinaison de l'activation de la voie Notch et de l'inactivation d'Ikaros a également été trouvée dans une large proportion de lymphomes thymiques murins induits par irradiation (Okano et al., 1999; Shimada et al., 2000) ou par l'action d'agents mutagènes (Karlsson et al., 2002). Le mécanisme qui pourrait expliquer ce lien étroit entre la perte d'Ikaros et l'activation de la voie Notch est suggérée par la similitude des séquences d'ADN reconnues par Ikaros et CSL. En effet Ikaros reconnaît des séquences contenant le motif central TGGGAA, (Molnar and Georgopoulos, 1994) et ce motif est aussi présent dans les sites de reconnaissance de CSL (Nellesen et al., 1999; Tun et al., 1994). Une compétition entre ces deux protéines pour la liaison à ces séquences pourrait ainsi jouer un rôle dans la répression des gènes cibles de Notch au cours de la maturation des thymocytes. Dans ce modèle, l'absence d'Ikaros favoriserait l'activation des gènes cibles de Notch et la transformation des cellules.

### **IV.3 Expression, gènes cibles, régulation d'Ikaros.**

#### **IV.3.1. L'expression d'Ikaros est essentiellement restreinte au système hématopoïétique.**

L'une des caractéristiques les plus intéressantes d'Ikaros est que son expression est quasi-exclusivement restreinte au système hématopoïétique (Georgopoulos et al., 1994). Ikaros est également exprimée dans la glande pituitaire (Yu et al., 2002), les neurones (Agoston et al., 2007), et le placenta (Ito et al., 2002).

#### **IV.3.2. Gènes cibles et mécanismes de régulation de la transcription par Ikaros.**

Afin de mieux comprendre ce qui se passe au niveau de la cellule, je vais vous présenter les données qui ont permis d'élucider en partie le mode d'action moléculaire et les gènes cibles d'Ikaros.

##### ***IV.3.2.a. Ikaros, un répresseur de la transcription.***

De nombreuses études tendent à démontrer qu'Ikaros est impliquée dans la répression de la transcription voire responsable de l'initiation de l'extinction héréditaire de gènes.

Ikaros a été identifiée comme un régulateur potentiel du gène *TdT* (Hahm et al., 1994). Par ailleurs, les sites de fixation spécifiques à Ikaros du promoteur de ce gène sont aussi des sites de fixation pour la protéine Elf-1, appartenant à la famille des protéines ets (Ernst et al., 1996). Lors de la stimulation via le TCR des cellules DP, Ikaros entre en compétition avec Elf-1 pour se fixer sur les mêmes sites de liaison à l'ADN (Trinh et al., 2001). La fixation de Ikaros sur ces séquences régulatrices induit la répression du gène *TdT*. Il semble donc qu'Ikaros soit un répresseur transcriptionnel de certains gènes.

Une approche par immuno-FISH a permis de suggérer un rôle potentiel d'Ikaros dans la répression des gènes (Brown et al., 1997). De façon étonnante, la protéine Ikaros est présente dans des foci d'hétérochromatine riches en protéine HP-1 au niveau de séquences  $\gamma$ -satellites

d'ADN centromériques. En outre, Ikaros colocalise avec la machinerie de réplication (Avitahl et al., 1999; Brown et al., 1997). De plus, ces foci sont associés à des gènes transcriptionnellement inactifs. Dans les cellules en division, les gènes *TdT* et *RAG* sont relocalisés au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique (HC-PC), suite à l'activation du TCR (Brown et al., 1999). Une dernière étude montre notamment que Ikaros est capable de se lier aux séquences  $\gamma$ -satellites que l'on retrouve particulièrement au niveau de l'HC-PC (Cobb et al., 2000). L'ensemble de ces données suggère qu'Ikaros, en plus de contrôler les transitions au cours du cycle cellulaire, serait impliqué dans l'initiation, la propagation ou la maintenance d'un état de répression génique au cours de la réplication et/ou dans la transition entre un état actif et inactif d'expression de certains gènes.

Des études biochimiques, dans les cellules T et dans les progéniteurs érythroïdes, ont montré que la protéine Ikaros est associée à des complexes de remodelage de la chromatine qui contiennent essentiellement des composants du complexe de remodelage et de déacétylation NuRD (Nucleosome Remodeling Complex) (Kim et al., 1999; O'Neill et al., 2000). Les protéines interagissant avec Ikaros au sein de ce complexe sont l'ATPase Mi-2 $\beta$ , les HDAC-1 et -2. Ces interactions laissent supposer qu'Ikaros joue un rôle comme répresseur de la transcription au cours de l'hématopoïèse. L'association d'Ikaros et de l'ATPase Mi-2 $\beta$  modifierait potentiellement l'accessibilité de loci spécifiques en ayant une influence sur l'association des histones avec l'ADN (Becker and Horz, 2002; Tong et al., 1998; Xue et al., 1998; Zhang et al., 1998). La présence de HDACs favoriserait la répression transcriptionnelle et permettrait la modification covalente de la chromatine (Cress and Seto, 2000; Kim et al., 1999). Une autre étude rapporte également qu'Ikaros est capable d'interagir avec les protéines Sin3 qui appartiennent à des complexes de HDACs et de réprimer l'activité de gène rapporteur en association avec ces protéines (Koipally and Georgopoulos, 2002). Ikaros interagit grâce à son motif PEDLS avec la protéine CtBP (C-terminal binding protein), impliquée dans des activités de co-répression de la transcription (Koipally and Georgopoulos, 2000). La répression par CtBP est HDAC indépendante. Des mutations affectant la liaison entre Ikaros et CtBP diminuent mais n'abrogent pas totalement la répression via Ikaros, qui peut toujours interagir avec Sin3 et NuRD. L'interaction Ikaros-CtBP n'affecte en rien l'activation de la transcription Ikaros spécifique. L'interaction d'Ikaros avec ces complexes de répression et de remodelage de la chromatine laisse supposer que la fixation d'Ikaros sur des

séquences géniques spécifiques conduit à la répression puis à l'inactivation de ces gènes par condensation de la structure chromatinienne.

#### ***IV.3.2.b. Ikaros, un activateur de la transcription.***

Ikaros est capable d'activer modestement le gène rapporteur CAT (Chloramphenicol Acetyl Transferase) sous la régulation des régions promotrices du gène *CD3δ* (Georgopoulos et al., 1992) ou une séquence contenant 4 motifs consensus de liaison à l'ADN de Ikaros (TGGGAA) (Sun et al., 1996).

Par ailleurs, Ikaros est aussi capable d'interagir avec l'ATPase Brg-1 et les protéines hSWI-3 et BAF-60 qui sont des composants du complexe SWI/SNF (Kim et al., 1999; O'Neill et al., 2000). Ce complexe est impliqué dans le remodelage de la chromatine de manière ATP-dépendante afin de rendre les gènes accessibles à la machinerie transcriptionnelle.

De manière assez peu conventionnelle, il a été montré que Ikaros est capable d'activer l'expression des gènes en potentialisant l'activité d'autres facteurs de transcription (Koipally et al., 2002). A cette fin, les domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation de Ikaros doivent être intacts pour que la localisation d'Ikaros au niveau de l'HC-PC soit effective. Il semblerait également qu'Ikaros soit impliquée dans le recrutement de Mi-2 $\beta$  (NuRD) à ce niveau. Cela suggère un rôle ambiguë pour Ikaros entre d'une part la localisation péricentromérique et la présence du complexe NuRD et d'autre part l'activation d'expression des gènes.

Finalement, le rôle d'Ikaros dans la régulation spécifique de gènes au cours du développement des cellules T reste à démontrer bien que de nombreux éléments suggère la réalité de cette répression par Ikaros.

#### **IV.3.3. Régulation de l'activité d'Ikaros.**

La régulation de l'activité de la protéine Ikaros a été peu décrite. Cependant, deux études montrent que Ikaros peut subir des modifications post-traductionnelles qui affectent son

activité de liaison à l'ADN au cours du cycle cellulaire (Gomez-del Arco et al., 2005; Gomez-del Arco et al., 2004).

La phosphorylation d'Ikaros est régulée de façon dynamique par la caséine kinase II durant le cycle cellulaire (Gomez-del Arco et al., 2004). Elle diminue sa capacité à lier l'ADN. Ainsi cette modification post-traductionnelle semble faciliter l'entrée en phase S des cellules, en régulant la liaison d'Ikaros avec ses séquences cibles au cours de la réplication.

D'autre part, dans les lymphocytes, Ikaros est SUMOylée (Gomez-del Arco et al., 2005). La présence de ces peptides SUMO influence négativement la répression de la transcription par Ikaros en abolissant les interactions avec les co-répresseurs Sin3, Mi-2 $\beta$  et CtBP.

#### **IV.4 Régulation du développement hématopoïétique par Ikaros.**

Similairement à Notch, les différents modèles de souris suivant ont montré qu'Ikaros joue un rôle déterminant dans l'obtention de tous les lignages hématopoïétiques. Les déficiences pour la protéine Ikaros affectent aussi bien la différenciation des HSC, que les cellules érythroïdes (Yoshida et al., 2006), les neutrophiles (Dumortier et al., 2003), les cellules dendritiques (Allman et al., 2006), que les cellules B et T (Georgopoulos et al., 1994; Winandy et al., 1995). En l'absence d'Ikaros, la barrière d'activation induisant la prolifération des lymphocytes B et T est diminuée.

##### **IV.4.1. La mutation dominante négative du gène Ikaros (Ik<sup>DN/DN</sup>) (Georgopoulos et al., 1994).**

Le ciblage par recombinaison homologue des exons 3 et 4 du gène Ikaros a permis d'obtenir des souris mutées au niveau du domaine de liaison à l'ADN. Ces souris expriment des formes dominantes négatives plus petites d'Ikaros qui sont normalement plus rares. Elles ne possèdent ni lymphocytes T, ni lymphocytes B, ni cellules NK ainsi qu'aucun progéniteur

de ce lignage lymphocytaire. Les lignages érythroïdes et myéloïdes ne sont pas affectés. Cela suggère que Ikaros est indispensable à la différenciation des HSC en progéniteurs lymphoïdes.

#### **IV.4.2. La mutation nulle du gène Ikaros ( $Ik^{-/-}$ ) (Wang et al., 1996).**

Les souris homozygotes pour une mutation de la région C-terminale (délétion interne de l'exon 7) qui supprime toute expression de la protéine Ikaros ne possèdent pas de cellules B, ni de cellules NK mais développent des cellules T après la naissance. Très rapidement, il y a apparition de tumeurs clonales ou oligoclonales thymiques. Les déficiences du compartiment lymphoïde observées chez ces souris permettent de définir un rôle moléculaire différent pour Ikaros au cours du développement des progéniteurs fœtaux par rapport au développement des progéniteurs adultes. De plus Ikaros semble avoir un rôle de gène suppresseur de tumeur au cours de la différenciation des thymocytes.

#### **IV.4.3. La mutation hypomorphe du gène Ikaros ( $Ik^{L/L}$ ) (Kirstetter et al., 2002)**

Cette souris mutante a été générée dans notre laboratoire par délétion interne de l'exon 2. Cette lignée est hypomorphe pour la protéine Ikaros, elle exprime environ 10% d'une protéine Ikaros comportant les domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation. Tous les tests de fonctionnalité effectués à ce jour ne montrent pas de déficience de la protéine mutante. Cependant, bien que le phénotype lymphoïde de ces souris soit moins extrême, chez les homozygotes  $Ik^{L/L}$ , les cellules B se développent après la naissance à partir d'un pool réduit de précurseur, comme chez les souris  $Ik^{-/-}$ , il y a apparition des tumeurs lymphoïdes de type T avec 100% de pénétrance. Ces données confirment le fait qu'Ikaros joue un rôle de suppresseur de tumeur lors du développement des thymocytes et qu'il est un facteur important de la lymphopoïèse.

**IV.4.4. La mutation  $Ik^{plstc}$  (plastic) (Papathanasiou et al., 2003)**

Cette mutation a été induite par injection intrapéritonéale de l'agent mutagène : éthylnitrosourée. Les souris développant des tumeurs sont sélectionnées. L'analyse du locus muté montre que la séquence du gène *Ikaros* est affectée au niveau d'une seule base chez ces souris. La liaison d'Ikaros à l'ADN est sélectivement inactivée par cette mutation ce qui induit un phénotype sévère d'embryolétalité chez les homozygotes. La différenciation terminale des érythrocytes et des granulocytes est particulièrement déficiente, ces souris présentent une formation excessive de macrophages et un blocage de la lymphopoïèse. Cela confirme le rôle prépondérant d'Ikaros au cours du développement du compartiment hématopoïétique.

## V. La régulation épigénétique

La différenciation des thymocytes immatures en cellules T matures nécessite la transduction de signaux par le TCR et les molécules co-réceptrices promouvant ainsi l'activation et la répression de plusieurs gènes comme *Cd4*, *Cd8*, *Tcra*, *Ptcra*, *Rag-1*, *Rag-2*, et *Tdt* (Egerton et al., 1990; Kearsse et al., 1995; Sant'Angelo et al., 1998; Turka et al., 1991; Wiest et al., 1999). L'importance de la répression des gènes au cours du développement des lymphocytes est basé sur quelques études (Nawijn et al., 2001a; Nawijn et al., 2001b; Wayne et al., 1994 1994) qui ont démontré que la perte d'extinction de gènes spécifiques induit de sévères défauts de développement.

Au cours de leur développement à partir des précurseurs de la MO, les lymphocytes T font une série de choix séquentiels et irrévocables. Le premier choix étant le choix du lignage T versus le lignage B, puis il y a les choix entre le TCR $\gamma\delta$  versus le TCR $\alpha\beta$ , entre le co-récepteur CD4 versus CD8 et dans les cellules CD4, le choix entre le lignage Th1 versus Th2. Ces choix cellulaires, à l'exception du réarrangement du TCR, sont initiés et maintenus sans changement dans la séquence d'ADN codant. Chaque engagement vers un lignage nécessite la transcription d'un ensemble de gènes spécifiques et la répression ou l'extinction d'autres. Ces changements dans l'expression des gènes ne sont pas codés par des modifications permanentes de l'information génétique initiale de la cellule mais par des changements d'informations épigénétiques qui déterminent quels gènes sont exprimés.

La transcription est contrôlée en partie par l'assemblage de complexes de transcription au niveau des régions régulatrices des gènes. Ainsi, le taux, les modifications post-transcriptionnelles, la localisation et les interactions avec d'autres facteurs de transcription, co-activateurs ou répresseurs sont des niveaux mécanistiques par lesquels la transcription peut être régulée. Un second niveau de contrôle est fourni par les processus épigénétiques qui affectent l'accessibilité des facteurs de transcription aux régions régulatrices de leurs gènes cibles au sein de structures chromatiniennes ordonnées. Ainsi, en modulant la facilité ou la probabilité avec laquelle un facteur de transcription peut reconnaître la région régulatrice de gènes et recruter les complexes contenant l'ARN polymérase II, les facteurs épigénétiques vont empêcher, amortir ou faciliter une transcription efficace (Egger et al., 2004; Felsenfeld

and Groudine, 2003; Fitzpatrick and Wilson, 2003; Li, 2002; Mostoslavsky and Bergman, 1997; Smale and Fisher, 2002).

En principe, la transmission héréditaire de programmes d'expression génique qui sont nécessaires au bon fonctionnement d'une cellule spécifique peut être maintenu simplement grâce à l'expression continue du même facteur de transcription que celui utilisé initialement pour l'établissement d'un programme spécifique. De façon alternative, l'hérédité peut-être maintenue si le facteur de transcription initial induit une empreinte épigénétique stable du programme d'expression génique qui peut alors être transmis après la réplication cellulaire des cellules parentales à leur descendance en l'absence des facteurs requis pour l'initiation de ces changements. Chez les mammifères, l'information épigénétique est codée par la variation de la méthylation de l'ADN au niveau de cytosines, les différences de composition des protéines histones et les modifications post-traductionnelles des histones associées à l'ADN dans la chromatine et autres structures chromatinienne plus complexes.

La régulation appropriée des événements épigénétiques au cours du développement et du fonctionnement du système immunitaire occupe une place importante.

Après une brève présentation de la structure de la chromatine et des nucléosomes, je m'attarderai uniquement à décrire les modifications post-traductionnelles majeures des histones impliqués dans la régulation de la transcription des gènes.

## **V.1 La structure de la chromatine**

Le noyau d'une cellule est un organelle complexe contenant la quasi-totalité de l'ADN cellulaire. Cet ADN doit être compacté et organisé de façon compatible avec de nombreux événements nucléaires tels que la transcription différentielle des gènes, la réplication de l'ADN, la recombinaison de gènes, et la division cellulaire. La découverte des histones, nucléosomes et des autres structures chromatinienne a permis d'expliquer l'organisation nucléaire. Dans le noyau en interphase, l'ADN est incorporé dans la fibre du nucléosome qui a un diamètre de 11 nm. Chaque nucléosome contient un octamère d'histones. La fibre de 11

nm est assemblée dans une structure connue comme étant le filament de 30 nm qui peut également se condenser en des structures plus complexes.

Dans une cellule donnée, la chromatine décondensée est associée aux gènes qui doivent être accessibles aux machineries impliquées dans la transcription et la recombinaison. La transition entre chromatine condensée et décondensée est un processus crucial dans la régulation de ces deux processus. Ce sont des protéines spécifiques du type cellulaire ou spécifiques du stade de différenciation, qui sont impliquées dans la décondensation de loci précis après stimulation, bien que l'on ne connaisse pas actuellement les protéines régulatrices directement responsables de la décondensation de chaque gène.

Bien que la décondensation de la chromatine semble être un pré-requis pour l'activation de la transcription, on observe la présence de nucléosomes dans des loci totalement décondensés qui continuent d'empêcher la liaison de nombreux facteurs de transcription ainsi que la formation du complexe de préinitiation au site d'initiation de la transcription. Afin que toutes les protéines requises pour l'activation transcriptionnelle puissent se lier à l'ADN, les nucléosomes à proximité de la région de contrôle du gène doivent être remodelés ou déplacés. Le remodelage des nucléosomes et la décondensation de structures chromatiniennes semblent être dépendants de l'activité de deux classes de complexes multiprotéiques : i) les complexes ATP-dépendant de remodelage des nucléosomes et ii) les complexes de modifications d'histones (Jenuwein and Allis, 2001; Kim et al., 1999; Peterson and Logie, 2000). Les complexes de remodelage ATP-dépendant utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP afin de modifier la conformation des nucléosomes. Les complexes de modification des histones catalysent la modification covalente de la partie N-terminale des histones ; les histones portant certaines modifications semblent former une fibre de nucléosomes moins rigide et sont reconnus par d'autres protéines qui contribuent à la régulation des gènes comme les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant.

## **V.2 Les histones et leurs modifications post-traductionnelles.**

Les nucléosomes sont des entités constituées d'un noyau de 8 histones entourées d'environ 160bp d'ADN. Le noyau histone contient deux copies des histones H2A, H2B, H3

et H4. Les nucléosomes adjacents sont connectés par de courts segments d'ADN (<80bp) et compactés à l'aide des histones linker H1 et H5 (Khorasanizadeh, 2004). La partie N-terminale des histones est accessible à l'extérieur du nucléosome et est le site de modifications post-traductionnelles (Lachner et al., 2003). Le potentiel combinatoire des modifications épigénétiques est énorme grâce aux multiples modifications possibles pour chaque molécule histone dans chaque partie d'ADN nucléosomale, c'est « le code histone » (Strahl and Allis, 2000). Ce dernier est loin d'avoir été décrypté. Cependant, certaines des données suivantes sont communément admises pour la régulation des gènes chez les mammifères. L'acétylation de l'histone H3 sur les résidus lysine 9 (H3K9-Ac), 14 (H3K14-Ac) ou 18 (H3K18-Ac) , et/ou l'acétylation de l'histone H4 sur les résidus lysine 5 (H4K5-Ac) ou 8 (H4K8-Ac) est associée à un statut de chromatine accessible dite « ouverte » et à l'expression active de gènes. Les résidus lysine peuvent aussi être modifiés par l'ajout d'un, deux ou trois groupes méthyl. La méthylation de l'histone H3 sur le résidu lysine 4 (H3K4-Me) est également associée à l'expression active des gènes, mais contrairement à l'acétylation de H3, cette modification persiste longtemps après l'arrêt de la transcription donnant une indication sur la compétence transcriptionnelle d'un locus (Turner, 2003). A l'inverse, la méthylation de l'histone H3 sur les résidus lysine 9 (H3K9-Me) ou 27 (H3K27-Me) est associée à un statut de chromatine condensée dite « fermée » et à la répression ou à l'extinction de l'expression de gènes. De plus, la répression stable de gènes présents dans l'hétérochromatine est associée à une tri-méthylation au niveau de la lysine 9 (Felsenfeld and Groudine, 2003; Peters et al., 2003). Les empreintes d'histone interagissent les unes avec les autres. Ainsi, la méthylation de H3K9 exclue l'acétylation de ce résidu, la phosphorylation de H3S10 semble faciliter d'autres modifications de H3 favorables à la transcription comme l'acétylation de H3K9 et la méthylation de H3K4. En complément des quelques modifications que je viens de décrire, il existe d'autres types de modifications d'histone, incluant les acétylations, méthylations, phosphorylations au niveau d'autres sites, mais aussi l'ubiquitination et l'ADP-ribosylation dont les fonctions sont moins bien caractérisées ou généralisées.

L'acétylation des histones est un processus dynamique régulé par les histones acétyltransférases (HATs) et les histones déacétylases (HDACs). A l'inverse, la méthylation des histones apparaît comme étant une modification beaucoup plus stable, ce qui corrobore le rôle de la méthylation de H3K9 et H3K27 dans l'extinction de gènes, et avec l'absence à

l'heure actuelle de déméthylases catalysant le déplacement des groupes méthyl des résidus lysine.

### **V.3 Les mécanismes épigénétiques impliqués dans le développement des thymocytes**

Au niveau chromatinien, les événements moléculaires les plus étudiés au cours de la différenciation sont ceux qui interviennent dans l'activation de la transcription. Les bases moléculaires de l'extinction des gènes et l'inactivation héréditaire des gènes sont bien moins compris. Ceci est surprenant du fait que non seulement une large proportion de gènes sont inactifs dans les cellules eucaryotes mais surtout car l'inactivation héréditaire des gènes semble être un processus important dans de nombreux processus de développement. Par exemple, lors de la différenciation des lymphocytes à partir des précurseurs hématopoïétiques, ces derniers perdent progressivement la capacité à changer de type cellulaire. Cette perte directionnelle de potentiel de lignage est probablement due à une extinction progressive du génome plutôt qu'à une activation séquentielle. Une démonstration assez évidente de ce mécanisme est donnée par le rôle crucial du facteur de transcription Pax-5 dans la répression de gènes définissant divers lignages lors de l'engagement vers les cellules B (Akashi et al., 2000).

Bien que l'identité cellulaire soit donnée par son activité transcriptionnelle, de nombreux régulateurs clés, qui définissent la compétence transcriptionnelle d'une cellule, ne sont exprimés que de façon transitoire à des stades précoces du développement. Afin que ce répertoire initial d'activation et de répression génique soit « mémorisé » par les cellules lors des stades plus tardifs, un second groupe de facteurs (regroupés dans les familles de protéines Polycomb (Pc-G) et Trithorax (Trx-G)) est nécessaire pour stabiliser et maintenir ce profil d'expression. Le compartiment lymphoïde de souris déficientes pour des Pc-G est particulièrement affecté par la mutation : la rate et le thymus de mutants homozygotes sont de petite taille et contiennent des lymphocytes peu prolifératifs en réponse aux agents mitogènes (Akasaka et al., 1996; Core et al., 1997; Takihara and Hara, ; van der Lugt et al., 1994).

### **V.3.1. Ikaros et le remodelage de la chromatine.**

La protéine Ikaros est associée à plusieurs gènes transcriptionnellement inactifs, et ces loci sont recrutés au niveau de l'ADN centromérique dans les lymphocytes en division (Brown et al., 1999; Brown et al., 1997). Bien que l'on ne sache pas exactement comment Ikaros régule l'expression des gènes ou pourquoi il est crucial au développement des cellules T, B et NK, il est fort probable qu'Ikaros joue un rôle particulier en comparaison aux activateurs de transcription classique. Par exemple, Ikaros est en compétition avec la protéine activatrice Elf-1 (membre de la famille Ets) pour la liaison de la région D' du promoteur *TdT* ; des mutations qui empêchent la liaison d'Ikaros à l'ADN inhibent la répression du gène *TdT* pendant la différenciation des cellules T (Trinh et al., 2001). Une autre étude analysant l'effet de séquences de liaison à Ikaros dans le promoteur du gène  $\lambda 5$  a également montré l'importance d'Ikaros dans l'extinction de gène (Sabbattini et al., 2001). Lorsque les sites de fixation à Ikaros sont mutés, le transgène n'est pas réprimé convenablement dans les cellules B matures. D'après ces données, il semble qu'Ikaros est capable d'initier le processus d'extinction de gènes.

### **V.3.2. Méthylation et répression de la transcription dans les lymphocytes**

Dnmt1 est nécessaire à la maturation correcte des progéniteurs thymiques comme le montre l'étude de souris n'exprimant plus Dnmt1 dans le lignage T (Lee et al., 2001) La délétion conditionnelle de Dnmt1 au stade DN2 est suivie par la multiplication cellulaire et la réplication de l'ADN en réponse à la  $\beta$ -sélection au stade DN3, dont la résultante est une perte de méthylation de l'ADN en DP et aux stades plus tardifs de maturation. Cela est associé avec une réduction importante de cellules  $T\alpha\beta$  aux stades DP, SP et dans la périphérie. Ceci est due à l'apoptose des cellules dont le taux de méthylation tombe sous un seuil critique.

### **V.3.3. Régulation de la méthylation du TCR.**

L'ADN du locus du TCR est méthylé dans les thymocytes DN. Une voie impliquant la signalisation par IL-7R $\alpha$  permet l'activation du gène TCR $\beta$  démontrée par l'émergence de sites d'hypersensibilité à la DNaseI et par la déméthylation de sites CpG (Chattopadhyay et al., 1998; Durum et al., 1998; Hozumi et al., 1996; Sakamoto et al., 1988). Ces événements autorisent l'accès du locus à la machinerie de recombinaison V(D)J, et permettent ainsi l'expression de la chaîne  $\beta$  du TCR pour son incorporation dans le pré-TCR (Krangel, 2003). La signalisation via le pré-TCR active les complexes de remodelage de la chromatine BAF ATP-dépendant qui affectent l'expression de nombreux gènes de survie et de différenciation et induit l'exclusion de l'autre allèle du TCR $\beta$  (Peters et al., 2003). L'exclusion allélique se caractérise par une hyperméthylation de l'ADN et la compaction de la chromatine. L'étude d'un minilocus artificiel du TCR $\beta$  montre le recrutement d'histone H3K9 méthyltransférase lors du phénomène d'exclusion allélique (Osipovich et al., 2004) ; ces résultats n'ont pas été montré dans le contexte endogène. Un processus similaire pourrait avoir lieu durant la recombinaison du locus du TCR $\gamma$  (Huang et al., 2001). Par ailleurs, une étude récente montre que le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine, SWI/SNF, au niveau des segments D du TCR $\beta$  est nécessaire au réarrangement du gène. (Osipovich et al., 2007)

L'absence de réarrangement du TCR $\gamma$  dans les souris IL-7R $\alpha$  KO est associée à la persistance de la méthylation au niveau de l'enhancer, suggérant que la déméthylation de l'ADN est soit nécessaire pour le réarrangement du locus, soit est une conséquence d'autres processus essentiels (Durum et al., 1998). Bien que les thymocytes déficients pour Dnmt1 aient une recombinaison V(D)J et une exclusion allélique normale, cela n'exclut pas la possibilité que la déméthylation soit nécessaire à la recombinaison ou qu'un taux approprié d'ADN méthylé soit requis.

#### **V.3.4. Régulation du locus Tdt dans les cellules T.**

L'extinction irréversible de l'expression de la terminale déoxynucléotidyl transférase dans les thymocytes matures est liée au développement des cellules T. L'extinction est associée à un remodelage des nucléosomes : la perte de H3K9-Ac et le gain de H3K9-Me au niveau du promoteur de TdT (Tanigaki et al., 2004). La méthylation des histones est initiée au niveau du promoteur puis diffuse le long du gène. La relocalisation du gène TdT vers

l'hétérochromatine est un événement assez précoce dans les thymocytes, tandis que la méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG est un événement assez tardif qui continue d'augmenter dans les cellules T matures après migration du thymus vers la rate.

### **V.3.5. Régulation épigénétique de l'expression de CD4.**

Le gène CD4 est la cible de répression réversible dans les DN et est ensuite éteint de façon permanente dans les SP CD8+. Cette extinction est un événement régulé de manière épigénétique mais la méthylation ne semble pas être nécessaire. A la place, des voies de répression spécifiques des cellules CD8+ se mettent en place, Runx3 interagit en cis avec une séquence CD4 silencer définie (Taniuchi et al., 2002). La machinerie d'extinction induite par Runx3 implique d'autres facteurs d'extinction (Woolf et al., 2003), des HATs (Williams et al., 2004), des complexes de remodelage de la chromatine de type BAF (Taniuchi et al., 2002), et/ou la protéine hétérochromatinienne HP1 (Taniuchi and Littman, 2004). L'hérédité de ces modifications épigénétiques est suffisamment fidèle pour être maintenue même après le départ du signal initiateur (Zou et al., 2001).

### **V.3.6. Régulation épigénétique de l'expression de CD8.**

La déméthylation des gènes *CD8 $\alpha$*  et *CD8 $\beta$*  a lieu au cours de la maturation des thymocytes du stade DN vers DP. Les vestiges de déméthylation des gènes *CD8* dans les cellules SP CD4+ prouvent que ces cellules dérivent de précurseurs ayant exprimé *CD8* au préalable (Carbone et al., 1988; Wu et al., 1990). La reméthylation de novo du gène *CD8 $\alpha$*  a été associée à la mort des cellules thymiques émigrantes mal sélectionnées (Pestano et al., 1999). Cependant d'autres mécanismes doivent être capables d'éteindre les gènes *CD8* après l'engagement cellulaire vers les SP CD4+, car aucune cellule DP n'est retrouvée dans la périphérie dans les souris *Dnmt1*<sup>-/-</sup>. GATA3 est un bon candidat pour jouer ce rôle, car sa surexpression inhibe le développement des cellules SP CD8+ tandis que l'expression du répresseur de GATA3 (ROG) augmente le taux de cellules SP CD8+ (Hernandez-Hoyos et al., 2003). Aucun lien direct entre GATA3 et la régulation épigénétique de *CD8* n'a encore

été défini. Cependant ce facteur de transcription joue un rôle important dans le contrôle de l'expression de l'IL-4 en interagissant avec une protéine liant les méthyl-CpG dans les cellules T.

La méthylation de l'ADN, les modifications d'histones, les facteurs de transcription et les complexes de remodelage de la chromatine coopèrent afin de réguler d'importants événements hérités de la cellule mère dans le compartiment des cellules T du système immunitaire, et ce tout au long du développement des cellules de la moins mature à la plus mature. Comme des altérations du répertoire du TCR sont impliquées dans l'auto-immunité, il ne semble pas incongru que l'origine de certaines maladies soit d'ordre épigénétique.

#### **V.4 Les dérégulations épigénétiques et les leucémies.**

Les dérégulations d'enzymes de modification chromatinienne ont été associées à l'étiologie de différentes pathologies hématopoïétiques. Dans certaines leucémies humaines, la translocation soit de HATs, soit de HDACs conduit à l'expression d'une protéine de fusion et induit la surexpression de gènes cibles (Hake et al., 2004). Dans la leucémie pro-myéloïde aigue, la protéine de fusion oncogène PML-RAR $\alpha$  recrute des HDACs afin de réprimer des gènes essentiels à la différenciation des cellules hématopoïétiques (Grignani et al., 1998). De façon similaire, dans une leucémie myéloïde aigue, des fusions AML1-ETO recrutent le complexe de répression N-CoR-Sin3-HDAC1 et inhibent le développement myéloïde (Fryer et al., 2002).

D'autre part, le rôle des protéines Pc-G dans le contrôle du cycle cellulaire dans les lymphocytes n'est pas clairement défini, cependant la surexpression de la protéine Pc-G Bmi-1 prédispose les souris au développement de lymphomes (Alkema et al., 1995).

Mon travail de thèse a consisté à déterminer d'un point de vue moléculaire et fonctionnel le rôle de la fixation d'Ikaros sur les séquences régulatrices dépendantes de Notch. J'ai démontré qu'Ikaros et CSL peuvent se fixer sur ces séquences cibles de façon compétitive, et que la fixation d'Ikaros permet une répression stable des gènes correspondants lors de la différenciation des thymocytes. J'ai focalisé mon étude sur le gène Hes-1 qui est un gène cible prototype de Notch, et l'un des seuls pour lequel les éléments régulateurs sont bien caractérisés.

## **II. Matériels et Méthodes**

## I. Essai gène rapporteur luciférase.

2,5.10<sup>6</sup> cellules HeLa ont été transfectées avec l'un des plasmides rapporteurs luciférase suivant : Hes-1 luc, Hes-1 luc $\Delta$ A, Hes-1 luc $\Delta$ B et Hes-1 luc $\Delta$ AB. Les autres plasmides contenant NIC, Ikaros, ou CSL ainsi que le gène normalisateur de la *Renilla* ou de la *GFP* ont été également transfectés dans le même mélange en fonction des expériences réalisées. La quantité d'ADN totale par puits transfecté a été maintenue constante par l'ajout des vecteurs vides correspondants. 48h après la transfection au JetPEI (Ozyme), les cellules ont été lysées et l'activité luciférase du gène rapporteur et du gène normalisateur a été mesurée avec le système dual-luciferase reporter assay system (Promega). Les valeurs de luciférase ont été corrigées en fonction de l'efficacité de transfection en divisant les résultats bruts de la luciférase par les résultats de la *Renilla* ou le pourcentage de cellules GFP positive.

## II. Les vecteurs rétroviraux.

MigR1 est un vecteur rétroviral spécifique de cellules souches murines avec une séquence IRES (internal ribosome entry site) et une séquence codant pour le gène de la GFP (green fluorescent protein). La fusion entre la séquence codante d'Ikaros et le tag HA (Hémagglutinine) a été réalisée par PCR et appelée HAIk. dnMam11 a été obtenu en réalisant une PCR sur l'ADNc du gène en amplifiant la partie correspondant aux acides aminés 13 à 64 (Weng et al., 2003). Les deux séquences ont été insérées dans le vecteur MigR1 par digestion/ligation afin de donner les vecteurs rétroviraux Mig-HAIk et Mig-dnMam11.

Afin de produire de grandes quantités de rétrovirus, les plasmides rétroviraux MigR1, Ik1, HAIk et dnMAML1 ont été transfectés dans les cellules d'emballage Eco-Phoenix. Les surnageants contenant les virus ont été récoltés, titrés, aliquotés et congelés.

### **III. Culture des lignées cellulaires IkL/L et infections des cellules avec les vecteurs rétroviraux.**

Les lignées T29, T64 et T153 dérivent de tumeurs primaires de souris Ik<sup>L/L</sup> qui sont cultivées dans du RPMI1640, 10% de sérum de veau fœtal, 1mM de pyruvate de sodium, 2mM de L-Glutamine, 1% de pénicilline, et 1% de streptomycine. 10<sup>6</sup> cellules T29 ou T64 ont été transduits avec 0,5 ml de surnageant (contenant les virus) par centrifugation pendant 90 min à 2600 rpm en présence de 4µg/ml de polybrène. Après infection, les cellules ont été repiquées toutes les 24h à une concentration de 500x10<sup>3</sup> cellules/ml dans du milieu frais.

### **IV. Expérience de reconstitution de tumeurs.**

Des souris C57Bl/6 (d'haplotype Ly5.1) ont été irradiées à une dose sub-létale de 6 Gray, puis les cellules tumorales (d'haplotype Ly5.2) en suspension dans du PBS1x ont été injectées par intraveineuse dans la queue. Un groupe de souris a servi à l'étude de la survie, et l'autre a été sacrifié à temps donné pour voir l'évolution de la tumorigénèse.

### **V. Immunoprécipitation Chromatinienne.**

Les essais d'immunoprécipitation chromatinienne ont été réalisés à partir d'environ ~1.5x10<sup>6</sup> thymocytes triés, fixés dans 1% de formaldéhyde (sans méthanol) pendant 10 min à 37°C. La réaction a été stoppée avec 125 mM de glycine. Les cellules fixées ont été lavées deux fois au PBS1X froid. Les culots de cellules ont été resuspendus dans du tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH8.1, 10mM EDTA, 1% SDS) avec de l'inhibiteur de protéase, puis incubés 10 min dans la glace. Les noyaux ont alors été soniqués de telle sorte à obtenir des fragments d'ADN de 300 à 1000bp avec le sonicateur Diagenode – Bioruptor. La chromatine a été clarifiée par centrifugation 15 min à 14000 rpm à 4°C. Des fractions de chromatine (correspondant à 5x10<sup>6</sup> cellules chacune) ont été préparées avec 80 µl de protéine A sépharose sous agitation pendant 1h, puis l'équivalent de 1.5x10<sup>6</sup> cellules a été incubé toute la nuit avec les anticorps indiqués pour chaque expérience. Les complexes immuns ont été précipités avec des billes de protéine A sépharose pendant 2h à 4°C. Les billes ont alors été lavées une fois

avec le tampon « low-salt » ( 20mM Tris-HCl pH8.1, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton-X-100, 0.1% SDS), « high salt » (500mM NaCl), et le tampon LiCl ( 10mM Tris-HCl pH8.1, 1mM EDTA, 1% deoxycholate, 1% NP-40, 0.25M LiCl), et deux fois au TE. Les complexes immuns ont été élués avec 1% SDS + 0.1M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>. La liaison des protéines à l'ADN est détruite en incubant les échantillons 4-6h à 65°C. Les protéines ont été digérées par un traitement à la protéinase K pendant 1h à 45°C suivie d'une extraction au phénol/chloroforme. L'ADN a été précipité à l'éthanol et resuspendu dans 500µl d'eau afin d'être analysé par PCR quantitative en temps réel (qPCR) avec les couples d'amorces spécifiques pour la région promotrice *CD8α* et celles du promoteur *Hes-1*. Les anticorps utilisés pour cette expérience sont les suivants : Histone H3 acétylé (06-599 (Millipore)), H3-K9 acétylé (07-352 (Millipore)), H3-K4 diméthylé (ab7766 (Abcam)), H3-K9 diméthylé (07-441 (Millipore)), H3-K27 diméthylé (07-452 (Millipore)), CSL (K0043 (Institute of Immunology Co., Ltd)). L'anticorps reconnaissant Ikaros est un anticorps polyclonal de lapin généré dans notre laboratoire.

## VI. qPCR ou PCR quantitatives en temps réel.

Lors des qPCR, les échantillons de ChIP ont été analysés en triplicat grâce au SYBR Green JumpStart TaqReadyMix (Sigma) dans un LightCycler 480 Real – Time PCR System (Roche). 5µl des 400µl d'éluat de ChIP ont été utilisés pour chaque réaction de qPCR avec les primer décrit dans la table 1. L'ADN de l'input a été dilué au 1/10. Le nombre de copies relatives à l'input pour chaque échantillon de ChIP a été calculé à partir des courbes standards grâce au logiciel LightCycler 480 Real – Time PCR Data Analysis Software. Une courbe standard a été préparée pour chaque couple d'amorces en utilisant une titration par une série de dilutions d'un nombre connu de copies de l'ADN initial (ADN de cellules T).

Gene		Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
pHes-1	-1kb	CCTCCCATTTGGCTGAAAGT	AGCTCCAGATCCTGTGTGATCC
	-2kb	ACGCACGCACACACACATCCTT	CCGAGCTGCAGTTTGACAT
	-3kb	CAAGGGTCTTGTGTGTGGTG	TATGGCTGAGGTGTTGGAAA
	-5kb	ACGGGTGGTGGGTTACT	TACTCCCAAAGCAGGAGGAA

	-7kb	ACACACACACACACCCTGCT	GTCAAGACCCACCCGAGTTA
	-9kb	CTCCCGCATACTAGGTGCTC	GACTGGTCTGTTGCCTTGGT
	-10kb	TTACCCTGGGAATTGCTTTG	CAGCACCTCCTGGATACTC
pCD8a	-1kb	TTTCAATTCCTCCCCTTGC	TTTAGCCAGCTGCAGACAGA

## VII. Gel retard-Supershift.

Les protéines CSL et Ik1 ont été produites dans des cellules Cos-1. Les extraits nucléaires ont été préparés en resuspendant  $10^7$  de cellules dans 500µl de tampon de lyse (10 mM HEPES, pH7.9 ; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 10 mM KCl ; 0.5 mM dithiothréitol (DTT)) 10 minutes sur glace. Les noyaux ont été récupérés par centrifugation et resuspendus dans 50µl du tampon suivant : 20 mM HEPES, pH7.9 ; 25% glycérol ; 420 mM NaCl ; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 0.2 mM EDTA ; 0.5 mM DTT ; cocktail inhibiteur de protéases. Après centrifugation, les extraits nucléaires ont été quantifiés par 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, pH7.9 ; 0.2 mM EDTA ; 20% glycérol ; 100 mM KCl et 1 mM DTT), en présence de 2µg de polydIdC, 1µg de BSA, 10µM de ZnCl<sub>2</sub> en présence ou en l'absence des anticorps anti-CSL (RBP-Jk TK0043, Institute of Immunology Co., Ltd Japan) ou anti-Ik. La sonde marquée à l'ATPγ<sub>32</sub>P ( $50 \times 10^3$  cpm) a alors été ajoutée pour une incubation supplémentaire de 25 min sur glace. Les complexes ADN-protéines sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 5% et migrés à 15mA. Les sondes suivantes ont été utilisées pour mes expériences de gel retard :

Hes-1	-1kb	
	AB	5'-ACTGTGGGAAAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC-3
	AmB	5'-ACTGTGCTGCAGAAAGTTTGGGAAGTTTCAC-3
	ABm	5'-ACTGTGGGAAAGAAAGTTTGGCTGCGTTTCAC-3'
	-10kb	
	AB	5'-CGCTCCTTCCCACGTACCTTACCCTGGGAATTGCTT-3'
	AmB	5'-CGCTCCTTGGCACGTACCTTACCCTGGGAATTGCTT-3'
	ABm	5'-CGCTCCTTCCCACGTACCTTACCCTGCCAATTGCTT-3'
	AmBm	5'-CGCTCCTTCCCACGTACCTTACCCTGCCAATTGCTT-3'

### **VIII. Alignement de séquences.**

Les séquences ont été extraites via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>. La séquence du gène Hes-1 de souris et un groupe de séquences orthologues (humain, rat, chimpanzé, macaque et vache) ont été extraite de -20 kb à +1 kb en accord avec le codon initiateur et ont été utilisées comme input dans une analyse PromAn (<http://bips.u-strasbg.fr/PromAn/>). Les données ont été visualisées et analysées dans GeneDoc (<http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/ibmpc/genedoc-readme.html>).

### **IX. Anticorps et cytométrie en flux.**

Afin d'enrichir la population DN, les suspensions cellulaires ont été incubées avec des concentrations saturantes d'anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8alpha (YTS169.4), anti-CD3 (KT3), anti-B220 (RA3.6B2), anti-CD11b (M1/70), anti-Gr1 (RB6-8C5), anti-NK1.1 (PK/36). Les cellules ayant été reconnues par un anticorps sont captées par des billes magnétiques couplées à des IgG de rat (Dynal, Biotech). Les suspensions de thymocytes sont ensuite marquées grâce aux anticorps suivant : anti-CD8a-FITC, anti-CD4-PE (tous deux de chez Caltag), anti-CD3-Cy5 (KT3), anti-CD25-PE et CD44-Cy5 (tous deux de BD Pharmingen). Les cellules ont été analysées par FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Les résultats correspondants ont été analysés avec le logiciel FlowJo (Tree Star, Inc., San Carlos, CA).

Pour les expériences de tri, les cellules en suspension marquées ont été passées au FACSVantage SE option DiVa (BD BioSciences) à une pression de 40 p.s.i. et avec un délais d'environ 98000 gouttes/s. Ceci m'a permis de trier 25-30000 cellules/s, avec un taux d'avortement de 10-12%.

### **X. RT-qPCR Ikaros et CSL.**

Les ARN totaux ont été isolés en utilisant le kit RNeasy (Qiagen SA, Valencia, CA), et resuspendus dans 12 $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Les ARN dilués au 1/10 ont été analysés grâce au SYBR Green

JumpStart TaqReadyMix (Sigma) avec un LightCycler 480 Real – Time PCR System (Roche) dans une réaction de RT-PCR en une étape comme suit : 60°C pendant 45 sec, 55°C pendant 10 min, 95°C pendant 5 min puis 40 cycles à 95°C 10 sec, 60°C 15 sec et 72°C 15 sec. Les amorces suivantes ont été utilisées :

Gene	Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
Hes-1	TGAAAACACTGATTTTGGATGC	GCTCGGGTCTGTGCTGAG
Ikaros	CATAAAGAGCGATGCCACAA	CAGGACAAGGGACCTCTCTG
CSL	TGGCACTGTTCAATCGCCTT	AATCTTGGGAGTGCCATGCCA

## XI. Western blots.

Les culots de cellules ont été resuspendus dans du tampon de charge 1x (0.33M Tris pH6.8, 10% Glycerol, 1.5% SDS, 1.5% 2-mercapto-ethanol). Les échantillons ont été déposés pour la migration sur un gel 6 à 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide. Après transfert, les membranes PVDF (Immobilon-P, Millipore) ont incubées toute la nuit avec les anticorps suivant : Notch1 clivé (Cell Signaling, n°2421), CSL (Institute of Immunology and Co, Ltd. T6719), Ikaros, ou  $\beta$ -actine (Sigma, A5441). Tous les anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase et proviennent de chez Jackson Immunoresearch. Les complexes ont été révélés avec l'Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

## XII. Marquage par Immunofluorescence.

70000 cellules triées ont été centrifugées sur une lame SuperFrost Plus 5 min à 800 rpm. Les cellules sur lame ont ensuite été fixées pendant 20 min dans du PBS 4% paraformaldéhyde 0.1% tween à 4°C. Les cellules ont ensuite été marquées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre Ikaros (produit au sein de notre laboratoire), dilué 500 fois dans du PBS1x ; puis 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé au Cy3 (Jackson Immunoresearch) dilué 1000 fois ; et enfin montées dans du vectashield (Vector Laboratories, Inc.) contenant du 1% de DAPI puis observées au microscope à épifluorescence au grossissement x63 (Leica).

### XIII. « Single-cell »

Les cellules ont été triées dans des plaques 96 puits dans 10 $\mu$ l de tampon de transcription reverse par puits (50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 500 $\mu$ M dNTP, 1% Triton X, 10U Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), 0.5 $\mu$ M reverse primer and 40U SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)) à raison d'une seule cellule par puits. Directement après le tri, les plaques ont été centrifugées 3 minutes à 2300rpm puis incubées 90 minutes à 37°C dans un incubateur humide. Lors de la première PCR, 40 $\mu$ l du mélange suivant a été ajouté à chaque puits pour un volume final de 50 $\mu$ l (1x GoTaq Polymerase Buffer (Promega), 200 $\mu$ M dNTP, 2 $\mu$ M forward and reverse primers and 2U GoTaq polymerase (Promega)). La plaque a été soumise au protocole de polymérisation en chaîne comme suit : 5 min. à 94°C; 40 cycles de 30 sec. à 94°C, 30 sec. à 60°C et 30 sec. A 72°C; 10 min. à 72°C). Pour la seconde PCR, 3 $\mu$ l de produit de la première PCR ont été prélevés et amplifiés dans une réaction de 50 $\mu$ l de même composition que précédemment grâce à des amorces internes à la séquence amplifiée lors de la première PCR (« nested PCR »). Les produits de cette dernière réaction ont été visualisés après migration sur un gel d'agarose 2% coloré au BET. Les amorces utilisées sont les suivantes :

Gene	Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
$\beta$ -Actin 1ere PCR	CCCTGAAGTACCCCATTGAA	GGGCACAGTGTGGGTGAC
2eme PCR	TGTTACCAACTGGGACGACA	CCATCACAATGCCTGTGGTA
Hes-1 1ere PCR	ACACCGGACAAACCAAAGAC	TGATCTGGGTCATGCAGTTG
2eme PCR	GAGCACAGAAAGTCATCAAAGC	CCTCACACGTGGACAGGAA

## **III. Résultats**

### **I. Section I**

Mon projet de thèse a été initié suite aux résultats obtenus par A.Dumortier au sein de mon laboratoire d'accueil.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement des lymphomes thymiques chez les souris  $Ik^{L/L}$ , j'ai analysé d'un point de vue moléculaire et fonctionnel les interactions entre Ikaros et Notch dans les cellules T. Ma recherche s'est orientée selon deux axes majeurs : 1- la détermination du rôle de l'activation de la voie Notch dans le phénotype tumoral  $Ik^{L/L}$ . 2- la détermination des mécanismes moléculaires par lesquels l'expression des gènes cibles de Notch est inhibée par Ikaros. Par ailleurs, afin de mieux situer le contexte de l'étude, j'exposerai dans un premier temps les résultats qui ont conduit à l'élaboration de mes hypothèses de travail.

**1<sup>ère</sup> partie : L'activation précoce de la voie Notch est un événement majeur du développement de lymphomes thymiques dans les souris  $Ik^{L/L}$ .**

Comme précédemment décrit dans l'introduction, Ikaros et Notch sont des gènes qui ont été indépendamment impliqués dans le développement de leucémie T chez l'homme et la souris. Les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels ces gènes participent au développement tumoral restent cependant encore méconnus.

Au sein du laboratoire, une lignée de souris portant une mutation hypomorphe d'Ikaros a été générée (Kirstetter et al., 2002). Toutes les souris homozygotes ( $Ik^{L/L}$ ) développent des lymphomes thymiques avec 100% de pénétrance. Ce phénotype marquant laisse supposer qu'Ikaros joue un rôle essentiel dans la régulation de mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigénèse chez les souris  $Ik^{L/L}$ .

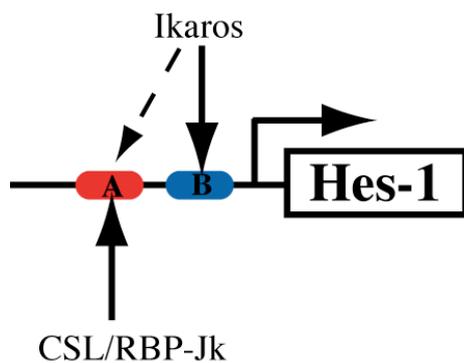
### **I.1 Données publiées**

L'étude du transcriptome des tumeurs thymiques de souris hypomorphes pour le gène Ikaros a montré une forte surexpression des gènes de la voie Notch dans ce type de tumeurs. De plus, lorsque l'activation de cette voie de signalisation est inhibée par un traitement à l'inhibiteur de  $\gamma$ -sécrétase, la prolifération de lignées cellulaires dérivant de tumeurs primaires de souris  $Ik^{L/L}$  cesse. Cela suggère fortement que la prolifération tumorale nécessite l'activation de Notch. Ce phénomène d'activation est dérégulé précocement au cours de la tumorigénèse dans ces souris et semble précéder la transformation des cellules, car on observe l'expression ectopique des gènes cibles de Notch, Hes-1 et Deltex-1, dans les thymocytes de jeunes souris n'exhibant pas encore de signes extérieurs de transformation. De façon intéressante, la réexpression d'Ikaros, par transduction rétrovirale dans les lignées tumorales, conduit à l'arrêt de la prolifération des cellules et à la répression rapide et spécifique des gènes cibles de Notch. En outre, j'ai montré qu'Ikaros se fixe fortement sur les éléments de réponse à Notch du promoteur Hes-1 modulant ainsi l'activation de la transcription Notch-dépendante de ce promoteur.

Ces résultats sont présentés dans l'article : « Notch activation is an early and critical event during T-cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice ».

## I.2 Résultats complémentaires

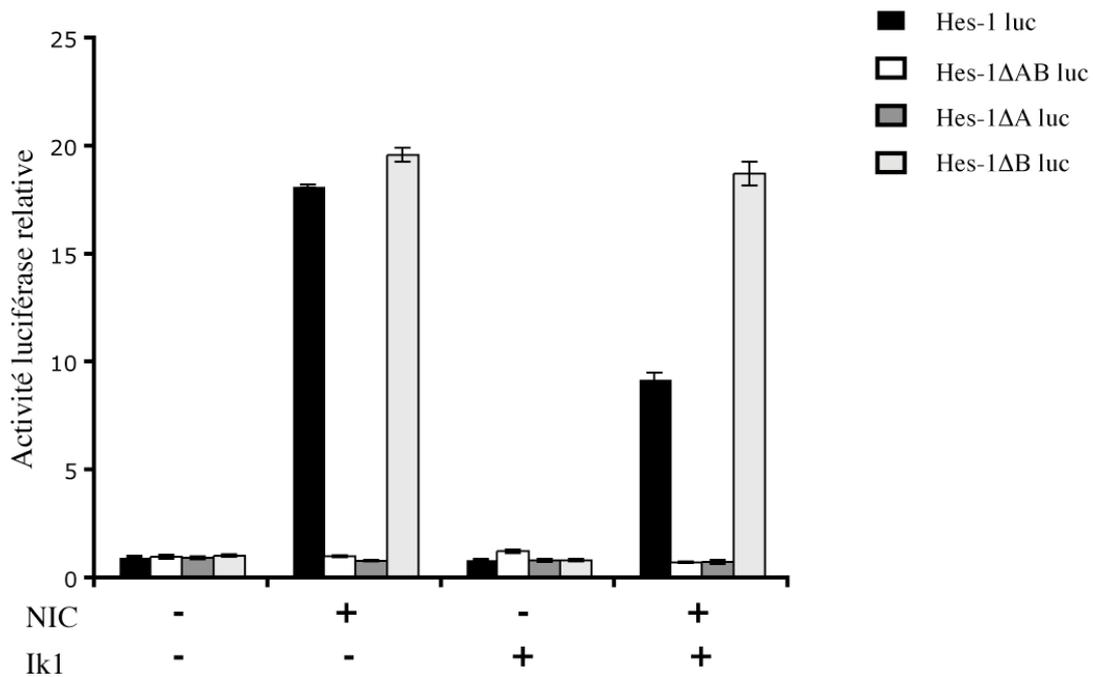
Dans l'article Dumortier et al, nous avons montré qu'Ikaros est capable de se lier à une séquence d'ADN contenant une séquence consensus de CSL répétée en tandem et annoté sites A et B (Figure R1). Afin de vérifier l'importance des sites A et B du promoteur Hes-1 précédemment décrits par Jarriault et al (Jarriault et al., 1995), j'ai analysé la répression par Ikaros sur des séquences promotrices mutées pour le site A ou pour le site B. Mon hypothèse de départ, d'après les résultats de gel retard (Kleinmann et al, manuscrit soumis), est qu'Ikaros a une forte affinité pour le site B et une plus faible pour le site A, tandis que CSL reconnaît essentiellement le site A (Figure R1).



**Figure R1 : Schéma des sites de liaisons du promoteur Hes-1.**  
Les flèches pleines indiquent une liaison forte de la protéine sur le site. La flèche en pointillé indique une affinité plus faible de la protéine pour le site.

## I.3 La répression via Ikaros nécessite un site B intact.

Dans des essais de gène rapporteur où ce dernier est sous le contrôle du promoteur Hes-1 $\Delta$ B, délété du site B de liaison à CSL, Ikaros n'est plus capable de réprimer l'activité NIC-dépendante (Figure R2). Cela suggère fortement qu'Ikaros nécessite le site B pour se fixer à la séquence du promoteur Hes-1 comme le laissait penser le gel retard. L'étude de l'effet d'Ikaros lorsque seul le site A de liaison à CSL est absent n'a pas été possible car, en l'absence de ce site, je n'observe pas d'activité lorsque j'ajoute uniquement NIC, ce qui corrobore avec l'abolition de la liaison de CSL sur le promoteur en gel retard (figure R2 et manuscrit soumis).



**Figure R2 : Le site B du promoteur Hes-1 est nécessaire à la répression par Ikaros.**

L'activité de répression d'Ikaros sur les sites de liaison de CSL (A et B) du promoteur Hes-1 a été testée grâce aux rapporteurs luciférase Hes-1 luc contenant les deux sites de liaisons A et B, Hes-1 ΔAB délété pour les deux sites, Hes-1 ΔA et Hes-1 ΔB délétés pour le site A et le site B respectivement. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides correspondant comme indiqué sur la figure : + : présent ; - : absent. En parallèle, le plasmide Renilla luciférase a également été transfecté dans tous les puits pour la normalisation, ainsi que les vecteurs vides afin de maintenir la quantité d'ADN constante. Les barres d'erreurs représentent les écart-types d'une expérience réalisée en triplicat.

Afin de confirmer la liaison de Ikaros avec les séquences régulatrices de promoteurs de gènes cibles de Notch et plus particulièrement du promoteur Hes-1, j'ai vérifié la réalité de cette interaction dans des lignées cellulaires murines.

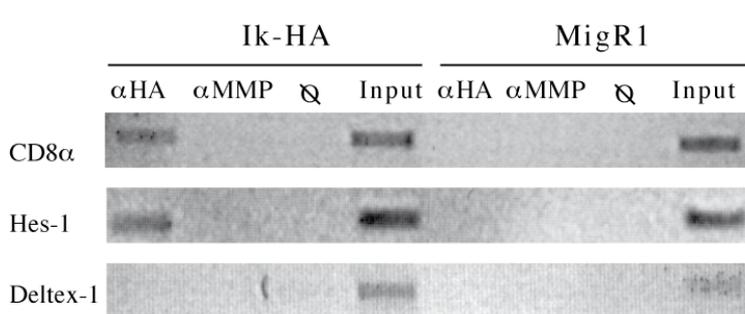
#### **I.4 La protéine Ikaros fusionnée au tag HA reconnaît le promoteur Hes-1 dans les lignées T29.**

Ikaros se lie aux séquences TGGGAA du promoteur Hes-1 en gel retard (Dumortier et al., 2006). De plus, il réprime la transcription d'un gène rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur Hes-1. L'existence d'une interaction physiologique entre la protéine Ikaros et le promoteur Hes-1 se devait donc d'être testée. Etant donné que je n'avais pas d'anticorps anti-Ikaros qui fonctionnait bien en immunoprécipitation, j'ai ajouté un épitope codant pour le tag hémagglutinine (HA) en N-terminal de la séquence d'Ikaros. J'ai ainsi testé la liaison au

promoteur Hes-1 de cette protéine tagguée dans un système de surexpression dans des lignées tumorales en culture (cellules T29, lignée dérivée de tumeurs primaires de souris  $Ik^{L/L}$ ).

Après le clonage de la séquence codant pour le tag HA en amont de la séquence d'Ikaros dans le vecteur rétroviral MigR1, j'ai vérifié par Western blot que la protéine HA-Ik1 est bien exprimée dans les cellules en culture. Ce système expérimental étant au point, j'ai réalisé des immunoprécipitations chromatiniennes, puis analysé par PCR la présence des séquences correspondant aux régions promotrices des gènes cibles de Notch.

Ainsi, j'ai montré qu'Ikaros se fixe sur des séquences cibles spécifiques bien caractérisées dans le promoteur de  $CD8\alpha$ , qui est un gène cible d'Ikaros connu (Harker et al., 2002). Il se lie également sur la région promotrice de Hes-1 (cf. Figure R3). Cependant, Ikaros ne se fixe pas au niveau de la séquence du promoteur de Deltex-1 testée, ni sur d'autres séquences géniques comme celles de CRXR3 ou l'extrémité 3' de Deltex-1. Cela montre qu'Ikaros se fixe sur les séquences régulatrices d'un gène cible de la voie Notch, établissant l'importance *in vivo* des observations antérieures d'une fixation d'Ikaros sur les éléments régulateurs de Notch *in vitro* (Dumortier et al., 2006). Ces données renforcent le concept d'une convergence moléculaire entre Ikaros et Notch au niveau de séquences cibles communes.



**Figure R3 : Fixation *in vitro* de Ikaros sur le promoteur de Hes-1.**

Les cellules de la lignée tumorale T29 ont été transduites avec le vecteur rétroviral Ik-HA ou le vecteur contrôle MigR1. Après immunoprécipitation chromatinienne avec un anticorps anti-HA ( $\alpha$ HA), un anticorps sans spécificité pour Ikaros ( $\alpha$ MMP) ou en omettant l'anticorps ( $\emptyset$ ), des PCR spécifiques des régions spécifiques des régions promotrices de  $CD8\alpha$ , Hes-1 et Deltex-1 sont réalisées.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère une convergence fonctionnelle de ces deux voies moléculaires au cours du développement des lymphomes thymiques. Toutes les données tendent à montrer qu'Ikaros est un régulateur négatif de l'expression génique dépendant de la signalisation par Notch. Ainsi, l'activation de cette voie en l'absence de Ikaros pourrait jouer un rôle central lors du développement tumoral chez les souris  $Ik^{L/L}$ .

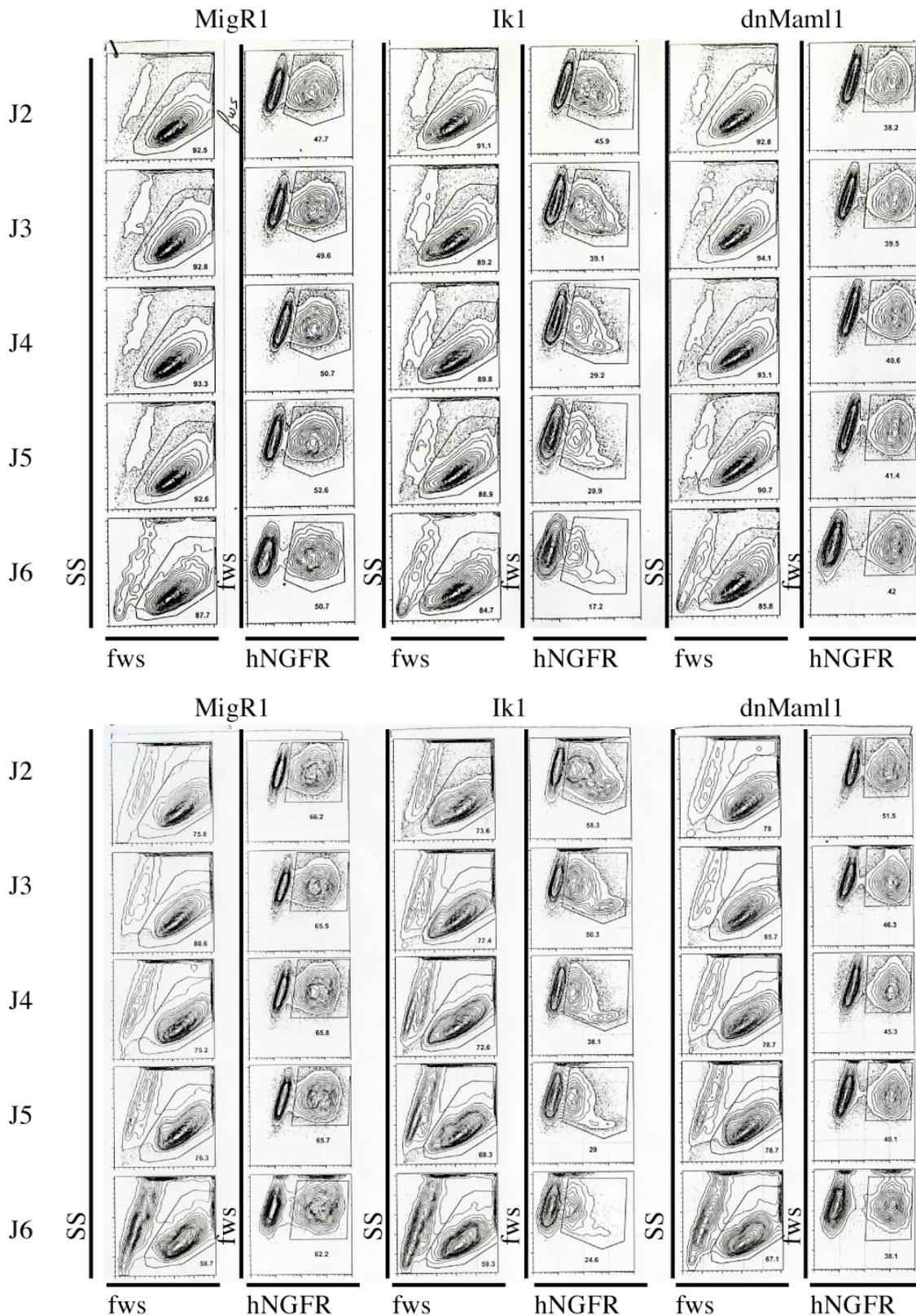
## II. SECTION II

**2<sup>ème</sup> partie : Détermination du rôle de l'activation de la voie Notch dans le phénotype tumoral Ik<sup>L/L</sup>.**

Le premier objectif de ma thèse a été d'établir d'un point de vue fonctionnel le rôle de l'activation de la voie Notch dans la détermination du phénotype tumoral chez les souris  $Ik^{L/L}$ . Existe-t-il un lien entre l'activation de la voie Notch et la détermination du phénotype transformé des cellules tumorales  $Ik^{L/L}$ ? A cette fin, j'ai tenté d'inhiber directement la voie Notch dans les lignées tumorales  $Ik^{L/L}$  pour observer si cette inhibition provoquait une diminution de la prolifération similaire à celle obtenue après surexpression de Ikaros (Dumortier et al., 2006).

## **II.1 Inhibition de la voie Notch grâce à la forme dominante négative de MAML1.**

Dans un premier temps, afin de vérifier que l'activation de la voie Notch est requise pour la prolifération des lignées tumorales  $Ik^{L/L}$  in vitro, j'ai voulu inhiber directement cette voie grâce à une forme dominante négative de la protéine Mastermind humaine, MAML1 (peptide comportant les acides aminés 13 à 74 appelé plus bas dnMAML1). Ce peptide peut se substituer à Mastermind pour assurer la formation efficace d'un complexe avec CSL, NIC et l'ADN, mais ce complexe a perdu les fonctions activatrices de la transcription contribuées par Mastermind (Weng et al., 2003). Le peptide dnMAML1 exerce donc une activité dominante-négative sur l'induction des gènes cibles de Notch. La première étape a consisté à cloner la séquence codante de ce fragment peptidique. La séquence codant pour le peptide 13-74 de MAML1 a été obtenue par RT-PCR à partir d'ARN de cellules de Jurkat, puis insérée dans le vecteur rétroviral MSCV-NGFR. Ce vecteur génère un messager bicistronique permettant l'expression simultanée de dnMAML1 et d'une forme inerte de la partie cellulaire du récepteur humain du NGF (nerve growth factor) ou hNGFR. La seconde étape a consisté en la transduction de nos lignées tumorales  $Ik^{L/L}$  avec le vecteur dnMAML1 et le vecteur  $Ik1$  comme contrôle. L'expression de dnMAML1 ne provoque ni la disparition progressive des cellules transduites (hNGFR+), ni une inhibition de la prolifération similaire à celle observée après surexpression d'Ikaros (cf Figure R4).



**Figure R4 : Transduction de lignées IkL/L (T29 et T64) avec les vecteurs exprimant Ik1 ou dnMaml1.** Les lignées IkL/L ont été transduites avec des vecteurs rétroviraux vides (MigR1) ou exprimant Ik1 ou dnMaml1. L'expression de hNGFR a été analysée tous les jours pendant 6 jours après infection. ss : sise scatter ; fws : forward scatter ; hNGFR : human Nerve Growth Factor.

Face à ce résultat, nous avons d'abord supposé que la protéine dnMAML1 n'était pas suffisamment exprimée à partir de notre vecteur pour avoir une activité dominante-négative dans les cellules hNGFR+ et que la protéine MAML1 endogène continuait d'assurer sa fonction au sein de la cellule. Afin de poursuivre nos expériences, l'équipe de John Aster nous a fourni le plasmide rétroviral qu'ils utilisent (Weng et al., 2003). La transduction de nos lignées tumorales Ik<sup>L/L</sup> avec leur rétrovirus permet l'inhibition de la prolifération cellulaire de nos lignées tumorales. En analysant la séquence, j'ai remarqué qu'ils ont fusionné dnMAML1 à la GFP, ce qui laisse à penser que le fragment peptidique dnMAML1 de 61 acides aminés n'est pas stable d'où l'absence d'effet dans nos cellules lors de nos expériences précédentes.

## **II.2 La réexpression d'Ikaros dans les lignées tumorales Ik<sup>L/L</sup> ne bloque pas la leucémogénèse *in vivo*.**

Dans un second temps, mon but a été de regarder le rôle d'Ikaros et de Notch dans la croissance des cellules tumorales *in vivo* par l'étude des capacités transformantes après transplantation de cellules tumorales des lignées Ik<sup>L/L</sup> dans des souris C57Bl/6 irradiées avec des doses sub-létales (6 Gray). L'injection de ce type de cellules provoque chez ces souris l'apparition de leucémie après un délai de 3-4 semaines, caractérisée par une splénomégalie et une présence abondante de cellules tumorales dans la moelle osseuse et le sang. J'ai utilisé ce système pour évaluer si la surexpression d'Ikaros permettait d'inhiber le développement de ces leucémies.

Avant de transplanter des cellules surexprimant Ikaros, j'ai testé la capacité de transformation de deux de nos lignées tumorales Ik<sup>L/L</sup> (T64 et T153) (cf. table R5). Le nombre minimal de cellules injectées est de  $2 \cdot 10^5$ . Après 3 semaines, toutes les souris injectées semblent malades comparées aux souris non injectées ou irradiées témoins. Après dissection, on observe que les organes de souris injectées sont couverts de métastases au niveau du foie, des reins, et développent des splénomégalies (rates 3 à 6 fois plus grosses qu'une rate normale) (cf. table R5). Cependant, les cellules ne semblent pas recoloniser le thymus.

Souris	Nb de cellules injectée	Poids de la rate	Poids d'un rein	Aspect du foie	Aspect des reins	Gangl lymph	Moelle Osseuse	Rate	
T64	1	NInj	60 mg	220 mg	Normal	Normal			
	2	5.10 <sup>6</sup>	270 mg	1110 mg	Mét	Blancs +Mét			
	3	5.10 <sup>6</sup>	250 mg	650 mg	Mét	Blancs +Mét			
	4	10 <sup>6</sup>	240 mg		Mét	Blancs +Mét	Abs		
	5	10 <sup>6</sup>	270 mg	570 mg	Mét	Blancs +Mét	Abs		
	6	2.10 <sup>5</sup>	670 mg	520 mg	Mét	Blancs +Mét	Petits	C Mortes	
	8	2.10 <sup>5</sup>	600 mg	790 mg	Normal	Mét	15.10 <sup>6</sup>	10.10 <sup>6</sup> 240.10 <sup>6</sup>	
	9	NIr 5.10 <sup>6</sup>	80 mg	250 mg	Normal	Normal	5.10 <sup>6</sup>	15.10 <sup>6</sup> 72.10 <sup>6</sup>	
	11	10 <sup>6</sup>	140 mg	340 mg	Normal	Mét	Abs	9.10 <sup>6</sup> 50.10 <sup>6</sup>	
	12	10 <sup>6</sup>	220 mg	390 mg	Normal	Mét	Abs	4,5.10 <sup>6</sup> 90.10 <sup>6</sup>	
	13	NIr 5.10 <sup>6</sup>	240 mg	610 mg	Normal	Mét	Abs	12.10 <sup>6</sup> 125.10 <sup>6</sup>	
	T153	14	NIr 5.10 <sup>6</sup>	80 mg	210 mg	Normal	Normal	Abs	8.10 <sup>6</sup> 16.10 <sup>6</sup>
		15	5.10 <sup>6</sup>	160 mg	330 mg	Normal	Mét	Abs	5.10 <sup>6</sup> 45.10 <sup>6</sup>
16		5.10 <sup>6</sup>	170 mg	310 mg	Normal	Mét	Abs	4.10 <sup>6</sup> 13.10 <sup>6</sup>	
17		2.10 <sup>5</sup>	380 mg	400 mg	Normal	Mét	Abs	4.10 <sup>6</sup> 120.10 <sup>6</sup>	
18		2.10 <sup>5</sup>	340 mg	450 mg	Normal	Mét	Abs	4,5.10 <sup>6</sup> 180.10 <sup>6</sup>	

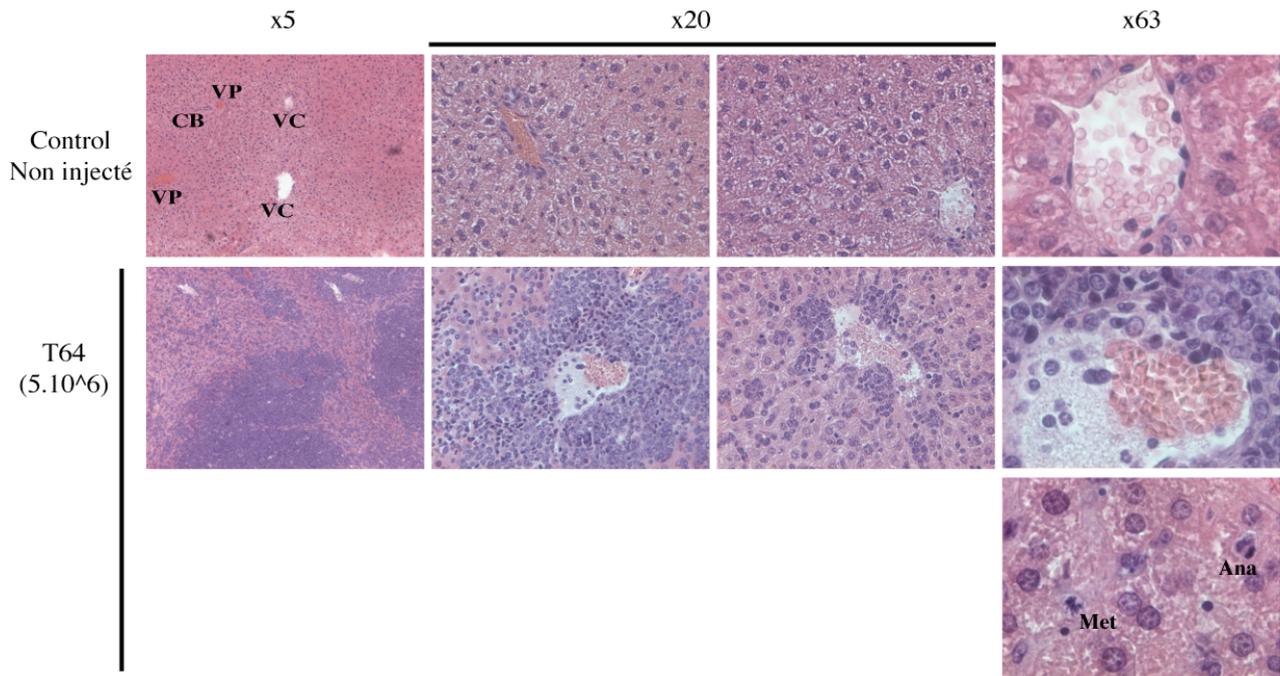
**Table R5** :Analyse de la taille et de la cellularité des organes de souris C57Bl/6 irradiées avec des doses sub-létales (6 Gray) puis injectées avec des cellules tumorales les lignées Ik<sup>L/L</sup> T64b et T153. Tous les thymi sont normaux comparés au contrôle de chaque groupe (en grisé dans le tableau). NInj : Non Injectée ; NIr : Non Irradiée ; Mét : Métastases ; Abs : Absent

On observe également la présence de nombreuses cellules de type lymphocytes (globules blancs) dans le sang de ces souris alors que le comptage des érythrocytes (globules rouges) est proche de la normale (cf. Table R6). Je suppose que ce sont des cellules tumorales circulantes.

	Souris	Comptage des globules blancs (x10 <sup>3</sup> /μl)	Comptage des globules rouges (x10 <sup>6</sup> /μl)
T64	1	NInj3,5	9,58
	2	12	7,2
	3	17	7,1
	8	19	10,6
	9	NIr 11,2	10,1
T153	11	ND	8
	12	ND	3
	13	ND	9,6
	14	NIr ND	10,5
	15	ND	7,1
	16	ND	7,1
	17	20	11
	18	12	9,8

**Table R6 :** Analyse de sang des souris C57Bl/6 irradiées avec des doses sub-létales (6 Gray) puis injectées avec des cellules tumorales des lignées Ik<sup>LL</sup>. Les souris contrôles sont en grisés. NInj : Non Injectée ; NIr : Non Irradiée ; Mét : Métastases ; Abs : Absent

L'observation de coupes histologiques du foie colorées à l'éosine-hématoxyline montre une déstructuration totale de l'organisation spatiale chez les souris injectées avec la lignée tumorale T64 (cf. Figure R7). Chez la souris contrôle, la forme des lobules hépatiques est préservée : sur le grossissement x5, on observe la veine centrolobulaire (VC), plusieurs branches de la veine porte (VP), et dans certain cas le canal biliaire (CB). Les vaisseaux sanguins contiennent des érythrocytes bien formés sous forme d'agrégats roses et des petites cellules constituées uniquement d'un noyau, probablement des lymphocytes. Le foie des souris injectées avec les cellules T64 présente des nodules et une invasion partielle plus ou moins avancée par de petites cellules de type « lymphocytes ». Dans les zones « intactes », la présence de nombreuses cellules en cours de division (une métaphase et une anaphase au grossissement x63) suggère que l'organe essaie de se régénérer.



**Figure R7 : Observation de développement de tumeurs dans le foie suite à l'injection de cellules tumorales dans des souris C57Bl/6 irradiées.**

Coupes histologiques de foie colorée à l'éosine-hématoxyline . Les cytoplasmes des cellules sont en rose et l'ADN des noyaux en violet. Après injection de  $5.10^6$  cellules tumorales de la lignée T64, on observe l'invasion de nombreuses petites cellules de type lymphocyte autour des vaisseaux sanguins. Cette invasion a tendance à s'étendre avec le temps. De plus les noyaux des cellules montrent une déstructuration importante, de nombreuses cellules sont en cours de division (essai de régénérescence de l'organe). CB : canal biliaire ; VC : veine centrolobulaire ; VP ; veine porte ; Met : Métephase ; Ana : Ana-phase.

L'expérience de transplantation avec les cellules tumorales  $Ik^{L/L}$  semblant fonctionner, j'ai transplanté des cellules  $GFP^-$  et  $GFP^+$ , purifiées à partir de cellules tumorales  $Ik^{L/L}$  en culture préalablement infectées avec le vecteur Mig-Ik1, dans des souris  $C57Bl/6^{Ly5.1}$ . L'utilisation de souris hôtes exprimant l'haplotype Ly5.1 me permettait d'identifier facilement les cellules transplantées (qui expriment l'haplotype Ly5.2). Dans cette expérience, je me proposais de suivre deux groupes d'animaux. Un premier groupe de 10 animaux me servait à déterminer la durée de survie. Les animaux d'un second groupe étant sacrifiés à un temps correspondant au début de la létalité des souris du groupe contrôle afin d'évaluer plusieurs paramètres comme: le poids de la rate, la présence de cellules tumorales dans les populations spléniques, médullaires et sanguines (détectées par l'expression de Ly5.2), l'infiltration de cellules tumorales dans d'autres organes (étudiée par histologie). Ces études devaient me permettre de déterminer si l'inhibition de la prolifération induite *in vitro* par l'expression d'Ikaros se traduit *in vivo* par une inhibition de la croissance tumorale.

Sur un groupe de 10 animaux injectés avec  $2 \cdot 10^5$  cellules, après 3 semaines, les souris ayant reçu les cellules GFP<sup>hi</sup> développent la maladie aussi rapidement que les animaux ayant reçu les cellules GFP<sup>lo</sup> et GFP. Il ne semble donc pas que l'inhibition de la prolifération induite *in vitro* par l'expression d'Ikaros se traduise *in vivo* par une inhibition de la croissance tumorale.

Quoiqu'il en soit, cela ne signifie pas qu'Ikaros n'est pas impliquée dans l'inhibition de la croissance tumorale. Lors d'expérience de cinétique avec des cellules tumorales réexprimant Ikaros, on observe la disparition rapide des cellules GFP<sup>hi</sup>, exprimant beaucoup Ikaros alors que les cellules GFP<sup>med</sup> ne disparaissent pas.

Cependant les résultats des ces expériences étant peu probants, j'ai décidé de focaliser la suite de mon travail de thèse sur la détermination des mécanismes moléculaires de répression des gènes cibles de Notch par Ikaros présenté dans la 3<sup>ème</sup> partie.

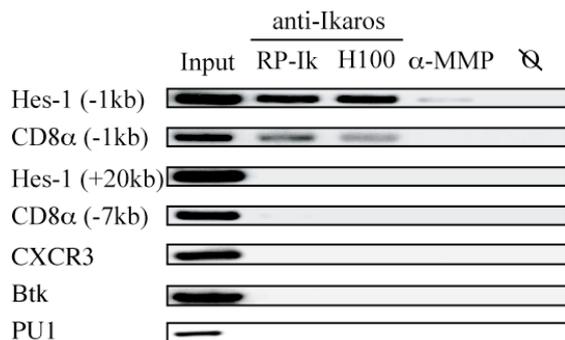
**III. Section III**

**3<sup>ème</sup> partie : Détermination des mécanismes moléculaires de répression des gènes cibles de Notch par Ikaros.**

### III.1 Expériences préliminaires.

#### III.1.1. Ikaros se lie au promoteur Hes-1 dans les thymocytes.

Précédemment (Résultats 1<sup>ère</sup> partie, Figure R3), j’ai montré dans un système de transduction avec un vecteur rétroviral que la protéine Ikaros tagguée avec l’épitope HA précipitait spécifiquement les séquences contenant les sites de liaison à CSL du promoteur Hes-1. Ce système artificiel ne permet cependant pas de conclure quant à la fixation de Ikaros sur le promoteur de Hes-1 dans les thymocytes, où Ikaros peut exercer un rôle physiologique de répresseur de Hes-1. Une vérification de la réalité physiologique de cette liaison de Ikaros sur le promoteur Hes-1 était donc nécessaire. J’ai alors vérifié par ChIP que Ikaros se lie effectivement aux séquences régulatrices de Hes-1 *in vivo*. Grâce à deux anticorps spécifiques pour Ikaros (l’anticorps polyclonal de lapin RP-Ik produit au laboratoire et l’anticorps H100 de Santa-Cruz), j’ai pu valider la fixation spécifique de Ikaros au niveau de ce promoteur. L’analyse par PCR d’amplicons correspondant aux régions promotrices des gènes cibles de Notch, montre que ces anticorps immunoprécipitent spécifiquement les séquences du promoteur Hes-1 comprenant les sites de liaisons à CSL, ainsi que celles du gène CD8 $\alpha$  (cf. Figure R8). Cependant, Ikaros ne se fixe pas au niveau d’autres séquences géniques de ces mêmes gènes, ni au niveau d’autres loci comme ceux de CXCR3, Btk, et PU1.



**Figure R8 :** Ikaros se lie au promoteur Hes-1 dans les thymocytes WT. Immunoprécipitation chromatiniene avec deux anticorps anti-Ikaros (Rp-Ik , H100) un anticorps sans spécificité pour Ikaros ( $\alpha$ MMP) ou en omettant l'anticorps ( $\emptyset$ ) de thymocytes de souris C57Bl/6. Les PCR spécifiques des régions promotrices de CD8 $\alpha$  et Hes-1 sont alors réalisées.

#### III.1.2. Données soumises à publication.

Une étude plus poussée du promoteur de *Hes-1* m’a permis de découvrir l’existence d’un second site de liaison potentiel pour CSL et Ikaros, conservé entre les espèces, à -9kb du

site d'initiation de la transcription. D'une part, Ikaros et CSL sont en compétition pour la liaison de ces séquences *in vitro*. D'autre part, Ikaros et NIC sont fortement associées aux deux sites du promoteur *Hes-1* dans les thymocytes DN mais absents dans les populations DP. Le profil de modification des histones dans ces deux populations suit la perte d'expression de *Hes-1* au cours de la différenciation : le locus est acétylé dans les cellules DN et fortement méthylé dans les cellules DP. De plus, la protéine Ikaros est fortement exprimée dans toutes les cellules DN4, alors que le taux de CSL reste constant à tous les stades de développement analysé, suggérant que la compétition entre les deux promoteurs aurait lieu au stade DN4. La signalisation par Notch est identique entre les souris WT et  $Ik^{L/L}$ , or *Hes-1* est surexprimé dans les populations DN4 chez les mutants. Le rôle d'Ikaros serait donc de réprimer l'activité de *Hes-1* de manière stade cellulaire spécifique. Par ailleurs, les cellules DP ne possédant pas Ikaros, à l'inverse des cellules WT, sont capables de réexprimer *Hes-1* lorsqu'elles sont mises en culture avec un ligand spécifique de la voie Notch. Cette réactivabilité peut s'expliquer par l'absence de marqueurs de répression au niveau du promoteur *Hes-1* chez les mutants. Ikaros semble donc être responsable, directement ou non, du remodelage du locus *Hes-1* au cours de la transition DN4-DP.

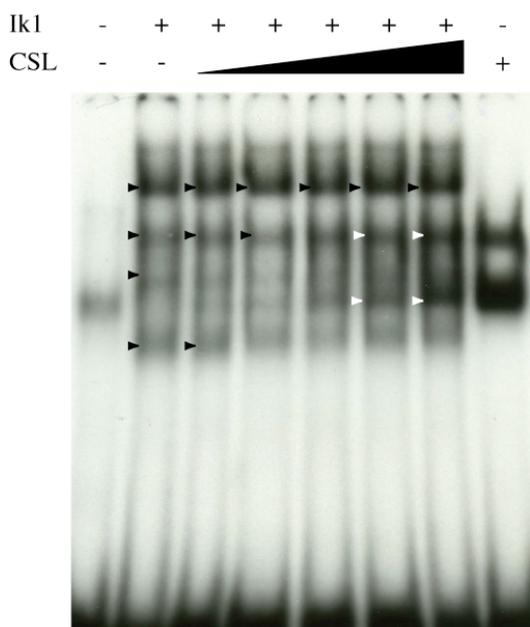
Ces expériences sont décrites dans le manuscrit « Ikaros is essential for Notch target gene *Hes-1* regulation during early T-cell development. »

### III.2 Résultats complémentaires.

#### III.2.1. Ikaros et CSL sont en compétition pour la liaison de Hes-1 *in vitro*.

Les expériences de gel retard présentées dans le manuscrit (cf. Figure 1c) montrent que le site A est requis à la fois pour la fixation efficace de Ikaros et de CSL, et suggèrent que les deux facteurs pourraient être en compétition pour la fixation au niveau de cette séquence.

J'ai confirmé cette hypothèse en réalisant une expérience de fixation où j'ai combiné les protéines Ikaros et CSL. En augmentant le rapport protéique Ikaros/CSL, je suis capable de convertir un profil de type CSL vers un profil de type Ikaros (cf Figure 1D du manuscrit). De plus, seulement 0,5  $\mu\text{g}$  d'extrait Ikaros suffisent à cette conversion, ce qui suggère une affinité importante d'Ikaros pour la séquence Hes-1. Dans l'expérience inverse (cf. Figure R9), lorsque j'augmente le rapport protéique CSL/Ikaros, j'observe que CSL est seulement capable de chasser une partie des complexes Ikaros. Même à la plus forte concentration d'extrait protéique CSL (4  $\mu\text{g}$ ), le profil de liaison de Ikaros n'a pas totalement disparu. L'affinité de CSL pour la séquence Hes-1 dans ces conditions salines est moins forte que l'affinité de Ikaros pour la séquence.

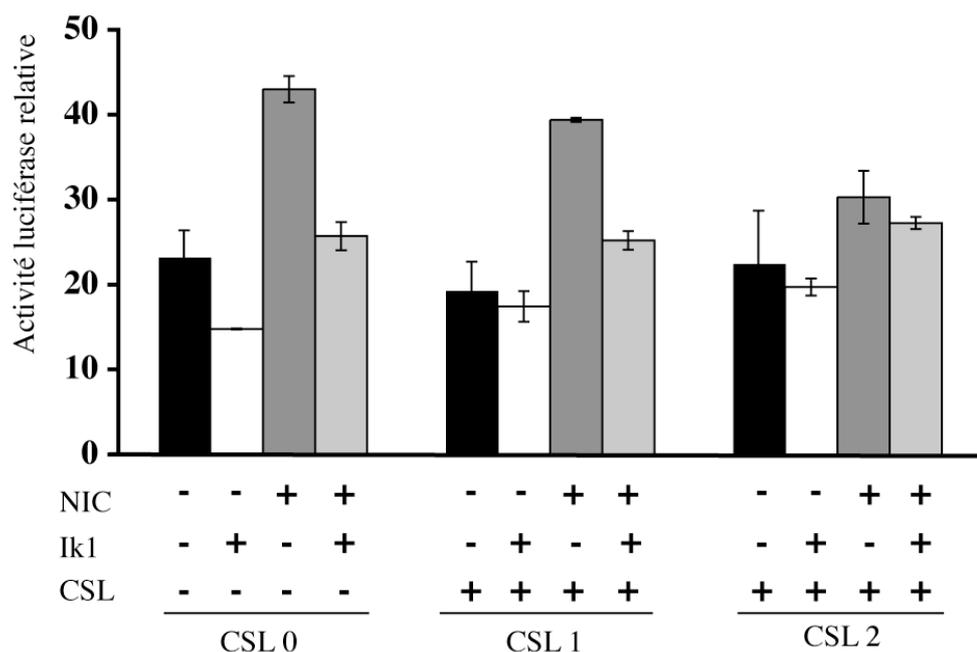


**Figure R9 : Ikaros et CSL sont en compétition pour la liaison au promoteur Hes-1.**

Gel retard avec comme sonde le fragment Hes-1 représenté en figure R7. Les flèches montrent les différents complexes protéiques de type Ikaros  $\blacktriangleright$  ou de type CSL  $\blacktriangleright$ . Cette expérience a été réalisée à partir d'extraits nucléaires de cellules COS transfectées avec des vecteurs d'expression codant pour Ik-1 ou CSL. Une quantité fixe d'Ikaros (1 $\mu\text{g}$ ) a été incubée en présence de quantité croissante de CSL (0,25 à 4 $\mu\text{g}$ ) avec la sonde Hes-1.

**III.2.2. CSL n'est pas capable de restaurer l'activité transcriptionnelle après l'inhibition par Ikaros.**

Grâce au même système de gène rapporteur par transfection transitoire, j'ai voulu regarder si Ikaros et CSL étaient bien en compétition pour réguler la transcription à partir de ce promoteur. J'ai donc transfecté la quantité minimale d'Ikaros nécessaire à l'inhibition de l'activité luciférase induite par NIC, et j'ai co-exprimé des quantités croissantes de CSL (Figure R10). Je m'attendais à observer une restauration progressive de l'activité transcriptionnelle en faveur d'un modèle de compétition entre Ikaros et CSL pour des séquences communes. Cela n'a jamais été le cas. Quelles que soient les quantités de CSL ajoutées, l'activité luciférase quantifiée en l'absence d'Ikaros est toujours la même était voire plus faible que lorsque je n'en rajoute pas dans le système. Dans les 3 conditions de CSL, Ikaros réprime toujours de l'ordre de 1,4x l'activité du gène. Je n'observe aucunement la levée progressive de l'inhibition de la transcription.



**Figure R10 : CSL n'est pas capable de déplacer Ikaros de la séquence du promoteur Hes-1.**

La compétition entre Ikaros et CSL pour la liaison au promoteur Hes-1 a été testée dans un système de gène rapporteur luciférase Hes-1 luc précédemment décrit en figure R2. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides correspondant comme indiqué sur la figure : + : présent ; - : absent. Deux quantités de CSL ont été testées. En parallèle, le plasmide Renilla luciférase a également été transfecté dans tous les puits pour la normalisation, ainsi que les vecteurs vides afin de maintenir la quantité d'ADN constante. Les barres d'erreurs représentent les écart-types d'une expérience réalisée en triplicat.

Cela peut s'expliquer soit par i) des quantités limitantes en NIC donc bien que la protéine CSL soit présente, elle joue son rôle de répresseur et non d'activateur de la transcription, ii) l'affinité d'Ikaros pour le locus est tellement forte que je ne suis pas dans les conditions idéales pour déplacer l'équilibre en faveur de CSL, iii) la répression par Ikaros implique des mécanismes non transitoires ce qui ne permet pas la réactivation du gène par CSL.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère qu'Ikaros est en compétition avec CSL au cours du développement thymique et plus spécifiquement lors de la transition DN4-DP. Ikaros est nécessaire à la mise en place de l'extinction du locus *Hes-1*. D'autres gènes activés par Notch de façon CSL-dépendante pourraient être régulés de la même manière. De ce fait, ces données suggèrent que la répression par Ikaros de gènes de la voie Notch semble être un processus important de la régulation lors de la différenciation des cellules T. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens : Quels sont les cofacteurs d'Ikaros pour la mise en place de l'extinction de gènes ? Ikaros est-il requis pour le maintien de la répression ? Les autres protéines membres de la famille Ikaros régulent-elles les gènes de la même façon ? Ce mécanisme de régulation est-il spécifique aux cellules T ? Ikaros peut-il être en compétition avec d'autres facteurs de transcription que CSL ? Certains de ces points seront abordés dans la discussion.

## **IV. Discussion et Perspectives**

Ikaros a été caractérisé comme un facteur essentiel au contrôle de l'hématopoïèse dans les compartiments lymphoïdes et érythroïdes. Mes résultats confirment le rôle d'Ikaros dans le développement des thymocytes. De plus, l'analyse de l'activité du locus Hes-1 montre que ce gène est exprimé de façon différentielle au cours du développement précoce des lymphocytes T et que son expression est régulée par Ikaros. Les données de la structure chromatinienne du locus suggèrent qu'Ikaros est capable de recruter une machinerie de remodelage de la chromatine à ce locus. Par conséquent, ces nouvelles données sont en faveur du rôle d'Ikaros dans la répression de gènes cibles spécifiques via une implication dans le remodelage de la chromatine voire la relocalisation au niveau de structure comme l'hétérochromatine péri-centromérique. Ainsi, Ikaros serait un facteur clé dans la réorganisation de l'état chromatinien et dans le passage des gènes d'un état « ouvert » à un état « fermé » au cours de la différenciation des thymocytes. De ce fait, l'absence de remodelage chromatinien au niveau des gènes de la voie Notch pourrait être responsable de la tumorigenèse chez les souris  $Ik^{L/L}$ . Cela n'exclut évidemment pas le rôle coopératif d'autres gènes cibles d'Ikaros qui seraient également dérégulés au cours du développement des cellules T dans le thymus chez ces souris.

**I. Section I**

**1<sup>ère</sup> partie. Le développement de lymphomes T chez les  
souris  $I\kappa^{L/L}$ .**

### **I.1 Quel est le lien entre la déficience en Ikaros et l'activation de la voie Notch dans les cellules T ?**

Ikaros est un gène suppresseur de tumeur. Cependant, le mécanisme d'action par lequel Ikaros joue ce rôle n'a pas encore clairement été élucidé. Au cours de ma thèse, j'ai montré qu'Ikaros agit comme un répresseur du gène Hes-1. Nos autres données montrent que :

- i) lors de l'analyse du transcriptome de tumeurs  $Ik^{L/L}$ , on observe une surexpression générale de la voie Notch
- ii) plusieurs gènes cibles de Notch comme Hes-1 et Deltex-1 sont exprimés de manière ectopique dans les thymocytes prétéumoraux
- iii) lorsque l'on réexprime Ikaros dans des lignées dérivées de tumeurs primaires  $Ik^{L/L}$  les gènes de la voie Notch sont réprimés.

Cela laisse supposer un mécanisme plus général de répression des gènes cibles de Notch par Ikaros. Or de nombreuses études ont impliqué l'activation excessive de Notch dans la transformation des cellules T chez l'homme (Weng and Aster, 2004; Weng et al., 2003) et chez la souris (Bellavia et al., 2002; Pear et al., 1996). Cela suggère que dans les LAL-T, l'absence d'Ikaros perturbe le fragile équilibre entre la répression et l'activation de la transcription de gènes cibles spécifiques. La surexpression de la forme intracellulaire de Notch, NIC, induit une activation continue de gènes qui normalement sont activés de façon transitoire au stade DN3 après activation par les ligands de Notch. La boucle de rétroaction positive de Notch amplifie la surexpression conduisant à la prolifération puis à la transformation des cellules. Une approche permettant de vérifier cette idée serait de comparer le transcriptome de cellules « wild-type » et  $Ik^{L/L}$  aux stades DN3, DN4, DP. L'identification de gènes cibles impliqués dans la tumorigenèse et/ou la différenciation qui diffèrent pour une population donnée entre le génotype WT et le mutant renforcerait fortement cette idée d'équilibre perturbé au cours de la différenciation.

J'ai montré qu'Ikaros est capable de réprimer Hes-1 au cours de la différenciation des thymocytes. Cependant la dérégulation de Hes-1 seule ne suffit pas à expliquer la tumorigenèse chez les souris  $Ik^{L/L}$ . D'ailleurs, la surexpression de Hes-1 seul ne conduit ni à la différenciation des cellules T, ni au développement de LAL-T (Hoebeke et al., 2006). D'autre part, il est intéressant de noter que le seul gène cible de Notch ayant été directement impliqué

dans le développement de cancers est *c-myc*. Cela renforce l'hypothèse qu'un mécanisme plus général de compétition CSL/Ikaros a lieu au niveau de séquences régulatrices d'autres gènes communs importants pour la transformation. L'identification d'autres gènes cibles pouvant jouer un rôle dans la tumorigénèse et corégulés par ces deux facteurs permettrait d'axer les recherches vers des traitements plus spécifiques. Par exemple, *c-myc* a été montré comme étant un gène cible de Notch (Palomero et al., 2006; Sharma et al., 2006; Weng et al., 2006) dans des expériences d'immunoprécipitation chromatinienne. Les séquences du promoteur *c-myc* reconnues par Notch1 contiennent des sites simples TGGGAA (séquence consensus de CSL et d'Ikaros). Il serait donc intéressant de regarder l'expression de *c-myc* dans les thymocytes de souris WT et *Ik<sup>L/L</sup>*. Si Ikaros régule également *c-myc*, je m'attends à observer une surexpression de *c-myc* dans les cellules *Ik<sup>L/L</sup>*. Si tel est le cas, la liaison de Ikaros et de CSL sera confirmée par ChIP. Ainsi, ces données montreront que la compétition Ikaros/CSL joue un rôle primordial dans la régulation des gènes cibles de Notch. De plus, la propriété oncogénique de *c-myc* ayant été démontrée dans de nombreux travaux, la dérégulation de ce gène dans les cellules permettrait en partie d'expliquer le développement rapide des tumeurs chez nos souris.

Quoiqu'il en soit, l'activation de la voie Notch dans les cellules *Ik<sup>L/L</sup>* semble être l'un des mécanismes de transformation dans nos souris même si les gènes cibles essentiels dérégulés n'ont pas encore été caractérisés. D'ailleurs, il se peut que ce soit l'ensemble de la dérégulation de la voie Notch plutôt que le fait d'un seul gène qui soit à l'origine de la tumorigénèse et de l'induction de la transformation par cascade de réactions.

## **I.2 Notch et la tumorigénèse**

Bien que l'observation d'une forte expression de formes tronquées de NIC1 dans nos tumeurs *Ik<sup>L/L</sup>* ainsi que de nombreuses données suggérant que Notch est un oncogène dans le système hématopoïétique, l'inactivation de Notch1 par CD4-cre n'induit ni tumorigénèse, ni perturbation du développement, de la maturation ou de la survie des cellules T (Wolfer et al., 2001). Par ailleurs, Notch pourrait agir comme suppresseur de tumeur dans d'autres tissus comme la peau (Nicolas et al., 2003). Ces deux dernières études suggèrent que dans les travaux précédents, les approches de gain de fonction utilisant la surexpression de NIC1 dans

les cellules activaient des voies de signalisation non contrôlées par Notch1 dans des conditions physiologiques. Par exemple, la surexpression de NIC1 pourrait activer la signalisation qui est normalement régulée par Notch2 ou Notch3 ; l'abondance de NIC1 dans les cellules augmente l'affinité de NIC1 pour des cibles qu'il ne régule pas physiologiquement. L'apparition de formes tronquées fortement exprimées de NIC1 dans les tumeurs serait un effet secondaire de l'induction de la tumeur. L'effet oncogénique de la perte d'Ikaros dans les souris  $Ik^{L/L}$  ne serait pas dû directement à Notch. Comment Notch peut-il être un oncogène et un suppresseur de tumeur ? L'explication la plus communément admise est que la réponse à la voie de signalisation Notch est cellule spécifique, la fonction primaire de Notch étant d'être le médiateur de la spécification cellulaire. Cependant Beverly et Capobianco (Beverly and Capobianco) ont suggéré que Notch soit un réel suppresseur de tumeur, et que dans ce cas la forme activée NIC agirait comme une forme dominante négative. Cela a déjà été montré pour d'autres suppresseurs de tumeurs (p53, Ikaros) possédant des allèles qui se comportent comme des dominants négatifs. Et je pense que, comme pour toutes les protéines essentielles au développement, la dérégulation de son expression est l'inducteur de l'oncogénèse. Cette double potentialité de suppresseur de tumeur, lorsqu'Ikaros tout comme Notch sont exprimées dans des conditions physiologiques, et d'oncogène lorsque les protéines sont délétées de certains domaines, me permet de penser que la classification des protéines impliquées dans la tumorigénèse dépend du point de vue lors de la découverte de son implication.

### **I.3 Quelles sont les cellules à l'origine de la tumeur chez les souris $IkL/L$ ?**

L'expression anormale des gènes cibles de Notch comme pTa et Hes-1 semble être une caractéristique des LAL-T (Bellavia et al., 2002). En temps normal ces gènes sont exprimés dans les populations les plus immatures du thymus aux stades DN3 et DN4. Cela laisse supposer que les lymphomes T ont émergé à partir de ces populations de cellules peu matures. Mes résultats montrent l'implication du facteur de transcription Ikaros dans la répression de gènes cibles de Notch au cours de la transition DN3-DN4. Ces données vont dans le sens de l'émergence des tumeurs à partir de ces populations de cellules. Afin de valider si ce sont les cellules DN3 ou les cellules DN4 qui possèdent le pouvoir de transformation, il serait

intéressant de réaliser des expériences de reconstitution par injection intra-thymique, chez des souris irradiées à des doses subléthales, à partir de population de cellules Ik<sup>L/L</sup> triées. Ikaros semblant être important dans la répression de Hes-1 au stade DN4, je prédis que l'apparition de tumeur sera accélérée chez les souris ayant reçu des cellules DN4 par rapport à celles ayant reçues des DN3. Les souris ayant reçu les cellules DP devraient également être transformées car, bien que le stade critique de différenciation et de prolifération soit passé, j'observe l'expression et surtout l'absence de répression de Hes-1 dans ces cellules.

Finalement, les expériences de reconstitution permettrait de cibler le stade critique d'émergence des tumeurs, afin d'étudier plus en détail la régulation par Ikaros dans ces cellules.

#### **I.4 Le lien entre Ikaros et les modifications épigénétiques.**

L'analyse des modifications épigénétiques au niveau des histones H3 dans les cellules DP de souris Ik<sup>L/L</sup> a montré qu'Ikaros semble influencer l'apparition de marques de répression comme meK9 ou meK27 au niveau des loci de gènes qu'il réprime. La perte de l'empreinte génétique et des mutations dans les enzymes modifiant les histones ont été associées à différents cancers du colon, des poumons, des myélomes et des leucémies (Lund and van Lohuizen). Cette perturbation de l'empreinte épigénétique de gènes régulés au cours du développement dans les cellules Ik<sup>L/L</sup> est une marque évidente du rôle d'Ikaros en temps que suppresseur de tumeur.

Les souris déficientes pour Ikaros développent toutes des lymphomes T (Georgopoulos et al., 1994; Wang et al., 1996 2002). Il semblerait que l'absence de régulation de la voie Notch dans les cellules DN4 soit l'un des facteurs oncogéniques, et ce par la perte du recrutement de complexes de remodelage de la chromatine. Une meilleure définition du rôle et du mode d'action d'Ikaros dans la régulation de ces gènes permettrait de trouver des cibles thérapeutiques potentielles dans ce types de pathologie.

**II. Section II**

**2<sup>ème</sup> partie. Ikaros et la régulation de l'état chromatinien  
dans les cellules T.**

## II.1 Ikaros et les modifications post-traductionnelles de l'histone H3.

L'absence de marque de répression meK9 et meK27 sur les histones H3 dans les cellules  $Ik^{L/L}$  suggère une forte corrélation entre Ikaros et l'extinction durable des gènes lors du processus de différenciation des cellules T. L'établissement de l'inactivation héréditaire de gènes nécessite plusieurs étapes séquentielles. Il est admis que le recrutement de gènes inactifs à proximité de l'hétérochromatine centromérique sert à stabiliser la répression des gènes. L'hypothèse de ce repositionnement de ces gènes au niveau de l'HC-PC est d'ordre énergétique ou parce que ce compartiment contient certains composants (comme les histones déacétylases et les méthyltransférases) qui sont impliquées dans la propagation du statut inactif. Le rôle de la liaison directe d'Ikaros au niveau de la plupart des séquences ADN satellites (Cobb et al., 2000) et son association avec le complexe NuRD qui contient des histones déacétylases et des facteurs de remodelage des nucléosomes (Kim et al., 1999) reste encore obscur. Cependant, comme Ikaros semble interagir avec des gènes cibles, l'ADN centromérique et des protéines capables de modifier la structure de la chromatine, il est fort probable qu'Ikaros induise la conversion de gènes candidats d'un statut de répression transitoire à un statut de répression permanente.

## II.2 Ikaros et HP1.

Les protéines associées aux gènes inactifs au niveau de l'HC-PC sont entre autres HP1, qui interagit directement avec les queues d'histones H3 triméthylées sur la lysine K9, et TIF1 $\beta$  (partenaire de HP1). Il serait intéressant de regarder si Ikaros et HP1 interagissent, ce qui pourrait expliquer le recrutement d'Ikaros au sein de ces structures. Il faudrait vérifier que dans les cellules  $Ik^{L/L}$  les loci normalement réprimés par Ikaros ne sont plus recrutés au sein de l'HC-PC et ainsi les histones correspondantes ne seraient également plus méthylées par les méthyltransférases présentes au sein de cette entité cellulaire. Cependant, dans une étude récente pour trouver les protéines partenaires d'Ikaros (Sridharan and Smale, 2007), seuls des peptides correspondant à TIF1 $\beta$  ont été détectés en spectrométrie de masse. Ce résultat n'a pas pu être confirmé par Western blot. Cela suggère qu'Ikaros et HP1 interagissent de manière indépendante au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique. Toutefois cela

n'exclut pas qu'Ikaros joue un rôle dans l'initiation de la méthylation de la lysine K9 de l'histone H3 pour permettre le recrutement de HP1-TIF1 $\beta$  au niveau du gène.

### **II.3 Ikaros et les complexes Polycomb.**

Les protéines associées à la méthylation de la lysine K27 de l'histone H3 sont celle du complexe Polycomb PRC2. PRC2 grâce à Ezh2 catalyse la tri-méthylation de ce résidu. Puis la liaison des protéines HPC induit le recrutement du complexe Polycomb PCR1. Il est admis que la présence de PCR1 est nécessaire au maintien de la répression d'un locus. Aucune donnée claire n'existe sur comment ces complexes Polycomb sont recrutés au niveau de gènes spécifiques chez les mammifères. Reconnaissent-ils des séquences géniques ou interagissent-ils avec des facteurs présents sur l'ADN ? Si je retiens la dernière hypothèse, se pourrait-il qu'Ikaros soit l'un de ces facteurs ? Une manière simple de le vérifier serait de réaliser des expériences de coimmunoprécipitation entre Ikaros et les protéines des complexes Polycomb (Suz12 par exemple pour PRC2). Si l'interaction est indirecte, je suggère également de regarder par microscopie confocale la colocalisation ou non de ces deux entités. Ces résultats permettraient d'élucider s'il existe un lien entre le recrutement d'Ikaros au niveau de promoteurs et l'extinction de gène par le système Polycomb.

Le double rôle potentiel d'Ikaros d'extinction permanente de gènes via le recrutement au niveau de l'HC-PC et l'interaction avec les complexes Polycomb reste à confirmer. Cependant un tel rôle serait en rapport avec le fait que les gènes *rag-1* et *TdT* sont recrutés dans des domaines contenant Ikaros au niveau de l'HC-PC dans les thymocytes au cours de l'extinction héréditaire (Brown et al., 1999).

**III. Section III**

**3<sup>ème</sup> partie. Ikaros au cours de la différenciation des  
cellules T : un facteur hautement régulé.**

### III.1 Régulation de l'expression d'Ikaros au cours du développement des cellules T.

D'après mes résultats et ceux de Taghon (Taghon et al., 2006), la quantité d'ARNm codant pour la protéine Ikaros est identique aux stades DN3 et DN4. Ikaros est bien exprimée dans les deux populations. Cependant, j'observe une forte augmentation de l'expression protéique dans toutes les cellules DN4. Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises :

1- il y a stabilisation de la protéine au stade DN4. Certaines modifications post-transcriptionnelles dynamiques comme la phosphorylation des résidus sérines, thréonines (Li et al., 2004; Sakaguchi et al., 1997) et tyrosines (Wang et al., 2006) et la SUMOylation peuvent réguler la dégradation des protéines. Certains acides aminés d'Ikaros peuvent présenter ce type de modifications (Dovat et al., 2002; Gomez-del Arco et al., 2005; Gomez-del Arco et al., 2004). Il serait intéressant de regarder le statut de phosphorylation ou de SUMOylation d'Ikaros dans les sous-populations DN3, DN4 et DP afin de vérifier si elles jouent un rôle dans la stabilisation de la protéine au stade DN4.

2- un mécanisme de régulation bloque la synthèse protéique en DN3. Dans ce cas deux hypothèses qui peuvent agir en synergie sont à envisager :

i) il existe un mécanisme de blocage de la traduction soit par l'inhibition de la formation du complexe d'initiation de la traduction, soit grâce à des miARN en DN3. Ainsi, seule une partie des ARNm présents sont traduits et les autres sont stockés dans les processing bodies sans être dégradés. Dès la levée de l'inhibition, lors du passage en DN4, ces messagers sont prêts à être traduits efficacement.

ii) il existe un mécanisme d'induction de la traduction pour les messagers Ikaros en DN4. Les ribosomes vont traduire plusieurs fois le même ARNm, grâce à un système de recrutement accru au niveau de sa séquence d'initiation de la traduction.

Afin de discriminer ces deux hypothèses de régulation de la traduction en DN3, il faudrait analyser le recrutement de polysomes sur l'ARN d'Ikaros dans les cellules DN3 et DN4 « wild-type ». Dans le cas de la première hypothèse, en DN3, la majorité des ARN codant pour Ikaros seraient dans les fractions sans polysome car non traduits, puis dans une fraction plus dense contenant des polysomes reflétant la traduction en DN4. Dans le cas de la seconde hypothèse, les ARN codant pour Ikaros seraient traduits et je me retrouverais dans le même cas que les cellules DN4 de la première hypothèse. Puis lors de la transition en DN4,

ils seraient dans les fractions plus lourdes contenant beaucoup de polysomes reflétant un fort recrutement de la machinerie de traduction sur cet ARN dans ces cellules.

Ces deux mécanismes de régulation ne sont pas mutuellement exclusifs, la traduction pouvant être bloquée au stade DN3 car la protéine Ikaros n'est pas requise dans ces cellules. Toutefois, pour que la synthèse d'Ikaros soit suffisamment abondante en DN4, les ARN doivent être stockés. A ce stade la machinerie de traduction produit de grandes quantités d'Ikaros afin d'induire une réponse rapide.

### **III.2 Régulation de l'activité d'Ikaros au cours du cycle cellulaire.**

Le gène Hes-1 est exprimé dans les cellules DN3 alors qu'Ikaros est présent dans cette population. Il existe donc certainement un mécanisme pouvant expliquer le manque d'action répressive d'Ikaros à ce stade cellulaire. En effet, Ikaros est phosphorylée de façon cycle cellulaire dépendante, ce qui empêche la liaison d'Ikaros à l'ADN (Dovat et al., 2002; Gomez-del Arco et al., 2004). La phosphorylation de Ikaros permettrait aux facteurs compétiteurs, comme CSL, de se lier aux séquences régulatrices reconnues par Ikaros. Ainsi, les évènements de signalisation contrôlant la phosphorylation d'Ikaros fourniraient une explication mécanistique par laquelle des gènes pourraient passer d'un état actif induit par CSL à un état inactif induit par Ikaros pendant la différenciation des cellules T. Au stade DN3, la cellule commence à générer un pool de protéines Ikaros phosphorylées dont la liaison à l'ADN est abolie. Ikaros n'est donc pas capable de jouer son rôle de répresseur ou d'activateur de la transcription dans ces cellules. Une déphosphorylation d'Ikaros à la fin de la phase M libérerait un pool de protéines Ikaros fonctionnelles prêtes à réprimer des gènes cibles spécifiques en DN4.

Une autre modification post-traductionnelle d'Ikaros qui pourrait inhiber sa fonction de répresseur dans les cellules DN3 est la SUMOylation. Ikaros possède plusieurs sites de SUMOylation (Gomez-del Arco et al., 2005). La présence de cette modification sur la lysine K58 abolit la liaison avec les complexes de répression NuRD et CtBP sans affecter la localisation au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique. Ainsi dans les cellules DN3, Ikaros pourrait ne jouer qu'un rôle d'activateur de la transcription et pas de répresseur.

Ainsi, des modifications post-traductionnelles d'Ikaros pourraient expliquer son incapacité à jouer son rôle de répresseur dans les DN3. Je pourrais le vérifier en regardant l'état de phosphorylation et/ou de SUMOylation d'Ikaros dans les différentes sous-populations DN3, DN4 et DP. Je m'attends, dans le cas de la phosphorylation, à ce qu'Ikaros présente plus de modifications en DN3, ce qui expliquerait l'absence de répression des gènes de la voie Notch à ce stade. Puis la perte de la phosphorylation en DN4 et DP, afin qu'Ikaros puisse se lier à l'ADN et réprimer ses gènes cibles. Si c'est la SUMOylation qui régule l'activité d'Ikaros dans les thymocytes, je m'attends à ce qu'Ikaros porte la modification dans les DN3. La répression par Ikaros est alors abolie mais son rôle d'activateur de la transcription reste intact. Ensuite, dans les stades suivants, la SUMOylation devrait disparaître afin de donner une protéine répressivement active au niveau de gènes cibles spécifiques. Cependant l'ajout d'un peptide SUMO à une protéine augmente son poids moléculaire de 11kDa, ce qui devrait aisément être visualisable en Western blot. Lors de mes expériences, je n'observe aucune bande de protéine Ikaros migrant plus lentement dans l'une ou l'autre des populations. En conclusion, je ne peux exclure la SUMOylation comme régulateur de l'activité d'Ikaros au cours de la différenciation bien que cette hypothèse me semble peut probable.

Les facteurs de transcription comme Ikaros sont des protéines jouant un rôle essentiel au cours du développement des cellules T. Leurs régulations transcriptionnelle, traductionnelle ou post-traductionnelle, bien que peu décrites, sont des mécanismes importants pour le maintien du bon déroulement de la différenciation. Mes résultats suggèrent qu'il existe un mécanisme de régulation de la traduction des ARN codant pour Ikaros dans les cellules DN3 et DN4. D'autre part, les données sur les modifications post-traductionnelle d'Ikaros montrent que celles-ci pourraient jouer un rôle important dans la régulation de ses fonctions.

**IV. Section IV**

**4<sup>ème</sup> partie. La compétition via Ikaros : un mécanisme plus général ?**

## **IV.1 La compétition Ikaros/CSL joue-t-elle un rôle dans d'autres types cellulaires ?**

### **IV.1.1. Dans le système hématopoïétique.**

Comme présenté dans l'introduction, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont à l'origine de tous les lignages du système hématopoïétique. Les facteurs de transcription de la famille Ikaros semblent jouer un rôle important au cours des différents stades du développement des différents lignages. La compétition Ikaros/CSL pourrait elle être l'un des mécanismes principaux régulant l'engagement et la maturation de ces lignages ?

#### Dans les HSC.

Les fonctions d'Ikaros sont nécessaires à la genèse et à l'activité des LT-HSC (long-term HSC) (Nichogiannopoulou et al., 1998). Bien que Notch ou CSL n'aient pas été impliqués directement dans les HSC chez l'adulte, des expériences de gain de fonction montrent que Notch promeut la régénérescence des HSC de l'adulte (Stier et al., 2002; Varnum-Finney et al., 1998). L'action de Notch est dépendante des cytokines SCF, IL-6, IL-11, et Flt3L (Varnum-Finney et al., 2000). Notch influence donc la régénérescence des HSC (Calvi, 2006; Duncan et al., 2005; Varnum-Finney et al., 2000). Le rôle des deux protéines à ce stade le plus immature est loin d'être défini. Pourtant Notch semble être impliqué dans la prolifération des HSC sous le contrôle de cytokines. Ikaros, pour sa part, est requis pour l'activité de LT-HSC. Se pourrait-il qu'il existe un équilibre entre Ikaros et CSL finement régulé pour assurer le maintien de cette population essentielle car à l'origine de toutes les cellules du système hématopoïétique ?

#### Dans les cellules B.

Le facteur de transcription Ikaros est essentiel au développement des cellules B (Georgopoulos et al., 1994; Wang et al., 1996). Les souris  $Ik^{L/L}$  présentent également un défaut de développement des cellules B (Kirstetter et al., 2002). La signalisation par Notch 1 inhibe le développement du lignage B, alors qu'Ikaros est requis pour le développement des cellules B (Winandy et al., 1995). Il se pourrait donc que la répression de la voie Notch par Ikaros (via une compétition avec CSL) puisse jouer un rôle important au cours du

développement des lymphocytes B pour que les cellules passent d'un stade immature (exprimant les gènes de la voie Notch) à un stade mature (voie Notch éteinte).

#### Dans les cellules NK.

Au contraire des cellules B et T, les cellules NK peuvent être générées à partir de la moelle osseuse ou du thymus (De Smedt et al., 2002; Jaleco et al., 2001; Radtke et al., 2000). De ce fait, leur développement n'est pas affecté par l'activité de Notch. La compétition Ikaros/CSL dans ce type cellulaire ne semble donc pas avoir sa place.

#### Dans la lignée myéloïde.

La différenciation myéloïde ne semble pas être affectée dans les souris nulles pour Ikaros (Nichogiannopoulou et al., 1998). Pourtant, une étude plus approfondie de la différenciation des neutrophiles montre qu'Ikaros régule les stades précoces de différenciation des neutrophiles mais son activité est dispensable dans les neutrophiles matures (Dumortier et al., 2003). Des études *in vitro* semblent montrer l'implication bien que contradictoire de Notch dans le développement du lignage myéloïde (Bigas et al., 1998; Milner et al., 1996; Schroeder and Just, 2000). Cependant les études de perte ou de gain de fonction *in vivo* ne révèlent aucun effet de Notch sur le développement des diverses cellules de la lignée myéloïde (Pear et al., 1996; Radtke et al., 2000; Radtke et al., 1999). Ces données suggèrent que la compétition Ikaros/CSL pourrait jouer un rôle dans le développement des neutrophiles dans les stades immatures, bien que ce mécanisme ne semble pas essentiel à la fonctionnalité des cellules matures.

#### Dans les cellules dendritiques.

Une étude du développement de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans les souris Ik<sup>LL</sup> a montré que ces dernières présentaient un défaut de maturation intrinsèque due à l'absence d'expression d'Ikaros (Allman et al., 2006). La signalisation par le ligand de Notch Dll1 est importante pour la différenciation des pDC, une combinaison entre l'activation de Notch 1 et la cytokine IL4 est nécessaire à la maturation de ces cellules (Cheng et al., 2003). Or l'analyse du transcriptome des pDC Ik<sup>LL</sup> immatures montre une surexpression de Hes-1 (Allman et al., 2006). La répression des gènes cibles de Notch par Ikaros par un système semblable à celui que j'ai suggéré dans les lymphocytes T pourrait être un mécanisme clé au cours de la maturation des pDC. Comme pour les cellules T, la signalisation par Notch est

requis dans les stades les plus immatures puis ses gènes cibles doivent être éteints pour permettre la différenciation finale.

Dans la majorité des systèmes que j'ai décrits, Notch semble important au maintien de l'immaturité et à la prolifération des cellules à un stade précoce du développement. Cependant le développement vers les cellules matures requiert l'extinction des gènes de la voie Notch par un mécanisme comme la compétition CSL/Ikaros ou d'autres facteurs de transcription.

#### **IV.1.2. Hors du système hématopoïétique.**

Il a longtemps été admis que l'expression de la protéine Ikaros était restreinte au système hématopoïétique, cependant, il a récemment été établi qu'Ikaros semblait également jouer un rôle critique dans le développement et la fonction du système neuroendocrine composé de l'hypothalamus et de la glande pituitaire (Ezzat et al., 2006; Ezzat et al., 2005). Réciproquement, une étude récente (Zhu et al., 2006) a montré l'importance de la voie Notch dans la régulation des phases précoces de l'organogénèse pituitaire. Ils ont également montré que l'extinction de la voie Notch était nécessaire pour les stades de développement plus tardifs et la différenciation terminale des cellules. Au stade embryonnaire et aux stades précoces après la naissance, les gènes de la voie Notch impliqués dans la régulation du développement pituitaire sont Hes-1 et Hes-5 (Kita et al., 2007; Zhu et al., 2006). Cependant, les facteurs impliqués dans l'extinction et la régulation de ces gènes restent encore à déterminer. L'axe hypothalamo-pituitaire-adrénal et le système immunitaire contribuent tout deux au maintien de l'homéostasie en temps normal et pendant un stress. A cause de leurs rôles essentiels dans la survie, les activités de ces systèmes ont évolué en parallèle et se chevauchent à différents niveaux lors de la réponse à un stress. La régulation de leur développement pourrait donc également être assez proche. Ainsi, au vu du rôle d'Ikaros dans la régulation des gènes de la voie Notch dans le système hématopoïétique je suggère qu'Ikaros pourrait en partie assurer la fonction de régulateur de la voie Notch par compétition avec CSL au cours du développement de la glande pituitaire.

D'autre part, Ikaros a été impliqué dans la régulation du gène de la leucine aminopeptidase placentale (P-LAP) dans les cellules trophoblastes (cellules précurseurs du

placenta) (Ito et al., 2002). Ikaros est fortement exprimée dans le trophoblaste extravilleux (Yamamoto et al., 2005) et semble jouer un rôle dans la placentation. Notch est également présent au niveau du trophoblaste extravilleux (De Falco et al., 2007) où il semble être impliqué dans la régulation du devenir cellulaire des cellules du placenta et dans l'angiogenèse. Peu de gènes cibles de Notch ont été caractérisés dans ce tissu ; on retrouve Hes-2, Hes-3 (Nakayama et al., 1997). L'expression d'Ikaros et de la voie Notch au sein des mêmes cellules laisse penser qu'il pourrait y avoir compétition entre Ikaros et CSL pour la régulation de gènes spécifiques dans le trophoblaste extravilleux.

Par ailleurs, un travail récent a rapporté qu'Ikaros était exprimé dans un sous-groupe de neurones du striatum en cours de prolifération et de différenciation qui seront à l'origine des neurones enképhalinerigiques du striatum (Agoston et al., 2007). En outre, Notch est impliqué dans le maintien de population de progéniteurs neuronaux (Mizutani and Saito, 2005). Une baisse de l'activité de Notch est liée à une réduction du nombre de progéniteurs neuronaux (Yoon and Gaiano, 2005) et à une augmentation de la différenciation neuronale (de la Pompa et al, 1997). L'extinction de la voie Notch dans les neurones en cours de différenciation est en corrélation avec l'expression d'Ikaros dans ce type cellulaire. Se pourrait-il que la compétition CSL/Ikaros joue également un rôle au cours du développement des neurones enképhalinerigiques du striatum ? Dans ce cas, Ikaros éteindrait de façon constitutive des gènes spécifiques qui étaient activés par Notch dans les progéniteurs.

Ces trois exemples suggèrent donc que la compétition Ikaros/CSL pourrait être un mécanisme plus général de régulation du devenir cellulaire au cours du développement d'un organisme.

#### **IV.2 Les autres membres de la famille Ikaros peuvent-ils également réguler la voie Notch ?**

La famille des gènes Ikaros est composée de 5 membres décrits Ikaros, Aiolos, Helios, Eos et Pegasus. Les trois premiers ont une expression hématopoïétique spécifique finement régulée au cours du développement. Ces profils d'expression uniques pour chacun des membres de la famille Ikaros au cours de la différenciation des lymphocytes pourrait-elle jouer un rôle dans la régulation de Notch ?

#### **IV.2.1. Aiolos.**

Les protéines Ikaros et Aiolos sont homologues à 70% (Kelley et al., 1998) et capables de former des hétérodimères présents dans le noyau (Kim et al., 1999 1997). L'affinité d'Aiolos pour des séquences d'ADN spécifiques est la même (Morgan et al., 1997). Ces données suggèrent que la protéine Aiolos peut se fixer sur les mêmes sites de fixation à l'ADN qu'Ikaros. Ainsi elle pourrait également être impliquée dans la régulation des gènes cibles de Notch dans les cellules où elle est exprimée. D'autre part, l'hétérodimère Aiolos-Ikaros pourrait avoir une spécificité génique, la co-expression de ces deux facteurs au sein d'une même cellule pourrait jouer un rôle important dans la régulation à un stade précis des gènes de la voie Notch

#### **IV.2.2. Helios.**

La protéine Helios présente 78% d'homologie avec la protéine Ikaros (Kelley et al., 1998). Helios peut former des hétérodimères avec Ikaros et Aiolos (Hahm et al., 1994; Kelley et al., 1998) qui colocalisent avec l'hétérochromatine péricentromérique. Helios est préférentiellement exprimée aux stades précoces de l'hématopoïèse et dans les cellules T. Cette expression correspond à des stades où la régulation de la voie Notch est critique. Ikaros semble en compétition pour réguler de façon négative les gènes de la voie Notch de ce type cellulaire, il n'est cependant pas à exclure qu'Helios pourrait assumer des fonctions similaires au niveau de certains gènes. Cette fonction est soutenue par le fait qu'Helios, comme Ikaros, semble agir au niveau de la répression des gènes en interagissant avec le complexe NuRD (Sridharan and Smale, 2007).

#### **IV.2.3. Eos et Pegasus.**

Ces deux protéines sont exprimées de façon plus large au sein de l'organisme et leur rôle n'a pas encore réellement été étudié. Cependant la fonction de la voie Notch étant ubiquitaire, il serait possible que la compétition Eos-CSL ou Pegasus-CSL joue un rôle dans

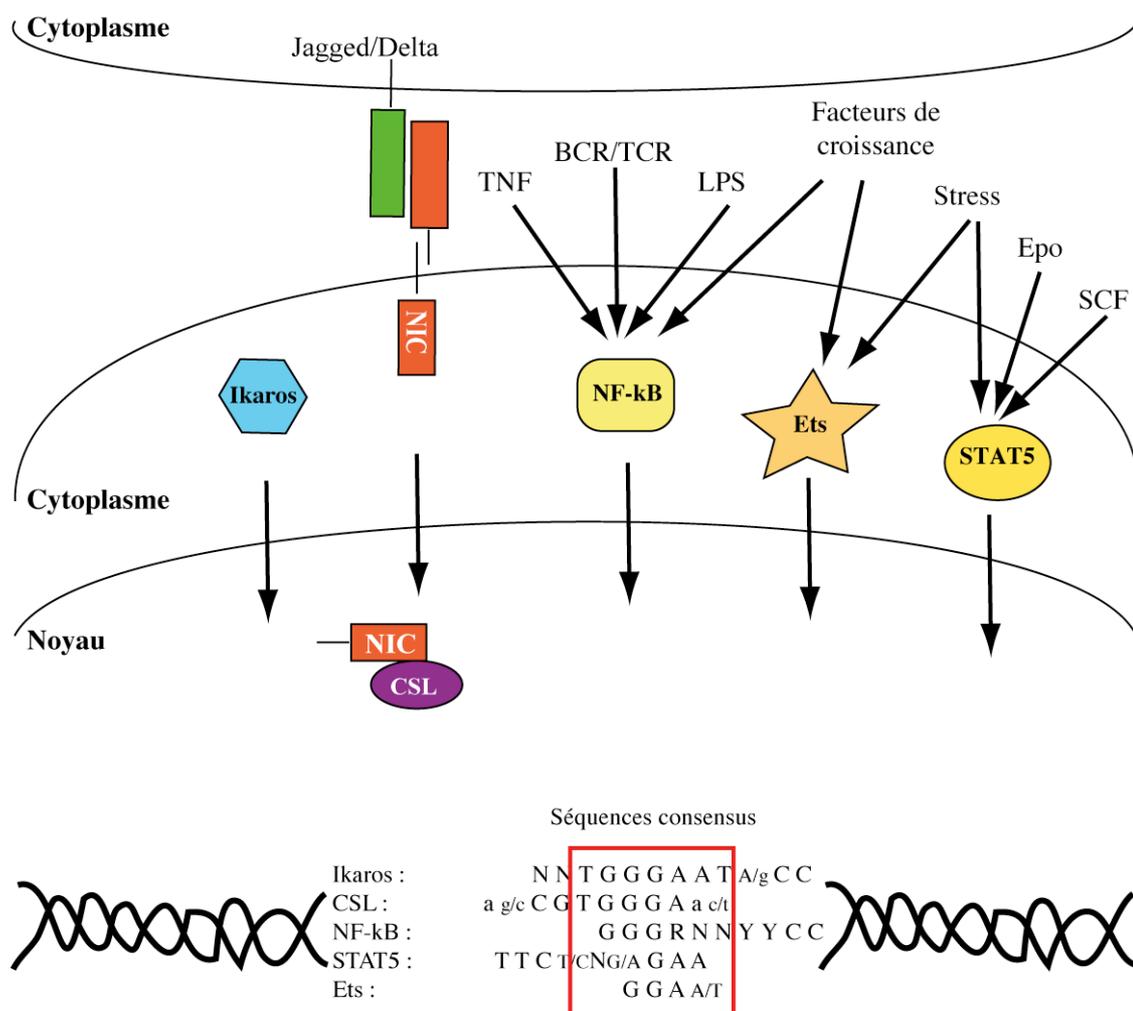
la régulation de la voie Notch au sein de certains tissus comme je l'ai suggéré pour Ikaros et CSL dans les neurones, le placenta, ou la glande pituitaire.

### **IV.3 Ikaros peut-il être en compétition avec d'autres facteurs que Notch ?**

Statistiquement le site TGGGAA est présent tous les 4 kb dans le génome, le nombre potentiel de séquences de fixation d'Ikaros est donc de l'ordre de 850000. Ce nombre important de sites de reconnaissance potentiels permettent de penser que la compétition d'Ikaros avec de nombreux facteurs de transcription pourrait jouer un rôle essentiel au cours du développement des cellules du système hématopoïétique. Les séquences consensus de NF-kB, STAT5 ou des membres de la famille Ets contiennent le motif TGGGAA (cf. Figure D1). Ils pourraient donc être en compétition avec Ikaros et/ou CSL pour la régulation de gènes cibles spécifiques.

#### **IV.3.1. NF-kB.**

La famille du facteur de transcription NF-kB est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose. Une activité anormale de NF-kB est observée dans de nombreuses tumeurs et il est communément admis que cette dérégulation est requise pour la transformation par certains oncogènes comme Bcr-Abl et Ras (Jo et al., 2000; Mayo et al., 1997; Reuther et al., 1998). Bien qu'aucun gène commun entre Ikaros et NF-kB n'a actuellement été identifié, les deux protéines sont capables de reconnaître la même séquence nucléotidique *in vitro* (Molnar and Georgopoulos, 1994). Cela suggère que la perte d'Ikaros pourrait affecter la régulation des gènes régulés par NF-kB d'une façon semblable à celle que j'ai montré pour Hes-1. En ce qui concerne la compétition CSL/NF-kB, quelques études ont montré que Notch était capable de contrôler l'activité basale de gènes cibles de NF-kB comme NF-kB2, I $\kappa$ B $\alpha$ , IL-6 (Oakley et al., 2003 1997 ; Oswald et al., 1998; Palmieri et al., 1999).



**Figure D1 : Le recouvrement de séquences régulatrices suggère la convergence de multiples voies de signalisation.**

Suite à l'activation de facteurs de transcription par des stimuli externes, les signaux sont transduits vers le noyau. A ce niveau, les facteurs de transcription peuvent réguler des gènes contenant des séquences consensus de régulation similaires ou recouvrantes.

NIC : Notch Intracellulaire; TNF : Tumor Necrosis Factor ; BCR : récepteur des cellules B ; TCR : récepteur des cellules T ; LPS : LipoPolySaccharide ; Epo : Erythropoïétine ; SCF : Stem Cell Factor.

### IV.3.2. STAT5.

Les facteurs de transcription STAT5 sont impliqués dans la régulation hormonale, ils jouent un rôle dans le maintien des HSC, et dans le développement des lignages myéloïdes, érythroïdes et lymphoïdes. La séquence promotrice reconnue par STAT5 est (TTC(T/C)N(G/A)GAA) (Soldaini et al., 2000). Le motif de liaison central d'Ikaros étant TGGGA, les deux protéines pourraient partager des sites de fixation à l'ADN au sein de certains promoteurs. Ainsi, un mécanisme de compétition entre Ikaros et STAT5 au niveau

des éléments régulateurs de certains gènes cibles semble envisageable vu l'homologie de séquence partagée.

#### **IV.3.3. La famille Ets.**

Il existe une trentaine de facteurs de transcription appartenant à la famille Ets contenant le domaine de liaison à l'ADN Ets. De nombreux membres ont été impliqués dans des leucémies comme PU.1 ou TEL (Buijs et al., 2000; Moreau-Gachelin et al., 1996). Le site de liaison à l'ADN de toutes les protéines de la famille Ets est GGAA/T, ce qui suggère que tous les éléments de réponse de CSL et Ikaros sont potentiellement de sites de liaison à Ets. Des expériences de liaison et de compétition ont montré qu'Ikaros et l'activateur de transcription de la famille Ets Elf-1 reconnaissent la même séquence unique du promoteur Tdt dans les lymphocytes T (Trinh et al., 2001). Après stimulation de cellules DP, Tdt est réprimé, et on observe le remplacement de Elf-1 par Ikaros sur le promoteur. Ce résultat suggère que l'absence d'extinction génique par Ikaros induirait l'activation anormale de Tdt via Elf-1. Ce mécanisme pourrait être étendu à d'autres facteurs de la famille Ets.

En conclusion, la régulation de la transcription d'un gène par compétition entre différents facteurs de transcription semble être un mécanisme assez général au cours de la différenciation des cellules.

## **5<sup>ème</sup> partie. Conclusion : Ikaros, répresseur de la transcription.**

L'association d'Ikaros avec le complexe NuRD, sa localisation dans l'hétérochromatine péricentromérique et son action au niveau du promoteur de *Tdt* lui confère un rôle de répresseur de la transcription. Les effets de l'absence d'Ikaros sur le développement du système hématopoïétique sont importants ; ce facteur de transcription joue donc un rôle primordial dans la régulation des gènes de ce compartiment cellulaire.

Nos études suggèrent qu'Ikaros et la voie Notch possèdent des activités antagonistes dans le développement des cellules T et plus particulièrement qu'Ikaros réprime les gènes cibles de Notch au cours du développement des thymocytes lors de la transition DN-DP. Mes résultats montrent l'importance de la compétition entre Ikaros et CSL au cours de la différenciation des cellules T au niveau du gène *Hes-1*. Ce mécanisme pourrait être étendu à d'autres gènes cibles, voire à d'autres facteurs que CSL. La présence d'Ikaros au niveau du promoteur de *Hes-1* induit l'apparition de marqueurs de répression au niveau des histones ; ces données suggèrent que la présence d'Ikaros est nécessaire pour la méthylation des résidus interagissant avec les protéines, associées à la répression des gènes, HP-1 et des complexes polycomb. Cependant le lien direct entre Ikaros et ses marques d'extinction reste à être élucidé.

Quoi qu'il en soit, de manière plus générale, la perturbation de la régulation de gènes clés réprimés par Ikaros pourrait être à l'origine de la tumorigénèse chez nos souris *Ik<sup>L/L</sup>*.

Ces données confirment qu'Ikaros occupe une place centrale dans le contrôle de l'hématopoïèse et lui attribue un rôle nouveau dans le recrutement de facteurs nécessaire à l'extinction génique.

## **V. Bibliographi**

**e**

- Agoston, D. V., Szemes, M., Dobi, A., Palkovits, M., Georgopoulos, K., Gyorgy, A., and Ring, M. A. (2007). Ikaros is expressed in developing striatal neurons and involved in enkephalinergic differentiation. *J Neurochem* *102*, 1805-1816.
- Aifantis, I., Gounari, F., Scorrano, L., Borowski, C., and von Boehmer, H. (2001). Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca<sup>2+</sup> mobilization and activation of NF-kappaB and NFAT. *Nat Immunol* *2*, 403-409.
- Aifantis, I., Mandal, M., Sawai, K., Ferrando, A., and Vilimas, T. (2006). Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor. *Immunol Rev* *209*, 159-169.
- Akasaka, T., Kanno, M., Balling, R., Mieza, M. A., Taniguchi, M., and Koseki, H. (1996). A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during theanteroposterior specification of the axial skeleton. *Development* *122*, 1513-1522.
- Alkema, M. J., van der Lugt, N. M., Bobeldijk, R. C., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1995). Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice. *Nature* *374*, 724-727.
- Allman, D., Dalod, M., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Robbins, S. H., Trinchieri, G., Biron, C. A., Kastner, P., and Chan, S. (2006). Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* *108*, 4025-4034.
- Anderson, G., and Jenkinson, E. J. (2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* *1*, 31-40.
- 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*, 3349-3354.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* *268*, 225-232.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* *284*, 770-776.
- Aster, J. C., Xu, L., Karnell, F. G., Patriub, V., Pui, J. C., and Pear, W. S. (2000). Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. *Mol Cell Biol* *20*, 7505-7515.
- 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*, 333-343.
- Baek, J. H., Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2006). Persistent and high levels of Hes1 expression regulate boundary formation in the developing central nervous system. *Development* *133*, 2467-2476.
- Becker, P. B., and Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* *71*, 247-273.
- Bellavia, D., Campese, A. F., Checquolo, S., Balestri, A., Biondi, A., Cazzaniga, G., Lendahl, U., Fehling, H. J., Hayday, A. C., Frati, L., *et al.* (2002). Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 3788-3793.
- 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*, 551-564.
- Beverly, L. J., and Capobianco, A. J. (2004). Targeting promiscuous signaling pathways in cancer: another Notch in the bedpost. *Trends Mol Med* *10*, 591-598.
- Bhandoola, A., and Sambandam, A. (2006). From stem cell to T cell: one route or many? *Nat Rev Immunol* *6*, 117-126.

- Bigas, A., Martin, D. I., and Milner, L. A. (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol* 18, 2324-2333.
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-689.
- 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, 207-217.
- 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, 845-854.
- Buijs, A., van Rompaey, L., Molijn, A. C., Davis, J. N., Vertegaal, A. C., Potter, M. D., Adams, C., van Baal, S., Zwarthoff, E. C., Roussel, M. F., and Grosveld, G. C. (2000). The MN1-TEL fusion protein, encoded by the translocation (12;22)(p13;q11) in myeloid leukemia, is a transcription factor with transforming activity. *Mol Cell Biol* 20, 9281-9293.
- 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.
- Calvi, L. M. (2006). Osteoblastic activation in the hematopoietic stem cell niche. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 477-488.
- Carbone, A. M., Marrack, P., and Kappler, J. W. (1988). Demethylated CD8 gene in CD4+ T cells suggests that CD4+ cells develop from CD8+ precursors. *Science* 242, 1174-1176.
- Ceredig, R., and Cummings, D. E. (1983). Phenotypic and functional properties of murine thymocytes. III. Kinetic analysis of the recovery of intrathymic cytolytic T lymphocyte precursors after in vivo administration of hydrocortisone acetate. *J Immunol* 130, 33-37.
- Ceredig, R., and Rolink, T. (2002). A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2, 888-897.
- Chattopadhyay, S., Whitehurst, C. E., Schwenk, F., and Chen, J. (1998). Biochemical and functional analyses of chromatin changes at the TCR-beta gene locus during CD4-CD8- to CD4+CD8+ thymocyte differentiation. *J Immunol* 160, 1256-1267.
- Cheng, P., Nefedova, Y., Miele, L., Osborne, B. A., and Gaborilovich, D. (2003). Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells. *Blood* 102, 3980-3988.
- 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, 2146-2160.
- Core, N., Bel, S., Gaunt, S. J., Aurrand-Lions, M., Pearce, J., Fisher, A., and Djabali, M. (1997). Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice. *Development* 124, 721-729.
- Cortes, M., Wong, E., Koipally, J., and Georgopoulos, K. (1999). Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr Opin Immunol* 11, 167-171.
- Cress, W. D., and Seto, E. (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 184, 1-16.
- Dang, T. P., Gazdar, A. F., Virmani, A. K., Sepetavec, T., Hande, K. R., Minna, J. D., Roberts, J. R., and Carbone, D. P. (2000). Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 92, 1355-1357.
- Davis, R. L., and Turner, D. L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342-8357.

- De Falco, M., Cobellis, L., Giraldi, D., Mastrogiacomo, A., Perna, A., Colacurci, N., Miele, L., and De Luca, A. (2007). Expression and distribution of notch protein members in human placenta throughout pregnancy. *Placenta* 28, 118-126.
- De Smedt, M., Reynvoet, K., Kerre, T., Taghon, T., Verhasselt, B., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., and Plum, J. (2002). Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells. *J Immunol* 169, 3021-3029.
- Defetos, M. L., He, Y. W., Ojala, E. W., and Bevan, M. J. (1998). Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity* 9, 777-786.
- Defetos, 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.
- Donskoy, E., Foss, D., and Goldschneider, I. (2003). Gated importation of prothymocytes by adult mouse thymus is coordinated with their periodic mobilization from bone marrow. *J Immunol* 171, 3568-3575.
- Dovat, S., Ronni, T., Russell, D., Ferrini, R., Cobb, B. S., and Smale, S. T. (2002). A common mechanism for mitotic inactivation of C2H2 zinc finger DNA-binding domains. *Genes Dev* 16, 2985-2990.
- Dumortier, A., Jeannet, R., Kirstetter, P., Kleinmann, E., Sellars, M., dos Santos, N. R., Thibault, C., Barths, J., Ghysdael, J., Punt, J. A., *et al.* (2006). Notch activation is an early and critical event during T-Cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice. *Mol Cell Biol* 26, 209-220.
- Dumortier, A., Kirstetter, P., Kastner, P., and Chan, S. (2003). Ikaros regulates neutrophil differentiation. *Blood* 101, 2219-2226.
- Duncan, A. W., Rattis, F. M., DiMascio, L. N., Congdon, K. L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J. M., Willert, K., Gaiano, N., and Reya, T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 6, 314-322.
- Durum, S. K., Candeias, S., Nakajima, H., Leonard, W. J., Baird, A. M., Berg, L. J., and Muegge, K. (1998). Interleukin 7 receptor control of T cell receptor gamma gene rearrangement: role of receptor-associated chains and locus accessibility. *J Exp Med* 188, 2233-2241.
- Egerton, M., Scollay, R., and Shortman, K. (1990). Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2579-2582.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463.
- 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, 649-661.
- Engel, I., Johns, C., Bain, G., Rivera, R. R., and Murre, C. (2001). Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity. *J Exp Med* 194, 733-745.
- Ernst, P., Hahm, K., and Smale, S. T. (1993). Both LyF-1 and an Ets protein interact with a critical promoter element in the murine terminal transferase gene. *Mol Cell Biol* 13, 2982-2992.
- 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, 6121-6131.
- Ezzat, S., Mader, R., Fischer, S., Yu, S., Ackerley, C., and Asa, S. L. (2006). An essential role for the hematopoietic transcription factor Ikaros in hypothalamic-pituitary-mediated somatic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2214-2219.
- Ezzat, S., Mader, R., Yu, S., Ning, T., Poussier, P., and Asa, S. L. (2005). Ikaros integrates endocrine and immune system development. *J Clin Invest* 115, 1021-1029.

- 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*, 1017-1025.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* *421*, 448-453.
- Fitzpatrick, D. R., and Wilson, C. B. (2003). Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. *Clin Immunol* *109*, 37-45.
- Fleming, R. J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* *9*, 599-607.
- Fortini, M. E. (2001). Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 627-634.
- Foss, D. L., Donskoy, E., and Goldschneider, I. (2001). The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med* *193*, 365-374.
- 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*, 1397-1411.
- Georgopoulos, K. (1997). Transcription factors required for lymphoid lineage commitment. *Curr Opin Immunol* *9*, 222-227.
- Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* *2*, 162-174.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* *79*, 143-156.
- 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*, 808-812.
- Georgopoulos, K., Winandy, S., and Avitahl, N. (1997). The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu Rev Immunol* *15*, 155-176.
- Godfrey, D. I., and Zlotnik, A. (1993). Control points in early T-cell development. *Immunol Today* *14*, 547-553.
- Gomez-del Arco, P., Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2005). Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol* *25*, 2688-2697.
- Gomez-del Arco, P., Maki, K., and Georgopoulos, K. (2004). Phosphorylation controls Ikaros's ability to negatively regulate the G(1)-S transition. *Mol Cell Biol* *24*, 2797-2807.
- Gridley, T. (2003). Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet* *12 Spec No 1*, R9-13.
- Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F. F., Zamir, I., *et al.* (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* *391*, 815-818.
- Haapasalo, A., Kim, D. Y., Carey, B. W., Turunen, M. K., Pettingell, W. H., and Kovacs, D. M. (2007). Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage regulates association of leukocyte-common antigen-related (LAR) receptor tyrosine phosphatase with beta-catenin. *J Biol Chem* *282*, 9063-9072.
- 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*, 7111-7123.
- Hake, S. B., Xiao, A., and Allis, C. D. (2004). Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* *90*, 761-769.
- 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, 637-645.
- Harker, N., Naito, T., Cortes, M., Hostert, A., Hirschberg, S., Tolaini, M., Roderick, K., Georgopoulos, K., and Kioussis, D. (2002). The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins. *Mol Cell* 10, 1403-1415.
- Hasserjian, R. P., Aster, J. C., Davi, F., Weinberg, D. S., and Sklar, J. (1996). Modulated expression of notch1 during thymocyte development. *Blood* 88, 970-976.
- Hernandez-Hoyos, G., Anderson, M. K., Wang, C., Rothenberg, E. V., and Alberola-Ila, J. (2003). GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation. *Immunity* 19, 83-94.
- Hoebeke, I., De Smedt, M., Van de Walle, I., Reynvoet, K., De Smet, G., Plum, J., and Leclercq, G. (2006). Overexpression of HES-1 is not sufficient to impose T-cell differentiation on human hematopoietic stem cells. *Blood* 107, 2879-2881.
- Hozumi, K., Kobori, A., Sato, T., Nishimura, T., and Habu, S. (1996). Transcription and demethylation of TCR beta gene initiate prior to the gene rearrangement in c-kit+ thymocytes with CD3 expression: evidence of T cell commitment in the thymus. *Int Immunol* 8, 1473-1481.
- Hsieh, J. J., Zhou, S., Chen, L., Young, D. B., and Hayward, S. D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 23-28.
- Huang, J., Durum, S. K., and Muegge, K. (2001). Cutting edge: histone acetylation and recombination at the TCR gamma locus follows IL-7 induction. *J Immunol* 167, 6073-6077.
- 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, 4180-4187.
- Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194, 237-255.
- Ito, T., Nomura, S., Okada, M., Katsumata, Y., Kikkawa, F., Rogi, T., Tsujimoto, M., and Mizutani, S. (2002). Ap-2 and Ikaros regulate transcription of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1048-1053.
- 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, 231-243.
- 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, 253-264.
- 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, 355-358.
- Jeffries, S., Robbins, D. J., and Capobianco, A. J. (2002). Characterization of a high-molecular-weight Notch complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line. *Mol Cell Biol* 22, 3927-3941.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Jhappan, C., Gallahan, D., Stahle, C., Chu, E., Smith, G. H., Merlino, G., and Callahan, R. (1992). Expression of an activated Notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. *Genes Dev* 6, 345-355.

- Jo, H., Zhang, R., Zhang, H., McKinsey, T. A., Shao, J., Beauchamp, R. D., Ballard, D. W., and Liang, P. (2000). NF-kappa B is required for H-ras oncogene induced abnormal cell proliferation and tumorigenesis. *Oncogene* *19*, 841-849.
- Johnstone, R. W., and Trapani, J. A. (1999). Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins. *Mol Cell Biol* *19*, 5833-5838.
- Kadam, S., and Emerson, B. M. (2003). Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol Cell* *11*, 377-389.
- Kaneta, M., Osawa, M., Sudo, K., Nakauchi, H., Farr, A. G., and Takahama, Y. (2000). A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J Immunol* *164*, 256-264.
- Karlsson, A., Soderkvist, P., and Zhuang, S. M. (2002). Point mutations and deletions in the *zfn1a1/ikaros* gene in chemically induced murine lymphomas. *Cancer Res* *62*, 2650-2653.
- 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*, 2211-2223.
- Kawamata, S., Du, C., Li, K., and Lavau, C. (2002). Overexpression of the Notch target genes *Hes* in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* *21*, 3855-3863.
- Kearse, K. P., Takahama, Y., Punt, J. A., Sharrow, S. O., and Singer, A. (1995). Early molecular events induced by T cell receptor (TCR) signaling in immature CD4+ CD8+ thymocytes: increased synthesis of TCR-alpha protein is an early response to TCR signaling that compensates for TCR-alpha instability, improves TCR assembly, and parallels other indicators of positive selection. *J Exp Med* *181*, 193-202.
- 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*, 508-515.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* *116*, 259-272.
- Kim, H. K., and Siu, G. (1998). The notch pathway intermediate HES-1 silences CD4 gene expression. *Mol Cell Biol* *18*, 7166-7175.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., *et al.* (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* *10*, 345-355.
- Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P., and Chan, S. (2002). Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol* *32*, 720-730.
- Kita, A., Imayoshi, I., Hojo, M., Kitagawa, M., Kokubu, H., Ohsawa, R., Ohtsuka, T., Kageyama, R., and Hashimoto, N. (2007). *Hes1* and *Hes5* control the progenitor pool, intermediate lobe specification, and posterior lobe formation in the pituitary development. *Mol Endocrinol* *21*, 1458-1466.
- 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 fringe-mediated inhibition of Notch-1. *Immunity* *15*, 225-236.
- 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*, 19594-19602.
- Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2002). A molecular dissection of the repression circuitry of Ikaros. *J Biol Chem* *277*, 27697-27705.
- Koipally, J., Heller, E. J., Seavitt, J. R., and Georgopoulos, K. (2002). Unconventional potentiation of gene expression by Ikaros. *J Biol Chem* *277*, 13007-13015.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661-672.

- Krangel, M. S. (2003). Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat Immunol* 4, 624-630.
- Krebs, L. T., Deftos, M. L., Bevan, M. J., and Gridley, T. (2001). The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway. *Dev Biol* 238, 110-119.
- Kurooka, H., and Honjo, T. (2000). Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *J Biol Chem* 275, 17211-17220.
- Lachner, M., O'Sullivan, R. J., and Jenuwein, T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* 116, 2117-2124.
- Lai, E. C. (2002). Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep* 3, 840-845.
- Lamar, E., Deblandre, G., Wettstein, D., Gawantka, V., Pollet, N., Niehrs, C., and Kintner, C. (2001). Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* 15, 1885-1899.
- Le Borgne, R., Bardin, A., and Schweisguth, F. (2005). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751-1762.
- Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Perez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., *et al.* (2001). A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15, 763-774.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3, 662-673.
- Li, H. H., Li, A. G., Sheppard, H. M., and Liu, X. (2004). Phosphorylation on Thr-55 by TAF1 mediates degradation of p53: a role for TAF1 in cell G1 progression. *Mol Cell* 13, 867-878.
- Lieber, T., Kidd, S., and Young, M. W. (2002). kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. *Genes Dev* 16, 209-221.
- 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, 5229-5243.
- Lund, A. H., and van Lohuizen, M. (2004). Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 18, 2315-2335.
- Maillard, I., Fang, T., and Pear, W. S. (2005). Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol* 23, 945-974.
- Mayo, M. W., Wang, C. Y., Cogswell, P. C., Rogers-Graham, K. S., Lowe, S. W., Der, C. J., and Baldwin, A. S., Jr. (1997). Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* 278, 1812-1815.
- Medina, K. L., Garrett, K. P., Thompson, L. F., Rossi, M. I., Payne, K. J., and Kincade, P. W. (2001). Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nat Immunol* 2, 718-724.
- Milner, L. A., Bigas, A., Kopan, R., Brashem-Stein, C., Bernstein, I. D., and Martin, D. I. (1996). Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13014-13019.
- Mizutani, K., and Saito, T. (2005). Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Development* 132, 1295-1304.
- Molnar, A., and Georgopoulos, K. (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 14, 8292-8303.

- 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*, 225-231.
- Moreau-Gachelin, F., Wendling, F., Molina, T., Denis, N., Titeux, M., Grimber, G., Briand, P., Vainchenker, W., and Tavitian, A. (1996). Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol Cell Biol* *16*, 2453-2463.
- 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*, 2004-2013.
- Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G., and Anderson, D. J. (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* *101*, 499-510.
- Mostoslavsky, R., and Bergman, Y. (1997). DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system. *Biochim Biophys Acta* *1333*, F29-50.
- Nakayama, H., Liu, Y., Stifani, S., and Cross, J. C. (1997). Developmental restriction of Mash-2 expression in trophoblast correlates with potential activation of the notch-2 pathway. *Dev Genet* *21*, 21-30.
- Nawijn, M. C., Dingjan, G. M., Ferreira, R., Lambrecht, B. N., Karis, A., Grosveld, F., Savelkoul, H., and Hendriks, R. W. (2001a). Enforced expression of GATA-3 in transgenic mice inhibits Th1 differentiation and induces the formation of a T1/ST2-expressing Th2-committed T cell compartment in vivo. *J Immunol* *167*, 724-732.
- Nawijn, M. C., Ferreira, R., Dingjan, G. M., Kahre, O., Drabek, D., Karis, A., Grosveld, F., and Hendriks, R. W. (2001b). Enforced expression of GATA-3 during T cell development inhibits maturation of CD8 single-positive cells and induces thymic lymphoma in transgenic mice. *J Immunol* *167*, 715-723.
- Nellesen, D. T., Lai, E. C., and Posakony, J. W. (1999). Discrete enhancer elements mediate selective responsiveness of enhancer of split complex genes to common transcriptional activators. *Dev Biol* *213*, 33-53.
- Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Friedrich, C., and Georgopoulos, K. (1998). Ikaros in hemopoietic lineage determination and homeostasis. *Semin Immunol* *10*, 119-125.
- Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mill, P., van Noort, M., Hui, C. C., Clevers, H., Dotto, G. P., and Radtke, F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* *33*, 416-421.
- 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., et al. (2000). An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol* *20*, 7572-7582.
- Oakley, F., Mann, J., Ruddell, R. G., Pickford, J., Weinmaster, G., and Mann, D. A. (2003). Basal expression of IkappaBalpha is controlled by the mammalian transcriptional repressor RBP-J (CBF1) and its activator Notch1. *J Biol Chem* *278*, 24359-24370.
- 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 gamma-ray-induced mouse thymic lymphomas. *Oncogene* *18*, 6677-6683.
- Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C. P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., and Kadesch, T. (1998). Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol* *18*, 2230-2239.
- Osipovich, O., Cobb, R. M., Oestreich, K. J., Pierce, S., Ferrier, P., and Oltz, E. M. (2007). Essential function for SWI-SNF chromatin-remodeling complexes in the promoter-directed assembly of Tcrb genes. *Nat Immunol* *8*, 809-816.

- Osipovich, O., Milley, R., Meade, A., Tachibana, M., Shinkai, Y., Krangel, M. S., and Oltz, E. M. (2004). Targeted inhibition of V(D)J recombination by a histone methyltransferase. *Nat Immunol* 5, 309-316.
- Oswald, F., Kostezka, U., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Dillinger, K., Zechner, U., Ludwig, L., Wilda, M., Hameister, H., Knochel, W., *et al.* (2002). SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *Embo J* 21, 5417-5426.
- Oswald, F., Liptay, S., Adler, G., and Schmid, R. M. (1998). NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. *Mol Cell Biol* 18, 2077-2088.
- 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, 7761-7774.
- Oswald, F., Winkler, M., Cao, Y., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Knochel, W., and Borggreffe, T. (2005). RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol Cell Biol* 25, 10379-10390.
- Pai, S. Y., Truitt, M. L., Ting, C. N., Leiden, J. M., Glimcher, L. H., and Ho, I. C. (2003). Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development. *Immunity* 19, 863-875.
- Palmieri, M., Sasso, M. P., Monese, R., Merola, M., Faggioli, L., Tovey, M., and Furia, A. (1999). Interaction of the nuclear protein CBF1 with the kappaB site of the IL-6 gene promoter. *Nucleic Acids Res* 27, 2785-2791.
- Palomero, T., Lim, W. K., Odom, D. T., Sulis, M. L., Real, P. J., Margolin, A., Barnes, K. C., O'Neil, J., Neuberg, D., Weng, A. P., *et al.* (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18261-18266.
- 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, 131-144.
- 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, 2283-2291.
- Pestano, G. A., Zhou, Y., Trimble, L. A., Daley, J., Weber, G. F., and Cantor, H. (1999). Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death. *Science* 284, 1187-1191.
- Peters, A. H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R. J., Derijck, A. A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., *et al.* (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12, 1577-1589.
- Peterson, C. L., and Logie, C. (2000). Recruitment of chromatin remodeling machines. *J Cell Biochem* 78, 179-185.
- Pirot, P., van Grunsven, L. A., Marine, J. C., Huylebroeck, D., and Bellefroid, E. J. (2004). Direct regulation of the Nrarp gene promoter by the Notch signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 526-534.
- Porritt, H. E., Rumfelt, L. L., Tabrizifard, S., Schmitt, T. M., Zuniga-Pflucker, J. C., and Petrie, H. T. (2004). Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* 20, 735-745.
- 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., Ferrero, I., Wilson, A., Lees, R., Aguet, M., and MacDonald, H. R. (2000). Notch1 deficiency dissociates the intrathymic development of dendritic cells and T cells. *J Exp Med* *191*, 1085-1094.
- Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S. J., and MacDonald, H. R. (2004). Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* *5*, 247-253.
- 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*, 547-558.
- 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.
- Reuther, J. Y., Reuther, G. W., Cortez, D., Pendergast, A. M., and Baldwin, A. S., Jr. (1998). A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev* *12*, 968-981.
- 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*, 483-492.
- Rodewald, H. R., and Fehling, H. J. (1998). Molecular and cellular events in early thymocyte development. *Adv Immunol* *69*, 1-112.
- Rohn, J. L., Luring, A. S., Linenberger, M. L., and Overbaugh, J. (1996). Transduction of Notch2 in feline leukemia virus-induced thymic lymphoma. *J Virol* *70*, 8071-8080.
- Rolink, A., Karasuyama, H., Haasner, D., Grawunder, U., Martensson, I. L., Kudo, A., and Melchers, F. (1994). Two pathways of B-lymphocyte development in mouse bone marrow and the roles of surrogate L chain in this development. *Immunol Rev* *137*, 185-201.
- Sabbattini, P., Lundgren, M., Georgiou, A., Chow, C., Warnes, G., and Dillon, N. (2001). Binding of Ikaros to the lambda5 promoter silences transcription through a mechanism that does not require heterochromatin formation. *Embo J* *20*, 2812-2822.
- 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*, 1208-1212.
- Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M. S., Anderson, C. W., Erickson, J. W., Appella, E., and Xie, D. (1997). Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* *36*, 10117-10124.
- Sakamoto, S., Ortaldo, J. R., and Young, H. A. (1988). Methylation patterns of the T cell receptor beta-chain gene in T cells, large granular lymphocytes, B cells, and monocytes. *J Immunol* *140*, 654-660.
- Sant'Angelo, D. B., Lucas, B., Waterbury, P. G., Cohen, B., Brabb, T., Gorman, J., Germain, R. N., and Janeway, C. A., Jr. (1998). A molecular map of T cell development. *Immunity* *9*, 179-186.
- Schmitt, T. M., Ciofani, M., Petrie, H. T., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2004). Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med* *200*, 469-479.
- 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*, 749-756.
- Schmitt, T. M., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2005). Thymus-derived signals regulate early T-cell development. *Crit Rev Immunol* *25*, 141-159.
- Schroeder, T., and Just, U. (2000). Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *Embo J* *19*, 2558-2568.
- Schuler, W., Weiler, I. J., Schuler, A., Phillips, R. A., Rosenberg, N., Mak, T. W., Kearney, J. F., Perry, R. P., and Bosma, M. J. (1986). Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* *46*, 963-972.

- Sharma, V. M., Calvo, J. A., Draheim, K. M., Cunningham, L. A., Hermance, N., Beverly, L., Krishnamoorthy, V., Bhasin, M., Capobianco, A. J., and Kelliher, M. A. (2006). Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol* 26, 8022-8031.
- 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, 855-867.
- Sicinska, E., Aifantis, I., Le Cam, L., Swat, W., Borowski, C., Yu, Q., Ferrando, A. A., Levin, S. D., Geng, Y., von Boehmer, H., and Sicinski, P. (2003). Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* 4, 451-461.
- Smale, S. T., and Fisher, A. G. (2002). Chromatin structure and gene regulation in the immune system. *Annu Rev Immunol* 20, 427-462.
- Soldaini, E., John, S., Moro, S., Bollenbacher, J., Schindler, U., and Leonard, W. J. (2000). DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites. *Mol Cell Biol* 20, 389-401.
- 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, 4769-4779.
- Spaulding, C., Reschly, E. J., Zagort, D. E., Yashiro-Ohtani, Y., Beverly, L. J., Capobianco, A., Pear, W. S., and Kee, B. L. (2007). Notch1 co-opts lymphoid enhancer factor 1 for survival of murine T-cell lymphomas. *Blood* 110, 2650-2658.
- Sridharan, R., and Smale, S. T. (2007). Predominant Interaction of Both Ikaros and Helios with the NuRD Complex in Immature Thymocytes. *J Biol Chem* 282, 30227-30238.
- Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N., and Scadden, D. T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 99, 2369-2378.
- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Sun, L., Crotty, M. L., Sensel, M., Sather, H., Navara, C., Nachman, J., Steinherz, P. G., Gaynon, P. S., Seibel, N., Mao, C., et al. (1999a). Expression of dominant-negative Ikaros isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 5, 2112-2120.
- 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., et al. (1999b). Expression of aberrantly spliced oncogenic ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 17, 3753-3766.
- 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, 680-685.
- 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, 5358-5369.
- Taghon, T., Yui, M. A., Pant, R., Diamond, R. A., and Rothenberg, E. V. (2006). Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 24, 53-64.
- Takahara, Y., and Hara, J. (2000). Polycomb-group genes and hematopoiesis. *Int J Hematol* 72, 165-172.

- Tan, J. B., Visan, I., Yuan, J. S., and Guidos, C. J. (2005). Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nat Immunol* 6, 671-679.
- Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M., and Honjo, T. (2004). Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* 20, 611-622.
- Taniuchi, I., and Littman, D. R. (2004). Epigenetic gene silencing by Runx proteins. *Oncogene* 23, 4341-4345.
- Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M. J., Bae, S. C., Komori, T., Ito, Y., and Littman, D. R. (2002). Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111, 621-633.
- 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, 1203-1210.
- Tong, J. K., Hassig, C. A., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., and Schreiber, S. L. (1998). Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* 395, 917-921.
- 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, 1817-1832.
- Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T., and Kawaichi, M. (1994). Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22, 965-971.
- Turka, L. A., Schatz, D. G., Oettinger, M. A., Chun, J. J., Gorka, C., Lee, K., McCormack, W. T., and Thompson, C. B. (1991). Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science* 253, 778-781.
- Turner, B. M. (2003). Memorable transcription. *Nat Cell Biol* 5, 390-393.
- van der Lugt, N. M., Domen, J., Linders, K., van Roon, M., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M., van Lohuizen, M., and et al. (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene. *Genes Dev* 8, 757-769.
- Varnum-Finney, B., Purton, L. E., Yu, M., Brashem-Stein, C., Flowers, D., Staats, S., Moore, K. A., Le Roux, I., Mann, R., Gray, G., et al. (1998). The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* 91, 4084-4091.
- Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W. S., and Bernstein, I. D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* 6, 1278-1281.
- 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, 677-689.
- Wang, J. H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A. H., Bigby, M., and Georgopoulos, K. (1996). Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 5, 537-549.
- Wang, S. C., Nakajima, Y., Yu, Y. L., Xia, W., Chen, C. T., Yang, C. C., McIntush, E. W., Li, L. Y., Hawke, D. H., Kobayashi, R., and Hung, M. C. (2006). Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol* 8, 1359-1368.
- Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B. J., Cado, D., and Robey, E. (1997). Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* 88, 833-843.

- Wayne, J., Suh, H., Misulovin, Z., Sokol, K. A., Inaba, K., and Nussenzweig, M. C. (1994). A regulatory role for recombinase activating genes, RAG-1 and RAG-2, in T cell development. *Immunity* *1*, 95-107.
- Weng, A. P., and Aster, J. C. (2004). Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr Opin Genet Dev* *14*, 48-54.
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., and Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* *306*, 269-271.
- Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C. G., Sai, H., Tobias, J., *et al.* (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* *20*, 2096-2109.
- 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*, 655-664.
- Wiest, D. L., Berger, M. A., and Carleton, M. (1999). Control of early thymocyte development by the pre-T cell receptor complex: A receptor without a ligand? *Semin Immunol* *11*, 251-262.
- Williams, C. J., Naito, T., Arco, P. G., Seavitt, J. R., Cashman, S. M., De Souza, B., Qi, X., Keables, P., Von Andrian, U. H., and Georgopoulos, K. (2004). The chromatin remodeler Mi-2beta is required for CD4 expression and T cell development. *Immunity* *20*, 719-733.
- Wilson, A., MacDonald, H. R., and Radtke, F. (2001). Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* *194*, 1003-1012.
- 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*, 289-299.
- 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*, 235-241.
- Wolf, E., Xiao, C., Fainaru, O., Lotem, J., Rosen, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Goldenberg, D., Brenner, O., Berke, G., *et al.* (2003). Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7731-7736.
- Wu, L. (2006). T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* *18*, 121-126.
- Wu, L., Antica, M., Johnson, G. R., Scollay, R., and Shortman, K. (1991). Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* *174*, 1617-1627.
- Wu, L., Pearse, M., Egerton, M., Petrie, H., and Scollay, R. (1990). CD4-CD8- thymocytes that express the T cell receptor may have previously expressed CD8. *Int Immunol* *2*, 51-56.
- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G. T., Young, M. K., Cote, J., and Wang, W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* *2*, 851-861.
- Yamamoto, E., Ito, T., Abe, A., Sido, F., Ino, K., Itakura, A., Mizutani, S., Dovat, S., Nomura, S., and Kikkawa, F. (2005). Ikaros is expressed in human extravillous trophoblasts and involved in their migration and invasion. *Mol Hum Reprod* *11*, 825-831.
- Yoon, K., and Gaiano, N. (2005). Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* *8*, 709-715.
- Yoshida, T., Ng, S. Y., Zuniga-Pflucker, J. C., and Georgopoulos, K. (2006). Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* *7*, 382-391.

- Yu, S., Asa, S. L., and Ezzat, S. (2002). Fibroblast growth factor receptor 4 is a target for the zinc-finger transcription factor Ikaros in the pituitary. *Mol Endocrinol* 16, 1069-1078.
- Yun, T. J., and Bevan, M. J. (2003). Notch-regulated ankyrin-repeat protein inhibits Notch1 signaling: multiple Notch1 signaling pathways involved in T cell development. *J Immunol* 170, 5834-5841.
- Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller, C. M., Carcangiu, M. L., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6414-6418.
- 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, 460-469.
- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H. P., Lane, W. S., and Reinberg, D. (1998). The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 95, 279-289.
- Zhu, X., Zhang, J., Tollkuhn, J., Ohsawa, R., Bresnick, E. H., Guillemot, F., Kageyama, R., and Rosenfeld, M. G. (2006). Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. *Genes Dev* 20, 2739-2753.
- Zou, Y. R., Sunshine, M. J., Taniuchi, I., Hatam, F., Killeen, N., and Littman, D. R. (2001). Epigenetic silencing of CD4 in T cells committed to the cytotoxic lineage. *Nat Genet* 29, 332-336.