



HAL
open science

Régulation épigénétique de l'expression du facteur de transcription hématopoïétique Aiolos et implication dans la leucémie lymphoïde chronique

Marianne Duhamel

► **To cite this version:**

Marianne Duhamel. Régulation épigénétique de l'expression du facteur de transcription hématopoïétique Aiolos et implication dans la leucémie lymphoïde chronique. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2007. English. NNT : 2007AGPT0031 . pastel-00003066

HAL Id: pastel-00003066

<https://pastel.hal.science/pastel-00003066>

Submitted on 5 Feb 2008

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

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

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**L'institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(AgroParisTech)**

Spécialité : Immunologie / Hématologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Marianne DUHAMEL

Le 31 octobre 2007

**Régulation épigénétique de l'expression du facteur de
transcription hématopoïétique Aiolos et implication dans la
leucémie lymphoïde chronique**

Directrice de thèse : Dr. Angelita REBOLLO

Travail réalisé à : INSERM U543, Immunologie Cellulaire et Tissulaire
Hôpital Pitié-Salpêtrière, Bât. CERVI, 83 bd de l'Hôpital 75013 Paris

Devant le jury :

Pr. Jean-Claude MEUNIER,Président
Dr. Cécile TONNELLE,Rapporteur
Dr. Jozo DELIC,Rapporteur
Pr. Hélène MERLE-BERAL,Examineur
Dr. Angelita REBOLLO,Directrice de thèse

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Jean-Claude Meunier d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse et d'avoir suivi mon travail pendant ces trois années de thèse et les trois années qui les ont précédées à l'INA P-G. Ses conseils m'ont toujours été d'une aide précieuse.

J'aimerais remercier également le Docteur Cécile Tonnelle et le Docteur Jozo Delic pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Hélène Merle-Béral pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail de thèse et m'avoir ouvert les portes de la leucémie lymphoïde chronique. Son soutien discret m'a apporté beaucoup de réconfort.

Je voudrais également remercier les personnes qui ont collaboré à ces travaux : Pablo Navarro, Muriel Cario-André, Issam Arrouss et Hélène Merle-Béral.

Je tiens bien sûr à remercier Angelita Rebollo pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son équipe. J'ai beaucoup mûri à ses côtés.

Merci également à tous les membres de mon équipe, anciens ou présents : Hélène, Allan, Aarne, Ata, Kevin, Issam et Katy. Un grand merci surtout à Frédéric Dessauge pour avoir guidé mes premiers pas dans le laboratoire ainsi que pour l'énergie et la bonne humeur qu'il a insufflé dans l'équipe.

Je remercie du fond du cœur les membres du service d'hématologie biologique, Myriam, Lynda, Patrick, Magali, Martine, Fred J, Laurent ainsi que Stan pour leurs nombreux conseils, leur bonne humeur et leur soutien de tous les jours.

Un grand merci à tous les autres membres de l'unité et en particulier à Catherine, Florence, Gael, Victoria, Izumi, Krys, Isabelle, Christophe et Karim.

Je souhaite remercier tout particulièrement CedCed, Jack, Cécile, Anne-So, Laurine, Fred et Elise pour le grain de folie qu'ils ont apporté au laboratoire. Votre présence m'a beaucoup manqué, en particulier ces derniers mois. Un grand merci à Brice, le seul de la bande à ne pas avoir quitté le navire et à m'avoir accompagné jusqu'au bout.

Je tiens à remercier du plus profond du cœur mes amies, Gaëlle, Sophie et Céline. Vous avez toujours été présentes quand j'en avais besoin et je vous en serai toujours reconnaissante. J'espère que la fin de cette thèse signera également la fin de nos soirées Déprime. Carpe Diem !

Une pensée également pour la bande des « Siciliens » : Annick, Christian, François, Ghislaine, Sarah, Olivier, Jean-Paul, Patrick, Régine et Eliane. Nos week-ends gastronomiques et volcaniques ont été de véritables bouffées d'oxygène.

Merci aussi à ma tante Françoise pour avoir eu le courage de relire ce manuscrit de thèse. On est loin de la physique !

Un très très grand merci pour terminer à mon frère et à mes parents. J'ai mis vos nerfs à rude épreuve pendant ces trois années de thèse et les quelques années d'études qui les ont précédées. Ce sont vos conseils avisés et votre soutien précieux de tous les jours qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici ! Mille merci.

TABLE DES MATIERES

Table des illustrations	6
Abréviations	8
Avant-propos	11
Introduction.....	13
A. L'hématopoïèse : un processus complexe dont la désorganisation conduit à des pathologies encore méconnues.....	14
I. Les grandes étapes de l'hématopoïèse	14
1. Des produits aux fonctions variées	14
2. Au départ, une cellule souche hématopoïétique pluripotente	15
3. Un processus complexe de différenciation puis de maturation : l'exemple des cellules B.....	16
II. A l'échelle moléculaire : une cascade de facteurs de transcription	18
1. Depuis les cellules souches hématopoïétiques vers les progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes : PU.1, GATA, Ikaros	18
2. Depuis les CLP vers les cellules B immatures : E2A, EBF, Pax5.....	20
3. Cellules B périphériques et formation du centre germinatif : Oct-2, OBF-1, NFκB, Aiolos, Bcl-6.....	21
4. Différenciation des cellules B des centres germinatifs en plasmocytes : Blimp-1 et XBP-1	22
III. Les conséquences d'un dérèglement de l'hématopoïèse : des proliférations malignes aux causes encore méconnues.....	23
1. La leucémie lymphoïde chronique B.....	24
2. Les lymphomes B non hodgkiniens	29
B. Aiolos, un facteur au fonctionnement complexe, impliqué dans la lymphopoïèse B.....	32
I. Structure et expression des protéines Ikaros et Aiolos	32
1. Une combinaison variable de doigts de zinc de type Cys ₂ /His ₂ , reconnaissant des domaines fonctionnels différents	32
2. Des profils d'expression distincts	33
II. Fonctions des protéines Ikaros et Aiolos <i>in vivo</i>	34
1. Ikaros affecte tous les lignages hématopoïétiques.....	34
2. Aiolos intervient dans la lymphopoïèse B.....	36
3. Quels sont les rôles des protéines Ikaros et Aiolos dans les hémopathies malignes humaines ?	38
III. Des protéines bifonctionnelles.....	40
1. Une localisation qui varie au cours du cycle cellulaire	40
2. Ikaros, un répresseur de la transcription	41
3. Ikaros, un activateur de la transcription	43
4. Qu'en est-il pour le facteur de transcription Aiolos ?	44

IV. Des modes de régulation peu documentés	45
1. Une influence du type d'isoforme et du nombre de sites de reconnaissance	45
2. Des modifications post-traductionnelles	46
3. Des effecteurs amont inconnus et des mécanismes complexes de régulation transcriptionnelle	46
C. L'épigénétique : une composante indispensable de la régulation transcriptionnelle	48
I. Des modifications épigénétiques de l'ADN et des histones	48
1. La méthylation de l'ADN	49
2. Des modifications covalentes des histones	50
3. Des modifications non covalentes	54
II. Impact des modifications épigénétiques sur la régulation transcriptionnelle	55
1. Deux types d'environnements chromatinien	55
2. Chromatine et assemblage du complexe d'initiation de la transcription	56
3. L'impact des modifications covalentes des histones et de l'ADN sur la régulation transcriptionnelle	57
III. Implication des mécanismes de régulation épigénétique au cours de la différenciation hématopoïétique ...	61
1. Epigénétique et hématopoïèse	61
2. Déséquilibre épigénétique et cancer	62
D. Objectifs du travail de thèse	64

Chapitre I : Une régulation épigénétique de la transcription du gène aiolos qui diffère entre lignées tumorales et cellules primaires	65
I. Préambule	66
II. Matériel et Méthodes	67
III. Résultats	71
1. Un îlot CpG de 342 pb encadre le site d'initiation de la transcription du gène aiolos	71
2. Le traitement, avec des agents inhibiteurs des Dnmt (5-Aza-dC) et/ou des HDAC (TSA), induit une augmentation des transcrits Aiolos	71
3. Dans les lignées cellulaires, l'expression d'Aiolos est corrélée à une déméthylation de l'îlot CpG	73
4. La méthylation <i>in vitro</i> de l'îlot CpG d'aiolos bloque l'activité transcriptionnelle du promoteur	74
5. Des profils distincts de modifications des histones	75
6. La déméthylation du promoteur aiolos avec la 5-Aza-dC induit une augmentation localisée des marques d'euchromatine active	76
7. L'inhibition d'Aiolos dans les cellules primaires fait appel à des mécanismes indépendants de la méthylation du promoteur	77
IV. Discussion	78
1. Méthylation de l'ADN : un rôle dans les lignées tumorales mais pas dans les cellules primaires	78
2. Modifications des histones : un rôle prépondérant dans les cellules primaires et dans les lignées Aiolos positives	81

Chapitre II : Une augmentation de l'expression d'Aiolos dans la LLC qui ne semble pas liée à des modifications épigénétiques 84

I. Préambule 85

II. Matériel et Méthodes 86

III. Résultats 89

1. Les isoformes dominantes négatives d'Aiolos sont minoritaires chez les donneurs sains comme chez les patients atteints de LLC ou de LNH 89

2. hAio 1 et hAio 4 représentent plus de 80% des isoformes Aiolos exprimées par les lymphocytes B, indépendamment de leur caractère cancéreux ou non 90

3. Les transcrits Aiolos sont augmentés dans la LLC, par rapport aux donneurs sains 91

4. La surexpression d'Aiolos dans la LLC ne semble pas dépendre de modifications épigénétiques au promoteur aiolos 92

IV. Discussion 93

Discussion/Perspectives 97

1. Isoformes Aiolos et leucémogénèse 99

2. Les cibles d'Aiolos ? Une intervention dans la transduction des signaux émis par le BCR et dans le contrôle de l'apoptose 101

3. Qui régule le régulateur ? Une composante génétique indissociable des mécanismes épigénétiques... 102

Bibliographie 106

Annexes 131

Annexe 1 : Aiolos et Ikaros 132

Annexe 2 : Aiolos et Epigénétique 144

Annexe 3 : Aiolos et LLC 179

Annexe 4 : Autres publications 190

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Introduction :

En face de la page :

<u>Figure 1</u> : Deux modèles de différenciation hématopoïétique	15
<u>Figure 2</u> : Développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse	16
<u>Figure 3</u> : Différents types de réponses immunitaires et plasmocytes/cellules mémoires associés	17
<u>Figure 4</u> : Principaux facteurs de transcription impliqués dans les étapes précoces de la différenciation hématopoïétique puis dans les lignages érythromyéloïdes et lymphoïdes	18
<u>Figure 5</u> : Principaux facteurs de transcription impliqués au cours de la différenciation des lymphocytes B dans la moelle osseuse	20
<u>Figure 6</u> : Principaux facteurs de transcription impliqués dans la maturation des lymphocytes B	22
<u>Figure 7</u> : Origines cellulaires potentielles des lymphomes B	23
<u>Tableau 1</u> : Classification anatomo-clinique de Binet	25
<u>Figure 8</u> : Deux voies alternatives de maturation des lymphocytes B, à l'origine de lymphocytes B mémoires mutés ou non mutés	28
<u>Figure 9</u> : Structure des protéines Ikaros et Aiolos	33
<u>Figure 10</u> : Expression des protéines Ikaros et Aiolos au cours de l'hématopoïèse	34
<u>Figure 11</u> : Un contrôle de la production des cellules B des zones marginales via Btk	37
<u>Figure 12</u> : Deux modes de répression de la transcription	41
<u>Figure 13</u> : Deux modes d'activation de la transcription	43
<u>Figure 14</u> : Aiolos induit la transcription du gène bcl-2	45
<u>Figure 15</u> : Structure de la chromatine, principales modifications covalentes et protéines associées	48
<u>Figure 16</u> : Le code histone	51
<u>Tableau 2</u> : La famille des Histones Acétyltransférases	52
<u>Figure 17</u> : Des histones méthyltransférases et des protéines de liaison aux histones méthylées, spécifiques d'un résidu histone donné	53
<u>Figure 18</u> : Modèles de remodelage de la chromatine lors de l'initiation de la transcription	57
<u>Figure 19</u> : Modèle de coopération entre les HAT, les kinases et les protéines à bromodomains lors de l'activation transcriptionnelle	58
<u>Figure 20</u> : Mécanismes de répression transcriptionnelle induits par la méthylation de l'ADN	60
<u>Figure 21</u> : Aspect de la chromatine au niveau des gènes suppresseur de tumeur, dans les situations normales et tumorales	62

Chapitre 1 :

En face de la page :

<i><u>Figure 22 :</u></i> Ilot CpG du gène aiolos et niveaux d'expression dans les différentes lignées et cellules primaires étudiées	71
<i><u>Figure 23 :</u></i> Analyse du niveau d'expression d'Aiolos dans les lignées cellulaires après traitement avec la 5-Aza-dC et/ou la TSA	72
<i><u>Figure 24 :</u></i> Profils de méthylation du promoteur aiolos dans les différentes lignées cellulaires, avant et après traitement avec la 5-Aza-dC	73
<i><u>Figure 25 :</u></i> La méthylation du promoteur aiolos bloque son activité transcriptionnelle	74
<i><u>Figure 26 :</u></i> Profils de modifications des histones dans les lignées Daudi, Jurkat, U937 et 1106mel	75
<i><u>Figure 27 :</u></i> Profils de modifications des histones dans les lignées U937 et 1106mel, traitées avec la 5-Aza-dC	76
<i><u>Figure 28 :</u></i> Profils de méthylation de l'ADN et de modifications des histones de la région promotrice d'aiolos dans les lymphocytes T, B, les monocytes et les mélanocytes	77
<i><u>Figure 29 :</u></i> Modèle des mécanismes potentiels d'inhibition du gène aiolos dans les différentes lignées et cellules primaires étudiées	78

Chapitre 2 :

En face de la page :

<i><u>Figure 30 :</u></i> Expression des isoformes Aiolos dans les PBMC de donneurs sains et de patients atteints de LLC ou de lymphomes B	89
<i><u>Figure 31 :</u></i> Proportions des isoformes Aiolos dans les lymphocytes B de patients atteints de LLC ou de lymphomes B et chez des sujets sains	90
<i><u>Figure 32 :</u></i> Une surexpression d'Aiolos dans la LLC	91
<i><u>Figure 33 :</u></i> Profils de modifications des histones au promoteur d'aiolos chez quatre patients LLC et chez un donneur sain	92

ABREVIATIONS

Abl : Abelson	CtIP : CtBP Interacting Protein
Ac : Anticorps	DN : Dominante Negative
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	DN1-4 : Thymocyte Double Négatif
Ag : Antigène	Dnmt : Dinucleotide methyl transferase
AID : Activation-Induced cytidine deaminase	DP : Thymocyte Double Positif
AP-4 : Activating enhancer binding Protein 4	DS : Donneur Sain
AR : Acide Rétinoïque	EBF : Early B cell-factor
Arg : Arginine	EBV : Epstein Barr Virus
ARN : Acide RiboNucléique	ELF-1 : Elongating Factor 1
ARN Pol II : ARN Polymerase II	EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay
ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated	E(Z) : Enhancer of Zeste
ATP : Adénosine TriPhosphate	FISH : Hybridation <i>in situ</i> fluorescente
5-Aza-dC : 5-Aza-2'-désoxycytidine	GATA-1-3 : GATA binding protein 1-3
Bcl-2/6/x_L : B cell lymphoma 2/6/x _L	GCN5 : General Control of amino-acid synthesis 5
BCR : B Cell Receptor	G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor
Blimp-1 : B lymphocyte induced maturation protein 1	GMP : Granulocyte Monocyte Progenitor
BSA : Bovine Serum Albumin	H3K9me3 : Triméthylation des lysines 9 des histones H3
BSAP : B cell Specific Activator Protein	HAT : Histone Acetyl Transferase
Btk : Bruton's tyrosine kinase	HC-PC : Hétérochromatine Péricentromérique
CD : Cluster of Differentiation	HDAC : Histone Désacétylase
CDF : Cellule Dendritique Folliculaire	HMT : Histone Methyl Transferase
CdK : Cyclin dependant Kinase	HP1 : Heterochromatin Protein 1
CHD : Chromodomain and helicase-like domain	HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
ChIP : Chromatin Immunoprecipitation	HSC : Hematopoietic Stem Cell
CLP : Common Lymphoid Progenitor	Ig : Immunoglobuline
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	IL : Interleukine
CMP : Common Myeloid Progenitor	IP : Immunoprécipitation
CtBP : C terminal Binding Protein	

IRF4/8 : Interferon Regulatory Factor
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
JAM-C : Junctional Adhesion Molecule C
K : lysine
kDa : kilo Dalton
LAL : Leucémie Aiguë Lymphoïde
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
LAP : Leucémie Aiguë Promyélocytaire
LEF-1 : Lymphoid Enhancer Binding Factor 1
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LMPP : Lymphoid-primed multipotent progenitor
LNH : Lymphome Non Hodgkinien
LPL : Lipoprotéine Lipase
LSD1 : Lysine Specific Demethylase 1
Lys : Lysine
MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MBD : Methyl CpG Binding Domain
MBP : Methyl CpG Binding Protein
M-CSF : Monocyte-colony stimulating factor
MEP : Megakaryocytic Erythrocyte Precursor
MPP : Multipotential Progenitor
NAD : Nicotinamide Adenine Nucleotide
N-CoR : Nuclear Co-Receptor
NF κ B : Nuclear Factor kappa enhancer Binding Protein
NK : Natural Killer
NT : Non Traité
NuA4 : Nucleosome Acetyltransferase of histone H4

NuRD : Nucleosome Remodeling and Deacetylation complex
Oct-1/2 : Octamer-binding transcription factor 1/2
OBF-1 : Oct-Binding Factor
ORF : Open Reading Frame
P : Patient
PADI4 : Protein Arginine Deaminase 4
Pax5 : Paired box protein 5
Pb : paire de bases
PBGD : porphobilinogen deaminase
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS : Phosphate Buffer Saline
Pc : Polycomb
(q)PCR : (quantitative) Polymerase Chain Reaction
PEV : Position Effect Variegation
PIC : PreInitiation Complex
PRC1 : Polycomb Repressiv Complex 1
PRMT : Protein Arginin MethylTransferase
Rag 1/2 : Recombination-activating gene 1/2
RAR : Recepteur de l'Acide Rétinoïque
Rb : Rétinoblatome
RT : Reverse Transcription
SAGA : Spt-Ada-Gcn5 acétyltransférase
SAM : S-adénosylméthionine
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser : Serine
Sir2 : Silent information regulator 2
SMRT : Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor
SP : thymocyte simple positif (CD4+ ou CD8+)

STAT : Signal Transducer Activating Transcription

Su(var) : Suppressor of variegation

SVF : Serum de veau foetal

TBP : TATA-box Binding Protein

TBS(T) : Tris buffer Saline (Tween 20)

TCR : T Cell Receptor

TdT : Terminal désoxynucléotide Transférase

TFII : Transcription Factor II

Tk : Thymidine kinase

TSA : Trichostatine A

UPR : Unfolded Protein Response

V_H : région variable de la chaîne lourde (des Ig)

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

V_L : région variable de la chaîne légère (des Ig)

WB : Western Blot

XBP-1 : X-Box binding Protein 1

ZAP-70 : Zeta-Associated Protein of 70 kDa

ZM : Zone Marginale

Avant-propos

Les lymphomes et leucémies, proliférations malignes de cellules du système immunitaire, sont des pathologies relativement fréquentes dans les pays occidentaux et en constante progression depuis plusieurs décennies. Leurs mécanismes physiopathologiques sont encore mal connus aujourd'hui et, bien que des traitements existent pour un certain nombre d'entre elles, pour d'autres l'issue reste fatale à plus ou moins longue échéance. Un axe de recherche consiste à étudier les mécanismes normaux de différenciation et de maturation des cellules immunitaires afin de mieux comprendre les facteurs à l'origine de la transformation néoplasique des cellules et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'hématopoïèse implique la production continue d'une grande diversité et d'une grande quantité de cellules immunitaires matures et est caractérisée par des étapes séquentielles et étroitement régulées de différenciation. Le développement de chaque lignée est contrôlé par des signaux extracellulaires solubles (cytokines, facteurs de croissance) ou par des contacts membranaires avec des cellules non hématopoïétiques, comme les cellules stromales du microenvironnement médullaire ou les cellules dendritiques folliculaires (CDF) des organes lymphoïdes secondaires. Il est contrôlé également au niveau intracellulaire par une cascade de facteurs de transcription dont l'expression est étroitement régulée, souvent spécifique d'une lignée donnée et qui sont essentiels au développement normal des cellules matures. Parmi ces facteurs figurent les protéines nucléaires à doigts de zinc de la famille Ikaros et, plus particulièrement, la protéine Aiolos.

Aiolos est un suppresseur de tumeur, impliqué dans la lymphopoïèse B et, en particulier, dans les étapes tardives de maturation et de réponse aux antigènes. Son mode d'action et ses mécanismes de régulation restent aujourd'hui largement inconnus. Ce travail de thèse a visé tout d'abord à améliorer notre connaissance des effecteurs amont d'Aiolos en caractérisant les mécanismes épigénétiques régulant son expression dans différents lignages hématopoïétiques. Nous avons également cherché à comprendre le rôle joué par ce facteur dans l'apparition et le développement des hémopathies en étudiant son expression chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC) ou de lymphomes B non hodgkinien (LNH), lymphoproliférations des cellules B matures.

Introduction

A. L'hématopoïèse : un processus complexe dont la désorganisation conduit à des pathologies encore méconnues

L'hématopoïèse regroupe un ensemble de phénomènes qui concourent à la fabrication et au remplacement continus et régulés des cellules sanguines, selon un processus complexe et étroitement contrôlé. Dans cette partie, je m'attacherai, après en avoir rappelé les grandes étapes, à présenter les principaux facteurs de transcription impliqués dans la lymphopoïèse B ainsi que les conséquences d'éventuelles dérégulations, à travers les exemples de la LLC et de quelques LNH.

I. Les grandes étapes de l'hématopoïèse

1. Des produits aux fonctions variées

L'hématopoïèse permet, chaque jour, la production chez l'adulte de $200 \cdot 10^9$ globules rouges, assurant le transport de l'oxygène, de $125 \cdot 10^9$ plaquettes nécessaires à la préservation de l'intégrité des vaisseaux, et enfin de $50 \cdot 10^9$ leucocytes.

Le terme de leucocytes (ou globules blancs) désigne l'ensemble des populations cellulaires impliquées dans la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. On distingue des granulocytes (ou polynucléaires), qui doivent leur nom à l'aspect lobé de leur noyau, et comprennent les neutrophiles (60 à 70% des leucocytes du sang), les éosinophiles (3%) et les basophiles (moins de 1%). Ces cellules sont des phagocytes professionnels qui interviennent dans la réponse immunitaire innée en libérant le contenu de leurs granules.

L'ensemble monocytes circulants et macrophages tissulaires constitue le système mononucléé / macrocytaire (SMM) ou système réticulo-histiocytaire. Les monocytes (8% des leucocytes) ont une durée de vie de 4 à 10h dans le sang. Lorsqu'ils quittent la circulation sanguine, ils se transforment en macrophages d'une durée de vie de plusieurs jours. Ils assurent des fonctions de phagocytose (dirigée notamment contre les bactéries, les protozoaires et les cellules cancéreuses) et de présentation de l'Ag.

La dernière grande famille de leucocytes est constituée des lymphocytes, qui représentent environ 25% des globules blancs. Les lymphocytes T sont les plus abondants (70 – 80%), les cellules tueuses naturelles (NK) et les lymphocytes B sont en nombres beaucoup plus restreints (7-18% et 5-15% respectivement). Les lymphocytes B, au stade de plasmocytes, sécrètent des Ac et sont ainsi les acteurs de l'immunité humorale, dirigée notamment contre les pathogènes extracellulaires. Les lymphocytes T sont sous-divisés en lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, acteurs de la réponse immunitaire à médiation cellulaire

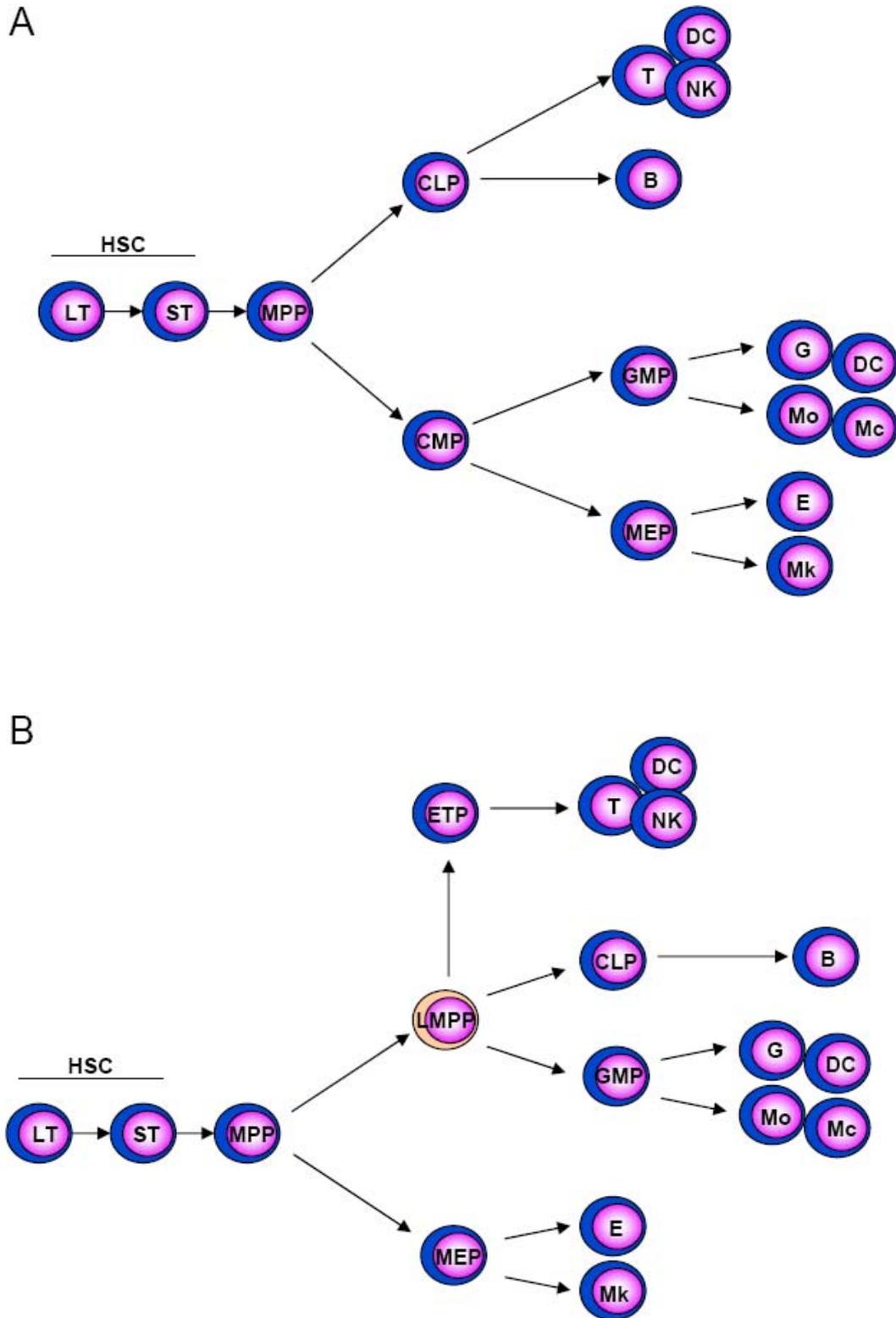


Figure 1 : Deux modèles de différenciation hématopoïétique

A. Modèle classique de Weissman où le lignage érythromyéloïde (MEP) se sépare du lignage lymphoïde (CLP) au niveau du précurseur multipotent (MPP). **B.** Modèle alternatif décrivant une séparation entre le précurseur des érythrocytes/mégacaryocytes (MEP) d'une part et le précurseur lymphoïde/myéloïde d'autre part (LMPP).

HSC : cellule souche hématopoïétique, ETP : Early T lineage progenitor, LT : HSC long terme, ST : HSC court terme, B : lymphocyte B, DC : cellule dendritique, E : Erythrocyte, G : Granulocyte, Mo : Monocyte, Mc : Macrophage, Mk : Mégacaryocyte, NK : cellule Natural killer, T : Lymphocyte T (D'après Ng et al., 2005)

et dirigés contre les pathogènes intracellulaires. La deuxième population de lymphocytes T est représentée par les lymphocytes T auxiliaires CD4+ qui coordonnent la réponse immunitaire adaptative. Les cellules NK définissent un troisième type de lymphocytes impliqués dans la surveillance immunitaire anti-tumorale et anti-virale.

2. Au départ, une cellule souche hématopoïétique pluripotente

L'ensemble des cellules circulantes dérive d'une population rare de cellules pluripotentes, les cellules souches hématopoïétiques (HSC). Elles sont capables de se renouveler de manière autonome ou de se différencier en cellules progénitrices, à l'origine de la totalité des cellules sanguines matures. Chez l'homme, ces processus débutent dans le sac vitellin, puis les cellules migrent dans le foie et la rate avant de gagner progressivement la moelle osseuse (10^{ième} semaine de grossesse).

Les travaux de Weissman et *coll* ont conduit à proposer, chez la souris, un modèle de ségrégation depuis les HSC vers les lignages myéloïdes et lymphoïdes qui fait autorité, même s'il ne fait pas l'unanimité (Fig. 1A) (Weissman *et al.*, 2001). Il propose ainsi l'existence de trois sous groupes de HSC. Les HSC de long terme sont présentes en très faibles quantités dans la moelle osseuse (de l'ordre de 0,01 à 0,05% des cellules médullaires) et sont les seules cellules qui possèdent à la fois de fortes capacités d'auto-renouvellement et un potentiel de différenciation multiple. Les HSC de court terme dérivent des HSC de long terme et conservent un potentiel de différenciation multiple mais leurs capacités d'auto-renouvellement sont diminuées. Enfin, les progéniteurs multipotents (MPP) conservent leur capacité à se différencier en n'importe quelle cellule sanguine mais perdent totalement leur capacité d'auto-renouvellement.

Les MPP donnent ensuite naissance à deux précurseurs spécialisés. Le progéniteur myéloïde commun ou CMP est restreint aux lignées myéloïdes au sens large et est à l'origine de l'ensemble des lignées érythrocytaire, mégacaryocytaire, granulocytaire et monocyttaire. Le progéniteur lymphoïde commun ou CLP a perdu son potentiel myéloïde mais est capable de se différencier en cellules B, T, NK et dendritiques. Il commence à exprimer les gènes d'activation de la recombinaison Rag1 et Rag2 ainsi qu'à initier le réarrangement de la chaîne lourde des immunoglobulines (IgV_H). Des théories récentes définissent un nouveau progéniteur, le LMPP, capable de se différencier en cellules lymphoïdes et myéloïdes mais sans potentiel érythromégacaryocytaire (Adolfsson *et al.*, 2005 ; Lai et Kondo, 2006) (Fig.1B).

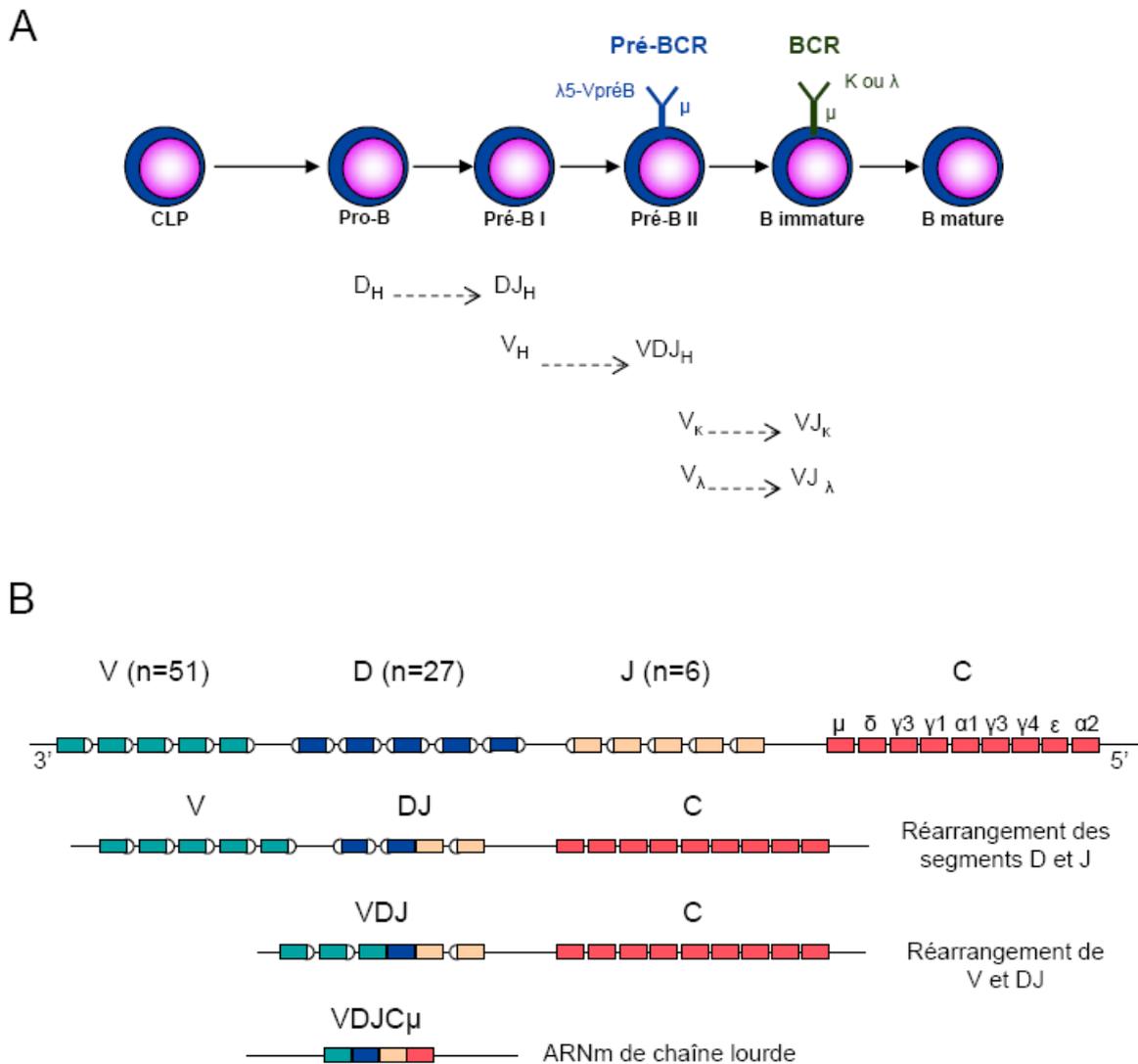


Figure 2 : Développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse

A. Séquence des différents précurseurs de lymphocytes B depuis le précurseur lymphoïde commun vers la cellule B immature et récepteurs B associés. **B.** Schéma du processus de réarrangement des segments variables V (Variable), D (Diversité) et J (Jonction) de la chaîne lourde des immunoglobulines (D'après Chiorazzi et al., 2005).

3. Un processus complexe de différenciation puis de maturation : l'exemple des cellules B

Le développement des lymphocytes B à partir du CLP se déroule tout au long de la vie. Il débute dans la moelle osseuse puis se poursuit dans les organes lymphoïdes secondaires.

Au sein de la moelle osseuse se succèdent plusieurs étapes de maturation, indépendantes de l'antigène (Ag) (Fig. 2A) (Matthias et Rolink, 2005 ; Sagaert *et al.*, 2007). Les cellules pro-B représentent le premier stade et sont caractérisées par le réarrangement des segments D-J puis V-DJ de la partie variable de la chaîne lourde des Ig (IgV_H) en réponse à l'activation des gènes Rag1, Rag2 et de la « Terminal deoxynucleotide Transferase » TdT (Fig. 2B). Le réarrangement correct des IgV_H conduit au stade des cellules pré-B précoces (pré-B I) et est suivi de l'expression d'un pré-récepteur à la surface des cellules (pré-BCR), composé d'une chaîne lourde μ , des pseudo-chaînes légères $\lambda 5$ (ou lambda-like) et VpréB, et d'un hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ (ou CD79a/CD79b), permettant la transduction du signal. Le signal induit par ce pré-BCR représente un point de contrôle critique dans le développement des lymphocytes B et conduit à une phase de prolifération cellulaire. Il assure ainsi la transition des cellules pré-B I aux cellules pré-B II. L'appariement des chaînes légères κ ou λ avec la chaîne lourde μ aboutit à l'expression d'une IgM en surface et correspond au stade des cellules B immatures. Il coïncide avec la répression des composants de la pseudo-chaîne légère et représente un deuxième point de contrôle de la différenciation des B. Les lymphocytes B ayant un réarrangement génétique non fonctionnel, de même que les lymphocytes B autoréactifs, sont éliminés par apoptose. Les cellules B matures naïves, qui résultent de cette étape de sélection négative, quittent la moelle osseuse, passent dans la circulation sanguine et vont coloniser les zones B des organes lymphoïdes secondaires. Les cellules B murines subissent plusieurs étapes supplémentaires de sélection négatives dans la rate qui définissent des stades B transitionnels T1 et T2. Plusieurs études récentes tendent à montrer l'existence de telles populations B transitionnelles chez l'homme (Carsetti *et al.*, 2004 ; Sims *et al.*, 2005a). Chaque lymphocyte B arrivant dans le sang est clonal c'est-à-dire qu'il exprime un BCR qui lui est spécifique et que ses descendants porteront la même signature moléculaire.

Une faible proportion des cellules B matures naïves migre dans les zones marginales (ZM) et forme la population des cellules B naïves de la ZM (Brendolan *et al.*, 2007 ; Spencer *et al.*, 1998). Chez l'homme, ces cellules naïves ne représentent que 10% des cellules B de la ZM. Les autres 90% sont composés de cellules B mémoires. Chez la souris, les

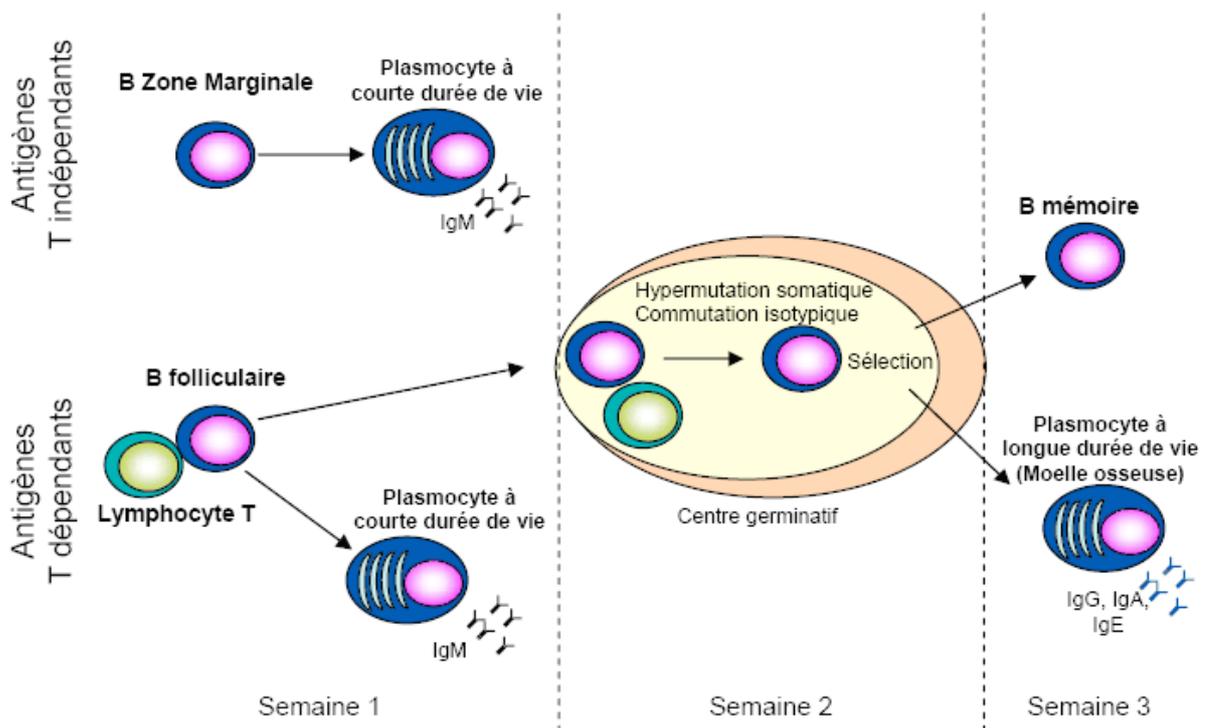


Figure 3 : Différents types de réponses immunitaires et plasmocytes/cellules mémoires associés

La rencontre d'un antigène par les cellules B naïves de la zone marginale (Ag T indépendants de type carbohydrate) ou les cellules B recirculantes (Ag T dépendants de type protéique) conduit à la production rapide de plasmocytes à faible affinité pour l'antigène et à la production plus tardive, par l'intermédiaire d'un centre germinatif, de plasmocytes à haute affinité pour l'antigène et de cellules mémoires (D'après Shapiro-Shelef et Calame, 2005).

proportions sont inversées avec 90% de cellules B naïves, spécifiques de la réponse immune indépendante des lymphocytes T, et 10% de cellules B mémoires. La plupart des lymphocytes B naïfs émergents entrent dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires et/ou dans la pulpe rouge de la rate et plus de 90% d'entre eux meurent. Les lymphocytes B IgD^+IgM^+ recirculants dérivent des lymphocytes B émergents.

La rencontre d'un Ag conduit à la formation de différents types de cellules sécrétrices d'anticorps (Ac), en fonction de la nature de l'Ag, de sa concentration et du lieu de rencontre avec les cellules immunitaires (Fig. 3) (Shapiro-Shelef et Calame, 2005). Un premier type de réponse, T-indépendante, est fourni par les cellules B de la ZM et, chez la souris, par les cellules B1a. Ces cellules réagissent aux Ag de type carbohydrate. Par ailleurs, les cellules de la ZM ont un seuil d'activation de leur BCR plus bas que les cellules B circulantes et assurent notamment une reconnaissance précoce des Ag présents dans le sang. Les cellules B1 et/ou de ZM fournissent une première ligne rapide de défense contre les pathogènes et se différencient en plasmocytes à courte durée de vie, sécrétant des IgM de faible affinité pour l'Ag.

Le développement d'une réponse immune B primaire T-dépendante est initié dans la zone T interfolliculaire et implique la coopération entre les lymphocytes B IgD^+IgM^+ activés par l'Ag, les lymphocytes T CD4 et les cellules dendritiques. Cette première phase de réponse immune B correspond à la formation de foyers oligoclonaux de cellules dites B-blastiques proliférant et se différenciant rapidement en plasmocytes de courte durée de vie sécrétant une IgM de faible affinité pour l'Ag. Les follicules formés par ces cellules sont visibles deux jours après immunisation et perdurent environ 8 jours.

Quelques lymphocytes B blastiques acquièrent la capacité à migrer au sein des follicules primaires adjacents. Ils constituent le peuplement fondateur des centres germinatifs des follicules secondaires et deviennent des centroblastes. Ces cellules subissent une première phase d'expansion oligoclonale exponentielle qui les conduit à remplir le réseau des CDF et à former un centre germinatif. Les lymphocytes B recirculants, IgM^+IgD^+ , sont repoussés en périphérie et forment alors le manteau. Le centre germinatif se compartimente ensuite en une zone claire et une zone sombre. La zone sombre contient les centroblastes, cellules en cycle continu qui subissent les processus d'hypermutation somatique (mutations aléatoires des régions variables des gènes des Ig augmentant l'affinité de cet Ac pour l'Ag) et, éventuellement, de commutation de classes d'Ig.

Les centroblastes se différencient ensuite en centrocytes, regroupés dans la zone claire du centre germinatif. Ils ne prolifèrent plus et sont destinés à mourir à moins de rencontrer leur Ag cible, présenté par une CDF. Les centrocytes sélectionnés par l'Ag se différencient, soit en plasmoblastes, soit en cellules mémoires. Les plasmoblastes terminent

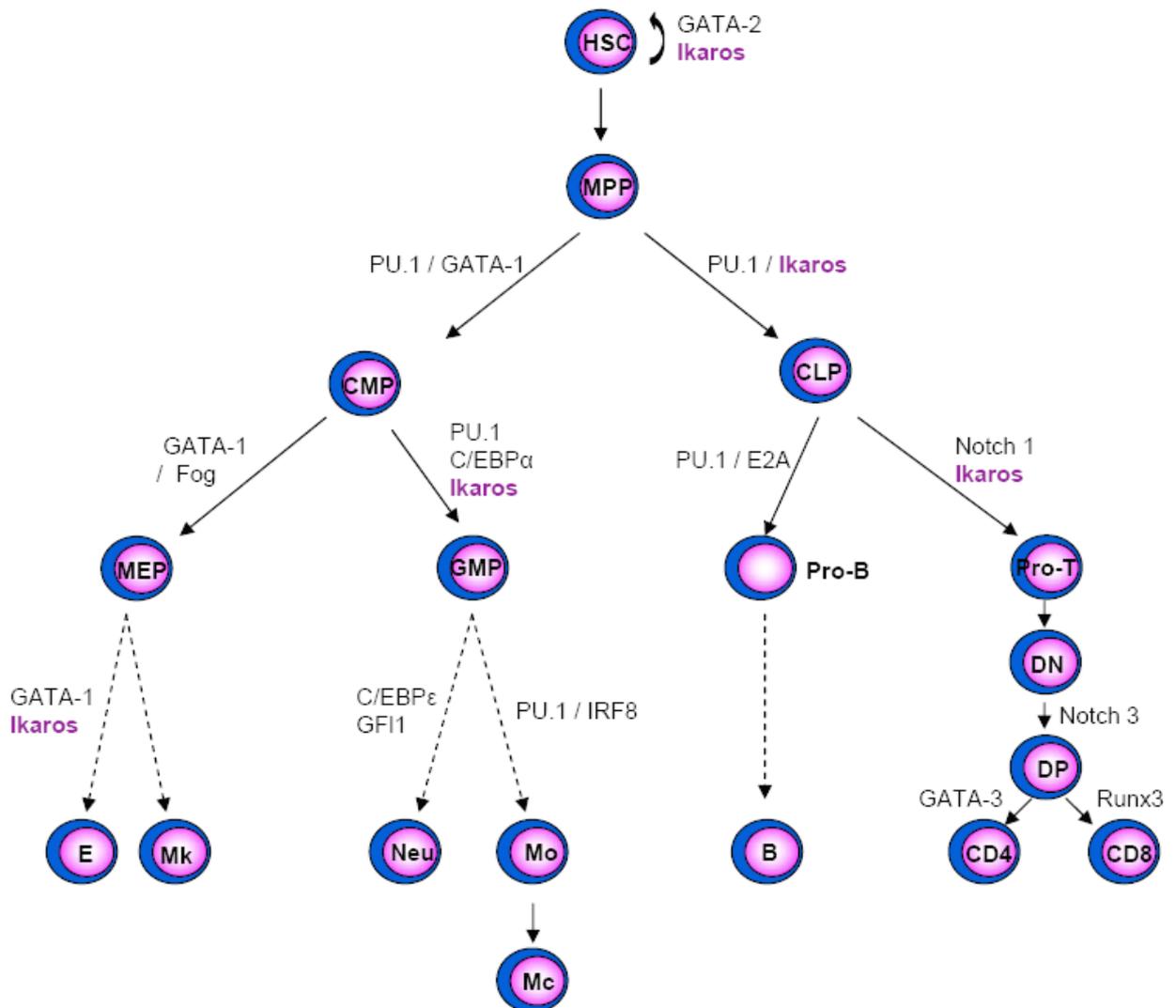


Figure 4 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans les étapes précoces de la différenciation hématopoïétique puis dans les lignages érythromyéloïdes et lymphoïdes

HSC : cellule souche hématopoïétique, MPP : Progéniteur multipotent, CLP : Précurseur lymphoïde commun, B : lymphocyte B, T : Lymphocyte T, DN : Double négatif, DP : Double positif, CMP : Précurseur myéloïde commun, MEP : Précurseur des Erythrocytes/Mégacaryocytes, E : Erythrocyte, Mk : Mégacaryocyte, GMP : Précurseur des Granulocytes/Monocytes, Neu : Granulocyte neutrophile, Mo : Monocyte, Mc : Macrophage.

leur différenciation en plasmocytes dans la moelle osseuse. Ces cellules, à longue durée de vie, sécrètent des Ac de très haute affinité de type IgG, IgA ou IgE et sont des actrices de la réponse immune secondaire, maximale entre 10 et 14 jours après l'immunisation. Les lymphocytes B mémoires peuvent s'accumuler dans la ZM. Une fraction d'entre eux peut rentrer dans le centre germinatif après une deuxième stimulation antigénique ou circuler dans l'organisme. Le sang périphérique contient entre 30 et 60% de cellules mémoires qui sont de trois types chez l'homme. Les cellules $CD27^+IgM^-IgD^-$ et des cellules $CD27^+IgM^+IgD^-$ dérivent du centre germinatif. Les cellules $CD27^+IgM^+IgD^+$ représentent une sous-population de cellules extrafolliculaires originaires des ZM, ayant subi des processus de réarrangement des Ig par un mécanisme inconnu à l'heure actuelle, mais indépendant de la formation d'un centre germinatif (Weller *et al.*, 2004 ; Weller *et al.*, 2001 ; Weller *et al.*, 2005 ; Willenbrock *et al.*, 2005).

II. A l'échelle moléculaire : une cascade de facteurs de transcription

La spécification des cellules souches hématopoïétiques en précurseurs lymphoïdes ou érythromyéloïdes puis la différenciation des cellules au sein de chacun de ces lignages est finement régulée, notamment par l'expression, coordonnée dans le temps, de nombreux facteurs de transcription. Les données présentées dans les paragraphes suivants proviennent principalement d'expériences réalisées chez la souris, modèle dans lequel les approches génétiques, nécessaires à la définition des principaux éléments régulateurs, sont plus facilement réalisables.

1. Depuis les cellules souches hématopoïétiques vers les progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes : PU.1, GATA, Ikaros

La formation des réseaux transcriptionnels précoces, aussi bien myéloïdes que lymphoïdes, dépend essentiellement du facteur de transcription PU.1 (Fig. 4). Il s'agit d'un membre de la famille des facteurs de transcription à domaine Ets dont l'expression est restreinte aux cellules sanguines (Klemsz *et al.*, 1990). En son absence, les souris meurent au cours de leur développement embryonnaire, après 18,5 jours de gestation, avec une absence complète de lymphocytes T, B, de monocytes et de granulocytes (McKercher *et al.*, 1996). Les capacités d'autorenouvellement de HSC sont touchées. La production des MPP est réduite et les cellules produites sont incapables de répondre à l'interleukine 7 (IL-7, nécessaire à l'engagement dans la voie lymphoïde) ou aux cytokines myéloïdes comme G-

CSF et M-CSF, l'activité des gènes codant les récepteurs de ces molécules étant régulée par PU.1 (DeKoter *et al.*, 2002 ; DeKoter *et al.*, 1998).

L'activité de PU.1 est modulée par les facteurs de transcription de la famille GATA. GATA1 interagit physiquement avec PU.1 et diminue ses capacités activatrices (Nerlov *et al.*, 2000), tandis que PU.1 inhibe l'acétylation de GATA-1 (Hong *et al.*, 2002). Les quantités de PU.1 et GATA.1 semblent jouer un rôle critique dans l'engagement vers le lignage lymphoïde ou le lignage myéloïde puis dans la différenciation myéloïde. Un faible niveau de PU.1 corrèle avec l'entrée dans la voie lymphoïde, une expression élevée de PU.1 est associée à une entrée dans la voie myéloïde (DeKoter et Singh, 2000). PU.1 et GATA-1 sont ensuite tout deux exprimés par les CMP et leur exclusion mutuelle coïncide avec l'engagement vers le progéniteur des mégacaryocytes/érythrocytes (MEP) ou vers le progéniteur des granulocytes/monocytes (GMP). L'expression de GATA-1 diminue ainsi lors de la différenciation en monocytes / granulocytes mais est indispensable à la différenciation en érythrocytes ou mégacaryocytes. À l'opposé, l'expression de PU.1 diminue dans les cellules issues du MEP et augmente parallèlement à la maturation des granulocytes/monocytes (Olson *et al.*, 1995 ; Rosenbauer et Tenen, 2007).

Un deuxième groupe de facteurs de transcription, indispensable au déroulement normal des étapes précoces de l'hématopoïèse, est constitué des protéines à doigts de zinc de la famille Ikaros (Fig. 4) (cf. partie B de cette introduction). Les souris homozygotes pour une mutation nulle d'Ikaros voient leur population de HSC long terme réduite par 30 et présentent une absence de cellules T foetales, de cellules B et NK (Nichogiannopoulou *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'introduction d'une mutation ponctuelle dans le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Ikaros est suffisante pour inhiber totalement la production des cellules du lignage lymphoïde et pour perturber fortement le développement des cellules érythromyéloïdes : les souris mutantes souffrent ainsi d'une anémie sévère et meurent avant la naissance (Papathanasiou *et al.*, 2003). Ce phénotype est probablement le résultat de l'inactivation de tous les complexes contenant Ikaros et de l'absence de facteurs de substitution. La fonction précise d'Ikaros lors de ces étapes précoces de différenciation reste cependant inconnue, en partie à cause de la compréhension incomplète des événements précoces d'engagement vers les différents lignages hématopoïétiques. Le couplage du promoteur Ikaros au gène rapporteur de la GFP a récemment permis à Yoshida et *coll* de confirmer le rôle pivot joué par Ikaros dans la spécification des LMPP vers le lignage lymphoïde, et de déterminer son implication dans le développement des granulocytes/monocytes à partir du CMP (Ng *et al.*, 2007 ; Smale et Dorshkind, 2006; Yoshida *et al.*, 2006).

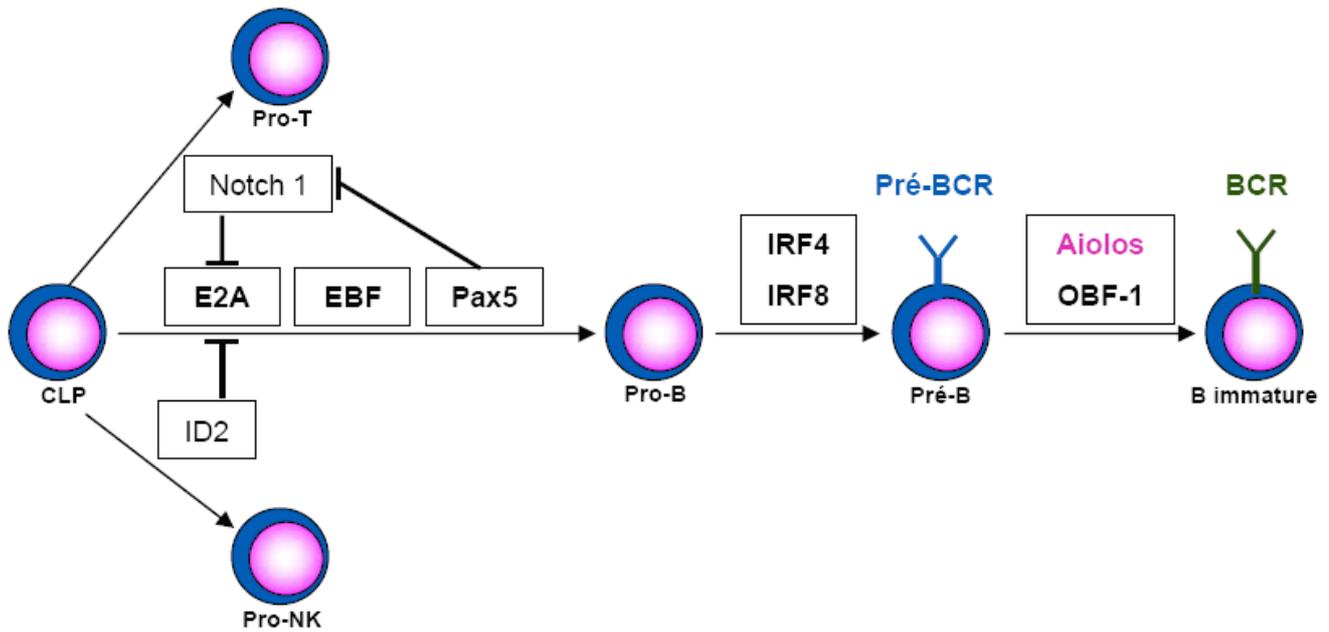


Figure 5: Principaux facteurs de transcription impliqués au cours de la différenciation des lymphocytes B dans la moelle osseuse
 (D'après Matthias et Rolink, 2005)

2. Depuis les CLP vers les cellules B immatures : E2A, EBF, Pax5

Trois facteurs de transcription sont essentiels à la différenciation des CLP en cellules B immatures : E2A, EBF (Early B-cell factor) et Pax5 (Paired box protein 5). Ces trois facteurs collaborent entre eux et l'absence de l'un d'entre eux est suffisante pour bloquer le développement des cellules B (Fig. 5) (Matthias et Rolink, 2005).

E2A est le membre fondateur de la famille des protéines à « Hélice boucle hélice » (bHLH). Son inhibition chez la souris induit essentiellement des défauts dans le lignage B, mais d'autres lignages, comme le lignage T, sont également affectés. Les chaînes lourdes des Ig ne sont pas réarrangées et plusieurs transcrits spécifiques du lignage B comme Pax 5 ou Ig α sont absents (Bain *et al.*, 1994). D'un point de vue mécanistique, on sait qu'E2A interagit avec le complexe SAGA, à activité histone acétyltransferase et pourrait ainsi moduler l'accessibilité de la chromatine au locus IgV_H (Massari *et al.*, 1999). Par ailleurs, sa surexpression ectopique dans une lignée myéloïde est capable d'induire l'expression d'EBF, Pax5, Vpré-B et Rag1 (Kee et Murre, 1998).

EBF est un facteur de transcription exprimé par les cellules B en cours de différenciation. Son inhibition chez la souris induit un blocage précoce, empêchant la production des cellules pro-B (Lin et Grosschedl, 1995). Les cellules obtenues expriment peu ou pas les gènes codant les sous-unités Ig α et Ig β ainsi que VpréB et Pax5 et les segments D_H-J_H du locus IgV_H ne sont pas réarrangés. En revanche, E2A n'est pas affecté ce qui suggère qu'EBF se situe en aval. La mutation d'un des allèles de chacun des facteurs E2A et EBF diminue la quantité de cellules pro-B par 20 alors qu'elle est divisée par deux lorsqu'un seul des deux facteurs est touché, ce qui suggère une collaboration entre les deux protéines (O'Riordan et Grosschedl, 1999). Par ailleurs, l'expression ectopique d'E2A ou EBF, en association avec Rag1 ou Rag2, dans des cellules embryonnaires rénales est suffisante pour induire une recombinaison au locus IgV_H et le réarrangement des segments D_H-J_H (Romanow *et al.*, 2000).

Le facteur de transcription Pax 5 (ou BSAP) est exprimé par les cellules B et par les cellules du système nerveux. Il est impliqué dans la régulation transcriptionnelle directe de gènes spécifiques des cellules B comme CD19, Ig α , ou LEF1 (Lymphoid Enhancer Binding Factor 1) (Nutt *et al.*, 1998). Sa mutation chez la souris induit un blocage complet de la différenciation B, en aval des facteurs de transcription E2A et EBF. Dans ces cellules, les segments DJ du locus IgV_H sont réarrangés normalement, mais les réarrangements des segments des gènes V sont affectés (Urbanek *et al.*, 1994). Ceci est associé à un repositionnement correct des segments du gène IgV_H depuis la périphérie vers le centre du noyau mais à un échec de la juxtaposition entre les segments V_H et les segments D_H (Fuxa *et al.*, 2004). Alors qu'E2A et EBF sont absolument indispensables à la formation des

cellules pro-B, ces deux facteurs ne sont pas suffisants pour induire un véritable engagement, irréversible, dans le lignage B. Ceci est assuré par Pax5, dont l'expression doit être maintenue de manière continue pour préserver l'identité B. En l'absence de Pax5, les cellules pro-B sont en effet capables, après stimulation, de se différencier en macrophages, en cellules dendritiques, en granulocytes ou en cellules NK (Nutt *et al.*, 1999). Par ailleurs, Pax5 exerce une activité inhibitrice sur des gènes dont l'expression est inappropriée dans le lignage B comme Notch1 (Souabni *et al.*, 2002).

D'autres facteurs comme IRF4, Aiolos ou OBF1 interviennent également. IRF4 et IRF8 (Interferon Regulatory Factor) sont exprimés à la fois par les cellules myéloïdes et les cellules lymphoïdes. En l'absence d'IRF4, les cellules B se développent normalement mais leur activation est compromise. En revanche, si l'on inactive à la fois IRF4 et IRF8, le développement des cellules B est arrêté entre les stades pro-B et pré-B, le réarrangement des chaînes légères est bloqué, tandis que l'expression des pseudo chaînes légères est augmentée (Lu *et al.*, 2003). Enfin, l'inhibition combinée des deux facteurs des cellules B matures périphériques, Aiolos et OBF1, induit un blocage des cellules B au stade pré-B avec une absence d'expression des IgM (Sun *et al.*, 2003).

3. Cellules B périphériques et formation du centre germinatif : Oct-2, OBF-1, NFκB, Aiolos, Bcl-6

Les promoteurs associés aux segments V_H et V_L des Ig possèdent, en amont de leur boîte TATA, un octamère hautement conservé et reconnu notamment par les facteurs de transcription Oct-1, Oct-2 et le co-activateur OBF-1. Alors qu'Oct-1 présente une expression ubiquitaire, Oct-2 et OBF-1 sont exprimés par la lignée B et affectent essentiellement les cellules B matures. Les souris déficientes en OBF-1 voient ainsi fortement diminuer le nombre total de leurs cellules B périphériques et en particulier les cellules circulantes de la moelle osseuse. La réponse immune dépendante des cellules T est compromise et une absence de formation des centres germinatifs est observée (Nielsen *et al.*, 1996 ; Schubart *et al.*, 1996). Ce phénotype reflète une capacité réduite des cellules OBF-1^{-/-} à répondre à un signal activateur. Les souris déficientes en Oct-2 ne sont pas viables et montrent un phénotype complexe. Oct-2 semble d'une part nécessaire à la prolifération des cellules B après stimulation par un Ag, indépendamment des cellules T (Corcoran et Karvelas, 1994). D'autre part, il interviendrait dans la maintenance des cellules B de la cavité péritonéale (Humbert et Corcoran, 1997) (Fig. 6).

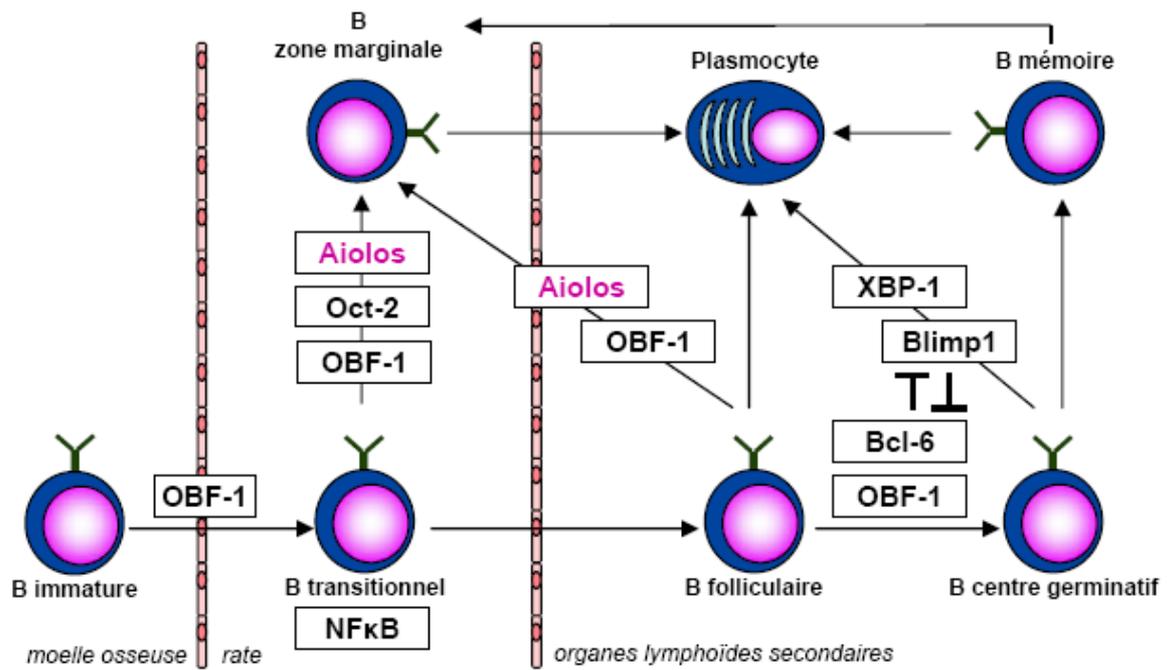


Figure 6: Principaux facteurs de transcription impliqués dans la maturation des lymphocytes B (D'après Matthias et Rollink, 2005)

Les sous-unités du facteur de transcription NFκB ont une expression ubiquitaire et activent un grand nombre de gènes. Au moins cinq d'entre elles interviennent à des stades différents de la lymphopoïèse B, depuis les étapes tardives de la différenciation dans la moelle osseuse jusqu'à la maturation des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires. Ainsi, les souris déficientes en p50 ne possèdent pas de cellules B des ZM tandis que les souris déficientes en Rel-A les possèdent en nombre réduit (Cariappa *et al.*, 2000). Ces dernières, ainsi que les souris déficientes en Rel-B sont, par ailleurs, incapables de former des centres germinatifs (Weih *et al.*, 2001).

Aiolos est un facteur de transcription de la famille Ikaros, exprimé faiblement dans les cellules B en cours de différenciation puis à des niveaux élevés par les cellules B matures circulantes. Les souris déficientes pour ce facteur présentent notamment un seuil d'activation réduit de leur BCR, associé à un développement spontané de centres germinatifs (Wang *et al.*, 1998). La production des cellules des ZM est par ailleurs bloquée. Ce facteur, sur lequel porte mon projet de thèse, est présenté plus en détail dans la partie B de cette introduction.

Bcl-6 (B cell lymphoma 6) est un proto-oncogène impliqué dans plusieurs étapes de la différenciation des lymphocytes et de la réponse immunitaire. Il est notamment présent en quantité très élevée dans les cellules B des centres germinatifs (Cattoretti *et al.*, 1995). En son absence, les souris ne possèdent pas de centre germinatif et présentent une réaction inflammatoire fatale avec une accumulation de lymphocytes T auxiliaires de type T_H2 (Dent *et al.*, 1997). Après rencontre avec leur Ag cible, les cellules B folliculaires surexpriment Bcl-6, migrent dans les zones folliculaires et initient la formation d'un centre germinatif. Les cellules B spécifiques de l'Ag qui ne surexpriment pas Bcl-6 se différencient en plasmablastes et fournissent la première salve de cellules sécrétrices d'Ac à faible affinité. D'un point de vue mécanistique, Bcl-6 se fixe *in vitro* sur de nombreux sites de liaison des protéines STAT6 et régule la transcription d'une série de gènes inductibles par l'IL-4 comme *ε*lg (Harris *et al.*, 1999). Il recruterait également des Histones Désacétylases de classe II, fonction inhibée s'il est lui-même acétylé par l'acétylase p300 (Bereshchenko *et al.*, 2002; Lemerrier *et al.*, 2002).

4. Différenciation des cellules B des centres germinatifs en plasmocytes : Blimp-1 et XBP-1

Le facteur de transcription Blimp-1 (B Lymphocyte Induced Maturation Protein 1) est nécessaire à la différenciation des cellules B des centres germinatifs en plasmocytes (Fig.6) (Shapiro-Shelef *et al.*, 2003 ; Turner *et al.*, 1994). Il induit un arrêt du cycle cellulaire et la

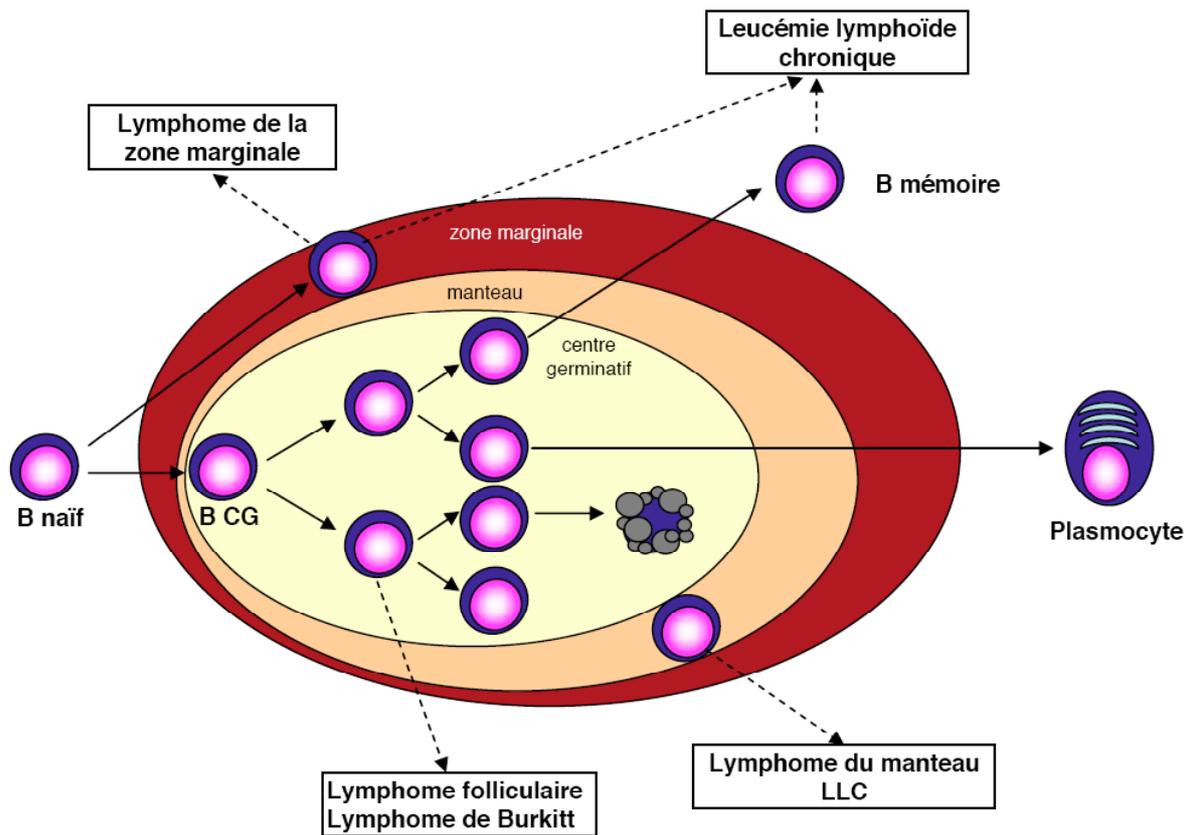


Figure 7 : Origines cellulaires potentielles des lymphomes B (D'après Küppers 2005)

mise en route d'un programme de sécrétion des Ig. Pour cela, il réprime des gènes qui définissent les cellules B matures des centres germinatifs, comme Pax5 et Bcl-6, ce qui assure une réexpression des locus IgV_H et IgV_L et empêche par ailleurs le retour des plasmocytes vers un stade antérieur de développement (Lin *et al.*, 2002 ; Shapiro-Shelef et Calame, 2005). L'activité répressive de Blimp-1 passe notamment par le recrutement d'Histones Désacétylases (Yu *et al.*, 2000).

En aval de Blimp-1, le facteur de transcription XBP-1 est crucial à la réalisation du programme de sécrétion des Ig (Shaffer *et al.*, 2004). Sa délétion chez la souris conduit à une anémie sévère et à la mort à un stade embryonnaire. XBP-1 amplifierait une réponse UPR physiologique (Unfolded Protein Response) ce qui augmenterait la capacité du réticulum endoplasmique à transloquer et replier les protéines sans induire de diminution de la synthèse protéique (Iwakoshi *et al.*, 2003).

III. Les conséquences d'un dérèglement de l'hématopoïèse : des proliférations malignes aux causes encore méconnues

Chacune des cellules immunitaires, quel que soit son degré de maturation ou sa localisation, peut devenir tumorale. Selon la nature de la cellule devenue tumorale, la pathologie observée sera différente. Ainsi les leucémies aiguës ont pour origine un précurseur médullaire immature tandis qu'une anomalie des lymphocytes B matures, qu'ils soient naïfs ou qu'ils aient déjà rencontré un Ag, conduit à un syndrome lymphoprolifératif chronique comme la LLC ou les LNH. De manière paradoxale et malgré l'importance des lymphocytes T dans la réponse immune, près de 90% des hémopathies lymphoïdes sont de nature lymphocytaire B. Parmi celles-ci, la LLC est l'hémopathie chronique la plus fréquente chez l'adulte dans le monde occidental. Elle doit être différenciée de certains LNH B (lymphomes du manteau, folliculaires ou de la ZM) qui sont également des proliférations des lymphocytes B matures et peuvent également diffuser dans le sang et la moelle osseuse. Diverses classifications ont été proposées au cours des 30 dernières années, progressivement remplacées par la classification REAL (publiée en 1994) puis, plus récemment par la classification OMS, qui intègre des données anatomopathologiques, cytologiques, cytogénétiques, immuno-phénotypiques et moléculaires. Chaque fois que cela est possible, l'équivalent non tumoral de la pathologie est déterminé (Fig. 7) (Kuppers, 2005).

1. La leucémie lymphoïde chronique B

La LLC est la forme de leucémie chronique la plus fréquente dans les pays industrialisés en dehors du continent asiatique où elle est rarement rencontrée (30% des leucémies). Elle a une incidence qui augmente fortement avec l'âge (10,6/100.000/an entre 55 et 60 ans, 43,7/100.000/an entre 80 et 85 ans) et touche deux fois plus d'hommes que de femmes. Elle est caractérisée par l'accumulation dans le sang périphérique (lymphocytose $> 5.10^9 / L$), les organes lymphoïdes secondaires et la moelle osseuse d'un clone de lymphocyte B mature exprimant le déterminant antigénique CD5. Cette hémopathie est le plus souvent découverte au cours d'un examen systématique chez un patient sans symptôme apparent (Chiorazzi *et al.*, 2005 ; Guipaud *et al.*, 2003).

Les lymphocytes de LLC présentent un phénotype spécifique et homogène. Il est caractérisé par le score de Matutes qui constitue actuellement le principal critère de diagnostic. Ce score donne une valeur de 1 à chacun des éléments suivants : positivité du CD5 et du CD23, négativité du FMC7 et du CD79b et faible expression d'une seule immunoglobuline (caractère monotypique) de surface κ (60% des cas) ou λ (40% des cas). Un score de 4 ou 5 confirme le diagnostic de LLC. Un score de 3 correspond généralement à une LLC « atypique » et un score inférieur à 3 exclut formellement le diagnostic de LLC.

a) Une réponse BCR défectueuse

Le BCR est très faiblement exprimé à la surface des cellules de LLC ce qui constitue l'une des principales caractéristiques de la LLC. L'hétérodimère CD79a/CD79b, qui assure la transduction du signal émis par le BCR, contient dans sa région intracytoplasmique des motifs ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) riches en tyrosines dont la phosphorylation par des tyrosine-kinases de la famille Src favorise son association avec la tyrosine-kinase Syk. Il s'en suit une cascade de réactions, qui commencent par la phosphorylation de Syk et de Btk et aboutissent à l'activation transcriptionnelle de gènes cibles. Dans certaines LLC, particulièrement celles dont les gènes des IgV_H sont non mutés, il existe une réponse BCR défectueuse due à une anomalie dans la transduction du signal (Karray *et al.*, 1987 ; Lanham *et al.*, 2003). Elle peut être expliquée par des défauts dans la phosphorylation des tyrosines ou dans la mobilisation calcique (Michel *et al.*, 1993), par une sous expression de certaines tyrosines kinases comme Syk (Lankester *et al.*, 1995), ainsi que par un défaut dans l'assemblage des différentes molécules du complexe BCR-CD79a/CD79b (Cragg *et al.*, 2002 ; Payelle-Brogard *et al.*, 2002 ; Vuillier *et al.*, 2005).

Tableau 1: Classification anatomo-clinique de Binet

Stade		Survie médiane
A	Hb \geq 10g/dL et plaquettes \geq 100.10 ⁹ /L Adénopathies < 3 aires palpables	12 ans
B	Hb \geq 10g/dL et plaquettes \geq 100.10 ⁹ /L Adénopathies \geq 3 aires palpables	5 ans
C	Hb<10g/dL et/ou plaquettes <100.10 ⁹ /L	2 ans

Aire = aire ganglionnaire superficielle ou rate

Hb : Hémoglobine

b) Une diminution de l'apoptose ou une augmentation de la prolifération ?

Une seconde caractéristique de la cellule de LLC est la dérégulation des gènes impliqués dans l'apoptose, alors que les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ne sont pas affectés (Korz *et al.*, 2002). On observe ainsi une surexpression constitutive de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 par des mécanismes qui restent encore à éclaircir. Dans la majorité des cas, la région promotrice du gène *bcl-2* est hypométhylée ce qui peut contribuer à une augmentation de la transcription de cette molécule (Hanada *et al.*, 1993). Deux micro-ARN, miR-15 et miR-16, qui régulent négativement Bcl-2 au niveau post-transcriptionnel, sont délétés ou sous-exprimés dans la majorité des LLC (Calin *et al.*, 2005 ; Cimmino *et al.*, 2005). Enfin, la surexpression de Bcl-2 serait également associée à une stabilisation de ses ARNm par l'intermédiaire de la nucléoline (Otake *et al.*, 2007).

Outre la diminution de l'apoptose, des études réalisées par Messmer *et coll* (2005) ont démontré que les cellules de LLC présentent une part proliférative, avec un taux de croissance de 0,1 à 1% par jour (Messmer *et al.*, 2005), taux de prolifération plus élevé que celui qui avait été antérieurement évoqué. Ceci induit, chez un patient possédant approximativement 10^{12} cellules leucémiques, la fabrication de 10^9 à 10^{10} nouvelles cellules leucémiques par jour, taux suffisant pour permettre l'apparition de nouveaux clones et l'évolution de la pathologie.

c) Evolution clinique et marqueurs pronostiques

La LLC est caractérisée par une évolution clinique hétérogène. Alors que certains patients ont une maladie totalement indolente pendant des dizaines d'années, d'autres meurent plus ou moins rapidement en dépit de tout traitement. Les classifications, introduites par Rai et Binet il y a une trentaine d'années, sont fondées sur des signes cliniques (adénopathies, hépatosplénomégalie) et des paramètres biologiques simples (Numération Formule Sanguine) et ont permis de distinguer trois groupes de patients ayant des pronostics distincts : stades précoces (Rai 0, Binet A), intermédiaires (Rai 1/2, Binet B) et avancés (Rai 3/4, Binet C) avec une moyenne de survie estimée supérieure à 10 ans, de 5 à 7 ans et de 1 à 3 ans, respectivement (Tableau 1) (Binet *et al.*, 1981 ; Rai *et al.*, 1975). Cependant, il existe une hétérogénéité dans l'évolution clinique au sein d'un même groupe et ces classifications ne permettent pas de prédire précisément à quelle vitesse la maladie va progresser pour un patient donné à un stade précoce (Rai 0, Binet A). Puisque plus de 90% des patients sont actuellement diagnostiqués en stade précoce, il est devenu indispensable d'identifier des marqueurs qui vont permettre de prédire l'évolution de chacun de ces patients afin d'envisager une thérapeutique adaptée.

Ainsi, depuis une dizaine d'années, de nouveaux marqueurs à valeur pronostique ont été identifiés. Certains marqueurs sériques tels que la $\beta 2$ microglobuline, la thymidine kinase, le CD23 soluble ou le temps de doublement des lymphocytes reflètent vraisemblablement la masse tumorale et/ou sa capacité proliférative. Ce sont les caractéristiques moléculaires, immunophénotypiques et cytogénétiques qui constituent actuellement les outils pronostiques les plus performants.

i. Facteurs pronostiques moléculaires : statut mutationnel des IgV_H

Le marqueur pronostique le plus pertinent à l'heure actuelle repose sur la détermination du statut mutationnel des IgV_H. Elle implique le séquençage de cette région après amplification par PCR de l'ADN ou l'ARN extrait des cellules tumorales et sa comparaison avec les séquences germinales les plus proches. Un seuil de 98 % d'homologie est reconnu par la majorité des études comme étant le plus discriminant sur le plan clinique et permet de faire la distinction entre des patients avec des cellules de LLC « mutées » (homologie inférieure à 98 %) ayant un pronostic favorable et des patients avec des cellules de LLC « non mutées » (homologie supérieure à 98%) ayant un pronostic défavorable (Damle *et al.*, 1999 ; Fais *et al.*, 1998 ; Hamblin *et al.*, 1999). Certains gènes des IgV_H semblent échapper à la classification mutée/non mutée et conférer leur propre valeur pronostique. C'est le cas notamment du gène VH3-21 dont la présence est défavorable, indépendamment du degré d'homologie (Tobin *et al.*, 2002).

D'autres marqueurs moléculaires comme la longueur des télomères et les taux de télomérase semblent également présenter une valeur pronostique. Ainsi, un taux élevé de télomérase dans les cellules de LLC est associé à une maladie évolutive et à une survie moindre (Damle *et al.*, 2004). Il est inversement corrélé à la longueur des télomères, qui représente un facteur de survie (Grabowski *et al.*, 2005).

ii. Facteurs pronostiques immunophénotypiques : CD38, ZAP-70

Le CD38, une glycoprotéine membranaire d'environ 45 kDa, est une ecto-enzyme (ADP-ribosyl cyclase et hydrolase) qui se comporte également comme un récepteur membranaire et intervient dans l'adhésion et la signalisation cellulaire par son interaction avec le ligand CD31. Sur les cellules lymphoïdes, il représente un marqueur d'activation et de maturation non spécifique de lignée. D'abord proposé comme marqueur de substitution à l'étude du statut mutationnel des gènes des IgV_H (Damle *et al.*, 1999) son intérêt comme facteur pronostique indépendant a néanmoins été démontré par certaines équipes, son expression par les cellules de LLC étant ainsi associée à un mauvais pronostic et à une

évolution rapide de la pathologie (Deaglio *et al.*, 2006 ; Del Poeta *et al.*, 2001 ; Ibrahim *et al.*, 2001 ; Morabito *et al.*, 2001). Cependant, ces résultats restent à l'heure actuelle controversés, d'autant plus que le niveau d'expression du CD38 peut changer au cours de l'évolution d'une LLC.

ZAP-70 est une protéine tyrosine kinase de la famille Syk ayant une fonction cruciale dans les cellules T. Impliquée dans la cascade de la signalisation intracellulaire après l'engagement du récepteur T (TCR), elle est aussi fortement exprimée dans les cellules NK tandis qu'elle n'est pas présente dans les cellules B normales matures. Son expression dans les cellules B de LLC apparaît fortement corrélée avec le statut mutationnel des gènes des IgV_H et représente donc un fort marqueur pronostique. La présence de ZAP-70 dans les cellules de LLC (mesurée par marquage intracytoplasmique puis cytométrie en flux) est ainsi corrélée à un pronostic défavorable et son absence à un pronostic favorable (Chen *et al.*, 2002 ; Crespo *et al.*, 2003 ; Orchard *et al.*, 2004 ; Rassenti *et al.*, 2004). L'expression d'autres gènes, tels que LPL et ADAM29, permet d'améliorer la corrélation de ZAP-70 avec le statut mutationnel. Ainsi ZAP-70 ou la Lipoprotéine Lipase (LPL) sont préférentiellement transcrits dans les LLC à IgV_H non mutées tandis que le gène Adam29 est majoritairement exprimé par les LLC à IgV_H mutées. Le rapport LPL/ADAM29 a une correspondance de 90% avec le statut mutationnel et représente un marqueur indépendant pour la survie sans événement chez les patients en stade A comme chez ceux en stade B ou C (Oppezzo *et al.*, 2005).

iii. Facteurs pronostiques cytogénétiques : délétions 13q14, 11q22-23, 17p13 et trisomie 12

Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes observées par cytogénétique conventionnelle (caryotype standard) sont la trisomie 12, la délétion partielle ou translocation impliquant le bras long du chromosome 13 (13q), les délétions partielles du bras long du chromosome 6 ou du chromosome 11 (6q et 11q), du bras court du chromosome 17 (17p) et, plus rarement, un réarrangement du chromosome 14, en 14q32, au locus des gènes codant pour les chaînes lourdes des Ig. A partir des années 1990, la recherche spécifique des anomalies récurrentes par FISH (Hybridation *in situ* Fluorescente) a permis de montrer leur grande fréquence (dans plus de 80% des cas de LLC analysés) et de mettre en évidence leur valeur pronostique (Dohner *et al.*, 2000).

Les deux anomalies cytogénétiques reconnus comme étant de mauvais pronostic à ce jour et pouvant orienter la prise en charge thérapeutique sont la délétion partielle du bras

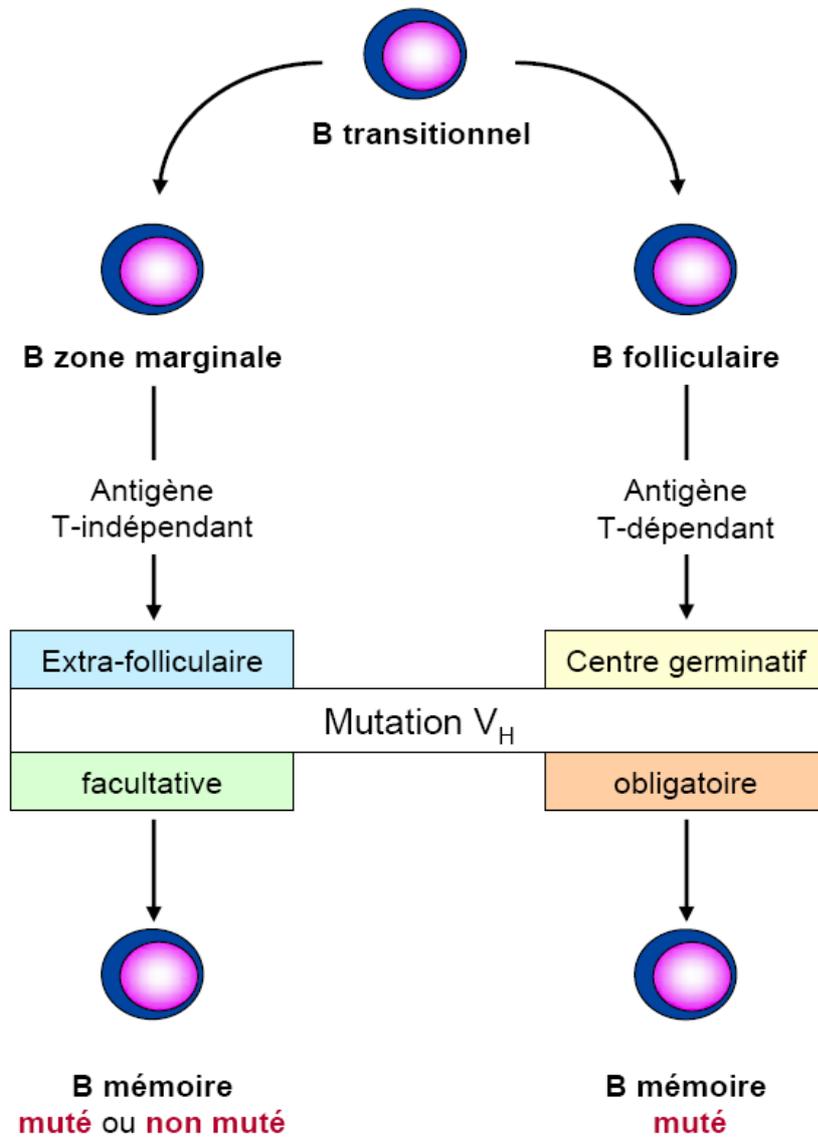


Figure 8 : Deux voies alternatives de maturation des lymphocytes B, à l'origine de lymphocytes B mémoires mutés ou non mutés

(D'après Chiorazzi et al., 2005)

long du chromosome 11 et la délétion du bras court du chromosome 17. Les délétions 11q22-23 sont retrouvées dans 11 à 18 % des cas de LLC et induisent une mutation du gène suppresseur de tumeur ATM dans 22 à 40 % des cas, pouvant entraîner un dysfonctionnement de la voie p53 (Austen *et al.*, 2005 ; Stankovic *et al.*, 1999 ; Trbusek *et al.*, 2006). Cette délétion est associée à des adénopathies volumineuses, à une progression plus rapide de la maladie, à un intervalle sans traitement plus court et à une survie globale diminuée. Les anomalies structurales du bras court du chromosome 17, responsable le plus souvent de la perte de la bande 17p13, sont observées dans 4% des cas de LLC et induisent une délétion du gène suppresseur de tumeur tp53 dans 7% des cas (Dohner *et al.*, 2000). Les anomalies tp53 ont un impact pronostique majeur, avec une survie globale plus courte et une absence de réponse aux agents alkylants et aux analogues de purines (Dohner *et al.*, 1995). La trisomie 12, qui est retrouvée dans 13 à 25 % des cas et aurait une influence sur la survie sans progression a également été retenue comme critère de mauvais pronostic.

La délétion impliquant la bande 13q14 est présente dans 55 à 63% des cas, ce qui en fait l'anomalie cytogénétique la plus fréquente. Les patients avec délétion 13q14 isolée (sans autres anomalies retrouvées) ont la meilleure survie globale et la plus longue médiane d'intervalle sans traitement (Dohner *et al.*, 2000). Cette survie sans traitement semble cependant significativement moins longue si la délétion 13q est associée à une translocation chromosomique.

d) Origine cellulaire de la LLC

L'existence de deux sous populations cellulaires de LLC, mutées et non mutées, avait conduit à l'hypothèse qu'il existait deux types de LLC dérivant de deux origines cellulaires différentes ou de deux stades de différenciation différents : celles de bon pronostic auraient une origine post-centre germinatif tandis que celles de mauvais pronostic proviendraient d'une cellule naïve pré-centre germinatif. Cependant des études de transcriptome ont démontré que la LLC était constituée d'un groupe homogène de cellules à phénotype proche de celui des cellules mémoires, confirmant l'entité réelle de la LLC (Klein *et al.*, 2001 ; Rosenwald *et al.*, 2001). Les cellules non mutées pourraient alors provenir de cellules B des zones marginales, activées par des mécanismes indépendants des cellules T tandis que les cellules mutées dériveraient de cellules des centres germinatifs ou de cellules des zones marginales par des mécanismes dépendant ou non des cellules T (Fig. 8) (Chiorazzi *et al.*, 2005).

D'autre part, les BCR des cellules de LLC présentent une très grande homologie dans les séquences codant les chaînes lourdes des Ig et certains patients présentent des CDR3 quasiment identiques (Stamatopoulos *et al.*, 2007). Cela suggère que les Ag qui lient

ces récepteurs sont semblables et déterminants pour la pathogénèse de la maladie. Ceci est en faveur de l'hypothèse de l'intervention d'un nombre limité d'Ag dans la leucémogénèse.

e) Traitements

Le traitement actuel de la LLC est essentiellement fondé sur l'abstention thérapeutique pour les patients en stade A. En cas d'évolution de la pathologie vers les stades B ou C, les patients sont classiquement traités par un analogue des purines, la Fludarabine, associé le plus souvent à un agent alkylant (cyclophosphamide), en raison de la synergie de ces 2 molécules dans la LLC. D'autres lignes thérapeutiques utilisent ces chimiothérapies associées à des anticorps monoclonaux (Rituximab ou Alemtuzumab). Par ailleurs, les greffes d'HSC ont montré leur efficacité chez les patients multitraités ou réfractaires. Hormis la greffe allogénique, dont le taux de mortalité lié à la greffe reste très important, aucun de ces traitements n'est curateur, la maladie évoluant habituellement en phases successives nécessitant plusieurs lignes de traitement.

2. Les lymphomes B non hodgkiniens

Les LNH B représentent 85% de l'ensemble des LNH dans les pays occidentaux et constituent un groupe extrêmement hétérogène de proliférations monoclonales des lignées lymphocytaires B, responsables du développement de tumeurs au niveau des organes lymphoïdes, notamment ganglionnaires. Leur incidence mondiale s'accroît de façon constante depuis plusieurs décennies et atteint aujourd'hui en France un niveau de 14/100 000 hab./an, avec un accroissement d'environ 4% par an. Les causes en sont multiples. Certains virus (EBV, VIH ou VHC), des bactéries comme *Helicobacter pylori* ainsi que des déficits immunitaires congénitaux ou des maladies auto-immunes peuvent être incriminés. Les facteurs environnementaux, et notamment l'exposition aux pesticides, semblent également jouer un rôle non négligeable. Nous détaillerons ci-dessous les principales caractéristiques des LNHB les plus fréquents : lymphomes folliculaires, lymphomes du manteau et lymphomes des ZM.

a) Le lymphome folliculaire

Le lymphome folliculaire représente 22% des LNH et est composé de cellules comparables à celles des centres germinatifs normaux (centroblastes et centrocytes). La pathologie évolue de manière indolente et les survies médianes sont de 8 à 10 ans avec cependant une hétérogénéité importante selon les patients. Les cellules tumorales présentent un phénotype CD10⁺CD5⁻CD23⁻ et sont, pour la plupart, caractérisées par une

translocation t(14 ;18)(q32 ;q21) ayant pour conséquence la juxtaposition des locus de la chaîne lourde des Ig et du gène *bcl-2*, la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et une résistance des centrocytes à l'apoptose en l'absence de stimulation antigénique (Tsujiimoto *et al.*, 1984a). Des altérations génétiques supplémentaires ainsi que le niveau d'activation des cellules dendritiques folliculaires environnantes pourraient également intervenir dans l'évolution de la pathologie (de Jong, 2005).

b) Le lymphome du manteau

Les lymphomes du manteau sont fréquents (15% des LNH B) et présentent plusieurs niveaux d'agressivité clinique. Ils touchent des patients âgés de 60 ans en moyenne et présentent une survie médiane de 3 à 4 ans. La pathologie consiste en une prolifération diffuse ou nodulaire de petites cellules irrégulières, caractérisées au plan phénotypique par l'expression de la molécule CD5, d'une IgM et d'une IgD membranaire et l'absence d'expression du CD10 et du CD23 (Fernandez *et al.*, 2005). Ces cellules correspondraient à un sous-type lymphocytaire B recirculant au stade pré-germinal ou à des cellules mémoires (Bertoni et Ponzoni, 2007). La majorité des cas de lymphomes du manteau sur-exprime la cycline D1, conséquence d'une translocation t(11 ;14)(q13 ;q32) qui juxtapose la chaîne lourde des Ig avec le gène *bcl-1* (Tsujiimoto *et al.*, 1984b). La cycline D1 régule la transition entre les phases G₁ et S du cycle cellulaire en s'associant aux CdK4/6. Son augmentation dans le lymphome du manteau pourrait induire une accélération de la transition G₁/S et ainsi contribuer à la prolifération de la cellule tumorale. D'autres facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme l'inhibiteur de CdK P16^{INK4a} ou BMI-1 peuvent également être dérégulés (Bea *et al.*, 2001 ; Pinyol *et al.*, 1997). Par ailleurs, les voies de réponse aux dommages de l'ADN sont fréquemment affectées, notamment par la délétion du locus 11q22-23 où est localisé le gène de la kinase ATM (Stilgenbauer *et al.*, 1999) ou par l'inactivation de la protéine p53 (Louie *et al.*, 1995).

c) Les lymphomes de la zone marginale

Il s'agit d'un groupe de LNH d'individualisation assez récente et encore mal défini. Une catégorie correspond aux lymphomes de la ZM splénique (avec ou sans cellules villeuses) et une autre catégorie correspond aux proliférations malignes au sein du tissu MALT (tissu lymphoïde associé aux muqueuses). Les LNH MALT présentent une localisation extra ganglionnaire (gastrique dans la moitié des cas) et disséminent très exceptionnellement dans le sang et la moelle osseuse. Dans les lymphomes de la ZM splénique, l'infiltrat tumoral prédomine au niveau de la ZM de la pulpe blanche et est constamment associé à une atteinte médullaire avec une diffusion variable dans le sang

périphérique. Cette pathologie touche des patients âgés de plus de 50 ans et présente une survie à 5 ans comprise entre 60 et 80% (Bertoni et Zucca, 2005 ; Franco *et al.*, 2003). Les cellules sont de phénotype $IgM^+IgD^{-/lo}CD5^-CD10^-CD23^-$ et dérivent d'un lymphocyte mémoire. À la différence des lymphomes décrits ci-dessus, les lymphomes de la ZM ne possèdent pas d'anomalies cytogénétiques caractéristiques. Des études de transcriptome ont cependant démontré l'existence d'une surexpression de gènes impliqués notamment dans les voies de signalisation du BCR ou du TNF ainsi que dans l'activation de la voie NF κ B, comme Syk ou Btk (Ruiz-Ballesteros *et al.*, 2005).

Les lymphoproliférations malignes, en particulier la LLC, restent aujourd'hui encore, des pathologies aux origines mal connues et aux traitements insuffisants. Nous avons vu que certaines protéines, impliquées notamment dans la prolifération ou la mort cellulaire, ont été mises en cause. Parmi les autres cibles de dérégulation, certains facteurs de transcription font l'objet de mutations ou de délétions, comme Pax5, EBF, Ikaros ou Aiolos dans les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) (Mullighan *et al.*, 2007). L'étude des processus normaux de régulation transcriptionnelle au cours de l'hématopoïèse représente donc une voie d'investigation intéressante afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes d'apparition des lymphoproliférations et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

B. Aiolos, un facteur au fonctionnement complexe, impliqué dans la lymphopoïèse B

Parmi les facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse, la famille des protéines à doigts de zinc de type Ikaros exerce des fonctions aux étapes précoces de l'hématopoïèse et aux étapes plus tardives de différenciation et de maturation des lymphocytes T et B. Elle contient aujourd'hui cinq membres : Ikaros, Aiolos, Helios, Eos et Pegasus. Ces protéines sont très conservées, aussi bien entre elles au sein d'une même espèce, que d'une espèce à l'autre, mais présentent des rôles distincts et encore mal définis dans la différenciation hématopoïétique (Haire *et al.*, 2000 ; Kohonen *et al.*, 2004 ; Liippo *et al.*, 1999 ; Mayer *et al.*, 2002 ; Molnar *et al.*, 1996). Les données concernant le seul facteur Aiolos étant succinctes, je m'appuierai sur Ikaros, beaucoup plus étudié, pour caractériser le mode de fonctionnement général, complexe et atypique, de cette famille de protéines régulatrices. Les données présentées ont été obtenues pour l'essentiel chez la souris.

I. Structure et expression des protéines Ikaros et Aiolos

1. Une combinaison variable de doigts de zinc de type Cys₂/His₂, reconnaissant des domaines fonctionnels différents

Les protéines de la famille Ikaros sont composées au maximum de six doigts de zinc multi-adjacents de type Cys₂/His₂ qui représentent le motif protéique le plus abondant dans les cellules de mammifères et en particulier dans les facteurs de transcription. Chaque doigt de zinc est composé de deux feuillets β antiparallèles et d'une hélice α , entourant un atome de zinc central (Wolfe *et al.*, 2000).

Les doigts de zinc des protéines de la famille Ikaros reconnaissent des domaines fonctionnels différents. Les quatre doigts de zinc N-terminaux, disposés à égale distance les uns des autres, reconnaissent une séquence consensus 5'-GGGAA-3' de l'ADN, tandis que les deux doigts de zinc C-terminaux se lient aux protéines et assurent la dimérisation des membres de la famille les uns avec les autres (Hahm *et al.*, 1994 ; Molnar et Georgopoulos, 1994 ; Morgan *et al.*, 1997 ; Sun *et al.*, 1996). La dimérisation assurée par les doigts de zinc 5 / 6 est très sélective et repose sur 11 résidus situés dans les hélices α et dans la région liant les doigts entre eux. Les deux activités de liaison à l'ADN et de liaison des protéines sont étroitement liées, la fixation des doigts de zinc 5 et 6, et donc la dimérisation des protéines, renforçant les capacités de liaison des doigts de zinc 1 à 4 à l'ADN.

Chacun des membres de la famille Ikaros peut exister sous plusieurs isoformes qui se distinguent par une combinaison variable des quatre doigts de zinc amino-terminaux de

A



B

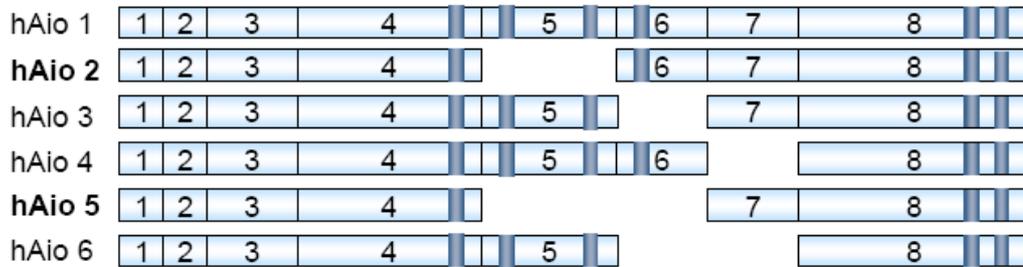


Figure 9 : Structure des protéines Ikaros et Aiolos

A. Exons composant les principales isoformes Ikaros et localisation des domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation. **B.** Schéma des principales isoformes Aiolos

liaison à l'ADN (Fig. 9). Trois de ces quatre doigts de zinc sont nécessaires à la liaison à l'ADN. Les isoformes qui en contiennent moins (isoformes dominante négative ou DN) perdent leur capacité à fixer l'ADN mais conservent leur capacité de dimérisation et peuvent ainsi moduler l'activité des isoformes « fonctionnelles » (Hahm *et al.*, 1994).

2. Des profils d'expression distincts

a) Ikaros est exprimé dans tous les lignages hématopoïétiques

Ikaros a été caractérisé conjointement chez la souris par les équipes de K. Georgopoulos et de K. Hahm par son interaction avec des séquences régulatrices des gènes lymphoïdes CD3 δ (Georgopoulos *et al.*, 1992) et TdT (Hahm *et al.*, 1994 ; Lo *et al.*, 1991). Sa présence chez l'homme a été démontrée plus tardivement (Nietfeld et Meyerhans, 1996). Il est exprimé très précocement au cours du développement embryonnaire murin : dès 8 jours de développement dans le sac vitellin et à partir de 11 et 13 jours dans le foie et le thymus, respectivement (Georgopoulos *et al.*, 1992). Chez l'adulte, il est exprimé dans toutes les cellules hématopoïétiques (HCS, progéniteurs lymphoïdes et érythromyéloïdes, lymphocytes B et T) mais à des niveaux variables (Fig. 10). Son niveau diminue parallèlement à la différenciation des cellules myéloïdes et érythromyéloïdes. Au contraire son expression augmente fortement aux étapes précoces de la différenciation lymphoïde (Dumortier *et al.*, 2003 ; Kelley *et al.*, 1998 ; Kirstetter *et al.*, 2002 ; Klug *et al.*, 1998 ; Morgan *et al.*, 1997). Il est également détecté dans le système neuro-endocrinien.

Le gène *ikaros* est localisé sur le chromosome 11 chez la souris et sur le bras court du chromosome 7 chez l'homme. Il est composé de 2 exons 1a et 1b alternativement épissés avec 7 autres exons, très conservés entre les espèces humaines et murines (Georgopoulos *et al.*, 1992 ; Hahm *et al.*, 1994 ; Kaufmann *et al.*, 2003 ; Molnar et Georgopoulos, 1994 ; Molnar *et al.*, 1996). Seuls les exons 2 à 8 sont traduits. On connaît aujourd'hui une dizaine d'isoformes distinctes, la plupart étant présentes à la fois chez l'homme et la souris, dans des quantités et des ratios identiques (Fig. 9A). Parmi elles, les deux isoformes les plus abondantes, Ik1 et 2 (IK-VI et IK-V dans la nomenclature de Hahm), sont préférentiellement exprimées lors des étapes précoces de différenciation des lymphocytes T et B. Parallèlement à la progression de la différenciation, on détecte en quantités croissantes les isoformes DN Ik6 (lymphoïde et myéloïde) et Ik4 (lymphoïde uniquement) (Klug *et al.*, 1998 ; Molnar et Georgopoulos, 1994 ; Sun *et al.*, 1996). L'isoforme Ikx est, quant à elle, exprimée de manière prépondérante dans la lignée myéloïde (Payne *et al.*, 2003 ; Payne *et al.*, 2001).

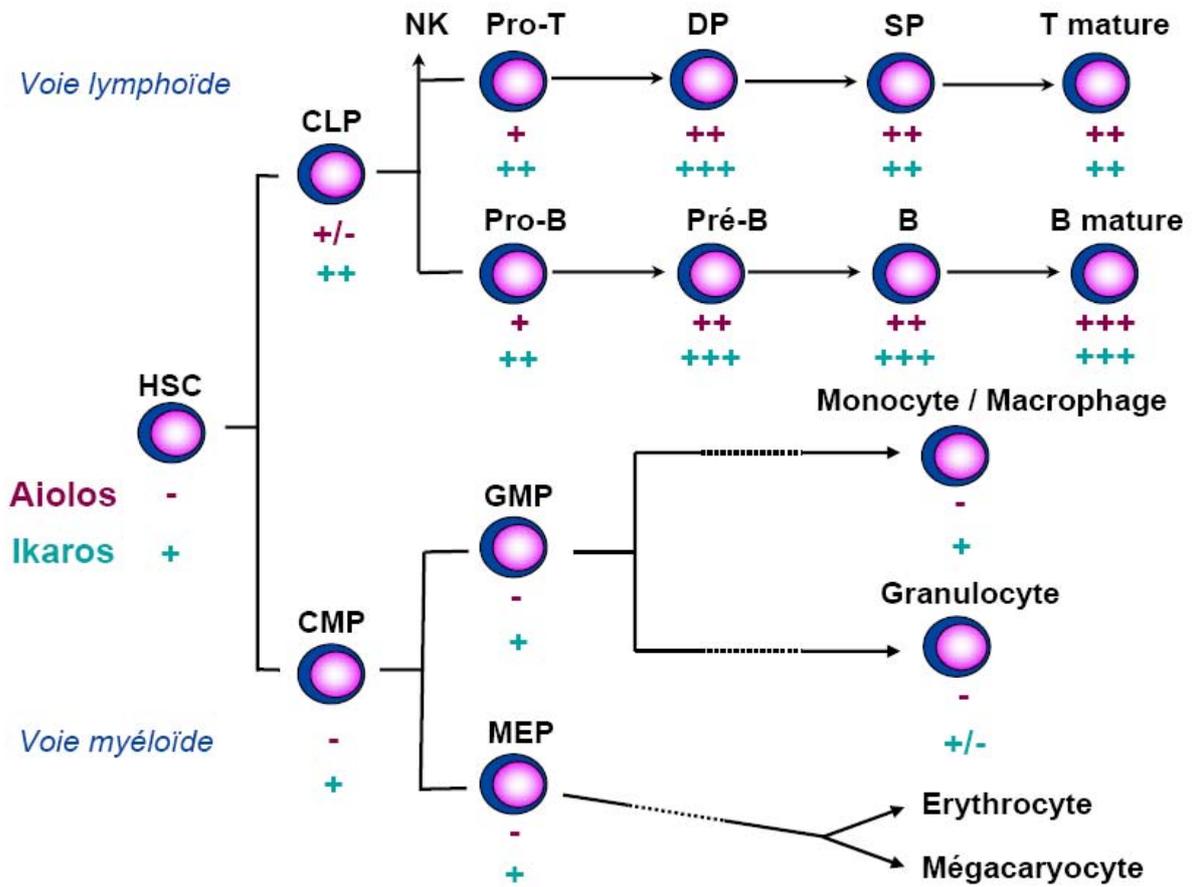


Figure 10 : Expression des protéines *Ikaros* et *Aiolos* au cours de l'hématopoïèse

Niveaux d'expression d'*Aiolos* (mauve) et d'*Ikaros* (turquoise) associés à chacun des principaux stades cellulaires de la différenciation hématopoïétique (D'après Weissman et al., 2001).

b) Aiolos présente une expression plus tardive et spécifique du lignage lymphoïde

En 1997, Bruce Morgan et ses collègues démontrèrent l'existence d'un transcrit, homologue à 70% à Ik-1, codant une protéine à doigts de zinc de 58 kDa, la protéine Aiolos. Le gène *aiolos* est localisé sur le chromosome 11 chez la souris et sur le chromosome 17 chez l'homme, à proximité du gène suppresseur de tumeur *brca1* (Hosokawa *et al.*, 1999). Il est composé de 8 exons dont l'épissage alternatif conduit à la production chez l'homme d'au moins six isoformes différentes, et en particulier des dominants négatifs hAio2 et hAio5 (Caballero *et al.*, 2007 ; Liippo *et al.*, 2001) (Fig. 9B). Une seule isoforme a été décrite chez la souris.

Au cours de l'embryogenèse murine, Aiolos est détecté pour la première fois dans le thymus après 16 jours de gestation. Son expression augmente ensuite fortement après la naissance. On le détecte ainsi à partir des CLP puis on le trouve dans les thymocytes précoces. Son expression est maximale dans les cellules double positives CD4⁺CD8⁺ (Fig. 10). Au sein du lignage B, Aiolos présente une expression faible dans les cellules pro-B puis il augmente très fortement dans les cellules pré-B et les cellules B matures, où il atteint un niveau supérieur à celui rencontré dans les cellules T. Aiolos est également présent, en plus faible quantité dans les cellules NK et dans les cellules dendritiques. Il n'est, en revanche, pas détecté dans les HSC et dans les cellules érythromyéloïdes (Kelley *et al.*, 1998 ; Morgan *et al.*, 1997).

II. Fonctions des protéines Ikaros et Aiolos *in vivo*

1. Ikaros affecte tous les lignages hématopoïétiques

Le rôle du facteur de transcription Ikaros au cours du développement des cellules hématopoïétiques a été analysé par la réalisation de quatre types de souris mutantes.

Un premier type de souris mutante (DN^{-/-}) a été produit par délétion des doigts de zinc 3 et 4 du domaine de liaison à l'ADN et induit la formation de protéines DN. Les souris mutantes ne présentent ni cellules T, B et NK, ni leurs précurseurs les plus précoces connus, alors que les autres lignages hématopoïétiques ne sont pas affectés (Georgopoulos *et al.*, 1994). Ceci suggère une intervention précoce de la protéine Ikaros au cours du développement lymphoïde. Les protéines DN conservant leurs capacités d'hétérodimérisation avec les autres protéines de la famille Ikaros, le phénotype observé reflète probablement la perte de fonction de plusieurs membres de la famille Ikaros. Par ailleurs, un taux réduit d'Ikaros, comme observé chez des souris DN^{+/-}, entraîne le

développement d'hémopathies lymphoïdes T chez 100 % des animaux (Winandy *et al.*, 1995).

La mutation nulle du gène *ikaros* ($Ik^{-/-}$) a consisté à couper la partie carboxy-terminale d'Ikaros, entraînant la perte totale de la protéine et un réel phénotype nul (Wang *et al.*, 1996). Le développement lymphocytaire y est également perturbé mais moins que chez les souris DN, les autres protéines de la famille Ikaros pouvant compenser en partie la perte de fonction d'Ikaros. Les foetus sont dépourvus de lymphocytes T, B et NK mais une population de lymphocytes T $\alpha\beta$ se développe en période post-natale, probablement grâce à la protéine Hélios (Hahm *et al.*, 1998 ; Kelley *et al.*, 1998). Ces cellules ont cependant tendance à développer davantage de réponses hyperprolifératives. Par ailleurs, la réduction des transcrits Ikaros dans les cellules T des souris $Ik^{+/-}$ facilite la transition entre les phases G₀ et G₁ du cycle cellulaire, puis accélère la progression de la phase G₁ à la phase S (Avitahl *et al.*, 1999). Ceci est corrélé avec une diminution du seuil de stimulation antigénique nécessaire à l'activation du récepteur T et à une réponse accrue aux facteurs de croissance.

Un troisième type de souris, $Ik^{L/L}$ (mutation hypomorphe), a été produit par l'insertion du gène rapporteur de la β galactosidase dans l'exon 2 d'*ikaros* et conduit à l'expression d'une faible quantité d'Ikaros. Dans ces souris, les cellules B sont totalement absentes au cours du développement embryonnaire et émergent, après la naissance, à partir d'un groupe réduit de précurseurs. Elles présentent des capacités de développement et de prolifération réduites, notamment une sous-expression des transcrits TdT, Rag-1, Rag-2 et $\lambda 5$ dans les cellules proB, ce qui perturbe la transition entre les stades pro-B et pré-B. Le phénotype des cellules B matures est normal, mais leur seuil d'activation est plus faible que dans les souris sauvages et la formation des centres germinatifs est restreinte, phénotype explicable en partie par la présence de la protéine Aiolos capable de se substituer partiellement à Ikaros (Kelley *et al.*, 1998 ; Morgan *et al.*, 1997). Ce type de souris mutante a permis également de mettre en évidence le rôle d'Ikaros dans les étapes précoces de différenciation des granulocytes neutrophiles (Dumortier *et al.*, 2003), leur nombre et leurs capacités de migration étant fortement réduits. Là encore, les cellules matures ne sont pas affectées.

Les souris *plastics* possèdent, quant à elle, une mutation ponctuelle au niveau du doigt de zinc n°3 (Papathanasiou *et al.*, 2003). Cette mutation, produite par un agent mutagène, induit le remplacement d'une histidine par une arginine et la déstructuration du doigt de zinc, rendant impossible la liaison à l'ADN. Les protéines sont, en revanche, présentes en quantités identiques à celles rencontrées dans les souris sauvages. Cette mutation conduit au phénotype le plus sévère observé jusqu'à présent : les souris meurent, avant la naissance, d'une anémie sévère. Elles ne possèdent aucun lymphocyte, les

granulocytes et les érythrocytes sont fortement diminués tandis que les monocytes/macrophages sont fortement augmentés. Ce phénotype est le résultat de l'inactivation probable de tous les complexes contenant Ikaros et de l'incapacité des autres membres de la famille à se substituer à Ikaros.

2. Aiolos intervient dans la lymphopoïèse B

a) La mutation nulle du gène aiolos ($Aio^{-/-}$): une modification de la proportion des différentes populations B et une hyperactivation

L'inhibition du gène aiolos chez la souris ne bloque pas le développement des lymphocytes, mais modifie leur nombre et leur seuil de réponse aux Ag (Wang *et al.*, 1998). Les souris $Aio^{-/-}$ présentent ainsi un nombre normal de cellules pro-B alors que les cellules pré-B sont augmentées de 50%. La production des cellules B non conventionnelles est fortement compromise, les cellules B1a péritonéales et les cellules B des zones marginales étant quasi-inexistantes. Les cellules B recirculantes de la moelle osseuse sont réduites de 50%.

Le nombre des cellules B spléniques est globalement inchangé mais on observe des changements dans leurs phénotypes : les cellules B naïves nouvellement exportées sont fortement diminuées tandis que les cellules B des centres germinatifs augmentent et présentent des caractéristiques de cellules activées (sur-expression des marqueurs CMH de classe II et CD23, sous-expression des marqueurs CD22 et FcγRIIB1). Wang et *Coll* ont montré également la présence d'Ac auto réactifs, signes d'une rupture dans la tolérance B. Le traitement des cellules B matures avec un Ac anti-chaîne lourde μ leur a permis de démontrer par ailleurs que l'absence d'Aiolos diminue le seuil nécessaire à l'activation du BCR. Ceci suggère que les cellules B des souris $Aio^{-/-}$ sont engagées dans des processus de maturation, dépendant des lymphocytes T, probablement en réponse à une stimulation antigénique qui aurait été inefficace chez des souris sauvages. Cette réponse hyperproliférative est corrélée au développement de lymphomes chez 6 souris sur 20, dont quatre lymphomes B. La différenciation des cellules T est, quant à elle, relativement peu affectée. Cependant, les souris Ikaros $^{+/-}$ Aiolos $^{-/-}$ développent des lymphomes T beaucoup plus rapidement que les souris Ikaros $^{-/-}$.

b) Aiolos contrôle la production de cellules B des zones marginales par l'intermédiaire de Btk

Dans les souris $Aio^{-/-}$, on observe une augmentation du nombre absolu de cellules B folliculaires et une diminution du nombre absolu de cellules B des ZM (Wang *et al.*, 1998).

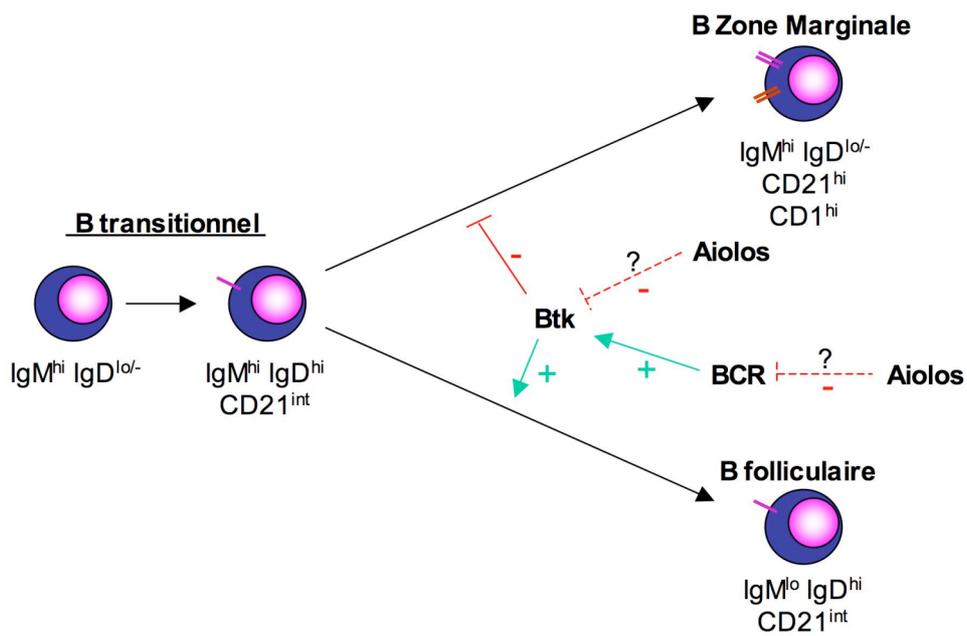


Figure 11 : Un contrôle de la production des cellules B des zones marginales via Btk

Schéma des modes d'action probables d'Aiolos sur Btk et sur la production des lymphocytes B des zones marginales (d'après Cariappa et al., 2001)

Un autre type de souris mutantes, les souris Xid dans lesquelles le gène *btk* est non fonctionnel, présente le phénotype inverse avec une diminution des cellules B folliculaires et une augmentation des cellules B des ZM (Cariappa *et al.*, 1999 ; Khan *et al.*, 1995). La production de souris double mutantes, *Aio*^{-/-}/Xid, conduit à un phénotype proche de celui observé dans les souris Xid avec une réapparition des cellules B des ZM et de leurs précurseurs potentiels, une diminution de la population des cellules B folliculaires et une absence de prolifération des cellules B en réponse à une stimulation par un Ac anti-IgM (Cariappa *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'Aiolos contrôle la production des cellules B des zones marginales via Btk, dont il représente un régulateur négatif (Fig. 11). En l'absence d'Aiolos, l'augmentation du signal BCR, induite en partie par Btk, et la diminution de l'expression de CD21 contribuent à l'échec du développement des cellules B des ZM et à la surproduction des cellules B folliculaires. En présence d'Aiolos, la diminution, directe ou non, de l'activité de Btk induit en revanche une augmentation de la formation des cellules B des ZM et une diminution de la production des cellules B folliculaires.

c) Le mode d'action d'Aiolos dans la production des plasmocytes circulants de la moelle osseuse est mal défini

L'absence d'Aiolos induit une réduction importante et sélective des plasmocytes à longue durée de vie, sécréteurs d'Ac à haute affinité pour l'Ag et localisés dans la moelle osseuse (Cortes et Georgopoulos, 2004 ; Wang *et al.*, 1998). Les mécanismes, à l'origine du contrôle de l'expression de cette sous-population par Aiolos, ne sont cependant pas clairement définis.

La présence des cellules B à longue durée de vie dans la moelle osseuse dépend d'une différenciation correcte des centroblastes en centrocytes dans le centre germinatif. Les souris *Aio*^{-/-} ne présentent pas de défauts majeurs à cette étape. Le processus de sélection négatif semble cependant moins contraignant que dans les souris sauvages et conduit à la survie de cellules B à affinité plus faible pour l'Ag, qui auraient été négligées dans les souris sauvages. D'autre part, des facteurs comme XBP-1, Blimp-1 ou IRF-4, nécessaires à la sélection clonale, à la survie et à la différenciation en plasmocytes au sein des centres germinatifs, sont exprimés normalement. Les cellules stromales de la moelle osseuse ou les lymphocytes T, avec lesquels les cellules B interagissent au sein du centre germinatif puis dans la moelle osseuse, ne sont pas affectés. On n'observe pas non plus de modifications de l'expression des molécules d'adhésion ou des récepteurs de chimiokines, qui auraient pu être à l'origine de perturbations dans la migration des plasmocytes vers la moelle osseuse. Par ailleurs, les cellules B mémoires sont produites en nombre normal, leurs segments V_H

étant cependant moins mutés que ceux des souris sauvages, et on voit apparaître temporairement une population de plasmocytes à faible durée de vie et à haute affinité pour l'Ag dans la rate. Un défaut dans la survie des plasmocytes pourrait être impliqué. En effet, le récepteur Fas est fortement surexprimé dans les cellules B des centres germinatifs en l'absence d'Aiolos (2,5 fois plus que dans les souris sauvages).

d) Aiolos et OBF-1 : des activités redondantes dans les cellules B immatures et antagonistes dans les cellules B matures

Les souris $Aio^{-/-}$ produisent des Ac anti-ADN double brin, ainsi que d'autres Ac dirigés contre le soi, qui sont à l'origine de phénotypes auto-immuns, proches du lupus érythémateux systémique (Sun *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 1998). Les souris $OBF-1^{-/-}$ présentent un développement normal des cellules B dans la moelle osseuse, mais la production des cellules B périphériques est défectueuse avec une absence totale de cellules B des centres germinatifs et une diminution très importante des cellules IgM^+/IgD^+ circulantes de la moelle osseuse (Kim *et al.*, 1996 ; Nielsen *et al.*, 1996 ; Schubart *et al.*, 1996). La production de souris double mutantes pour Aiolos et OBF-1 abolit complètement le phénotype auto-immun, ce qui suggère qu'OBF-1 est essentiel à la formation d'une réponse auto-immune par les cellules $Aio^{-/-}$ (Sun *et al.*, 2003). Par ailleurs, la production des cellules B des centres germinatifs est complètement bloquée. OBF-1 ou ses gènes cibles se situent donc en aval du facteur de transcription Aiolos. D'autre part, l'expression du marqueur d'activation CD23 est normale alors qu'il est surexprimé dans les souris $Aio^{-/-}$ et sous exprimé dans les souris $OBF-1^{-/-}$. Ces deux facteurs ont donc une activité antagoniste dans les cellules B matures.

En revanche, l'absence de ces deux facteurs perturbe fortement la transition des cellules pré-B en cellules B immatures, induisant une réduction drastique de ces dernières, associée à une légère diminution de l'expression de la pseudo chaîne légère $\lambda 5$ et à une réduction très nette de l'expression de la chaîne lourde μ . Ce phénotype n'est observé ni dans les souris $Aio^{-/-}$, ni dans les souris $OBF-1^{-/-}$, ce qui suggère qu'Aiolos et OBF-1 interviennent dans deux voies régulatrices distinctes et redondantes dans la moelle osseuse, et assurent la transition des cellules pré-B aux cellules B immatures.

3. Quels sont les rôles des protéines Ikaros et Aiolos dans les hémopathies malignes humaines ?

Les souris $Ik\ DN^{+/-}$, $Ik^{+/plstc}$ et $Ik^{L/L}$ développent des lymphomes thymiques quelques mois après la naissance (Dumortier *et al.*, 2006 ; Papathanasiou *et al.*, 2003 ; Winandy *et al.*,

1995) tandis que les souris *Aio*^{-/-} développent préférentiellement des lymphomes B (Wang *et al.*, 1998). Ces réponses hyperprolifératives sont dues notamment à une diminution de l'activité des protéines Ikaros, par diminution des isoformes longues capables de lier l'ADN ou par augmentation des isoformes DN. Elles sont associées d'autre part à une diminution des seuils nécessaires à l'activation des TCR et BCR (Avitahl *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1998) et à l'hyperactivation de certaines voies régulatrices comme la voie Notch (Dumortier *et al.*, 2006).

Ces résultats ont conduit à rechercher si d'éventuelles altérations de l'expression d'Ikaros et d'Aiolos pouvaient être impliquées dans les hémopathies malignes humaines. Des niveaux élevés d'isoformes DN d'Ikaros (Ik4, Ik7 et Ik8) ont ainsi été observés dans les LAL T et B de l'enfant (Sun *et al.*, 1999a ; Sun *et al.*, 1999b ; Sun *et al.*, 1999c). D'autres groupes ont démontré l'expression majoritaire de l'isoforme Ik6 dans les LAL B de l'adulte (Nakase *et al.*, 2000 ; Nishii *et al.*, 2002 ; Tonnelle *et al.*, 2003) et de l'enfant (Ruiz *et al.*, 2004 ; Takanashi *et al.*, 2002) ainsi que dans la leucémie aiguë myéloïde de l'enfant (LAM) (Yagi *et al.*, 2002) et dans les leucémies myéloïdes chroniques des adultes en crise blastique (LMC) (Nakayama *et al.*, 1999). Ik6 pourrait jouer un rôle dans la différenciation des monocytes et macrophages en induisant une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L et ainsi la prolifération cellulaire (Yagi *et al.*, 2002). Une résistance accrue à la mort cellulaire, suite à la surexpression d'Ik6, a également été démontrée dans plusieurs lignées B (Ruiz *et al.*, 2004 ; Sezaki *et al.*, 2003). Le gène *ikaros* peut, par ailleurs, faire l'objet de translocations : dans les lymphomes B diffus à grandes cellules, la translocation t(3;7) entraîne alors la fusion de la région régulatrice amont d'Ikaros avec le gène *bcl-6* et la dérégulation de l'expression de ce dernier (Hosokawa *et al.*, 2000).

Les rôles d'Aiolos dans les hémopathies malignes sont beaucoup moins documentés. Plusieurs études dans la LAL (Liippo *et al.*, 2001 ; Nakase *et al.*, 2002 ; Takanashi *et al.*, 2002) et la LLC (Liippo *et al.*, 2001) ont démontré l'expression majoritaire de l'isoforme hAio1, associée à des quantités faibles d'hAio4 et des isoformes dominantes négatives hAio2 et 5. Ces isoformes sont cependant présentes en proportions identiques dans les cellules saines (Liippo *et al.*, 2001). Des délétions d'Aiolos et d'Ikaros ont par ailleurs été récemment identifiées dans la LAL pédiatrique (Mullighan *et al.*, 2007). Par ailleurs, Antica *et Coll* (2007) se sont intéressés à la phosphorylation d'Aiolos dans différents échantillons de LAM, de LAL (B et T) et de LLC mais n'ont pas réussi à démontrer son implication (Antica *et al.*, 2007).

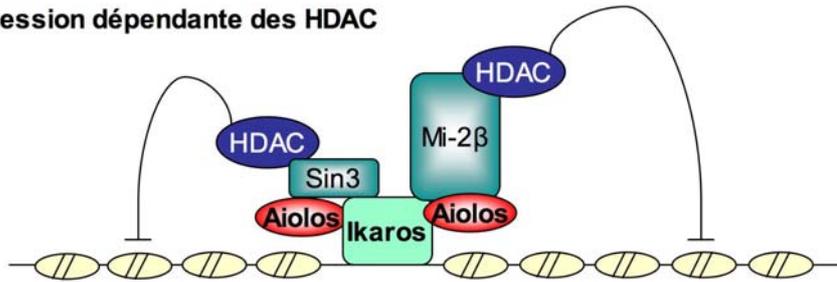
III. Des protéines bifonctionnelles

La particularité des protéines de la famille Ikaros vient de ce qu'elles peuvent fonctionner comme activateur transcriptionnel et comme répresseur transcriptionnel. Bien que des sites de fixation aient été trouvés dans de nombreux promoteurs de gènes spécifiques des lignages lymphoïdes comme TCR δ,β et α , CD3 δ , ϵ et γ , IL-2R α et TdT ou dans des gènes régulateurs de l'apoptose comme bcl-2 (Georgopoulos *et al.*, 1992 ; Lo *et al.*, 1991 ; Molnar et Georgopoulos, 1994 ; Romero *et al.*, 1999), très peu de cibles directes d'Ikaros ou d'Aiolos ont été identifiées à l'heure actuelle.

1. Une localisation qui varie au cours du cycle cellulaire

La localisation des protéines de la famille Ikaros varie en fonction de l'état de la cellule. Ainsi, dans les cellules B au repos, Aiolos et Ikaros sont répartis de manière diffuse dans le noyau. Lorsque les cellules B sont activées, Aiolos et Ikaros se localisent dans des structures toroïdales qui apparaissent en phase G₁, persistent pendant la phase S et sont situées à proximité immédiate de l'hétérochromatine péricentromérique (HC-PC), région très condensée du génome à fort pouvoir répresseur sur la transcription des gènes (cf. partie C-II de cette introduction). Cette relocalisation est associée à une augmentation de l'expression d'Ikaros (Brown *et al.*, 1999 ; Brown *et al.*, 1997 ; Klug *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1998). Les structures toroïdales co-localisent avec des histones méthyltransférases (HMT) et avec des foyers actifs de réplication, suggérant un rôle d'Aiolos et d'Ikaros dans le contrôle du cycle cellulaire (Avitahl *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1998). Ikaros n'est pas détectable dans la cellule lors des premières étapes de la mitose. On le voit réapparaître au cours de la télophase, en association avec les centromères (Avitahl *et al.*, 1999 ; Brown *et al.*, 1997). La localisation d'Ikaros à proximité de l'HC-PC fait intervenir les doigts de zinc 2 et 3 de liaison à l'ADN et semble passer par une reconnaissance directe des séquences satellitaires (Cobb *et al.*, 2000). Les capacités de liaison à l'ADN des protéines Ikaros sont beaucoup plus faibles dans les cellules en cours de mitose, comparativement aux cellules en phases G₁ ou G₂. Cette diminution d'affinité pour l'ADN serait due à la phosphorylation des sérines 168 et 196 et de la thréonine 140, situées dans des régions très conservées faisant la jonction entre les quatre doigts de zinc N-terminaux (Dovat *et al.*, 2002). D'autre part, l'inhibition des cascades de signalisation situées en aval du TCR diminue la proportion des cellules en phase G₁ présentant des structures toroïdales. Ceci suggère un rôle prépondérant des récepteurs T/B, et/ou des cascades de signalisation intracellulaire qui y sont liées, dans la distribution nucléaire des protéines Ikaros (Avitahl *et al.*, 1999).

A. Répression dépendante des HDAC



B. Répression indépendante des HDAC

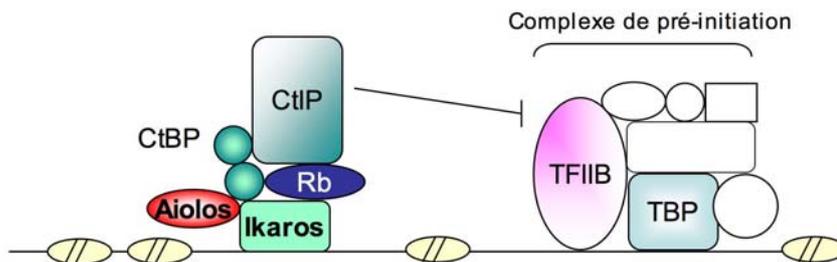


Figure 12 : Deux modes de répression de la transcription

Schéma des modes de répression dépendant des HDAC (A) et indépendant des HDAC (B) utilisés par la protéine Ikaros et des principales molécules associées (D'après Koipally et al., 2002).

2. Ikaros, un répresseur de la transcription

a) Une répression dépendante des désacétylases des histones

Une fraction importante des protéines Ikaros et Aiolos est associée, dans le noyau des cellules T matures, à un complexe multimérique de remodelage de la chromatine. D'une taille de 2 MDa, il migre dans des structures toroïdales proches de l'HC-PC suite à l'activation des cellules (Kim *et al.*, 1999). Il est composé à 60% des protéines de la famille Ikaros (Ik1, Ik2, Ik7, Aiolos et Hélios), à 24% des ATPases Mi-2 β , et des histones désacétylases 1 et 2 (HDAC) du complexe de remodelage de la chromatine NuRD (cf. partie C-I de cette introduction). La migration de ce complexe vers l'HC-PC est dépendante de la présence d'Ikaros. Une telle association avec un complexe de remodelage de la chromatine a également été décrite dans le lignage érythroïde (O'Neill *et al.*, 2000). Par ailleurs, Ikaros et Aiolos interagissent avec les protéines mSin3a et mSin3b, appartenant au complexe de désacétylation Sin3, leur permettant ainsi de recruter les HDAC1 et 2 et d'exercer une action répressive sur leurs gènes cibles (Fig. 12A) (Koipally *et al.*, 1999).

La présence des protéines Ikaros dans ces deux complexes pourrait refléter leur participation à des processus moléculaires différents. Dans les cellules T activées, le complexe Ikaros-Mi2 β -HDAC, de part les propriétés de remodelage de la chromatine du complexe Mi2 β -HDAC et sa localisation centromérique, pourrait contrôler l'état d'acétylation des histones en se liant à l'ADN néo-synthétisé au cours de la phase S, dans des régions inaccessibles de l'hétérochromatine. Par ailleurs, les complexes Ikaros/Sin3/HDAC pourraient exercer leur action sur des gènes cibles présents dans un environnement chromatinien plus accessible (Koipally et Georgopoulos, 2002b).

b) Une répression indépendante des désacétylases des histones

La protéine Ikaros murine et toutes ses isoformes connues peuvent interagir avec le co-répresseur CtBP (C terminal Binding Protein), une phosphoprotéine de 48kDa, par l'intermédiaire d'un motif PEDLS situé en position N-terminale. Aiolos, qui ne possède pas ce motif, ne peut pas interagir directement avec CtBP mais peut cependant former des complexes trimériques Ikaros/CtBP/Aiolos (Koipally et Georgopoulos, 2000). Ikaros et Aiolos sont également capables d'interagir avec le co-répresseur CtIP (CtBP interacting protein) (Koipally et Georgopoulos, 2002a). Cette interaction ne peut se faire qu'en présence, chez CtIP, d'un domaine fonctionnel de liaison au gène suppresseur de tumeur Rb, un régulateur clé de la transition G₁/S.

Ikaros et ses 3 co-répresseurs peuvent alors former un complexe Ikaros/CtBP/CtIP/Rb. Ce dernier réprimerait le promoteur de la Thymidine kinase (Tk),

indépendamment des HDAC, en interagissant avec TBP et TFIIB, deux composants majeurs de la machinerie transcriptionnelle (Fig. 12B). La mutation du site d'interaction avec CtBP réduit la répression du promoteur Tk à 50% de son niveau basal. Si on mute également le site d'interaction avec CtIP, la répression tombe à 15%. D'autres co-répresseurs, comme Sin3a pourraient également intervenir, indépendamment des HDAC (Koipally et Georgopoulos, 2002a).

c) Deux exemples d'activité répressive : TdT et $\lambda 5$

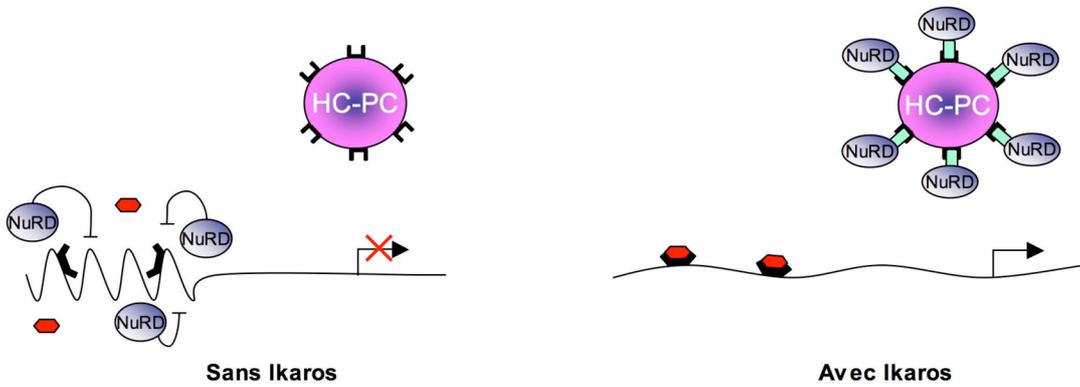
i. Ikaros et la TdT

La TdT est une ADN polymérase qui insère des nucléotides aux jonctions D-J, V-DJ ou V-J et augmente ainsi la diversité des répertoires des Ig. Ikaros possède deux sites de fixation au promoteur du gène TdT (Hahm *et al.*, 1994). Un de ces sites coïncide avec un site de fixation de la protéine de la famille Ets, ELF-1 (Ernst *et al.*, 1993 ; Ernst *et al.*, 1996). Ces deux familles de protéines ne peuvent lier en même temps le promoteur et entrent en compétition : alors qu'ELF-1 semble être le principal activateur transcriptionnel du gène TdT, Ikaros agirait en tant que répresseur. Il induirait en effet une relocalisation péricentromérique du gène TdT via la formation de multimères, permettant à la fois une liaison au promoteur du gène TdT et une liaison à l'HC-PC (Cobb *et al.*, 2000 ; Trinh *et al.*, 2001). La fixation d'Ikaros, au détriment d'ELF-1, pourrait être induite par une augmentation de la concentration en Ikaros ou par sa modification post-traductionnelle.

ii. Ikaros et $\lambda 5$

Les éléments régulateurs nécessaires au contrôle de l'expression des gènes $\lambda 5$ et Vpré-B sont situés dans une région de 19 kb, contenant notamment deux sites de fixation pour Ikaros/Aiolos situés aux positions -83 et -107 (Lo *et al.*, 1991). Le site de fixation, localisé à -83 pb du site d'initiation de la transcription, se superpose à un site de fixation d'EBF, essentiel à la régulation de $\lambda 5$ (Sigvardsson *et al.*, 1997). La fixation d'Ikaros ou d'Aiolos au site -107 favoriserait la fixation d'une deuxième protéine de la famille au site -83 et induirait le départ d'EBF (Thompson *et al.*, 2007). La répression qui en découle ne semble pas nécessiter une relocalisation au niveau de l'HC-PC. Celle-ci pourrait cependant assurer une concentration locale importante d'Ikaros et ainsi favoriser la fixation d'Ikaros, en lieu et place d'EBF. L'inhibition de la transcription de $\lambda 5$ peut également faire intervenir le recrutement du complexe NuRD de remodelage de la chromatine (Sabbattini *et al.*, 2001).

A. Capture des complexes de remodelage de la chromatine



B. Modification de la structure de l'hétérochromatine

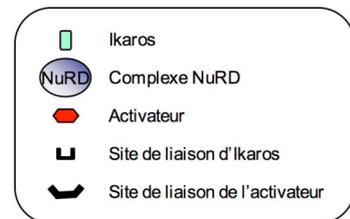
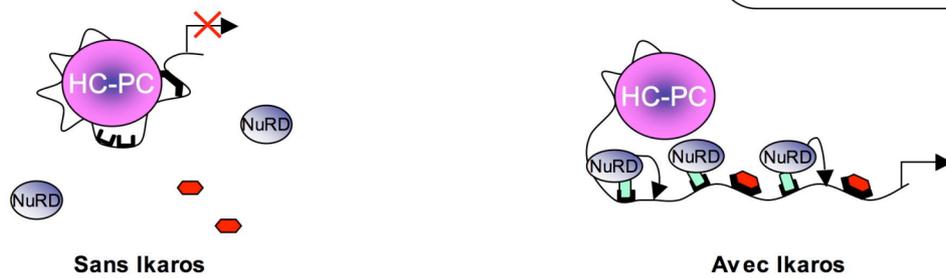


Figure 13 : Deux modes d'activation de la transcription

Schéma de deux modèles de potentialisation de la transcription, proposés par Koipally et al., (2002) où Ikaros interviendrait, soit par la capture des complexes de remodelage de la chromatine de type NuRD (A), soit par une modification directe de la structure de la chromatine (B).

3. Ikaros, un activateur de la transcription

a) Un domaine d'activation non fonctionnel

Un domaine d'activation bipartite, localisé dans la partie N-terminale de l'exon 8 en amont des deux doigts de zinc C-terminaux de dimérisation, a été identifié par une technique de double hybride (Sun *et al.*, 1996). Ce domaine, fortement conservé entre Ikaros et Aiolos ne présente cependant aucune activité transcriptionnelle dans la protéine Ikaros complète, la réalisation de mutants n'ayant aucun effet sur le potentiel activateur d'Ikaros (Koipally *et al.*, 2002). Il est possible que la structure tridimensionnelle de la protéine complète modifie l'accessibilité du domaine d'activation et son potentiel activateur.

b) Une potentialisation de l'activité d'autres facteurs de transcription et une modification de l'accessibilité de la chromatine

Une étude réalisée par Koipally *et coll* a permis de démontrer le caractère atypique de la fonction activatrice de la protéine Ikaros (Koipally *et al.*, 2002). Elle est incapable d'activer un promoteur contenant uniquement une boîte TATA mais est, en revanche, capable d'augmenter l'expression de gènes contrôlés par d'autres facteurs de transcription, sans que la présence d'un site de reconnaissance des protéines Ikaros ni un contact direct avec le deuxième facteur de transcription ne soient nécessaires. Cette capacité d'Ikaros à favoriser l'expression des gènes nécessite en revanche que les doigts de zinc 2 et 3, ainsi que le domaine de dimérisation C-terminal, soient intacts. Ce potentiel activateur est également fortement corrélé à la localisation péricentromérique d'Ikaros et de l'ATPase Mi2 β (Koipally *et al.*, 2002).

L'activité inductrice des protéines de la famille Ikaros pourrait faire intervenir les deux mécanismes suivants. Le premier modèle repose sur la capture des complexes de remodelage de la chromatine : en l'absence d'Ikaros, le complexe NuRD présente une distribution diffuse dans le noyau et peut, en partie, gêner la transcription des gènes présents dans l'euchromatine (Fig. 13A). En présence d'Ikaros, le complexe NuRD est localisé au niveau de l'HC-PC, permettant alors un fonctionnement optimal de la machinerie transcriptionnelle et une augmentation de l'expression des gènes cibles. Le deuxième modèle repose sur une action directe d'Ikaros. Son arrivée au sein de l'HC-PC, avec Mi2 β et les HDAC 1/2, pourrait induire une modification locale de la structure de la chromatine et, ainsi permettre la transcription (Fig. 13B) (Koipally *et al.*, 2002).

Par ailleurs, une fraction des protéines Ikaros et Aiolos, présentes de manière diffuse dans le noyau des lymphocytes T activés, est associée aux ATPases activatrices Brg1, Swi-3 et BAF-60 des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Koipally *et al.*,

1999).

c) L'exemple de la régulation du gène CD8 α

Harker et *coll* ont démontré qu'Ikaros était présent aux séquences promotrices du gène CD8 α dans les cellules CD8 $^+$ et que le locus CD8 était situé au niveau de l'HC-PC, à proximité d'Ikaros, dans les cellules CD8 $^-$ (Harker *et al.*, 2002). D'autre part, en l'absence d'Ikaros et d'Aiolos, ils observent une augmentation des cellules CD4 $^+$, au détriment des cellules CD8 $^+$. Cette diminution des niveaux d'expression d'Ikaros induit une augmentation de la PEV (Position Effect Variegation) qui témoigne de l'association du locus CD8 avec une chromatine répressive. Ikaros pourrait agir en tant qu'activateur des transgènes CD8, situés dans un environnement chromatinien répressif, en augmentant l'accessibilité de la chromatine autour de ses séquences cibles, en amont des gènes CD8, et en facilitant l'action d'autres facteurs de transcription essentiels à l'expression des gènes CD8. Les complexes de remodelage de la chromatine impliqués dans cette ouverture ne sont pas connus à l'heure actuelle.

4. Qu'en est-il pour le facteur de transcription Aiolos ?

a) Aiolos est un régulateur transcriptionnel plus puissant qu'Ikaros

Les études réalisées par Morgan et *Coll* ont montré qu'Aiolos était un activateur transcriptionnel plus puissant qu'Ikaros et était capable *in vitro* de stimuler l'expression de la protéine CAT de 25 à 50 fois, contre 12 à 25 fois pour Ikaros (Morgan *et al.*, 1997). Les homodimères d'Aiolos peuvent donc entrer en compétition avec les homodimères d'Ikaros pour un site de fixation et stimuler ou réprimer la transcription du gène cible à des niveaux plus importants. L'expression différentielle d'Ikaros et Aiolos au cours de la lymphopoïèse et leurs différences de potentiel d'activation suggère un rôle important de leurs quantités relatives au sein de la cellule. Récemment, Thompson et *coll* ont ainsi démontré que l'augmentation importante des quantités d'Aiolos dans les cellules pré-BII assurait la répression efficace du promoteur de $\lambda 5$, dont le niveau d'expression est contrôlé dans les cellules pré-B I par une balance entre EBF et Ikaros (Thompson *et al.*, 2007).

b) Aiolos intervient dans le contrôle de la mort cellulaire programmée

Romero et *coll* (1999) et Rebollo et *coll* (2001) ont démontré l'implication d'Aiolos dans la régulation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L, dans un modèle de cellules T murines, dépendantes pour leur survie de la présence des facteurs IL-2 ou IL-4.

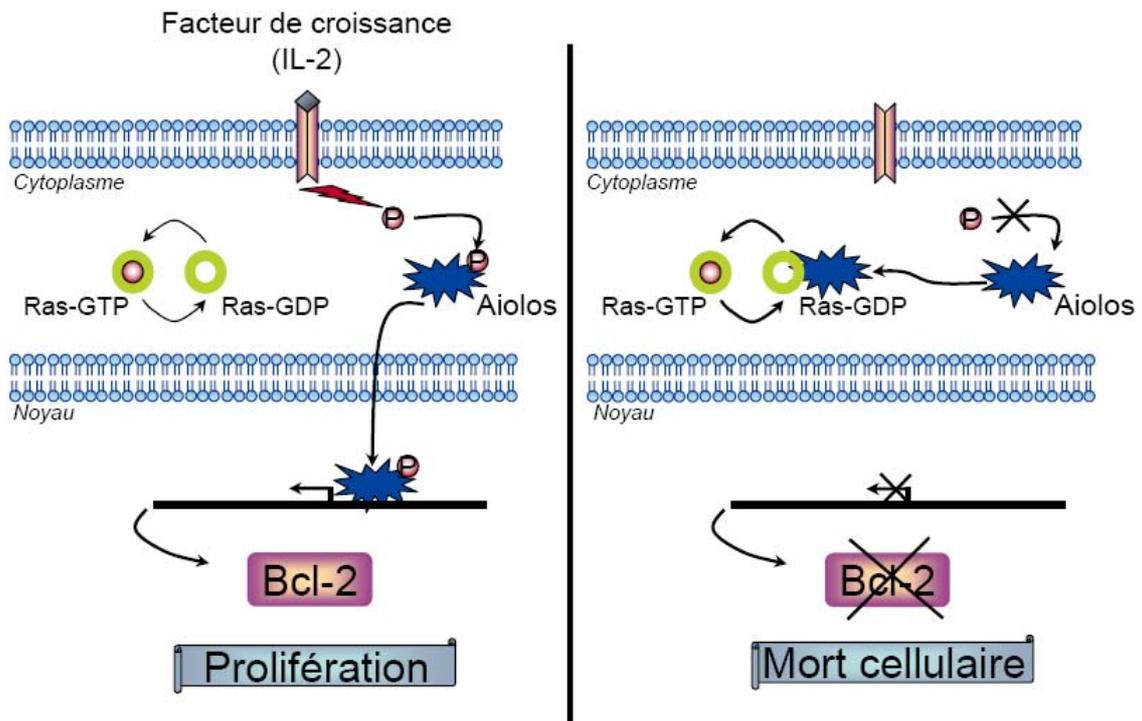


Figure 14 : Aiolos induit la transcription du gène *bcl-2*

Localisation et état de phosphorylation de la protéine Aiolos dans les cellules TS1 α en fonction de la présence ou non du facteur de croissance IL-2 et conséquences sur la prolifération ou le déclenchement de la mort cellulaire (D'après Romero et al., 1999).

En l'absence d'IL-2, les cellules TS1 $\alpha\beta$ meurent en quelques heures par apoptose, les quantités de protéines Bcl-2 diminuant au cours de cette période. L'expression du gène *bcl-2* est contrôlée par deux promoteurs P1 et P2. Leur positionnement en amont du gène rapporteur de la luciférase et la transfection de ces constructions dans les cellules TS1 $\alpha\beta$ a permis de démontrer qu'Aiolos était capable d'activer le promoteur P1 (Romero *et al.*, 1999). Par ailleurs, Aiolos est localisé dans le noyau en présence d'IL-2 et est progressivement redistribué dans le cytoplasme en son absence, ce qui lui permet d'interagir avec Ras, une protéine impliquée dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Cette redistribution d'Aiolos est corrélée à sa déphosphorylation. Romero *et coll* suggèrent que la privation en facteur de croissance induit la séquestration d'Aiolos déphosphorylé dans le cytoplasme (en association avec la molécule Ras) ce qui coïncide avec la diminution de l'expression de Bcl-2 et l'induction de l'apoptose. En présence d'IL-2, Aiolos phosphorylé migre dans le noyau où il induit la transcription du gène *bcl-2* et participe ainsi à la survie de la cellule (Fig. 14).

Par ailleurs, Aiolos interagit avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L dans le cytoplasme des cellules TS1 $\alpha\beta$, cultivées en présence d'IL-4 (Rebollo *et al.*, 2001). La quantité de complexe Aiolos/Bcl-x_L augmente (x4) avec la privation en IL-4, suggérant la séquestration de Bcl-x_L par Aiolos. Cette augmentation est corrélée à une diminution de la phosphorylation d'Aiolos.

IV. Des modes de régulation peu documentés

1. Une influence du type d'isoforme et du nombre de sites de reconnaissance

La dimérisation des protéines de la famille Ikaros joue un rôle essentiel dans l'exercice de leurs fonctions. Les hétérodimères composés d'une isoforme longue et d'une isoforme DN comme Ik6 ont une affinité très réduite pour l'ADN et ne peuvent donc pas activer la transcription de leur gène cible de façon aussi efficace que des homodimères Ik1/Ik1 ou que des hétérodimères Ik1/Ik2 (Sun *et al.*, 1996). La présence d'Ik-6 serait même corrélée à une activité répressive très forte (Koipally *et al.*, 1999). Dans la cellule, les isoformes courtes sont présentes en quantités inférieures aux isoformes longues. Leur augmentation pourrait participer à la régulation de l'activité des isoformes longues et potentiellement être à l'origine, en cas de dérégulation, de nombreux défauts dans la différenciation des cellules hématopoïétiques.

D'autre part, l'isoforme hIK-H, spécifiquement exprimée par les cellules hématopoïétiques humaines (Payne *et al.*, 2001) est capable, *in vitro*, de potentialiser ou d'inhiber le fonctionnement des autres isoformes longues d'Ikaros présentes dans les

lymphocytes T activés, en fonction du nombre de sites de fixation d'Ikaros sur la séquence d'ADN cible (Ronni *et al.*, 2007). Elle induit ainsi une fixation synergique d'hIK-VI (=hIk1) à l'HC-PC en présence de deux séquences consensus tandis qu'elle inhibe totalement cette fixation en présence d'un seul site. Ce fonctionnement, différent de celui d'une protéine dominante négative, pourrait représenter un mécanisme supplémentaire de contrôle de la spécificité de liaison à l'ADN dans les cellules humaines, où les séquences péri-centromériques sont plus variées que chez la souris.

2. Des modifications post-traductionnelles

La phosphorylation d'Aiolos modifie son activité en jouant sur sa capacité à interagir avec des molécules comme Ras ou Bcl-x_L ainsi que sur sa localisation cellulaire (Rebollo *et al.*, 2001 ; Romero *et al.*, 1999). Les résidus phosphorylés et leur influence précise sur la régulation de l'activité d'Aiolos n'ont cependant pas été déterminés à l'heure actuelle. Cette étude a été entreprise dans le cas de la régulation d'Ikaros. Gomez-del Arco *et coll* ont montré qu'Ikaros pouvait être phosphorylé à deux sites différents : un premier site dans l'exon 8, constitué d'une thréonine et de 3 à 4 sérines situées entre les acides aminés 383 et 404 (en amont des doigts de zinc C-terminaux) et un deuxième site, dans l'exon 4, en position S63 (Gomez-del Arco *et al.*, 2004). Le niveau de phosphorylation d'Ikaros varie au cours du cycle cellulaire ; la protéine est déphosphorylée au stade G₁, puis elle est phosphorylée lorsqu'elle entre en phase S. La phosphorylation des cinq résidus de l'exon 8 modifie en fait la capacité d'Ikaros à réguler négativement la transition entre les stades G₁ et S, en diminuant l'affinité de la protéine pour l'ADN.

Gomez del Arco *et coll* ont démontré également que les lysines K58 et K240 (région N-terminale) d'Ikaros pouvaient être la cible de SUMOylation (Gomez-del Arco *et al.*, 2005). Celle-ci diminuerait l'activité répressive d'Ikaros, sans interférer sur sa localisation péri-centromérique. Le groupement SUMO empêche l'interaction d'Ikaros avec les co-répresseurs Mi2 β , Sin3 ou CtBP, mais n'a aucun effet sur son interaction avec la protéine Brg1 (complexe SWI/SNF).

3. Des effecteurs amont inconnus et des mécanismes complexes de régulation transcriptionnelle

Si les protéines de la famille Ikaros jouent un rôle essentiel dans la différenciation des cellules hématopoïétiques, nous ne connaissons quasiment rien de la façon dont leur transcription est elle-même régulée. Une première étude sur Ikaros, réalisée par Kaufman et

coll en 2003, a démontré l'existence de deux exons 1 différents, a et b, indépendamment associés à l'exon 2 (Kaufmann *et al.*, 2003). Les régions promotrices potentielles situées en amont de ces deux promoteurs ne contiennent ni boîtes TATA, ni boîtes CAAT, mais sont particulièrement riches en bases G et C, une caractéristique assez répandue dans les promoteurs hématopoïétiques.

L'étude des régions sensibles à la DNase c'est-à-dire des régions où la chromatine est accessible leur a permis de définir 10 régions régulatrices supplémentaires qui interviennent à différents stades de l'hématopoïèse. Ainsi le transgène A-p-GFP, composé de la région d'hypersensibilité à la DNase C2 (DHS-C2), de l'exon 1a et de 442 pb en amont de l'exon 2, est actif dans les granulocytes. Le transgène B-p-GFP, qui contient la région DHS-C3 et l'exon 1b, est prédominant dans le lignage B et dans une moindre mesure dans le lignage myéloïde. Il est également exprimé dans les premiers stades de différenciation des thymocytes DN1 à DN3. Il faut intégrer la région DHS-C6, située entre les exons 3 et 4, pour observer une expression dans les thymocytes au delà du stade DN3, un haut niveau d'activité dans les cellules T périphériques, une augmentation de l'expression des transgènes dans la majorité du compartiment myéloïde et, ainsi, induire une expression d'Ikaros comparable à celle rencontrée dans la majorité des lignages hématopoïétiques.

Les mécanismes de régulation d'Aiolos n'ont pas été étudiés à l'heure actuelle. Les travaux de Nera et *coll* dans une lignée de cellules B issue du poulet ont cependant mis en évidence en 2006, l'action exercée par le facteur de transcription Pax5 sur la régulation des transcrits Aiolos, ces derniers étant sous exprimés dans les cellules Pax5^{-/-} (Nera *et al.*, 2006). D'autre part, Thompson et *coll* ont montré récemment, dans des cellules pré-B II murines, le rôle activateur exercé par le pré-BCR et la protéine adaptatrice SLP-65 (Thompson *et al.*, 2007).

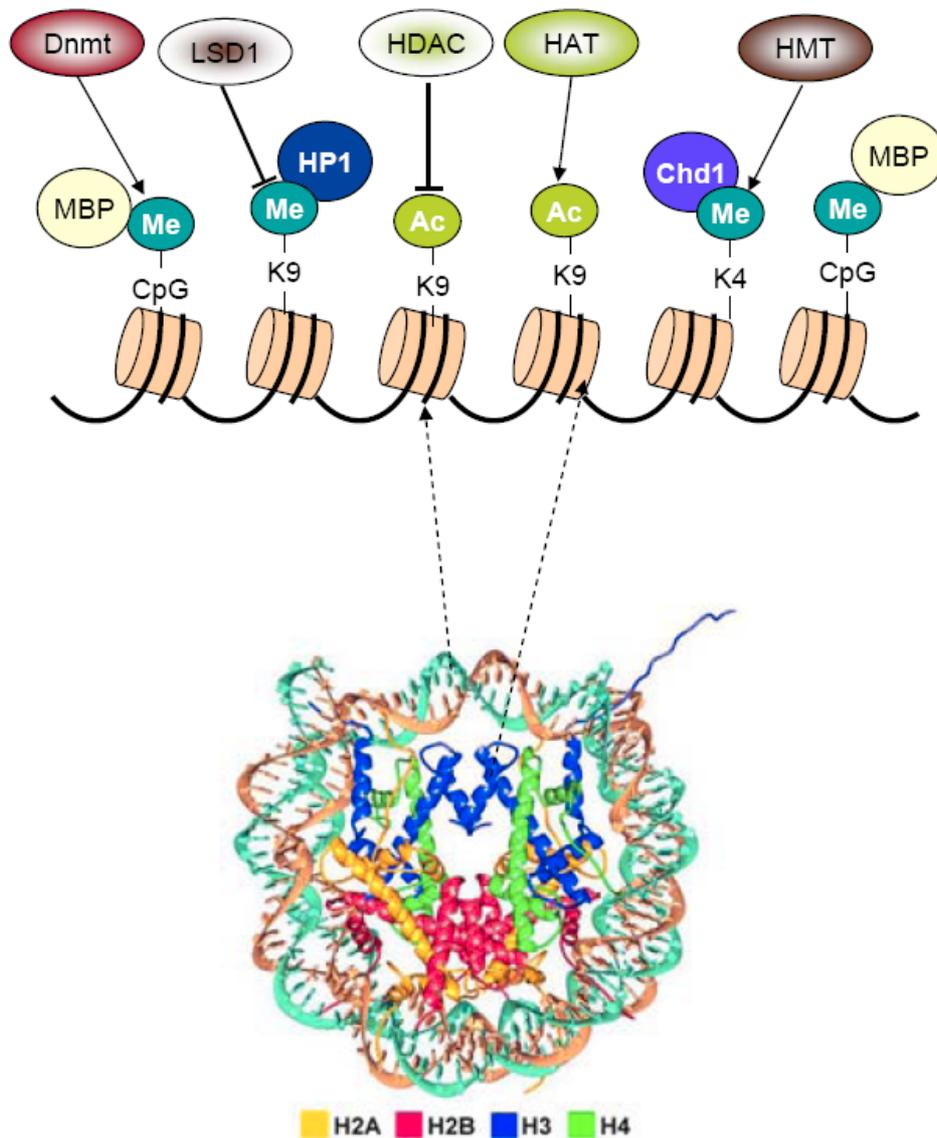


Figure 15 : Structure de la chromatine, principales modifications covalentes et protéines associées

Le nucléosome, particule élémentaire de la chromatine, est constitué d'un octamère d'histones H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel sont enroulées 146 pb d'ADN. Les principales modifications covalentes de l'ADN et des histones décrites dans cette introduction, ainsi que les enzymes responsables de ces modifications et les protéines s'y associant, sont également représentées. Me : méthylation, Ac : acétylation, Dnmt : Dinucléotide méthyltransférases, HMT : Histone méthyltransférase, HAT : Histone acétyltransférase, HDAC : Histone déacétylases, MBP : Protéine se liant à l'ADN méthylé (D'après Luger *et al.*, 1997 – Feinberg et Ticko, 2004).

C. L'épigénétique : une composante indispensable de la régulation transcriptionnelle

Lors de leur développement dans la moelle osseuse, les cellules hématopoïétiques s'engagent irréversiblement vers un lignage donné. À l'exception des réarrangements des gènes des Ig et du TCR qui sont la conséquence de changements de l'information génétique à l'intérieur des cellules, cet engagement est initié et maintenu sans aucun changement dans la séquence d'ADN et est la conséquence de l'expression spécifique d'une série de gènes, et de l'extinction ou de la répression des autres.

La transcription est contrôlée en partie par l'assemblage de complexes pertinents de facteurs de transcription, au niveau des régions régulatrices des gènes. Ces derniers peuvent être spécifiquement exprimés dans un tissu donné ou être présents dans toutes les cellules mais être bloqués par une série de mécanismes (modifications post-traductionnelles, recrutement de protéines répressives ou séquestration dans un autre compartiment nucléaire). Cependant, le type de facteurs de transcription présent dans une cellule n'est pas suffisant pour expliquer la totalité du spectre possible d'activité des gènes.

La variété des réponses observées peut être la conséquence de modifications biochimiques non codées par l'ADN qui modulent l'accessibilité des gènes. Ces paramètres, héréditaires au cours des divisions cellulaires, qui contribuent à la régulation d'états fonctionnels au sein d'une cellule sans affecter directement la séquence d'ADN, sont regroupés sous le terme d'épigénétique (Bernstein *et al.*, 2007 ; Feinberg et Tycko, 2004 ; Goldberg *et al.*, 2007).

I. Des modifications épigénétiques de l'ADN et des histones

Dans le noyau, le génome s'organise en une structure nucléoprotéique, appelée chromatine. Au plan moléculaire, l'unité élémentaire de la chromatine, le nucléosome, comprend une particule cœur et une région internucléosomique. La particule cœur est composée de 146 paires de bases d'ADN, enroulées (1,65 tour) autour d'un octamère protéique comprenant deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4, la région internucléosomique (80 pb environ) étant pour sa part caractérisée par la présence de l'histone H1 (Fig. 15) (Luger *et al.*, 1997).

L'ADN et les histones font l'objet de modifications, covalentes ou non, qui modifient les propriétés des nucléosomes, l'accessibilité de la chromatine et la capacité de la machinerie transcriptionnelle à interagir avec sa séquence cible et à induire la transcription.

1. La méthylation de l'ADN

a) Des génomes de mammifères globalement méthylés sauf au niveau des îlots CpG

Le génome des vertébrés contient la proportion la plus importante de CpG méthylés de tout le règne animal, avec une distribution dispersée sur la totalité des régions, d'où le terme de méthylation globale (Bird, 2002). Dans les cellules somatiques humaines, les cytosines méthylées représentent ainsi 1% de la totalité des bases de l'ADN et touchent environ 70 à 80% des dinucléotides CpG du génome. Une des caractéristiques les plus remarquables des profils de méthylation rencontrés chez les vertébrés est la présence d'îlots CpG, régions définies par une taille supérieure à 100 pb, un pourcentage de bases C ou G supérieur à 50% et un ratio de dinucléotides CpG observés, par rapport aux dinucléotides CpG attendus, supérieur à 0,6 (Gardiner-Garden et Frommer, 1987). Ces îlots CpG sont généralement déméthylés, situés le plus souvent en amont des gènes, dans des zones riches en sites de fixation de facteurs de transcription et jouent un rôle fondamental dans la régulation transcriptionnelle. Ils sont notamment présents dans les régions promotrices des gènes de « ménage ». On estime ainsi que près de 60% des gènes seraient associés à de tels îlots (Antequera et Bird, 1993). Des études de plus en plus nombreuses montrent cependant l'existence d'îlots CpG méthylés, notamment ceux associés à des gènes à expression tissu spécifique (De Smet *et al.*, 1999).

b) Une modification covalente catalysée par des ADN méthyltransférases

La méthylation de l'ADN est une modification covalente au cours de laquelle un groupement méthyl est transféré depuis la S-adénosylméthionine (SAM) vers le carbone 5 d'une cytosine de l'ADN. Cette réaction a lieu symétriquement sur les deux brins d'ADN et presque exclusivement au niveau des dinucléotides CpG. Elle fait intervenir une famille d'enzyme, les Dinucléotides méthyltransférases ou Dnmt, les plus importantes d'entre elles étant, chez les mammifères, les Dnmt1, 3a et 3b, qui diffèrent par le type de réactions qu'elles sont capables de catalyser (Goll et Bestor, 2005).

Dnmt1 intervient dans le maintien des profils de méthylation. Elle est surexprimée au cours de la phase S et est recrutée à la fourche de réplication. Son activité hémiméthylase lui permet d'induire la méthylation de l'ADN nouvellement synthétisé et de réaliser une copie des profils de méthylation des brins pères (Bestor, 1988 ; Bestor, 1992).

Les Dnmt 3a et 3b interviennent dans l'établissement des profils de méthylation. Elles sont capables de catalyser une méthylation *de novo* de l'ADN, à condition que celui-ci soit dans un état accessible (Okano *et al.*, 1999 ; Okano *et al.*, 1998). Cette méthylation *de novo*

semble intervenir au cours du développement embryonnaire ainsi que dans les cellules somatiques, notamment lors du vieillissement ou de la cancérisation (Jones, 2002). Les Dnmt3a et 3b co-localisent également avec les fourches de réplication lors de la phase S tardive et sont présentes, dans les cellules au repos, au niveau des séquences répétées de l'HC-PC (Ge *et al.*, 2004).

Les Dnmt1 permettent la conservation de 95% des CpG méthylés au cours de la réplication, la méthylation de 5% des CpG serait donc perdue à chaque cycle cellulaire. Dnmt3a et 3b peuvent corriger en partie les erreurs des Dnmt1 en induisant la méthylation de sites non méthylés sur le brin d'ADN père. Les profils de méthylation des brins fils restent ainsi globalement inchangés, même s'ils diffèrent à l'échelle des dinucléotides CpG (Laird *et al.*, 2004).

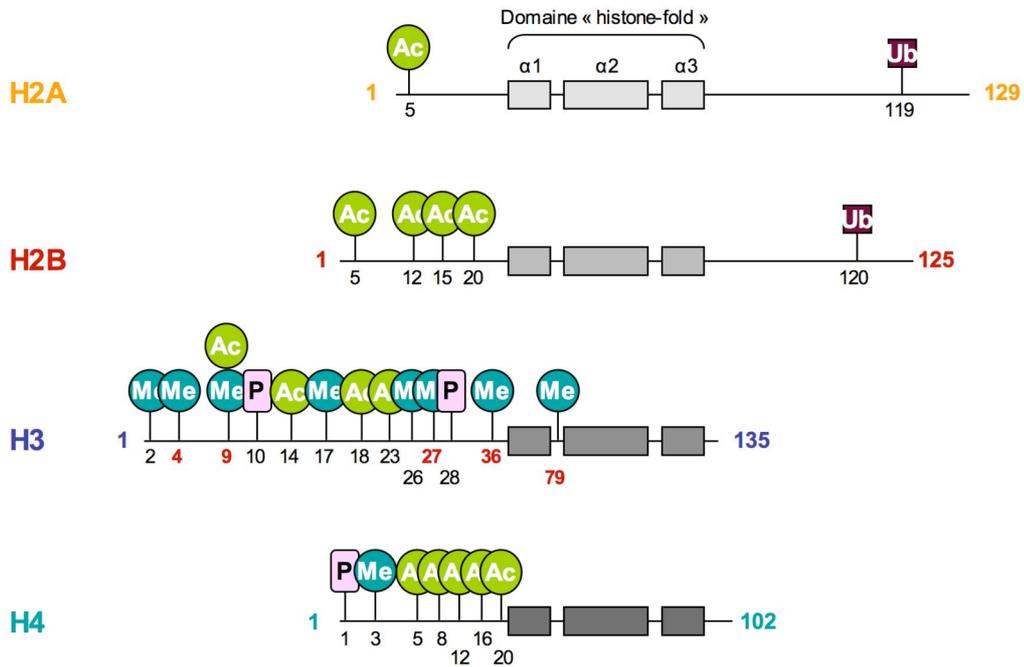
La contrepartie à la maintenance de la méthylation et à sa propagation est la déméthylation. Elle peut être la conséquence passive d'un fonctionnement insuffisant de la Dnmt1 au cours de la réplication (quantité ou fidélité trop faibles, exclusion de la fourche de réplication). Ceci induit une copie incorrecte de la méthylation du brin père et une perte progressive de la méthylation au cours des réplications successives. Ce mécanisme est notamment responsable de la déméthylation du génome maternel après la fécondation (Surani *et al.*, 2007). Il existe également de nombreuses preuves d'une déméthylation active, indépendante de la réplication. C'est le cas notamment de la déméthylation de l'ADN du pronucléus mâle dans l'œuf fécondé, du promoteur du gène *bdnf* (Brain Derived Neurotrophic Factor) dans les cellules neuronales ou du promoteur de l'IL-2 dans les cellules T activées (Bruniquel et Schwartz, 2003 ; Martinowich *et al.*, 2003 ; Surani *et al.*, 2007). Cependant, les molécules responsables de cette déméthylation active des CpG symétriquement méthylés n'ont pas encore été découvertes à l'heure actuelle.

2. Des modifications covalentes des histones

a) La notion de code histone

Les histones sont de petites protéines basiques (de 11 à 22 kDa) contenant un domaine globulaire de nature hydrophobe, le domaine « histone-fold », impliqué dans la dimérisation des histones (Fig. 16A). De part et d'autre de ce domaine très conservé s'étendent les extrémités amino- et carboxy-terminales qui émergent à la surface du nucléosome. Ces régions, basiques, sont très fortement conservées d'une espèce à l'autre. Certains résidus spécifiques des extrémités amino-terminales, et dans une moindre mesure des extrémités carboxy-terminales et du cœur des histones, sont les cibles privilégiées de nombreuses modifications post-traductionnelles. Les modifications les plus étudiées à

A



B

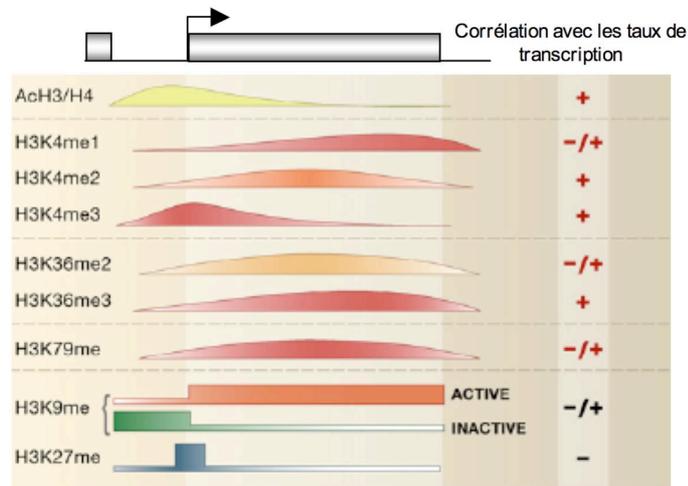


Figure 16 : Le code histone

A. Localisation des principales modifications des histones H2A, H2B, H3 et H4 (D'après Ray-Gallet et *al.*, 2005).

B. Profils de distribution des résidus méthylés et/ou acétylés sur les histones H3 situées au niveau du site d'initiation de la transcription d'un gène actif (D'après Li et *al.*, 2007).

l'heure actuelle sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitylation, mais d'autres modifications ont également été décrites telles que l'ADP-ribosylation, la sumoylation, la glycosylation ou la biotinylation (Fig. 16A) (Ray-Gallet *et al.*, 2005). Toutes ces modifications covalentes ont lieu sur des résidus spécifiques (lysines pour l'acétylation, lysines ou arginines pour la méthylation, sérines ou thréonines pour la phosphorylation), à des degrés parfois variables (entre 1 et 3 groupements méthyl par résidu) et sont catalysées par des enzymes spécifiques (Kouzarides, 2007 ; Li *et al.*, 2007).

Les modifications des histones présentent des profils de distribution distincts. Leur répartition, notamment sur les régions en amont du promoteur, sur le cœur du promoteur, sur les régions 5' et 3' du cadre ouvert de lecture (« Open Reading Frame » ou ORF) est étroitement contrôlée et intervient de manière critique dans de nombreux processus nucléaires (Fig. 16B). L'état d'acétylation ou de méthylation d'une histone varie rapidement au cours du temps, en fonction des conditions cellulaires et en particulier des stimulus arrivant à la surface cellulaire. D'autre part, la présence d'un type de modification sur une histone particulière peut influencer, positivement ou négativement, la modification d'un autre site sur cette même histone. Certaines modifications sont, par ailleurs, mutuellement exclusives. Ainsi la Lysine 9 des histones H3 est soit méthylée (H3K9me), soit acétylée (H3K9ace). Ces modifications post-traductionnelles forment ainsi un « code histone », complexe et interconnecté, qui joue notamment un rôle majeur dans l'accessibilité des séquences cibles à leurs facteurs de transcription respectifs et dans l'expression des gènes situés sous leur contrôle (Jenuwein et Allis, 2001 ; Strahl et Allis, 2000).

b) L'acétylation des histones

L'acétylation des histones est le résultat du transfert d'un groupement acétyl depuis l'acétyl-coenzyme-A vers un résidu lysine donné d'une histone par une Histone Acetyl Transferase (HAT). Le niveau d'acétylation d'un résidu à un instant donné résulte ensuite d'un équilibre dynamique entre les activités des HAT et des histones désacétylases (HDAC), qui catalysent la réaction inverse.

Il existe deux types d'HAT qui diffèrent par leur localisation cellulaire et leur spécificité de substrat (Sternier et Berger, 2000). Les HAT de type B (HAT1 et HAT2) sont essentiellement localisées dans le cytoplasme et acétylent les histones nouvellement formées. Les HAT de type A sont des enzymes nucléaires qui agissent généralement en tant que régulateurs transcriptionnels. Elles sont divisées en plusieurs sous-groupes dont les familles GCN5/PCAF, MYST, CBP/p300, SRC ou TAF_{II}250. Elles agissent, la plupart du

Tableau 2 : La famille des Histone Acétyltransférases

(D'après Marmorstein, 2001)

HAT	Organisme	Histone
Famille GCN5/PCAF		
Gcn5 PCAF	Levure à Homme Homme	H3
Famille MYST		
Sas2	Levure	H4
Sas3	Levure	
Esa1	Levure	(H3)
Tip60	Homme	
MOZ	Homme	
HBO1	Homme	
Famille TAF_{II}250		
	Levure à Homme	H3
Famille CBP/p300		
	Ver à Homme	Toutes
Famille SRC		
SRC-1		
ACTR/AIB1/pCIP		
TRAM-1/RAC3	Souris et Homme	H3/H4
SRC-3		
TIF-2		
GRIP1		

temps, sur des résidus localisés sur les queues amino-terminales, plus facilement accessibles, des histones H3 ou H4 (Tableau 2).

En plus de leur domaine acétyltransférase, certaines HAT possèdent des bromodomaines ou des domaines kinase qui modifient leur activité. Les bromodomaines sont des régions d'une centaine d'acides aminés, très conservées chez les eucaryotes, qui définissent une poche à forte affinité pour les lysines acétylées (Dhalluin *et al.*, 1999 ; Marmorstein, 2001). Plusieurs indications montrent, par ailleurs, un lien entre acétylation et phosphorylation. D'une part, ces deux modifications ont lieu sur les mêmes extrémités d'histone. D'autre part, des études réalisées en 2000 par Cheung *et al.* et par Lo *et al.* ont montré que l'acétylation des Lysines 14 des histones H4 était augmentée de 5 à 10 fois lorsque ces histones étaient préalablement phosphorylées en Ser10 (Cheung *et al.*, 2000 ; Lo *et al.*, 2000).

Les HAT sont par ailleurs associées à des complexes multiprotéiques plus larges qui modulent leur activité. Esa1 (famille MYST) représente la sous-unité catalytique du complexe HAT « H4-specific NuA4 » (Nucleosome Acetyltransferase of histone H4) tandis que Gcn5 appartient aux complexes Ada et SAGA. Gcn5 acétyle préférentiellement H3K14 et, dans une moindre mesure, H4K8 et H4K16. Son association aux complexes Ada et SAGA étend son activité à d'autres résidus des histones H3 et H2B (Marmorstein, 2001).

Les HDAC sont, quant à elles, regroupées en quatre classes (Gregoretto *et al.*, 2004 ; Yang et Seto, 2003). Les HDAC1, 2, 3 et 8 appartiennent à la classe I et sont localisées dans le noyau. Elles sont apparentées à la protéine Rpd3 de la levure et possèdent un domaine catalytique très conservé et de grande taille (près des deux tiers des HDAC1, 2 et 3). HDAC1 et HDAC2 sont regroupés dans deux complexes majeurs de désacétylation, les complexes Sin3 et NuRD/Mi-2 β (Wade *et al.*, 1998 ; Xue *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 1999). HDAC3 appartient aux complexes corépresseurs SMRT et N-CoR (Li *et al.*, 2000) et est capable, à la différence de HDAC1 et 2, de passer du noyau au cytoplasme.

Les HDAC de la classe II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10) ont été identifiées par leur homologie avec l'histone désacétylase Hda1p présente chez la levure. Elles sont plus grandes que les HDAC de classe I et sont présentes à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Les HDAC 4 et 5 peuvent être bloquées dans le cytoplasme par la protéine 14.3.3, établissant ainsi à nouveau un lien entre acétylation et phosphorylation des protéines (Grozinger et Schreiber, 2000).

Les HDAC de la classe III (SIRT1 à 7) sont similaires au répresseur transcriptionnel Sir2 de la levure (Silent Information Regulator) et utilisent la coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) comme co-facteur. Enfin l'HDAC11 définit la classe IV à elle seule.

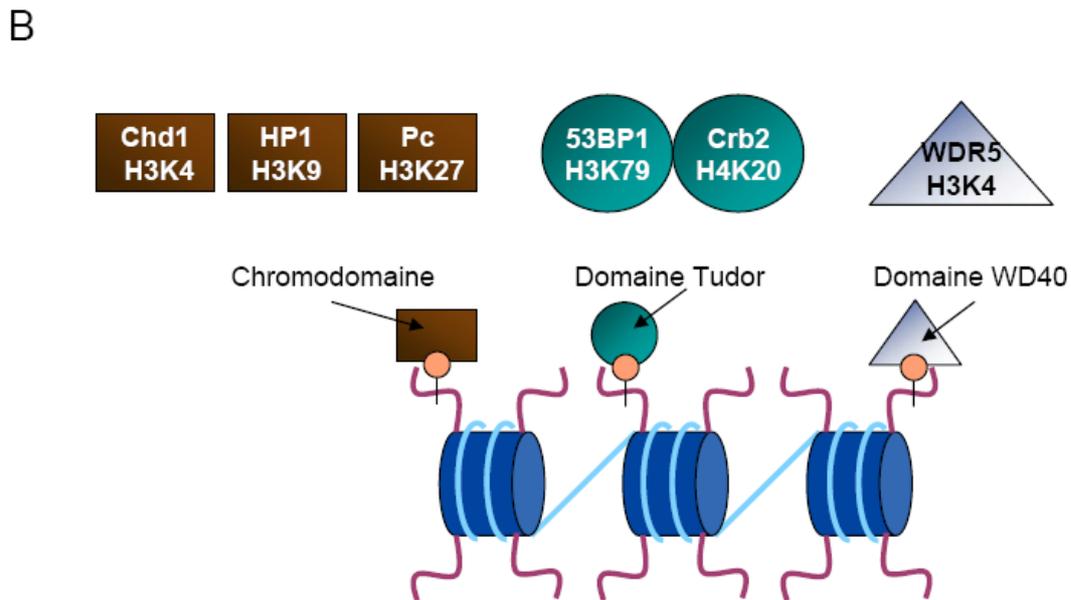
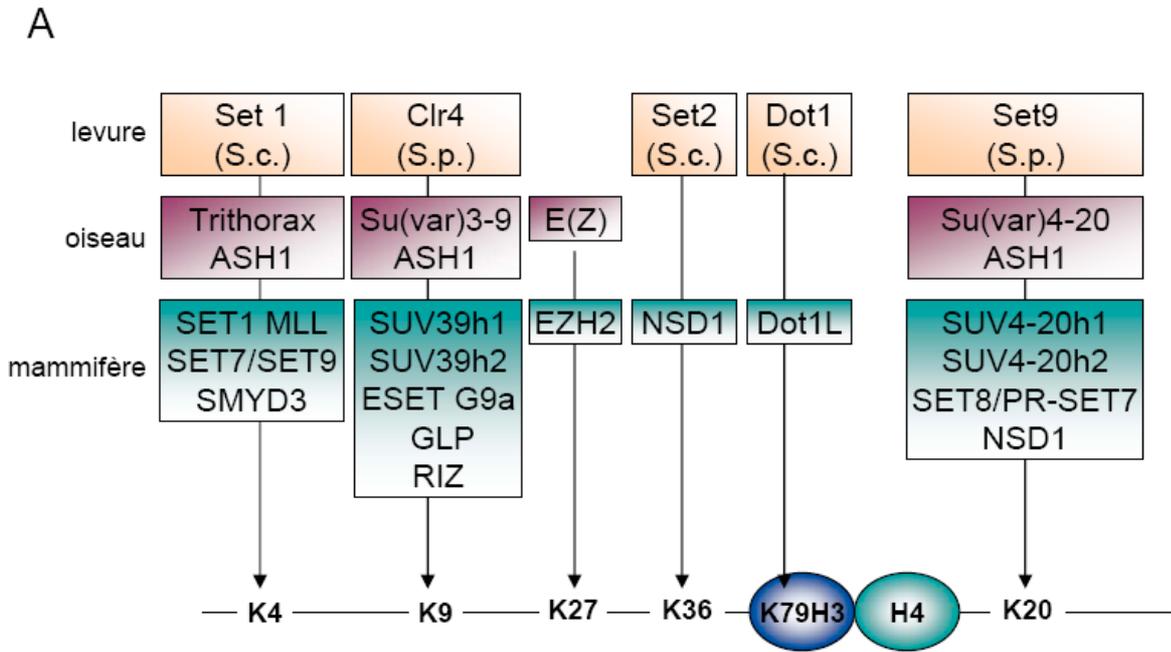


Figure 17 : Des histones méthyltransférases et des protéines de liaison aux histones méthylés, spécifiques d'un résidu histone donné

A. Principales HMT, résidus cible et organismes dans lesquels elles ont été découvertes (S.c. : *Saccharomyces cerevisiae* ; S.p. : *Schizosaccharomyces pombe*). **B.** Protéines reconnaissant les histones méthylées et type de domaine utilisé (chromodomaine, Tudor ou WD40) en fonction du résidu modifié (D'après Martin et Zhang, 2005).

c) La méthylation des histones

La méthylation des histones est une modification covalente au cours de laquelle un groupement méthyle est transféré depuis la SAM vers un atome d'azote d'un résidu lysine ou arginine. Cette méthylation peut être multiple : mono à triméthylation pour les lysines et mono à diméthylation pour les arginines.

Les histones méthyltransférases sont regroupées en trois catégories : la famille PRMT (Protein Arginin Methyltransferase) assure la méthylation des arginines (Krause *et al.*, 2007). La deuxième catégorie est composée des protéines à domaine SET et comprend en particulier les protéines Su(var) ou « Suppressor of variegation » (Martin et Zhang, 2005 ; Rea *et al.*, 2000). Parmi celles-ci, on trouve de nombreuses protéines associées à l'hétérochromatine comme les membres de la famille Su(var)3-9, composées d'un chromodomaine aminoterminal et d'un domaine SET carboxyterminal, à activité méthyltransférase dépendante de la présence de cystéines. Enfin, la troisième famille est composée des protéines DOT1/DOT1L, qui ne possèdent pas de domaine SET (Feng *et al.*, 2002). À la différence des HAT, ces enzymes sont souvent spécifiques d'un résidu donné sur une histone donnée (Fig. 17A). Ainsi, l'activité méthyltransférase des formes humaine SUV39H1 et murine (*Suv39h1*) de Su(var)3-9 (isolée chez la Drosophile) est spécifique des lysines 9 des histones H3. D'autre part, elle empêche l'acétylation de ce même résidu et inhibe la phosphorylation de Ser10 tout en permettant l'acétylation de Lys14.

Les groupements méthyle représentent des sites potentiels de liaison d'effecteurs aval comme les protéines à chromodomaine (Chd1, HP1 ou Pc), à domaine Tudor (53BP1 ou Crb2) ou à domaine « WD40-repeat » (WDR5), qui sont, là encore, spécifiques d'une modification donnée (Fig. 17B). Ainsi, la triméthylation de H3K9 est reconnue par HP1, celle de H4K20 par Crb2 et celle de H3K27 par Pc (Polycomb) (Martin et Zhang, 2005). L'efficacité de liaison de ces protéines aux lysines méthylées pourrait, par ailleurs, être affectée par la présence d'autres modifications sur des résidus adjacents.

Pendant de nombreuses années, on a pensé que la méthylation des histones, à la différence de l'acétylation, était une modification permanente. La découverte en 2004 par Shi et *coll* de l'existence d'histones déméthylases a remis cette théorie en question (Shi *et al.*, 2004). LSD1 induit en effet la déméthylation des H3K4 et H3K9, mono et diméthylées. Les déméthylases de type Jumonji assurent quant à elles la déméthylation des H3K4, H3K9 et H3K36 di et triméthylées (Klose *et al.*, 2006). La méthylation des arginines peut d'autre part être retirée par la protéine PADI4 (Protein Arginine Deaminase 4) qui convertit les arginines méthylées en cytrulline (Cuthbert *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004).

3. Des modifications non covalentes

Les nucléosomes sont des structures relativement stables qui présentent une mobilité intrinsèque réduite. Ils possèdent cependant des capacités dynamiques importantes, indispensables à tous les processus impliquant les chromosomes (transcription, réplication, réparation de l'ADN, ...). Outre la méthylation de l'ADN et les modifications covalentes des histones, les propriétés dynamiques des nucléosomes sont rendues possibles par l'altération de leur composition, à travers le remplacement des histones classiques par des variants. Elles sont également la conséquence du fonctionnement de complexes protéiques de remodelage de la chromatine, qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP afin de modifier les contacts entre l'ADN et les histones et déplacer les nucléosomes sur l'hélice d'ADN.

a) Les variants des histones

Les histones H2A, H2B, H3, H4, insérées au cours de la phase S, ont longtemps été considérées comme les composants de tous les nucléosomes. Une analyse plus précise a cependant mis en évidence l'existence de formes variantes des histones chez différents organismes (Kamakaka et Biggins, 2005). Elles se distinguent notamment des histones « classiques » par le fait qu'elles sont exprimées en dehors de la phase S et insérées dans la chromatine indépendamment de la réplication de l'ADN. Ainsi, le variant H2A.Z (ou Htz1 chez la levure) peut être déposé dans le nucléosome, soit par réaction d'échange d'histones dépendante de l'ATP, soit avec l'aide de la protéine chaperonne Nap1.

b) Les complexes de remodelage de la chromatine

Les enzymes de remodelage de la chromatine dépendante de l'ATP appartiennent toutes à la même famille SNF2, d'ATPases dépendantes de l'ADN. Elles sont subdivisées en cinq sous-familles, en fonction des domaines fonctionnels présents : SWI/SNF, NuRD/Mi2/CHD, ISWI, INO80 et SWR1 (Saha *et al.*, 2006). Les protéines de la famille SWI/SNF sont composées d'une sous-unité ATPasique, contenant un domaine ATPase et un bromodomaine, et d'au minimum cinq protéines supplémentaires qui définissent les différents complexes de remodelage SWI/SNF. Les membres de la famille ISWI contiennent des domaines SANT et SLIDE, qui leur permettent de reconnaître les queues des histones et les ADN internucléosomiques, et sont accompagnées d'une seule protéine additionnelle (NURF, CHRAC ou ACF). Enfin, les membres de la famille CHD sont caractérisés par la présence de deux chromodomains. Parmi ces derniers, le complexe le mieux caractérisé est le complexe NuRD, qui comprend notamment, en plus de l'ATPase Mi2- β , les HDAC1 et

2, ainsi que les protéines de liaison à l'ADN méthylé MBD3a et b (Wade *et al.*, 1998 ; Xue *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 1999).

II. Impact des modifications épigénétiques sur la régulation transcriptionnelle

Les fonctions des modifications des histones et de la méthylation de l'ADN peuvent être divisées en deux principales catégories :

- L'établissement d'un environnement chromatinien global, au niveau du génome complet, qui assure la distinction entre des régions d'euchromatine où l'ADN est accessible à la transcription, et des régions d'hétérochromatine, où l'ADN est inaccessible.
- L'orchestration de fonctions au niveau de l'ADN comme la transcription, la réparation ou la réplication. Cette fonction nécessite le recrutement ordonné d'une machinerie qui permet notamment de déplacer les nucléosomes au cours de la progression de l'ARN polymérase.

1. Deux types d'environnements chromatinien

a) L'hétérochromatine constitutive

L'hétérochromatine constitutive désigne des régions très condensées du génome qui assurent la protection des extrémités des chromosomes ainsi que la séparation des chromosomes lors de la mitose. Ces régions sont souvent composées de séquences d'ADN répétées, comme les séquences satellitaires qui entourent les centromères, et sont considérées comme pauvre en gènes (Arney et Fisher, 2004). Elles représentent la plus grande part du génome et peuvent exercer un très fort pouvoir répresser sur la transcription des gènes, notamment quand ces derniers sont insérés à proximité des séquences satellitaires.

L'hétérochromatine constitutive est caractérisée par une triméthylation importante des lysines 9 et 27 des histones H3 (H3K9me3, H3K27me3) et des lysines 20 des histones H4 (H4K20me3), une hypoacétylation des histones et une hyperméthylation de l'ADN (Peters *et al.*, 2003 ; Rice *et al.*, 2003 ; Schotta *et al.*, 2004). Cette hyperméthylation de l'hétérochromatine, en particulier des séquences satellitaires répétitives de l'HC-PC, serait due à l'activité méthyltransférase de Dnmt3b, recrutée dans cette région du génome via un domaine PWWP (proche du domaine Tudor) (Ge *et al.*, 2004 ; Okano *et al.*, 1999). On note d'autre part, un enrichissement en protéines HP1 α , au niveau des centromères des cellules murines et humaines. Ces protéines, recrutées via H3K9me3, contribuent à la stabilité des

structures chromatinienne, à la compaction des chromosomes lors de la mitose, ainsi qu'à l'inhibition transcriptionnelle (Bannister *et al.*, 2001 ; Lomberk *et al.*, 2006).

b) L'euchromatine

L'euchromatine désigne une petite fraction du génome composée de gènes activement transcrits ou à fort potentiel d'activation. Les histones des séquences génomiques situées dans ces régions sont généralement hyperacétylées (en particulier au niveau des îlots CpG), les histones H3 sont enrichies en lysines 4 et 79 méthylées et en résidus phosphorylés (Ser10 notamment), les Arg 2, 17, 26 des histones H3 et les Arg 4 des histones H4 sont également méthylées, signe d'une activation transcriptionnelle (Arney et Fisher, 2004). La plupart des régions d'euchromatine contiennent probablement un mélange de locus transcriptionnellement actifs ou activables, séparés par des gènes réprimés transitoirement (ou hétérochromatine facultative). Les régions actives ont une structure chromatinienne ouverte avec des nucléosomes faiblement attachés à l'ADN et moins densément répartis.

2. Chromatine et assemblage du complexe d'initiation de la transcription

Un cycle classique de transcription commence par la fixation d'activateurs transcriptionnels en amont du cœur du promoteur (comprenant le site d'initiation de la transcription et, le plus souvent, une boîte TATA). Cet événement conduit au recrutement de complexes adaptateurs comme le complexe SAGA à activité HAT ou de médiateurs, qui ont tous deux pour rôle de faciliter la fixation des facteurs généraux de transcription (Li *et al.*, 2007 ; Marmorstein, 2001). L'ARN polymérase II (ARN Pol II) se positionne sur la région cœur du promoteur, en association avec TFIID, TFIIA et TFIIIB, et forme ainsi la forme fermée du complexe de pré initiation (PIC). TFIIH fixe ensuite 11 à 15 pb de l'ADN et les met au contact de l'ARN Pol II afin d'initier la synthèse de l'ARN (PIC ouvert). Le domaine carboxyterminal de l'ARN Pol II est phosphorylé par TFIIH au cours des 30 premières paires de bases d'élongation (en position Ser5) : l'ARN Pol II perd ses contacts avec les facteurs généraux de transcription et commence l'étape d'élongation proprement dite. La Ser2 du domaine carboxyterminal de l'ARN Pol II est, quant à elle, phosphorylée par la kinase Cdk2 lorsque l'ARN Pol II atteint la région 3' de l'ORF. Ces phosphorylations contrôlent le recrutement des facteurs nécessaires au bon déroulement du processus d'élongation, dont le complexe PAF/RTF.

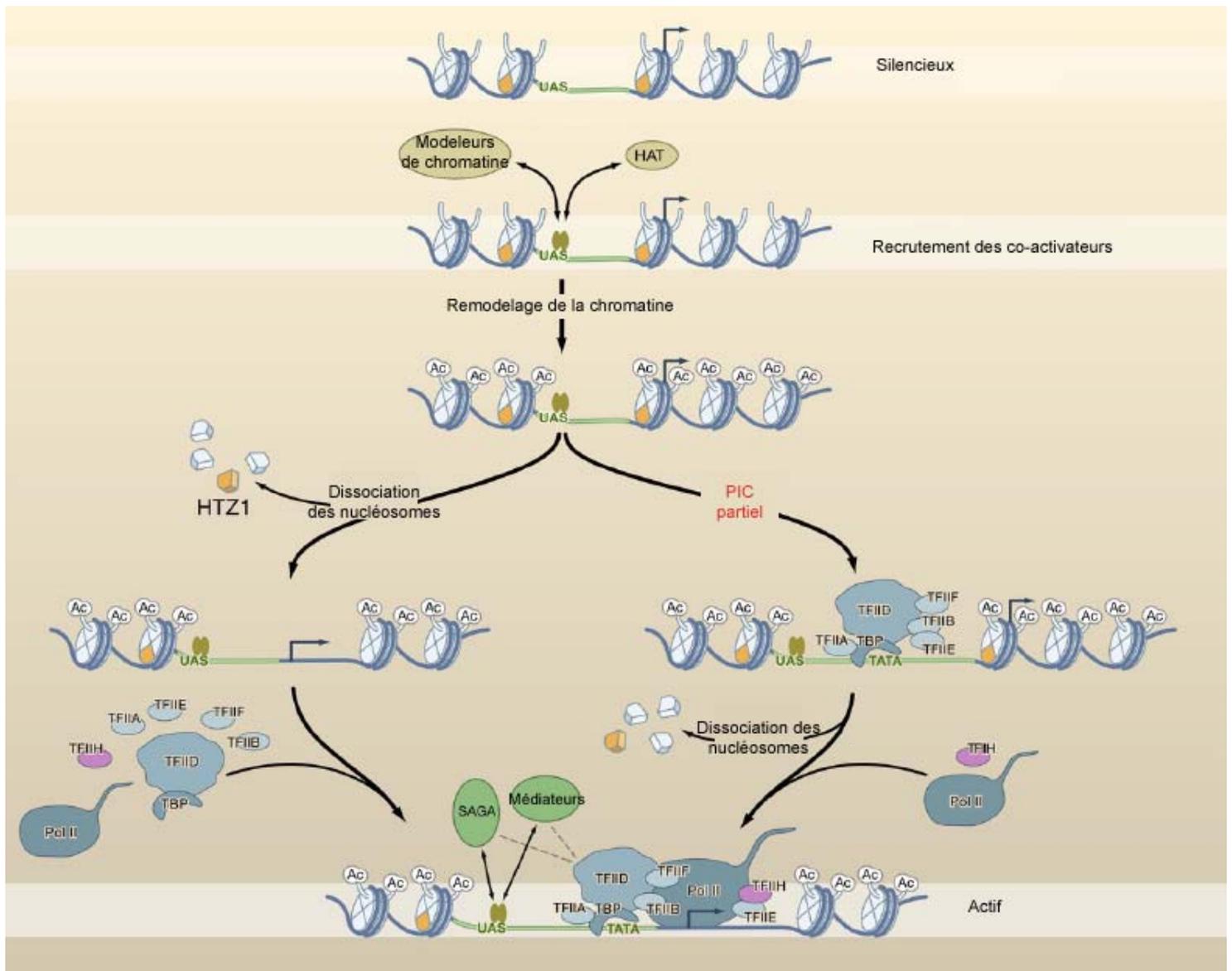


Figure 18 : Modèles de remodelage de la chromatine lors de l'initiation de la transcription

Après ciblage de séquences activatrices en amont du site d'initiation de la transcription (UAS), les activateurs recrutent des co-activateurs de type SAGA ou SWI/SNF qui induisent une acétylation des histones et augmentent la mobilité des nucléosomes. Dans le modèle de gauche, cette combinaison acétylation/remodelage est suffisante pour induire la dissociation des nucléosomes et l'assemblage du complexe de pré-initiation. Dans le modèle de droite, un complexe partiel de pré-initiation est mis en place avant dissociation des nucléosomes. La fixation de l'ARN Pol II et de TFIH permet ensuite le déplacement des nucléosomes et la formation d'un PIC complet (D'après Li *et al.*, 2007)

Lorsque l'ADN est empaquetée dans la chromatine, les facteurs de transcription doivent élaborer des stratégies variées pour assurer leur liaison à leur ADN cible. Plusieurs études ont démontré que les facteurs de transcription pouvaient se lier à l'ADN nucléosomique (Adams et Workman, 1995). D'autre part, la densité des nucléosomes est plus faible dans les régions promotrices et au niveau des sites fonctionnels de fixation des facteurs de transcription (Lee *et al.*, 2004). Ce modèle simplifié ne permet cependant pas d'expliquer la fixation de tous les coactivateurs. Kornberg et Lorch (1999) ont montré que la structure du nucléosome représentait un obstacle significatif à la formation du complexe de pré initiation (PIC) (Kornberg et Lorch, 1999). Ces derniers peuvent être déplacés le long de l'ADN par les complexes de remodelage de la chromatine. Des études réalisées sur les promoteurs PHO5 et HSP82 de la levure ont démontré également que les histones pouvaient être « perdues » au moment de l'activation du gène et reformées à l'extinction du gène (Fig. 18) (Adkins *et al.*, 2004 ; Boeger *et al.*, 2004 ; Buccheri *et al.*, 2006). Cette dissociation des nucléosomes (plutôt que leur déplacement sur l'ADN) pourrait, en partie, être due à l'assemblage d'un PIC partiel, comprenant TFIIA, TFIID, TFIIB, TFII E, TFII F mais pas l'ARN Pol II et TFII H (Zanton et Pugh, 2006). Enfin, le variant H2A.Z (Htz1 chez la levure) est présent en quantité abondante dans les nucléosomes des promoteurs susceptibles d'activité transcriptionnelle (Zhang *et al.*, 2005). Ces variants sont facilement éjectables et leur positionnement dans le promoteur permettrait de dissocier rapidement les nucléosomes, autorisant ainsi l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription. Au cours de l'élongation transcriptionnelle, les nucléosomes seraient dissociés en amont de l'ARN Pol II puis rapidement reformés sur l'ADN après son passage (Workman, 2006).

3. L'impact des modifications covalentes des histones et de l'ADN sur la régulation transcriptionnelle

a) Modifications des histones et activation transcriptionnelle

Une augmentation de l'acétylation des lysines des histones au niveau des régions promotrices est presque exclusivement associée à une activation de la transcription. Pokholok a par ailleurs récemment démontré chez la levure que le niveau d'acétylation des histones H3 et H4 était proportionnel aux taux de transcription (Pokholok *et al.*, 2005). La présence du groupement acétyl neutralise la charge positive de la lysine et par voie de conséquence la conformation du nucléosome. L'attachement du nucléosome à l'ADN est alors plus lâche et l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN est favorisé (Morales et Richard-Foy, 2000 ; Wang *et al.*, 2000).

Un modèle d'activation transcriptionnelle fait appel à la coordination entre les domaines HAT, kinases et bromodomains (Marmorstein, 2001). Des protéines activatrices,

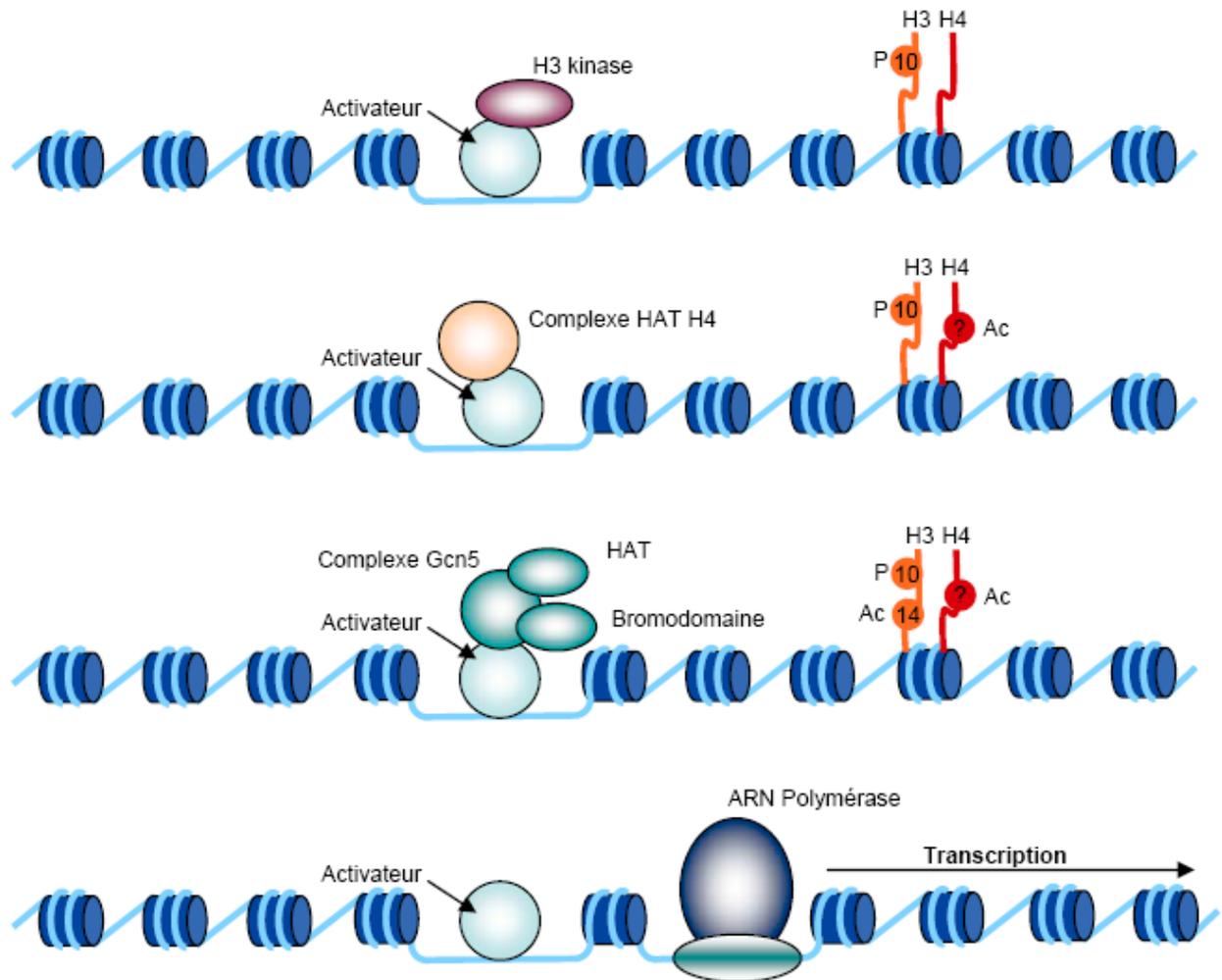


Figure 19: Modèle de coopération entre les HAT, les kinases et les protéines à bromodomaine lors de l'activation transcriptionnelle

Dans un premier temps, une kinase des histones H3 est recrutée au promoteur par un activateur et induit la phosphorylation d'H3Ser10. Un complexe d'HAT est recruté à son tour et acétyle des résidus lysine de l'histone H4. Le complexe Gcn5 induit ensuite l'acétylation des lysines 14 des histones H3. L'ensemble de ces modifications conduit au recrutement de l'ARN Pol II et des facteurs généraux de transcription et à l'activation de la transcription (D'après Marmorstein, 2001).

spécifiques d'une séquence donnée de l'ADN, pourraient ainsi être recrutées à l'ADN puis induire la phosphorylation des H3Ser10 par une histone kinase (Fig. 19). Les HAT Gcn5 et Esa1 seraient ensuite recrutées au promoteur à travers la combinaison d'interactions entre la sous-unité Tra1 du complexe SAGA (auquel appartient Gcn5) et des activateurs, d'une reconnaissance de lysines acétylées sur d'autres histones par le bromodomaine de Gcn5 ou par une interaction entre le domaine HAT de Gcn5 et la phosphosérine 10. La phosphorylation de la Ser10 favoriserait ensuite l'acétylation d'H3K14. L'extrémité de l'histone H3, à la fois phosphorylée et acétylée, induirait alors un réarrangement de la chromatine, résultant dans le recrutement de l'ARN Pol II et de la machinerie de transcription.

Il faut noter par ailleurs que des complexes de remodelage de la chromatine comme le complexe SWI/SNF sont nécessaires au recrutement des complexes HAT (Hassan *et al.*, 2001). La sous-unité Swi2 du complexe SWI/SNF contient ainsi un bromodomaine qui pourrait assurer un lien entre acétylation des histones et remodelage de la chromatine.

Les principaux sites de méthylation associés à une activation transcriptionnelle sont : H3K4, H3K36 et H3K79 (Kouzarides, 2007 ; Martin et Zhang, 2005 ; Vakoc *et al.*, 2006). La méthylation des résidus H3K36 et H3K4 a été directement liée au processus de transcription. Ainsi, chez la levure, H3K4me1 est enrichie dans les régions 3' des gènes actifs, H3K4me2 est essentiellement trouvée au milieu de la région codante, tandis que la triméthylation de H3K4 est majoritairement présente autour du site d'initiation de la transcription et à l'extrémité 5' de l'ORF (Fig. 16B) (Pokholok *et al.*, 2005). La méthylation d'H3K4 serait le résultat de l'activité de l'histone méthyltransférase Set1, associée à la forme initiale de l'ARN Pol II (phosphorylée en Ser5) et au complexe PAF. L'accumulation de groupements méthyl à l'extrémité 5' de l'ORF, au fur et à mesure des transcriptions, expliquerait le gradient de méthylation d'H3K4 observé le long de la région codante, la méthylation d'une histone donnée étant d'autant plus importante que le gène est fréquemment transcrit. Un tel phénomène est également observable chez l'homme, par l'intermédiaire du complexe de méthylation MLL/WDR5 (Wysocka *et al.*, 2005). La méthylation d'H3K4 pourrait servir de signal, définissant le début de la région à transcrire. Si elle n'affecte pas directement l'élongation transcriptionnelle, elle pourrait être reconnue par des facteurs ou des complexes de remodelage de la chromatine comme NURF ou Chd1 (Pray-Grant *et al.*, 2005 ; Sims *et al.*, 2005b).

La méthylation d'H3K36 représente une autre marque importante. Les H3K36 mono et diméthylées sont enrichies à l'extrémité 3' de l'ORF et seul le niveau de triméthylation de H3K36 semble être corrélé à la fréquence de transcription (Pokholok *et al.*, 2005 ; Rao *et al.*, 2005). Cette méthylation permet le recrutement de la protéine à chromodomaine Eaf3, une

sous-unité du complexe HDAC Rpd35 (Joshi et Struhl, 2005). Ce complexe enlèverait alors toutes les traces d'acétylation qui auraient pu être mises en place lors du processus de transcription et assurerait le retour de la chromatine dans son état initial.

La méthylation d'H3K79 est due à la protéine Dot1 et à ses homologues (Feng *et al.*, 2002). Cette méthylation est reconnue par la protéine 53BP1, par l'intermédiaire d'un domaine Tudor. 53BP1 intervient dans la réparation de l'ADN mais il n'y a aucune preuve à l'heure actuelle de son implication dans la transcription (Huyen *et al.*, 2004).

b) Modifications des histones et répression transcriptionnelle

La désacétylation des histones est corrélée à une répression transcriptionnelle. Cette modification augmente l'association entre la queue basique des histones et le squelette acide de l'ADN : les activateurs transcriptionnels accèdent alors moins facilement à l'ADN. D'autre part, l'action des HDAC n'est pas restreinte aux histones et la désacétylation des facteurs de transcription ou de l'ARN Pol II peut interférer dans leur fonction (Yang et Seto, 2003). Les HDAC sont, par ailleurs, impliquées dans de multiples voies de signalisation et font partie ou s'associent avec de nombreux complexes répresseurs comme les complexes NuRD, Sin3, CoREST, SMRT ou N-CoR (Li *et al.*, 2000 ; Wade *et al.*, 1998 ; Xue *et al.*, 1998). Elles collaborent également avec les complexes de remodelage de la chromatine. Cette activité fait partie intégrante du complexe NuRD, tandis que les complexes Sin3 et N-CoR/SMRT s'associent avec des composés des complexes SWI/SNF. Elles interagissent avec des Dnmt, ainsi qu'avec des HMT comme celles de la famille Su(var)3.9 (Bai *et al.*, 2005 ; Czermin *et al.*, 2001 ; Fuks *et al.*, 2000 ; Fuks *et al.*, 2001). Enfin, elles coopèrent avec des répresseurs transcriptionnels comme les facteurs Ikaros et Aiolos (Kim *et al.*, 1999 ; Koipally et Georgopoulos, 2002b ; Koipally *et al.*, 1999 ; Caballero *et al.*, 2007).

Trois sites de méthylation des lysines sont associés à une répression transcriptionnelle : H3K9, H3K27 et H4K20 (Kouzarides, 2007 ; Martin et Zhang, 2005). La méthylation des H3K9 des régions promotrices est impliquée dans la répression des gènes de l'euchromatine ainsi que dans la formation de l'hétérochromatine (Bannister *et al.*, 2001). Ce mécanisme de répression ferait intervenir le recrutement, au promoteur des gènes réprimés, d'histones méthyltransférases comme G9a, GLP, SUV39h1 ou SUV39h2 et des protéines à chromodomaine HP1 (α ou β) (Bannister *et al.*, 2001 ; Peters *et al.*, 2003 ; Rea *et al.*, 2000).

La monométhylation d'H3K27 est impliquée dans la localisation au niveau de l'HC-PC tandis que sa triméthylation joue un rôle dans la répression transcriptionnelle du gène HOX, dans l'inactivation du chromosome X ou dans le phénomène d'empreinte génomique. Elle

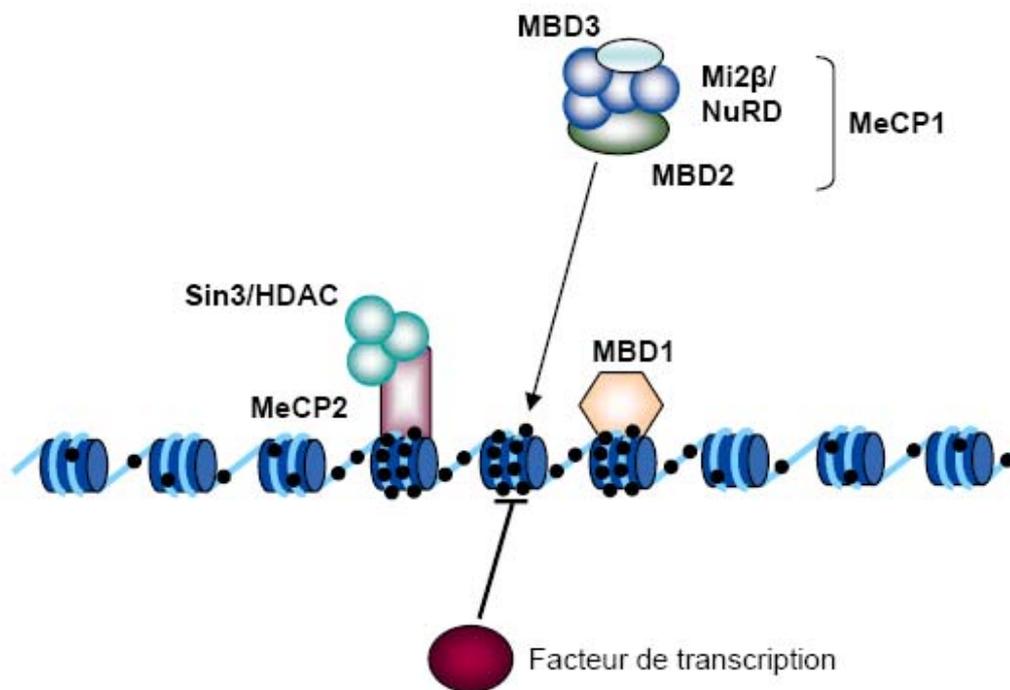


Figure 20 : Mécanismes de répression transcriptionnelle induits par la méthylation de l'ADN

L'ADN méthylé (cercles noirs) peut empêcher directement la fixation des facteurs de transcription à leur séquence cible ou recruter des protéines de liaison à l'ADN méthylé qui permettent à leur tour le recrutement de complexes de désacétylation des histones comme Sin3 ou Mi2 β /NuRD (D'après Bird 2002).

fait intervenir des méthylases du groupe Polycomb sous la forme d'un complexe E(Z)/EZH2, contenant au moins la protéine E(Z) (« Set-domain containing protein enhancer of Zeste » ou EZH2 chez l'homme), la protéine ESC (« Extra Sex Combs » ou EED chez l'homme) et la protéine SUZ12 (« suppressor of zeste 12 »). Un modèle de répression a été établi chez *D. melanogaster* où la triméthylation des H3K27, induite par le complexe E(Z), serait reconnue par la protéine à chromodomaine Pc appartenant au complexe répresseur PRC1 (= Polycomb Repressiv Complex 1). Il s'en suivrait l'ubiquitynation de H2A puis une répression par un mécanisme encore indéfini : recrutement d'une protéine effectrice du « silencing » ou blocage d'une étape spécifique de la transcription (Cao *et al.*, 2002).

c) La méthylation de l'ADN : un mécanisme répresseur

La méthylation de l'ADN, en particulier au niveau des îlots CpG, est corrélée à une répression transcriptionnelle (Bird, 2002 ; Siegfried *et al.*, 1999). Cette répression peut être induite par deux mécanismes différents.

La présence des groupements méthyl peut, d'une part, gêner directement la fixation de certains facteurs positifs au promoteur (Fig. 20). La protéine CTCF, impliquée dans les phénomènes d'empreinte génomique au locus H19/Igf2 chez la souris, ne peut se lier au promoteur méthylé du locus paternel alors qu'elle peut se fixer au locus maternel, non méthylé, et réprimer ainsi l'expression d'Igf2 par ce dernier (Hark *et al.*, 2000).

D'autre part, les CpG méthylés peuvent contribuer au recrutement de co-répresseurs transcriptionnels. Cette répression ferait intervenir des protéines de liaison aux CpG méthylés (MBP = Methyl CpG Binding Protein), les plus importantes dans la régulation des gènes des mammifères étant MeCP2, MBD1 et MBD2 (Bird, 2002 ; Klose et Bird, 2006).

MeCP2 est une protéine chromosomique très abondante qui peut lier les CpG symétriquement méthylés. Elle présente une forte activité de répression transcriptionnelle, notamment par l'intermédiaire de l'association de son domaine répresseur (TRD) avec le complexe co-répresseur à activité histone désacétylase Sin3, ainsi que par sa liaison avec l'HMT Su(var)3-9 (Fuks *et al.*, 2003a ; Fuks *et al.*, 2003b ; Nan *et al.*, 1998).

MBD1 a la particularité de posséder, en plus de son domaine MBD, deux à trois copies d'un motif riche en cystéine (CXXC), que l'on trouve également dans Dnmt1. Comme MeCP2, elle possède une intense capacité de répression transcriptionnelle, notamment via le recrutement de HDAC. Elle est également capable d'interagir avec l'HMT Suv39h1 et la protéine à chromodomaine HP1 α , ce qui augmente son activité répressive (Fujita *et al.*, 2003).

Le complexe MeCP1 est composé de MBD2 et du complexe de remodelage de la chromatine Mi-2/NuRD (Ng *et al.*, 1999). MBD2 possède des propriétés de liaison à l'ADN similaires à celle de MBD1 mais requiert la présence de plusieurs CpG méthylés pour se lier efficacement.

Les Dnmt participeraient également à la répression transcriptionnelle, soit en bloquant l'initiation de la transcription, soit en réduisant l'activité de l'ARN Pol II et l'accessibilité de la chromatine au cours de l'élongation (Lorincz *et al.*, 2004). Ces enzymes sont en effet capables d'interagir avec des histones méthyltransférases comme SUV39H1 (Fuks *et al.*, 2003a ; Lehnertz *et al.*, 2003), et des histones désacétylases comme HDAC1 et 2 (Bai *et al.*, 2005 ; Fuks *et al.*, 2000 ; Fuks *et al.*, 2001).

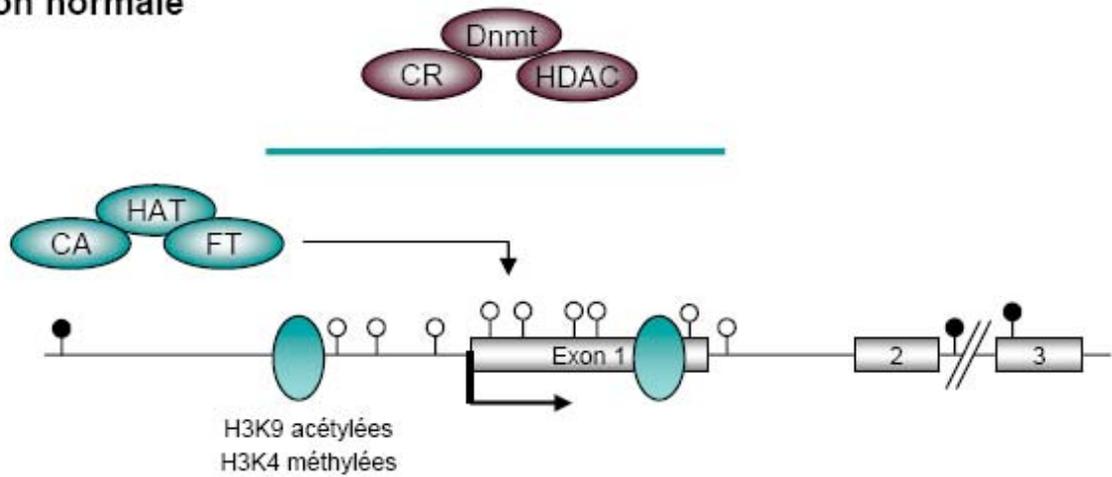
III. Implication des mécanismes de régulation épigénétique au cours de la différenciation hématopoïétique

1. Epigénétique et hématopoïèse

Une diminution localisée des groupements méthyl, associée à une augmentation de l'accessibilité de la chromatine, permet d'activer sélectivement certains gènes. Ce phénomène, associé à des variations dans la localisation nucléaire, est rencontré au cours du réarrangement des gènes des Ig des cellules B. On observe ainsi, dans les cellules pro-B, une relocalisation des deux allèles de la chaîne légère κ des Ig depuis la périphérie vers le centre du noyau. Dans les cellules pré-B, un des allèles est préférentiellement empaqueté sous forme d'euchromatine active, caractérisée par une acétylation des histones et une méthylation des lysines 4 des histones H3. L'autre allèle est recruté dans l'hétérochromatine, en association avec les protéines HP1 α et Ikaros. Un seul des allèles est ainsi accessible et peut faire l'objet d'une déméthylation de son ADN facilitant le processus de réarrangement (Bergman et Cedar, 2004 ; Goldmit *et al.*, 2005).

On observe également une déméthylation des gènes CD4, CD8 α et CD8 β au cours de la maturation des thymocytes, lorsque ces derniers passent du stade double négatif au stade double positif. Dans les cellules simples positives CD4 $^+$, les gènes CD8 α et β retrouvent ensuite une structure chromatiniennne fermée, les mécanismes à l'origine de cette répression transcriptionnelle étant encore mal connus (Bosselut, 2004 ; Kioussis et Ellmeier, 2002). L'expression du gène CD4 est favorisée par la présence de l'ATPase Mi-2 β qui s'associe, d'une part à la séquence amplificatrice du promoteur du gène CD4 et, d'autre part à l'HAT p300. Elle induit ainsi une hyperacétylation des histones H3 dans la région régulatrice du gène CD4. Dans les cellules simples positives CD8 $^+$, le gène CD4 est réprimé

Situation normale



Situation tumorale

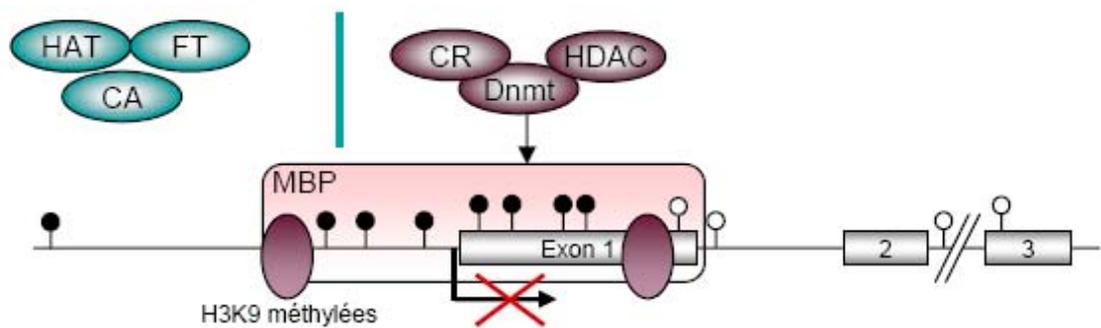


Figure 21 : Aspect de la chromatine au niveau des gènes suppresseurs de tumeur, dans les situations normales et tumorales

Dans une situation normale, la plupart des CpG en dehors des îlots sont méthylés (cercles noirs) tandis que les CpG des îlots ne le sont pas (cercles blancs). Dans cette région promotrice, l'acétylation des histones maintient la chromatine dans un état relâché, accessible aux facteurs de transcription (FT), aux histones acétyltransférases (HAT) et aux co-activateurs transcriptionnels (CA). Dans une situation tumorale, les profils sont inversés avec une hypométhylation des CpG le long du génome et une hyperméthylation des îlots CpG au niveau des promoteurs. Ces CpG méthylés sont reconnus par des protéines de liaison à l'ADN méthylé (MBP), responsable du recrutement des histones désacétylases (HDAC), des dinucléotides méthyltransférases (Dnmt) ou des co-répresseurs transcriptionnels (CR), rendant cette zone inaccessible aux complexes de transcription (D'après Deltour et *al.*, 2005)

par une protéine « silencer » qui se fixe sur la région promotrice du gène CD4 et bloque son expression. Les protéines Runx3 semblent jouer un rôle important dans cette répression transcriptionnelle. Elles interagiraient pour cela avec d'autres facteurs de liaison à l'ADN, avec des complexes de remodelage de la chromatine, comme le complexe BAF (de type SWI/SNF) et avec des HAT.

La déméthylation intervient également dans la régulation de l'expression de certaines cytokines comme l'IL-2. Dans les cellules T CD4 ou CD8 naïves, le locus IL-2 est associé à un environnement chromatinien inactif et subit un remodelage de la chromatine et une acétylation des histones en réponse à la stimulation des cellules. La délétion du gène dnmt1 induit une forte augmentation de la production d'IL-2 dans les 24 à 72h suivant l'activation des cellules. Il suffit d'une vingtaine de minutes pour induire une telle surexpression *in vivo*. Ceci démontre l'importance de la méthylation de l'ADN dans la régulation d'IL-2 et confirme également l'existence de processus actifs de déméthylation (Bruniquel et Schwartz, 2003).

2. Déséquilibre épigénétique et cancer

Les processus de méthylation des cytosines, de modifications covalentes des histones et de remodelage de la chromatine sont intimement liés et leur altération est associée à de nombreuses pathologies dont des cancers.

Dans une grande majorité de cellules cancéreuses, on observe une hyperméthylation des îlots CpG, en particulier au niveau de gènes suppresseurs de tumeur (Fig. 21) (Deltour *et al.*, 2005). Cette hyperméthylation est associée à une inhibition anormale de la transcription des gènes touchés (Jones, 2002 ; Jones et Baylin, 2007). Ainsi l'hyperméthylation des îlots CpG des DAP-kinases (Death Associated Protein) est une caractéristique commune dans les pathologies malignes des cellules B et induit une protection contre l'apoptose. On note également une hyperméthylation du promoteur transloqué Abl dans le chromosome de Philadelphie, caractéristique de la LMC. Le niveau de méthylation de ce gène augmente au fur et à mesure de la progression de la pathologie alors qu'il a un caractère pronostic limité dans les stades précoces de la maladie (Issa *et al.*, 1999).

Les autres régions du génome sont, quant à elles, hypométhylées, ce qui pourrait avoir pour conséquences d'augmenter l'instabilité génomique dans les régions non promotrices et dans des éléments structuraux comme l'ADN centromérique, et de favoriser les translocations chromosomiques (Xu *et al.*, 1999). On peut également observer une hypométhylation anormale de certains gènes. Ainsi les gènes MAGE, exprimés dans les cellules germinales et éteints dans les cellules somatiques, sont fréquemment hypométhylés

et exprimés dans les mélanomes (De Smet *et al.*, 1999). De même, une hypométhylation du gène bcl-2 est rencontrée dans la LLC (Hanada *et al.*, 1993).

La modification des profils de méthylation dans les cellules cancéreuses a été récemment liée à une perte de la méthylation des histones H4K20 et de l'acétylation des H4K16 (Fraga *et al.*, 2005). D'autre part, la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) représente la première pathologie dans laquelle l'implication des HDAC a été démontrée (Minucci *et al.*, 2001). Le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), impliqué dans cette pathologie, est associé à des complexes contenant des HDAC. Lorsque son ligand, l'acide rétinoïque (AR) est présent en quantités normales, RAR est libéré des complexes HDAC et peut induire la transcription de ses gènes cibles. Dans la LAP en revanche, RAR est incapable de se libérer des HDAC, en présence d'une concentration physiologique d'AR. La présence des protéines de fusion PML- et PLZF-RAR accentue ce blocage et augmente l'inhibition transcriptionnelle des gènes cibles de RAR. Le développement de ce type de leucémie est également dû à une dégradation accrue de p53 par le protéasome, conséquence de la désacétylation de p53, associé à PML-RAR, par les HDAC de classe I (Insinga *et al.*, 2004).

Outre l'inactivation transcriptionnelle qu'elle peut induire, l'hyperméthylation des dinucléotides CpG est aussi source de mutations : les cytosines méthylées sont sujettes à désamination spontanée, induisant une transition d'une base C à une base T. Ainsi, pas moins de 50% des mutations inhibitrices du gène tp53 dans les cellules somatiques ont lieu au niveau de cytosines méthylées. Ce risque de désamination est par ailleurs augmenté en présence d'éléments carcinogènes comme le rayonnement ultraviolet ou des résidus hydrocarbonés du tabac.

D. Objectifs du travail de thèse

Aiolos est un facteur de transcription majeur de l'hématopoïèse qui semble intervenir principalement dans la maturation des lymphocytes B. À la différence d'Ikaros, membre fondateur de la famille, il est peu étudié et les données le concernant ont été obtenues pour l'essentiel chez la souris. Chez l'homme, ses mécanismes de régulation, son mode de fonctionnement, ses cibles et son éventuelle implication dans les hémopathies restent à préciser.

Les objectifs de mon travail de thèse étaient doubles :

- d'une part, identifier les facteurs régissant la transcription d'Aiolos au cours de l'hématopoïèse humaine. Je me suis attachée pour cela à caractériser les mécanismes épigénétiques contrôlant l'activité de son promoteur dans différents types cellulaires, hématopoïétiques et non hématopoïétiques.
- d'autre part, évaluer l'implication d'Aiolos dans l'apparition et le développement des lymphoproliférations humaines. Dans cet objectif, j'ai étudié le niveau d'expression des différentes isoformes d'Aiolos dans des syndromes lymphoprolifératifs des cellules B matures (LLC et LNHB).

Chapitre I

Une régulation épigénétique de la
transcription du gène aiolos qui diffère
entre lignées tumorales et cellules primaires

I. Préambule

Les protéines de la famille Ikaros jouent un rôle essentiel dans la différenciation des cellules hématopoïétiques mais nous connaissons très peu de choses, à l'heure actuelle, sur la manière dont elles sont même régulées. Afin de caractériser les mécanismes intervenant dans la régulation transcriptionnelle du gène *aiolos*, notre équipe a cloné le promoteur potentiel du gène *aiolos* et a testé son activité, ainsi que celles de différents fragments de tailles plus restreintes, dans quatre lignées cellulaires, représentatives de lignages lymphoïdes, myéloïdes et non hématopoïétiques. Daudi (lymphocytes B matures) et Jurkat (lymphocytes T matures) expriment toutes deux *Aiolos*, mais à des niveaux différents, tandis que U937 (promonocyte) et HEK293 (épithélium rénal) ne l'expriment pas. Nous avons démontré que la séquence promotrice « nue » du facteur de transcription *Aiolos* est capable d'induire une activité transcriptionnelle dans les quatre lignées testées (Ghadiri *et al.*, 2007), cf. annexe n° 1). Les cellules exprimant *Aiolos*, comme les cellules ne l'exprimant pas, possèdent donc la machinerie transcriptionnelle nécessaire à l'expression du facteur de transcription *Aiolos*. D'autre part, nous avons isolé des régions promotrices minimales, de 175 pb dans les lignées Jurkat, U937 et HEK293, et de 370 pb dans la lignée Daudi.

Par la suite, nous avons étudié les protéines capables de se lier à la région de 175 bp. Par des techniques d'EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) et de mutations *in vitro*, nous avons mis en évidence l'importance des facteurs de transcription Ikaros, NF κ B et AP-4 dans l'activité promotrice du gène *aiolos*, que ce soit dans des lignées lymphoïdes exprimant *Aiolos* (Daudi, Jurkat) ou dans des lignées *Aiolos* négatives (U937, HEK). La réalisation d'immunoprécipitations de la chromatine (ChIP) a cependant mis au jour une distinction, *in vivo*, entre lignées *Aiolos* positives et lignées *Aiolos* négatives. Tandis qu'il a confirmé la fixation du facteur de transcription Ikaros au promoteur *aiolos* dans Daudi et Jurkat, celui-ci ne se fixe pas ou très peu dans les U937 et les HEK.

Les différences dans les niveaux de transcrits *Aiolos* et dans la fixation des facteurs de transcription amont comme Ikaros pourraient, en partie, être expliquées par la surimposition de mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, acétylation/méthylation des histones), induisant une diminution de l'accessibilité de la chromatine dans des lignées n'exprimant pas *Aiolos*. Pour tester cette hypothèse, j'ai entrepris, au cours de ma thèse, une analyse des degrés de méthylation de l'ADN et d'acétylation/méthylation des histones au promoteur d'*aiolos*, à la fois dans des lignées cellulaires (Daudi, Jurkat, U937 et 1106mel) et dans des cellules primaires (lymphocytes T et B, monocytes et mélanocytes) exprimant *Aiolos* à des niveaux variés. Les résultats obtenus font l'objet d'un article, soumis, dont le manuscrit est présenté en annexe 2.

II. Matériel et Méthodes

1. Modèle biologique

a) Lignées cellulaires

Au cours de notre étude, nous avons utilisé les lignées humaines Daudi (lymphome de Burkitt), Jurkat (leucémie lymphoïde T aiguë), U937 (lymphome histiocytaire) et 1106mel (mélanome), représentatives respectivement de lymphocytes B matures, de lymphocytes T matures, de promonocytes et de mélanocytes. Les cellules Daudi, Jurkat et U937 sont cultivées en milieu RPMI, additionné de sérum de veau foetal (SVF 10%), de glutamine (2mM) et d'un mélange pénicilline/streptomycine. Les cellules 1106mel sont cultivées en milieu DMEM, additionné de SVF (10%), de glutamine (2mM), d'acides aminés non essentiels, de pyruvate de sodium (1 mM) et d'un mélange pénicilline/streptomycine.

b) Cellules primaires

Les mélanocytes nous ont été fournis par l'Hôpital de Bordeaux. Ils sont isolés à partir d'échantillons de peau, provenant d'opérations de chirurgie esthétique ou de circoncision. À réception, la peau est coupée en pièces de 2 mm x 2 mm et incubée sur la nuit, à 4°C, dans une solution de Trypsine 0,25%-EDTA 0,1 M, ce qui induit la dissociation de la couche basale de l'épiderme. Après neutralisation de la trypsine par du SVF, les cellules de la couche basale sont détachées, centrifugées à 300 g et incubées à 1.10^5 cellules /mL de milieu M2 (PromoCell GmbH). Après une semaine de culture, les mélanocytes sont séparés des kératinocytes contaminants par « trypsinisation ».

Les cellules mononuclées du sang périphériques (PBMC) ont été isolées par gradient de Ficoll, à partir de sang total ou d'anneaux de cytophère fournis par l'Etablissement Français du Sang. Les différentes sous populations lymphoïdes (B et T) et myéloïdes ont ensuite été triées positivement par billes magnétiques, couplées respectivement à des Ac anti-CD19, anti-CD3 ou anti-CD14 (Dyna), selon les recommandations du fabricant. Pour les expériences d'immunoprécipitations de la chromatine, les lymphocytes B/T et les monocytes ont été isolés par tri magnétique négatif (Dyna).

2. Traitement des lignées cellulaires avec des agents déméthylants de l'ADN ou de remodelage de la chromatine et clonage des cellules traitées

Les cellules Daudi, Jurkat et U937, à la concentration de $0,5.10^6$ cellules/mL, ont été traitées avec 2 μ M de 5-aza-2'-désoxycytidine (5-Aza-dC), un agent inhibiteur des Dnmt, ou avec 50 nM de Trichostatine A (TSA), un agent inhibiteur des HDAC (classes I et II), pendant

des durées d'incubation variables (avec changement des milieux toutes les 48 heures). Les 1106mel ont été traitées avec 5 μ M de 5-Aza-dC ou 300 nM de TSA. Après traitement, les cellules sont lavées puis les ARN, ADN et protéines sont extraits.

Les cellules U937 et 1106mel, clonées par dilution limite, ont été traitées avec 1 μ M de 5-Aza-dC pendant huit jours, lavées, diluées dans du milieu sans agents traitants à la concentration de 10 cellules / mL et aliquotées en plaque 96 puits, à raison de 100 μ L / puits. Ces cellules ont été amplifiées pendant 35 à 52 jours puis les ARN ont été extraits et l'expression d'Aiolos a été testée par RT-(q)PCR.

3. [RT-PCR et RT-qPCR](#)

Les ARN totaux sont extraits sur kit Qiagen RNeasy mini, selon les recommandations du fabricant. Les ADN complémentaires sont synthétisés, à partir d'1 μ g d'ARN total, avec des oligonucléotides dT et la transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen). Aiolos est amplifié avec les conditions de PCR suivantes : 94°C pendant 2 min, 28 à 35 cycles de 94°C-30s + 60°C-1min + 72°C-1min puis 72°C pendant 7min. Les séquences des amorces utilisées sont : Aiolos sens 5'-GGCAGCGACATGGAAG-3' (exon 1), Aiolos anti-sens 5'-TAGCTGATGGCGTTATTGATGG-3' (exon 8). PBGD ou Abelson sont utilisés comme contrôle interne : PBGD sens 5'-CTGGTAACGGCAATGCGGCT-3', PBGD anti-sens 5'-GCAGATGGCTCCGATGGTGA-3', Abelson sens, 5'-AGTCCAGCTCTACTACCTACGTTTG-3', Abelson anti-sens 5'-GAGCAGGAACTCCACAGATAAAA-3'. Les produits de PCR sont ensuite séparés sur gel d'agarose et visualisés par marquage au bromure d'éthidium.

La PCR quantitative est réalisée sur un ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems) avec des couples sondes/amorces développés par Applied. Les couples Hs00232635_m1 et Hs99999909_m1 ont été utilisés respectivement pour la détection d'Aiolos (jonction entre exons 2 et 3) et d'HPRT (contrôle interne), selon les recommandations du fabricant. Les échantillons sont dosés en triplicat et sont normalisés avec la méthode du $2^{\Delta\Delta Ct}$.

4. [Traitement au bisulfite de sodium et séquençage](#)

L'ADN génomique est extrait sur kit DNeasy de Qiagen, selon les recommandations du fabricant. 500 ng d'ADN sont traités avec du bisulfite de sodium à l'aide du kit « MethylDetector Modification Kit » (ActiveMotif). Cet agent assure la conversion des cytosines non méthylées en uraciles. 4 μ L de l'ADN traité sont amplifiés par PCR dans les conditions suivantes : 94°C-5min puis 30 cycles de 94°C-30s + 55°C-90s + 72°C-1min et enfin 72°C-7min. Les amorces utilisées se situent de part et d'autre de l'îlot CpG d'Aiolos : sens 5'-TTTTTTTTAAATAGATATTTTGAGATAATT-3', anti-sens 5'-AACTAAAACTCACCTTCCATATC-3'.

Une deuxième PCR est réalisée sur 2 µL du produit de la PCR 1 avec le même couple d'oligonucléotides et 25 cycles d'amplification. Les produits PCR sont ensuite purifiés sur gel, clonés en utilisant le kit TOPO TA cloning d'Invitrogen et transformés dans des bactéries TOP10. Les ADN plasmidiques sont purifiés à partir de 10 colonies distinctes (kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen) et séquencés avec le kit BigDye® Terminator v3.1 sur un séquenceur ABI3100 (Applied Biosystems).

5. Immunoprécipitation de la chromatine

Les ChIP ont été réalisées selon un protocole publié précédemment (Navarro *et al.*, 2006) avec les Ac anti-H3 trimeK4 (1/250, Abcam #AB8580), anti-H3 dimeK4, trimeK9, trimeK27 et aceK9 (respectivement à 1/100, 1/100, 1/250 et 1/100, Upstate #07030, #07442, #07449, #07352). Un Ac anti-HA (1/100, Santa Cruz #sc-805) est utilisé comme contrôle du bruit de fond.

L'ADN immunoprécipité (IP) et une dilution au 1/100 de l'ADN total (« Input ») sont analysés par PCR en temps réel à l'aide du détecteur SYBR Green et d'un ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). Chaque qPCR est réalisée en duplicat. Les amorces utilisées reconnaissent l'îlot CpG d'Aiolos et des régions situées entre - 2kb et +2kb autour du site d'initiation de la transcription. Leurs séquences sont les suivantes : A1 sens 5'-TGGTCACTTCCCCTTCTCT-3', A1 anti-sens 5'-TCCCAACACCCTCCCTACTG-3' ; A2 sens 5'-CAGTCCCAGAGGGAAAACAAA-3', A2 anti-sens, 5'-TTGGTCCAAGTTTTTCAGACAGTTG-3' ; A3 sens 5'-GACAAAAAGTTCCAGATCTTCTCA-3', A3 anti-sens 5'-GTCAGCCTTGCTTTCTTGGc-3' ; A4 sens 5'-GAGAGGCCGAGTAGCCACAG-3', A4 anti-sens 5'-TTGCACAGGTTAAGTTTTCTCAAAGA-3' ; A5 sens 5'-TTGGCATTTCAGTTCCCTT-3', A5 anti-sens 5'-AACCTGATTTTTTGCGCTGG-3' ; A6 sens 5'-TGGGCTGTTGTACTATGGGAAA-3', A6 anti-sens 5'-CGGCTAGGAAAAATAGTGTGGA-3'. Afin de standardiser les différentes expériences entre elles, le pourcentage d'immunoprécipitation est calculé en divisant la valeur moyenne obtenue pour l'IP par la valeur moyenne obtenue pour l'Input.

6. Western Blot (WB)

Les cellules sont lysées en tampon RIPA (137 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10% Glycerol, 1% NP40, 1% SDS, inhibiteurs de protéases). Les protéines sont séparées par SDS-PAGE et transférées sur nitrocellulose. Les membranes sont bloquées avec du lait à 3% dans du TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,5 – 150mM NaCl – 0,05% Tween 20) et sont incubées avec l'Ac primaire en présence de lait à 0,5% dans du TBS pendant une nuit. Les membranes sont lavées avec du TBST et incubées pendant 1h avec un Ac secondaire couplé à la peroxydase. La détection des protéines est ensuite

réalisée avec le système ECL (Amersham). Nous avons utilisé les Ac anti-Histones (Chemicon) et les Ac secondaires de Dako. L'Ac anti-Aiolos a été produit selon le protocole publié précédemment (Romero *et al.*, 1999).

7. Méthylation *in vitro*

Un fragment de 370 pb contenant l'îlot CpG d'Aiolos a été obtenu par PCR à partir d'ADN génomique extrait de cellules mononuclées du sang périphérique et en utilisant les amorces suivantes : 370-sens 5'-CCTCCGTGTGATGTCACTTTTCTC-3' et Aio(AT*G) anti-sens 5'-CTGGAGGCTCACCTTCCTTGTC-3' (Ghadiri *et al.*, 2007). Dans un premier temps, ce fragment a été cloné dans le vecteur pCRII-Topo à l'aide du kit TOPO TA d'Invitrogen, puis il a été transféré dans le vecteur pGL3-basic, en amont du gène rapporteur de la luciférase (Promega). 50 µg de plasmides ont été traités par la méthylase SssI (1U/µg, New England Biolabs), en présence de SAM (160 µM). La méthylation complète du vecteur a été vérifiée par digestion par HpaII (New England Biolabs), une enzyme sensible à la méthylation des CpG.

8. Transfection et mesure de l'activité luciférase

2.10⁶ Jurkat, 1.10⁶ U937, 1.10⁶ Daudi ou 5.10⁴ 1106mel ont été transfectées avec 1 µg de plasmide pGL3-Aiolos370 (méthylé ou non) et 50 ng de vecteur pRL-CMV contenant le gène rapporteur de la rénillase. Les techniques de transfections suivantes ont été utilisées, selon les recommandations des fabricants : Jurkat et U937 avec le kit Nucleofactor V (Amaxa), Daudi avec du DEAE-dextran et 1106mel avec JetPEI™ (Polyplus transfection). 24h après transfection, les cellules sont lavées dans du PBS et sont lysées par 45 min d'incubation dans 50 à 100 µL de tampon de lyse passive (kit Dual Luciferase Reporter Assay System, Promega). 20 µL de lysat cellulaire sont ajoutés à 50 µL de substrat et l'activité luciférase est détectée sur un luminomètre Berthold L99501. 50 µL d'agent de blocage sont ensuite ajoutés et l'activité rénillase est mesurée. Les données obtenues sont normalisées en calculant le ratio activité luciférase / activité rénillase et exprimées en unité relative de luminescence.

9. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 4.0c (GraphPad Software), avec un test de Student impair et une correction de Welch. Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs lorsque $p \leq 0,05$, avec les degrés suivants : ns, non significatif, * $0,01 < p \leq 0,05$, ** $0,001 < p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

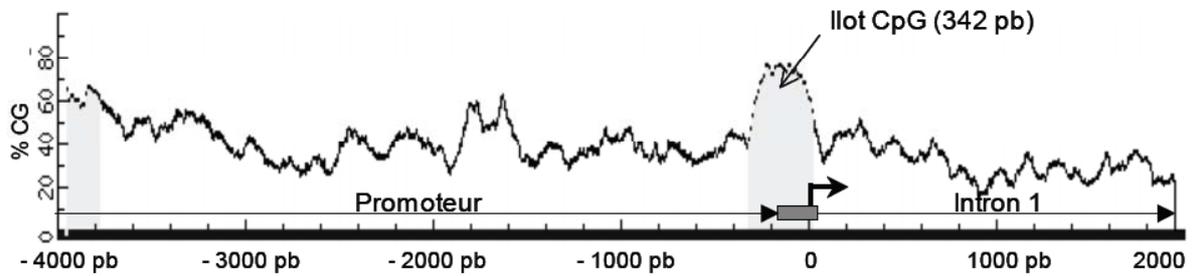
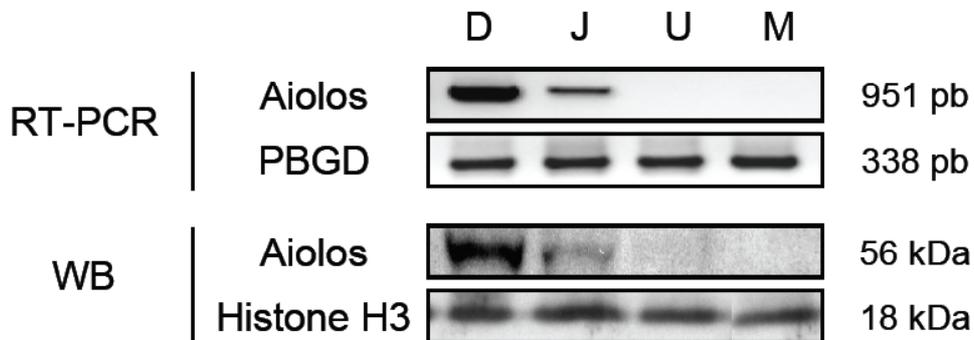
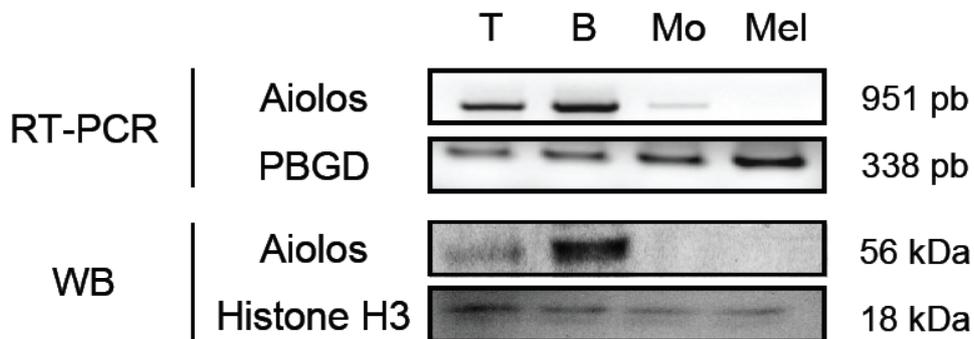
A**B****C**

Figure 22 : Ilot CpG du gène *aiolos* et niveaux d'expression dans les différentes lignées et cellules primaires étudiées.

A. Analyse par le logiciel Methprimer de la composition en CG de la région entourant le site d'initiation de la traduction (flèche). Les îlots CpG sont en gris. **B.** Analyse par RT-PCR et WB de l'expression d'*Aiolos* dans les lignées Daudi (D), Jurkat (J), U937 (U) et 1106mel (M). PBGD et Histones H3 sont utilisés en contrôle interne. **C.** Idem B avec les Lymphocytes T, B, les monocytes (Mo) et les mélanocytes (Mel) primaires.

III. Résultats

1. Un îlot CpG de 342 pb encadre le site d'initiation de la transcription du gène aiolos

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la régulation transcriptionnelle du facteur Aiolos, nous avons étudié la séquence du gène aiolos et de sa région promotrice et nous avons recherché l'existence d'îlots CpG.

Un îlot CpG est défini comme une région d'au moins 100 pb, contenant plus de 50% de bases C et G ainsi qu'un ratio de dinucléotides CG observés (par rapport aux CpG attendus) supérieur à 60%. L'analyse sur le logiciel MethPrimer de la séquence du gène aiolos et de son promoteur a permis de mettre en évidence l'existence de 10 îlots CpG distincts. Deux sont situés dans la région promotrice, sept sont situés dans les régions introniques 1, 2, 3 (2 îlots), 5, 6 (2 îlots). Le dernier se superpose à l'exon 8. Un îlot de 342 pb est notamment localisé sur la région 3' du promoteur aiolos, l'exon 1 et les premières bases de l'intron 1, zone encadrant le site d'initiation de la transcription et souvent impliquée dans la régulation des gènes. La figure 22A montre les pourcentages de CG au niveau de la région 3' du promoteur aiolos et du début du gène aiolos. L'îlot de 342 pb est en grisé, la flèche représentant le site d'initiation de la traduction situé dans l'exon 1 (rectangle gris).

Nous nous sommes attachés dans le reste de cette étude à caractériser l'implication de cet îlot dans la régulation de l'expression du gène aiolos, dans quatre lignées cellulaires et quatre types de cellules primaires, représentatives de différents lignages hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Les niveaux d'expression des ARNm et des protéines Aiolos dans les différents types cellulaires étudiés sont présentés dans les figures 22B et 22C. Les lignées Daudi et Jurkat, ainsi que les lymphocytes B et T primaires sont positifs pour Aiolos, l'expression étant plus faible dans les cellules T que dans les cellules B. Les cellules U937 et 1106mel, les monocytes et mélanocytes primaires, n'expriment pas Aiolos dans nos conditions expérimentales. On note cependant la présence d'un léger bruit de fond dans les monocytes en RT-PCR.

2. Le traitement, avec des agents inhibiteurs des Dnmt (5-Aza-dC) et/ou des HDAC (TSA), induit une augmentation des transcrits Aiolos

Nous avons ensuite analysé l'implication de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones dans la régulation de l'expression d'Aiolos. Pour cela, nous avons

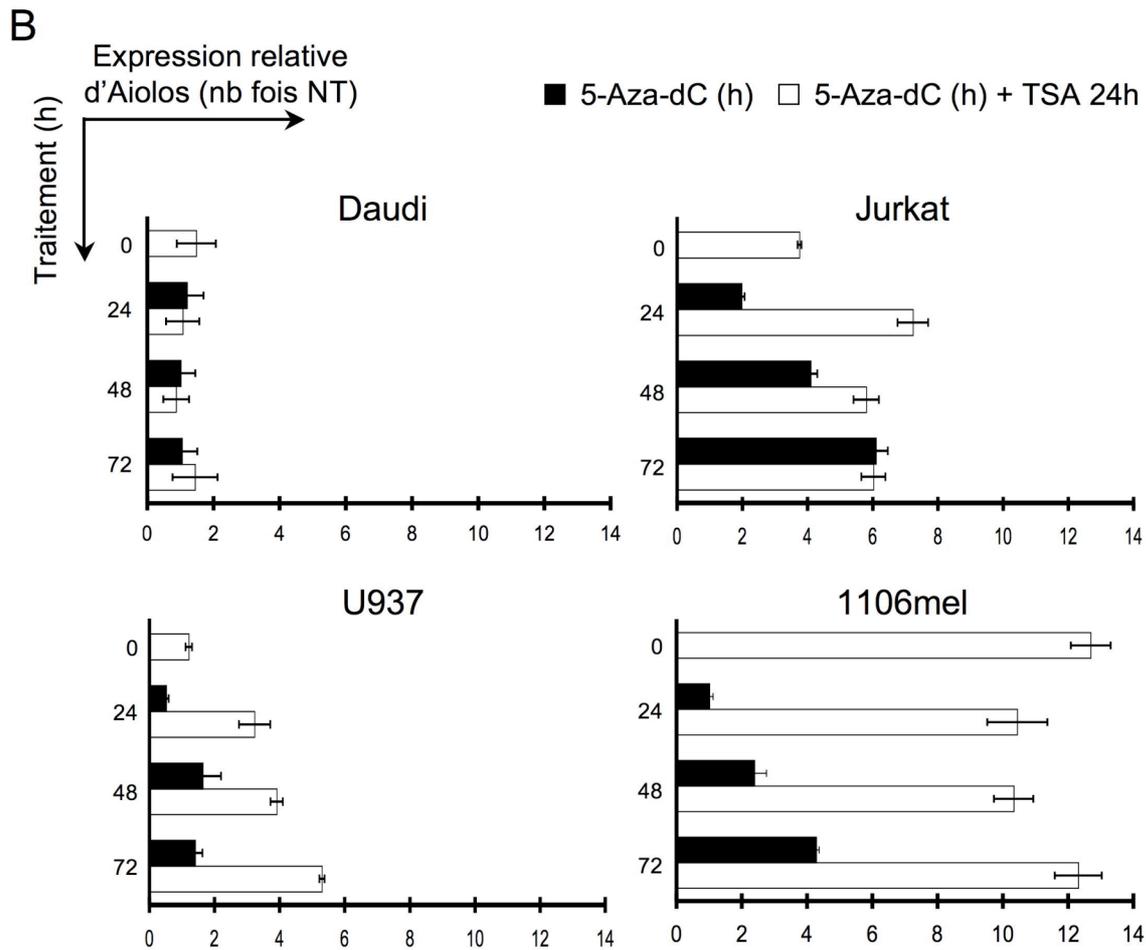
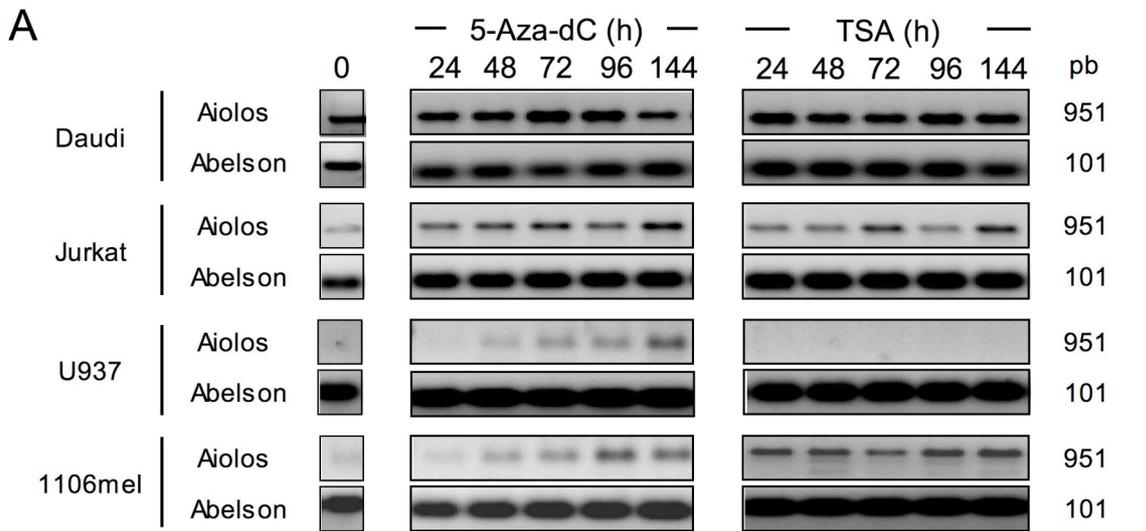


Figure 23 : Analyse du niveau d'expression d'Aiolos dans les lignées cellulaires après traitement avec la 5-Aza-dC et/ou la TSA

A. Daudi, Jurkat, U937 ont été traitées avec 2 μ M de 5-Aza-dC ou 50 nM de TSA pendant des durées variables. Les 1106mel ont été traitées avec 5 μ M de 5-Aza-dC ou 300 nM de TSA. Les ARNm obtenus ont été amplifiés par RT-PCR avec 28 (D), 32 (J) ou 35 (U/M) cycles d'amplification et déposés sur agarose 1,5%.

B. Les lignées cellulaires ont été traitées avec la 5-Aza-dC pendant des durées variables puis avec la TSA pendant 24h. Le niveau d'expression d'Aiolos est déterminé par RT-qPCR et normalisé par rapport au gène HPRT. Chaque point représente la moyenne de triplicats, exprimés en nombre de fois les cellules non traitées.

traité les lignées cellulaires avec un agent inhibiteur des Dnmt, la 5-Aza-dC, ou avec un agent inhibiteur des HDAC (de classes I et II), la TSA. Ces traitements induisent une déméthylation globale et progressive des ADN nouvellement formés ou une acétylation des histones. Les changements dans l'expression d'Aiolos ont été mesurés par RT-(q)PCR après des durées variables de traitement.

Comme le montre la figure 23A, le traitement avec la 5-Aza-dC induit une augmentation des transcrits Aiolos dans la lignée Aiolos positive Jurkat comme dans les lignées Aiolos négatives U937 et 1106mel tandis que ces quantités de transcrits varient peu dans la lignée Daudi. L'accroissement est visible dès 24h de traitement pour Jurkat et à partir de 48h pour U937 et 1106mel, le niveau maximum étant atteint dès 96h pour 1106mel et après 144h pour les deux autres lignées. Ces résultats démontrent que la déméthylation de l'ADN est suffisante pour induire l'expression d'Aiolos et confirment que les deux lignées Aiolos négatives étudiées possèdent la machinerie transcriptionnelle nécessaire à l'expression d'Aiolos.

L'expression d'Aiolos augmente également dans les cellules Jurkat et 1106mel après traitement avec la TSA. L'induction est plus rapide qu'avec le traitement déméthylant, l'augmentation de signal étant significative dès 24h et progressant peu avec des incubations plus longues. En revanche, les cellules U937 ne réagissent pas au traitement acétylant et aucun transcrit n'est détectable dans nos conditions expérimentales, quelle que soit la durée du traitement. L'acétylation des histones est donc suffisante pour induire l'expression d'Aiolos dans la lignée 1106mel mais insuffisante dans la lignée U937. Ceci suggère l'existence de mécanismes de répression distincts dans nos deux lignées Aiolos négatives.

Dans un troisième temps, nous avons combiné les deux traitements, avec une incubation de durée variable (de 0 à 72h) en présence de l'agent déméthylant de l'ADN, suivie d'une incubation de 24h avec l'agent acétylant des histones. Les variations qui en résulte dans les quantités de transcrits Aiolos sont mesurées par PCR quantitative. Nous avons obtenu quatre profils distincts (Fig. 23B). Ces agents, utilisés seuls ou combinés, ont une action limitée sur l'expression d'Aiolos dans les cellules Daudi (au maximum 1,5 fois le témoin non traité). En revanche, le traitement combiné des Jurkat induit un effet synergique : les ARNm sont ainsi augmentés 7,2 fois après 24h de 5-Aza-dC + 24h de TSA contre 2 fois avec 24h de 5-Aza-dC et 3,7 fois avec 24h de TSA. L'augmentation de la durée du traitement avec la 5-Aza-dC ne permet cependant pas d'augmenter davantage le nombre de transcrits Aiolos, ce qui suggère l'existence d'un seuil.

Une telle synergie est également observée dans les cellules U937. Le nombre de transcrits progresse cette fois avec l'augmentation de la durée du traitement avec la 5-Aza-dC pour atteindre 5,3 fois le niveau obtenu dans les cellules non traitées, après 72h de 5-

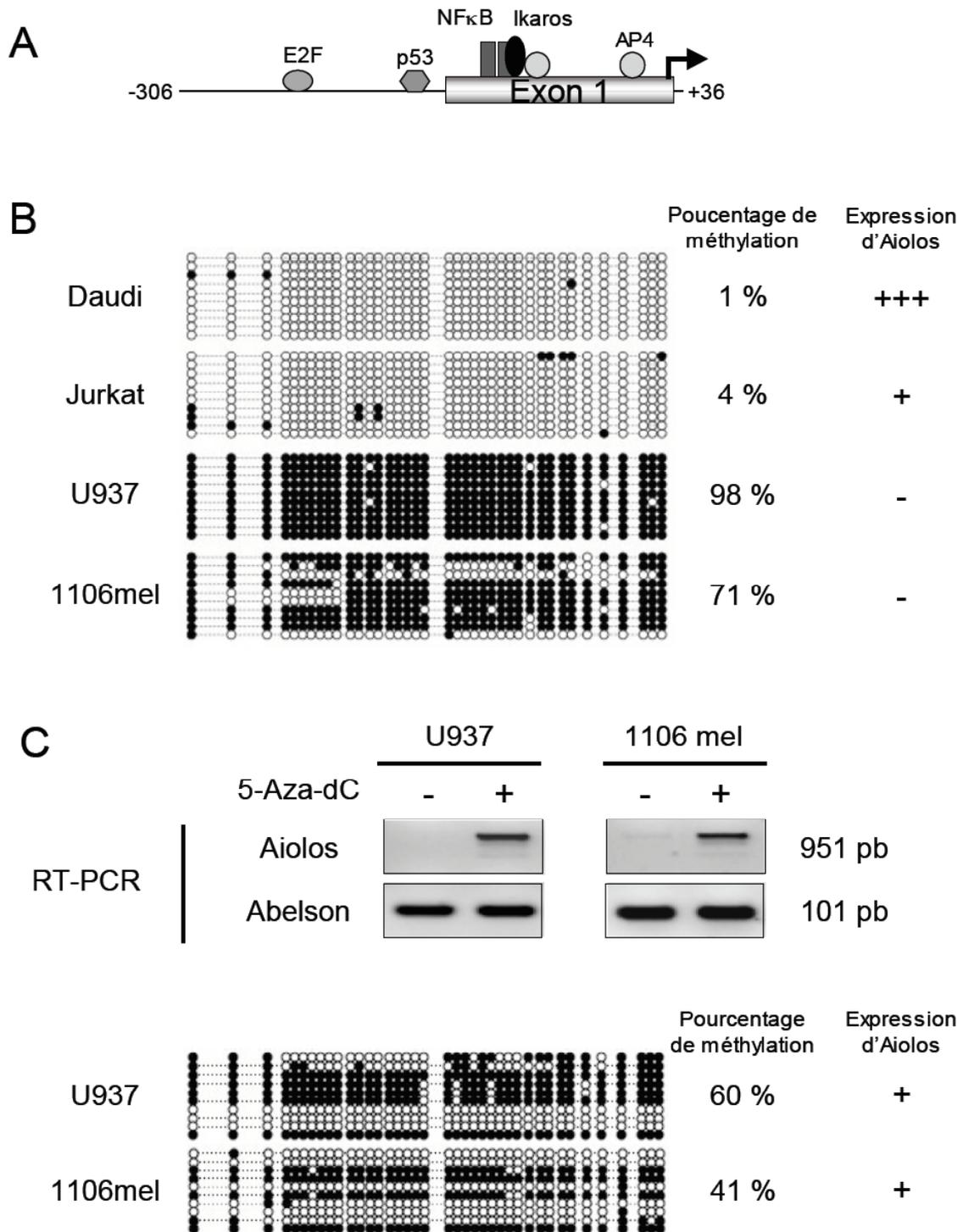


Figure 24 : Profils de méthylation du promoteur aiolos dans les différentes lignées cellulaires, avant et après traitement avec la 5-Aza-dC

A. Représentation schématique de l'îlot CpG d'aiolos avec la position de sites potentiels de fixation des facteurs de transcription E2F, p53, NFκB, AP-4 et Ikaros. **B.** Profils de méthylation de l'îlot CpG obtenus par séquençage au bisulfite de sodium de 10 clones différents. Les cercles noirs correspondent aux cytosines méthylées, les blancs aux cytosines non méthylées. **C.** Niveaux d'expression d'Aiolos (cf. Fig. 22) et profils de méthylation (cf. ci-dessus) de deux clones U937 et 1106mel obtenus par traitement avec 1 μM 5-Aza-dC pendant 8 jours puis clonage par dilution limite et expansion en milieu sans 5-Aza-dC pendant 35 à 52 jours.

Aza-dC + 24h de TSA. Ces résultats confirment le rôle majeur joué par la méthylation de l'ADN dans le contrôle de l'expression d'Aiolos dans cette lignée promonocytaire. L'acétylation des histones apparaît comme un mécanisme supplémentaire permettant d'accroître le signal existant.

Les résultats obtenus dans les cellules 1106mel confirment quant à eux l'importance de l'acétylation des histones. Après 24h de traitement avec la TSA, le nombre de transcrits Aiolos est augmenté 12,7 fois alors qu'un traitement de la même durée avec l'agent déméthylant n'a pratiquement aucun effet. La combinaison de la déméthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones induit une expression d'Aiolos identique à celle obtenue avec le traitement TSA seul, quelle que soit la durée d'incubation avec la 5-Aza-dC.

L'ensemble de ces résultats démontre que les modifications des niveaux de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones sont capables de moduler le nombre de transcrits Aiolos présents dans la cellule. Ils montrent également que l'inhibition d'Aiolos est régulée par des mécanismes différents dans les deux lignées Aiolos négatives : la méthylation de l'ADN occupe une place prépondérante dans la lignée U937 tandis que l'expression d'Aiolos semble être davantage contrôlée par le degré d'acétylation des histones dans la lignée 1106mel.

3. Dans les lignées cellulaires, l'expression d'Aiolos est corrélée à une déméthylation de l'îlot CpG

La figure 24A montre la structure de l'îlot CpG avec la position des sites potentiels de fixation des facteurs de transcription E2F, p53, NFκB, AP-4 établie par le logiciel MatInspector. La fixation d'Ikaros et son rôle activateur de la transcription d'aiolos ont été démontrés par notre équipe (Ghadiri *et al.*, 2007).

Le séquençage de cet îlot après traitement au bisulfite de sodium, un agent permettant de transformer les cytosines non méthylées en uraciles, nous a permis d'évaluer le pourcentage de méthylation de l'îlot CpG d'aiolos dans les quatre lignées cellulaires. Après traitement, l'ADN génomique de l'îlot est amplifié par PCR, cloné et 10 séquences, correspondant à 10 clones différents, sont analysées.

Nous avons observé une distinction très nette entre les deux types de lignées positives et négatives (Fig. 24B) : les îlots de Daudi et Jurkat sont complètement déméthylés (1% et 4% respectivement) tandis que ceux d'U937 et de 1106mel sont fortement méthylés. On peut cependant remarquer que le pourcentage de méthylation est plus faible dans les 1106mel (71%) que dans les U937 (98%). Ces résultats suggèrent une

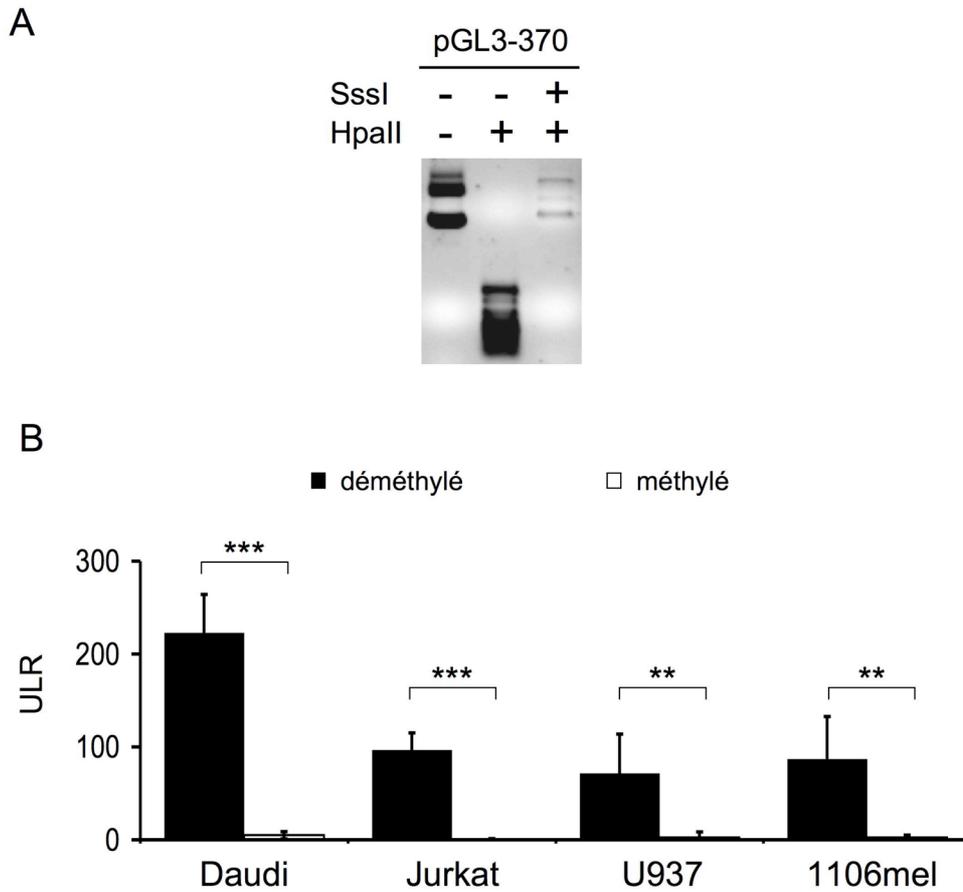


Figure 25 : La méthylation du promoteur aiolos bloque son activité transcriptionnelle

Une construction contenant l'îlot CpG d'aiolos en amont du gène rapporteur de la luciférase a été méthyliée *in vitro* par l'enzyme Sssl. **A.** La méthylation des vecteurs, traités ou non avec Sssl, est vérifiée par digestion avec l'enzyme HpaII, sensible à la méthylation des CpG. **B.** Daudi, Jurkat, U937 et 1106mel sont transfectées avec la construction A, méthyliée ou non. L'activité transcriptionnelle du promoteur est évaluée par mesure de l'activité luciférase, rapportée à l'activité du gène rénillase. Chaque histogramme correspond à la moyenne des triplicats d'au moins 5 transfections indépendantes.

corrélation entre répression transcriptionnelle du gène *aiolos* et méthylation de l'îlot CpG et sont en accord avec l'augmentation des transcrits *Aiolos* après traitement avec la 5-Aza-dC. La différence entre les pourcentages de méthylation des U937 et 1106mel pourrait d'ailleurs expliquer, en partie, les réactions distinctes de ces deux lignées aux traitements déméthylant et acétylant.

Nous ne savons pas cependant si le traitement avec la 5-Aza-dC a un effet direct sur la méthylation du promoteur *aiolos*. Pour répondre à cette question et afin de mieux déceler les variations éventuelles dans les pourcentages de méthylation du promoteur *aiolos*, nous avons traité des cellules U937 et 1106mel pendant 8 jours avec 1 μ M de 5-Aza-dC puis nous les avons clonées par dilution limite. Après 35 à 52 jours d'amplification dans un milieu sans 5-Aza-dC, nous avons analysé les niveaux de transcrits *Aiolos* par RT-(q)PCR et le pourcentage de méthylation du promoteur par séquençage au bisulfite de sodium (Fig. 24C). Les clones ayant réagi au traitement déméthylant voient leurs pourcentages de méthylation diminuer : celui-ci passe de 98% à 60% dans le clone U937 présenté et de 71% à 41% dans le clone 1106mel. Les clones n'ayant pas réagi au traitement déméthylant présentent des pourcentages de méthylation identiques à ceux observés dans les cellules non traitées et non clonées (données non présentées). Cette diminution de la méthylation de l'îlot CpG est associée à un accroissement des transcrits *Aiolos* de 13 (U937) et 17 (1106mel) fois les cellules non traitées (déterminé par RT-qPCR).

4. La méthylation *in vitro* de l'îlot CpG d'*aiolos* bloque l'activité transcriptionnelle du promoteur

Nous avons voulu vérifier si la méthylation de l'îlot CpG pouvait moduler l'activité promotrice de cette région et ainsi expliquer les différences observées, en termes de nombres de transcrits *Aiolos*, dans les cellules traitées avec l'agent déméthylant comparativement aux cellules non traitées. Pour cela, nous avons amplifié l'îlot CpG d'*aiolos*, à partir d'ADN génomique extrait de PBMC, et nous avons cloné le produit de PCR en amont du gène rapporteur de la luciférase. Le vecteur pGL3-370 ainsi obtenu (Ghadiri *et al.*, 2007) a été méthylié *in vitro* par l'enzyme SssI. La figure 25A montre les contrôles réalisés sur les vecteurs méthylés et non méthylés avec l'enzyme de restriction HpaII, sensible à la méthylation des CpG.

Les cellules Daudi, Jurkat, U937 ou 1106mel ont été transfectées avec le vecteur PGL3-370, méthylié ou non. La mesure de l'activité luciférase permet de déterminer l'activité

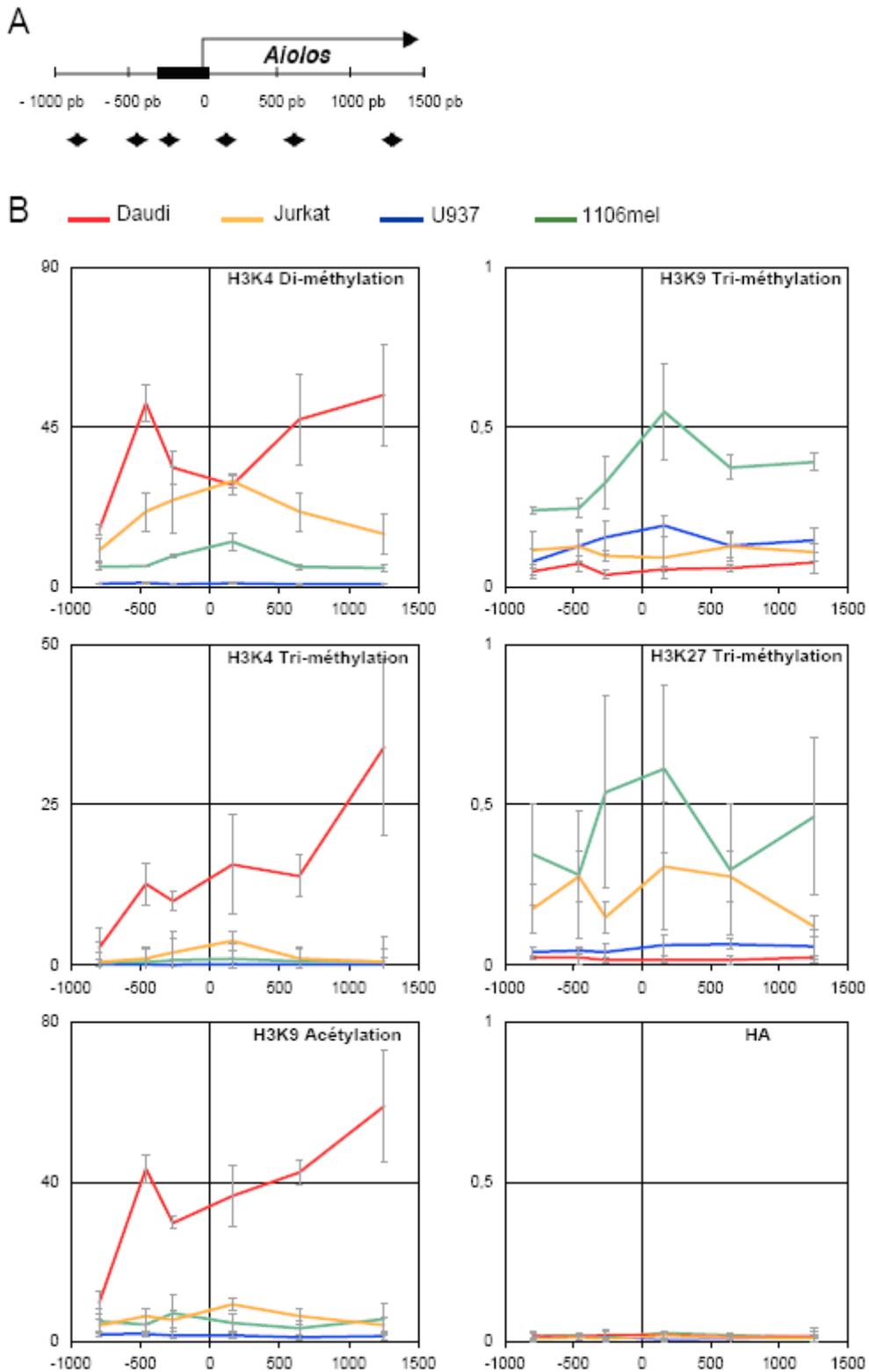


Figure 26 : Profils de modifications des histones dans les lignées Daudi, Jurkat, U937 et 1106mel

A. Position des amorces utilisées dans cette étude par rapport au site d'initiation de la transcription (flèche) et à l'îlot CpG (rectangle noir). **B.** Analyse des di- et tri-méthylations d'H3K4, des tri-méthylations d'H3K9 et d'H3K27 et de l'acétylation des H3K9 par ChIP puis qPCR. Chaque point correspond à la moyenne des duplicats de deux expériences indépendantes.

promotrice de l'îlot CpG (Fig. 25B). Quelle que soit la lignée étudiée, la méthylation de l'îlot CpG bloque complètement son activité promotrice. La méthylation de l'ADN au niveau de l'îlot CpG d'aiolos est donc bien un mécanisme impliqué dans la régulation transcriptionnelle du gène aiolos.

5. Des profils distincts de modifications des histones

Dans la cellule, l'ADN est associé à des histones qui font l'objet de modifications covalentes. Le caractère méthylé ou non de l'ADN agit sur le recrutement de protéines de liaison à l'ADN méthylé qui à leur tour vont influencer les modifications des histones comme leur acétylation ou leur méthylation. Nous avons donc étudié les profils d'acétylation et de méthylation des histones H3 dans une région de 4 kb autour du site d'initiation de la transcription du gène aiolos par une technique de ChIP (Fig. 26).

Les cellules Daudi qui expriment fortement Aiolos et qui possèdent un îlot CpG déméthylé présentent des marques de chromatine active avec un niveau élevé d'acétylation des lysines 9 et de di/tri méthylation des lysines 4, notamment autour de l'îlot CpG. Les marques d'hétérochromatinisation (triméthylation des lysines 9 et 27) sont en revanche absentes, quelle que soit la région étudiée.

Les cellules Jurkat qui expriment faiblement Aiolos et qui possèdent un îlot CpG déméthylé présentent un profil bivalent avec, à la fois, des marques de chromatine active et un niveau non négligeable de marques d'hétérochromatine, en particulier autour du site d'initiation de la transcription. En effet, les lysines 4 sont moyennement diméthylées (niveau inférieur à celui obtenu chez Daudi) ce qui dénote une activation de la chromatine, mais elles ne sont pas triméthylées et les lysines 9 sont hypoacétylées, ce qui suggère que l'activation de la chromatine n'est pas maximale. D'autre part, on note la présence de lysines 27 triméthylées. Ces résultats pourraient expliquer, d'une part les différences de niveaux d'expression d'Aiolos entre Daudi et Jurkat, d'autre part l'impact important des inhibiteurs de désacétylases sur l'induction de la transcription d'Aiolos dans les cellules Jurkat (Fig. 23A et B).

Les deux lignées Aiolos négatives U937 et 1106mel, qui possèdent toutes deux des îlots CpG méthylés, présentent des profils de modifications des histones opposés à ceux observés chez Daudi et Jurkat. Les marques de chromatine active sont majoritairement absentes. Les cellules 1106mel présentent cependant une légère diméthylation des lysines 4 au niveau du site d'initiation de la transcription. Les marques d'hétérochromatinisation divergent entre les deux lignées : les cellules U937 n'en présentent aucune tandis que les 1106mel possèdent des lysines 9 fortement triméthylées au niveau et à proximité immédiate

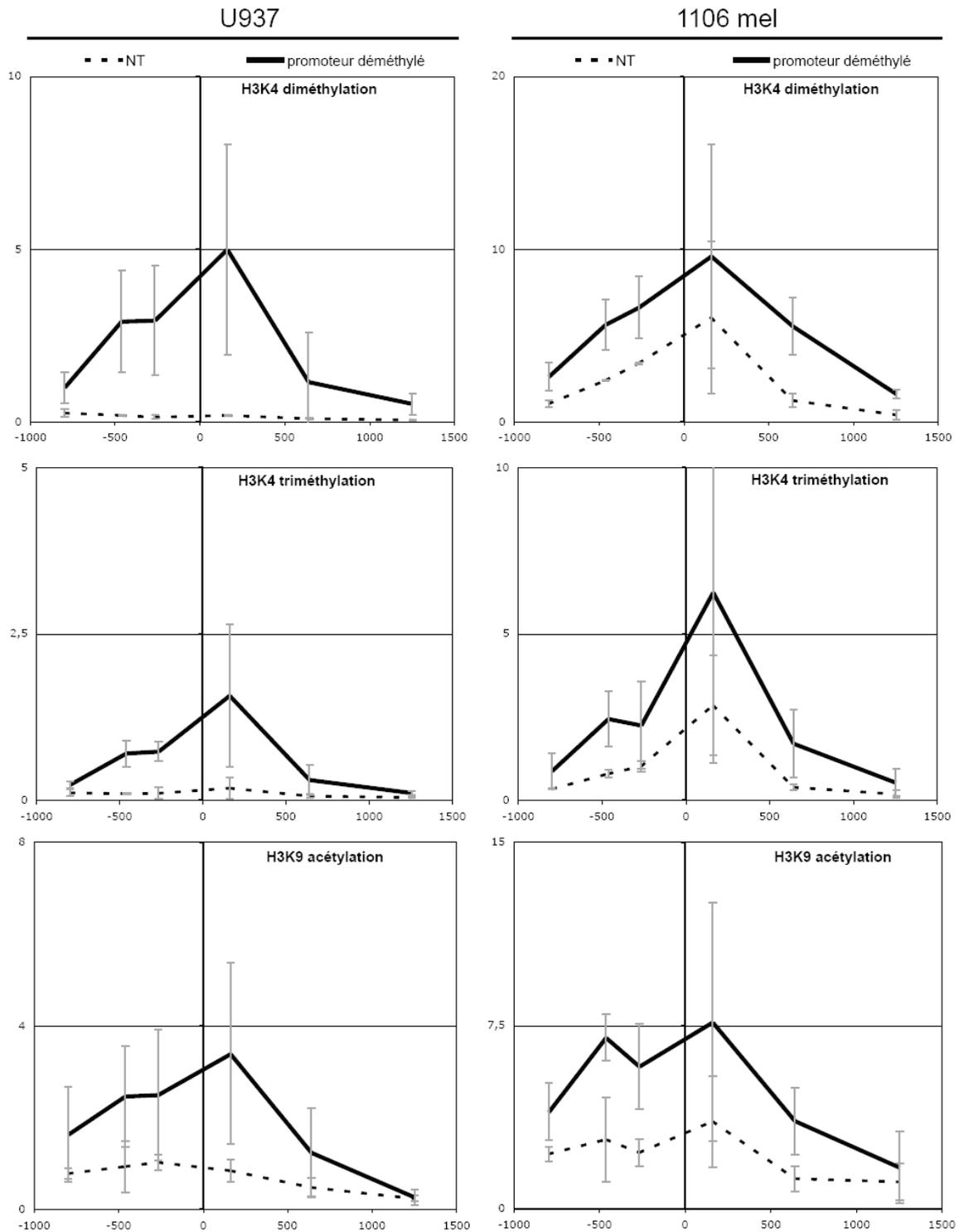


Figure 27 : Profils de modifications des histones dans les lignées U937 et 1106mel, traitées avec la 5-Aza-dC

Analyse des di- et tri-méthylations d'H3K4 et de l'acétylation des H3K9 par ChIP puis qPCR. Chaque point correspond à la moyenne des duplicats de deux expériences indépendantes. Pourcentage de méthylation correspondants présentés Fig. 24C.

de l'îlot CpG. Les lysines 27 sont triméthylées à un niveau légèrement supérieur à celui observé dans la lignée Jurkat.

Ces résultats confirment l'existence de deux profils distincts de répression d'Aiolos dans la lignée myéloïde U937 et dans la lignée non-hématopoïétique 1106mel (Fig. 29). Les cellules U937 ne présentent, ni marque de chromatine active, ni marque d'hétérochromatine. La répression d'Aiolos semble faire intervenir principalement la méthylation de son îlot CpG, comme l'ont montré le traitement déméthylant de l'ADN et les séquençages au bisulfite de sodium. En revanche, la chromatine des cellules 1106mel est partiellement inaccessible (triméthylation d'H3K9 et H3K27) et la méthylation de l'ADN apparaît comme un mécanisme de répression supplémentaire, consolidant la répression induite par la modification des histones mais insuffisant à lui seul.

6. La déméthylation du promoteur aiolos avec la 5-Aza-dC induit une augmentation localisée des marques d'euchromatine active

Afin d'étudier plus en détail l'impact de la déméthylation du promoteur aiolos sur les modifications covalentes des histones, nous avons analysé les profils de méthylation et d'acétylation des clones U937 et 1106mel obtenus après traitement avec la 5-Aza-dC (Fig. 27). Dans la lignée U937, la déméthylation du promoteur est associée à une augmentation des diméthylations (x2,7 à la position 162 pb) et triméthylations (x9,2) des lysines 4 des histones H3, ainsi qu'à une augmentation de l'acétylation des lysines 9 (x4). Une même tendance est également observable pour les 1106mel (H3K4me2 x1,6, H3K4me3 x2,2 et H3K9ace x2,1) mais les écarts expérimentaux plus importants ne permettent pas de tirer de conclusion. L'augmentation des marques d'euchromatine active est localisée spécifiquement au niveau et à proximité immédiate de l'îlot CpG. Les niveaux atteints restent inférieurs à ceux observés dans les lignées Aiolos positives Daudi et Jurkat ce qui est corrélé aux résultats précédemment présentés (cf. Fig. 23). Les marques d'hétérochromatine (triméthylation des lysines 9 et 27) ne sont pas modifiées par rapport aux cellules non traitées (données non présentées). Par ailleurs, les cellules qui n'ont pas réagi au traitement avec la 5-Aza-dC et n'ont pas vu diminuer la méthylation de leur promoteur aiolos, présentent des profils de modifications d'histones comparables à ceux observés dans les cellules non traitées (données non présentées).

L'augmentation de l'accessibilité de la chromatine représente donc un des mécanismes par lequel la déméthylation du promoteur aiolos des cellules U937, et probablement des 1106mel, induit une augmentation de leur activité transcriptionnelle.

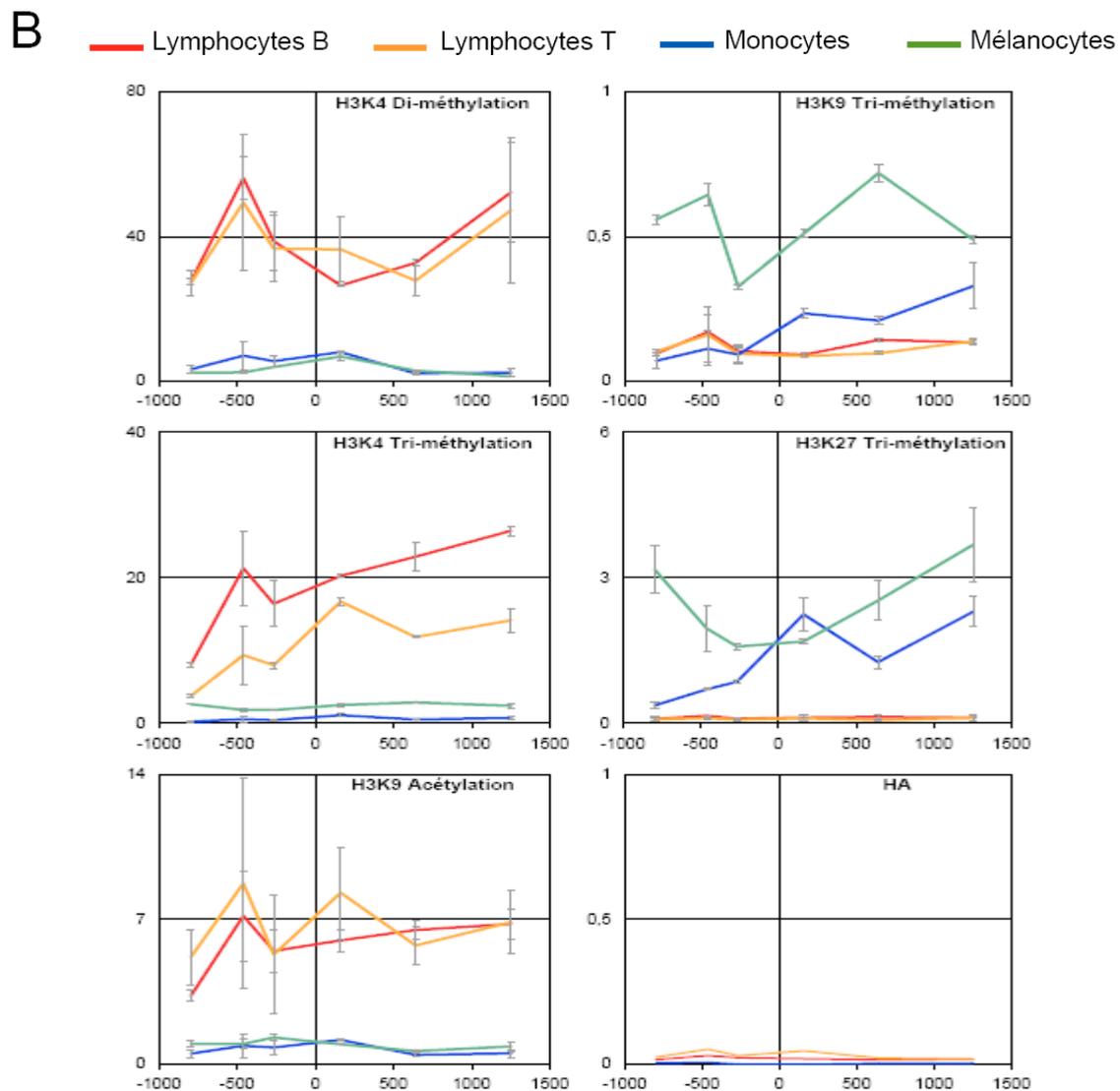
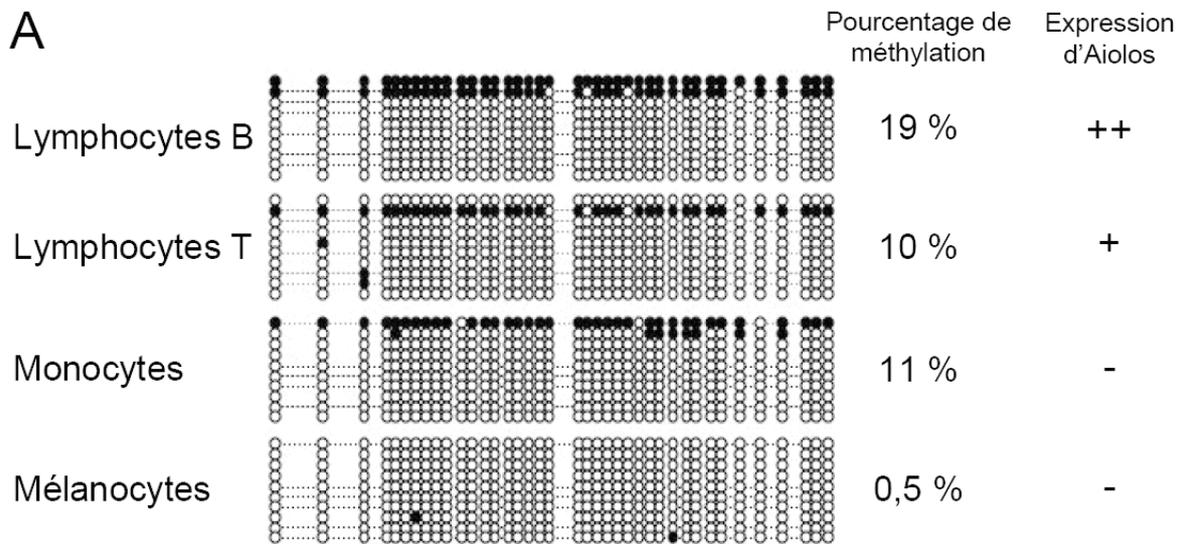


Figure 28 : Profils de méthylation de l'ADN et de modifications des histones de la région promotrice d'aïolos dans les lymphocytes T, B, les monocytes et les mélanocytes

A. Profils de méthylation de l'îlot CpG obtenu par séquençage au bisulfite de sodium de 10 clones différents. Les cercles noirs correspondent aux cytosines méthylées, les blancs aux cytosines non méthylées. **B.** Analyses des di- et tri-méthylations d'H3K4, des tri-méthylations d'H3K9 et d'H3K27 et de l'acétylation des H3K9 par ChIP puis qPCR. Chaque point correspond à la moyenne des duplicats de deux expériences indépendantes.

7. L'inhibition d'Aiolos dans les cellules primaires fait appel à des mécanismes indépendants de la méthylation du promoteur

Afin de déterminer si les mécanismes de répression du facteur de transcription Aiolos sont équivalents dans des cellules primaires, non cancéreuses et fraîchement isolées, nous avons analysé les profils de méthylation de l'îlot CpG et de modifications des histones dans des lymphocytes B/T et des monocytes du sang périphérique et dans des mélanocytes.

Les îlots CpG des lymphocytes B et T, exprimant Aiolos, sont très faiblement méthylés (Fig. 28A). De manière plus surprenante, ces derniers sont également déméthylés dans les monocytes et mélanocytes, négatifs pour Aiolos, ce qui démontre que la méthylation de l'îlot CpG n'est pas nécessaire à la répression du gène aiolos dans ces cellules. On ne peut pas exclure cependant une intervention de dinucléotides CpG, présents dans d'autres domaines du promoteur de manière isolée ou dans les autres îlots CpG du gène aiolos.

Les profils de modifications des histones présentent de très nettes différences entre les cellules exprimant Aiolos et les cellules ne l'exprimant pas (Fig. 28B). La chromatine est accessible et active dans les lymphocytes B et T, comme en témoignent les faibles niveaux de tri-méthylation des lysines 9 et 27 et les niveaux élevés de di- et tri-méthylation des lysines 4 et d'acétylation des lysines 9. La tri-méthylation des lysines 4 est plus faible dans les lymphocytes T que dans les lymphocytes B, ce qui est corrélé aux différences d'expression des transcrits Aiolos dans ces deux types cellulaires. Les monocytes et les mélanocytes présentent quant à eux une chromatine inactive et inaccessible avec une absence d'acétylation des lysines 9 et de méthylation des lysines 4 tandis que les lysines 27 sont très fortement tri-méthylées, à des niveaux bien supérieurs (environ 10 fois) à ceux qui sont observés dans les lignées U937 et 1106mel. On note par ailleurs, une triméthylation importante des lysines 9 pour les mélanocytes. Cette fermeture de la chromatine des monocytes et mélanocytes pourrait expliquer l'extinction du gène aiolos, rendant inutile la méthylation de l'îlot CpG aiolos, alors qu'elle reste importante dans les lignées U937 et 1106mel (Fig. 29).

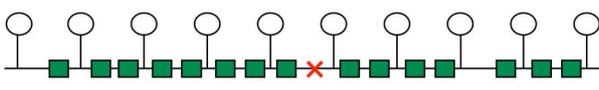
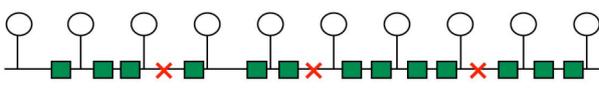
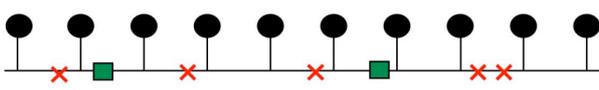
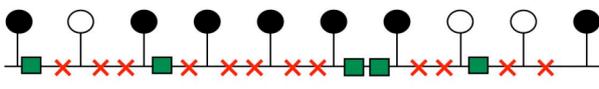
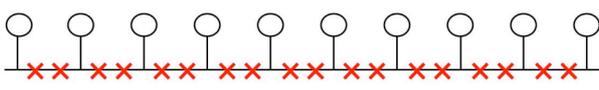
Cellules	Structure ADN /Chromatine	Aiolos
Daudi / Lymphocytes B	 <p>ADN / Chromatine ouverts</p>	++
Jurkat / Lymphocytes T	 <p>ADN / Chromatine ouverts</p>	+
U937	 <p>ADN fermé</p>	-
1106mel	 <p>ADN / chromatine partiellement fermés</p>	-
Monocytes / Mélanocytes	 <p>Chromatine fermée</p>	-

Figure 29 : Modèle des mécanismes potentiels d'inhibition du gène aiolos dans les différentes lignées et cellules primaires étudiées

Les cercles noirs correspondent aux cytosines méthylées, les blancs aux cytosines non méthylées. L'euchromatine active est représenté par des carrés verts, l'hétérochromatine par des croix rouges. Les niveaux d'expression d'Aiolos, correspondant à chaque type cellulaire, sont également indiqués.

IV. Discussion

Le facteur de transcription Aiolos est un élément régulateur essentiel dans la différenciation des lymphocytes, en particulier des lymphocytes B. Cependant, nous connaissons peu de choses sur les mécanismes qui régissent son expression au cours des différentes étapes de la lymphopoïèse. Il a été démontré au laboratoire que des lignées cellulaires exprimant Aiolos, comme des lignées ne l'exprimant pas, possédaient la machinerie transcriptionnelle nécessaire à l'expression d'Aiolos. Il a d'autre part été mis en évidence l'importance d'un autre membre de la famille, le facteur de transcription Ikaros, dans le contrôle de l'expression d'Aiolos (Ghadiri *et al.*, 2007).

Mes travaux de thèse ont permis d'affiner davantage notre connaissance des mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène aiolos, en démontrant la surimposition des mécanismes épigénétiques que sont la méthylation de l'ADN et les modifications covalentes des histones. L'importance relative de ces modifications dans l'inhibition d'Aiolos diffère cependant selon les types cellulaires étudiés : la méthylation de l'ADN joue un rôle prépondérant dans les lignées tumorales U937 et 1106mel mais pas dans les monocytes et mélanocytes primaires, où la répression repose sur la méthylation des histones H3.

1. Méthylation de l'ADN : un rôle dans les lignées tumorales mais pas dans les cellules primaires

Dans les lignées cancéreuses, la méthylation semble fonctionner comme un événement dominant qui assoit la répression transcriptionnelle. Une méthylation dense est observée dans les cellules U937 et 1106mel n'exprimant pas Aiolos, tandis que le promoteur est totalement déméthylé dans les cellules Daudi et Jurkat exprimant Aiolos. D'autre part, le traitement des lignées avec un agent inhibiteur des Dnmt, la 5-Aza-dC, et/ou un agent inhibiteur des HDAC, la TSA, a révélé des comportements différents face à la déméthylation.

Dans les cellules U937, l'inhibition des Dnmt uniquement permet d'induire l'expression d'Aiolos tandis que l'inhibition des HDAC seule n'a aucun effet. Si les cellules sont préalablement traitées avec la 5-Aza-dC, l'inhibition des HDAC induit en revanche un effet synergique. Ceci démontre la présence d'au moins deux mécanismes différents de répression transcriptionnelle au promoteur aiolos dans les cellules U937 :

- d'une part, un blocage direct de la fixation de facteurs régulateurs (notamment de facteurs de transcription) à la séquence méthylée, verrou non libéré par le traitement TSA seul.
- d'autre part, une liaison ADN méthylé/histone, notamment par l'intermédiaire des MBP, qui explique l'activation d'Aiolos dans les cellules traitées par la 5-Aza-dC seule et l'effet synergique observé lorsque les deux agents inhibiteurs sont couplés.

Une telle synergie entre méthylation de l'ADN et acétylation des histones, et le rôle dominant de la méthylation de l'ADN, a déjà été observée dans l'inhibition aberrante de l'expression des gènes *mlh1*, *timp3*, *cdkn2b* (*ink4b*, *p15*) ou *cdkn2a* (*ink4*, *p16*) (Cameron *et al.*, 1999). Les mécanismes à l'origine de cet effet synergique sont encore mal connus.

Nous avons démontré que le traitement avec la 5-Aza-dC induisait une augmentation, localisée au niveau de l'îlot CpG, de l'acétylation des H3K9 et de la méthylation des H3K4. D'autres équipes ont montré que cet agent inhibiteur des Dnmt induisait également une diminution de lysines 9 diméthylées sur les histones H3 (Ghoshal *et al.*, 2002 ; Nguyen *et al.*, 2002 ; Sharma *et al.*, 2005). L'hyperacétylation des histones pourrait être la conséquence de la dissociation des complexes de liaison à l'ADN méthylé comme MeCP2 ou de la séquestration et/ou dégradation des Dnmt par la 5-Aza-dC, induisant une diminution des quantités totales de protéines susceptibles d'interagir avec les HDAC (Ghoshal *et al.*, 2005 ; Rietveld *et al.*, 2002 ; Sharma *et al.*, 2005). Ce mécanisme pourrait également expliquer la diminution de la méthylation des H3K9, observée par Nguyen, Ghoshal ou Sharma, les Dnmt devenant incapables d'interagir avec les HMT SUV39H1 (Fuks *et al.*, 2003a ; Ghoshal *et al.*, 2002 ; Lehnertz *et al.*, 2003 ; Nguyen *et al.*, 2002 ; Sharma *et al.*, 2005). L'augmentation de la méthylation des H3K4 pourrait, quant à elle, résulter de l'hyperacétylation des histones H3 et de l'inactivation consécutive des histones déméthylases de type LSD1 (Lee *et al.*, 2006). Elle pourrait également s'expliquer par la liaison, au niveau des dinucléotides CpG non méthylées de complexes de type SET1 qui catalysent la méthylation d'H3K4 (Lee et Skalnik, 2005). Par ailleurs, le traitement avec la TSA, l'inhibition des HDAC et l'augmentation consécutives de l'acétylation des histones pourraient, d'une part augmenter la méthylation des H3K4 par l'intermédiaire de l'hyperacétylation des histones H3, et d'autre part bloquer partiellement l'activité répressive de MeCP2, dont l'action nécessite le fonctionnement correct des complexes de désacétylases comme Sin3A (El-Osta *et al.*, 2002).

Dans les cellules 1106mel, l'inhibition de l'activité histone désacétylase par la TSA est suffisante pour induire l'expression d'Aiolos. La déméthylation du promoteur a un effet mineur comparativement à l'acétylation. Un tel type de régulation a été rencontré pour le gène de la cycline A1 (Muller *et al.*, 2000). Dans ces cellules, on peut donc supposer que la

méthylation de l'ADN n'a pas d'effet direct sur la fixation d'éléments régulateurs et que la répression fait davantage appel à des mécanismes dépendant des MBP et/ou des différentes modifications des histones présentes dans la région promotrice. Certains auteurs suggèrent également que le traitement avec la TSA pourrait induire une déméthylation de l'ADN mais cet effet ne serait pas systématique (Ghoshal *et al.*, 2002 ; Selker, 1998).

Au cours de notre étude nous avons également observé une surexpression d'Aiolos dans les cellules Jurkat (et dans une moindre mesure dans les cellules Daudi) alors que leur promoteur est complètement déméthylé. Cette surexpression d'Aiolos après traitement avec la 5-Aza-dC et/ou la TSA pourrait être due à une activation de facteurs transcriptionnels amont d'Aiolos. Des facteurs de transcription comme EBF, E2A, Pax5, PU.1, AP-4 ou GATA peuvent être régulés par des mécanismes épigénétiques et pourraient induire en cascade une modification de l'expression d'Aiolos (Lee *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2001 ; Nakayama *et al.*, 2007 ; Palmisano *et al.*, 2003 ; Watamoto *et al.*, 2003). D'autre part, le facteur Ikaros se fixe au promoteur d'Aiolos et est capable d'induire son expression (Ghadiri *et al.*, 2007). Des études récentes dans le système endocrinien ont montré qu'Ikaros était lui-même régulé par des mécanismes épigénétiques, un traitement avec la 5-Aza-dC et la TSA induisant notamment sa surexpression (Zhu *et al.*, 2007). Cependant, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de variation dans les niveaux d'expression d'Ikaros après traitement avec les inhibiteurs des Dnmt et/ou des HDAC.

Le niveau de méthylation du promoteur pourrait intervenir sur l'efficacité de fixation d'Ikaros au promoteur Aiolos et expliquer, en partie, les différences de fixation observées *in vivo* par ChIP entre les cellules Aiolos positives Daudi ou Jurkat et les cellules Aiolos négatives U937 (Ghadiri *et al.*, 2007). Un tel mécanisme a été observé pour la régulation de l'activité du facteur E2F : la méthylation des sites de fixation d'E2F au promoteur des gènes *cdc2*, *c-myb* ou *c-myc* bloque la fixation du facteur E2F1 et modifie la réponse du promoteur (Campanero *et al.*, 2000). De la même façon, l'activation des gènes $\lambda 5$ et *V μ préB* est associée à une modification de la structure de la chromatine dans les séquences régulatrices de ces deux gènes et à une fixation accrue des facteurs de transcription PU.1 et E2A (Szutorisz *et al.*, 2005). Par ailleurs, les quantités moindres de protéines Ikaros totales dans le lignage myéloïde par rapport au lignage lymphoïde pourraient également intervenir et expliquer notamment la moindre activation transcriptionnelle du promoteur Aiolos dans les cellules U937, par rapport aux cellules Jurkat ou Daudi, après traitement déméthylant de l'ADN.

Dans les cellules primaires, contrairement à ce que nous attendions, la méthylation de l'ADN n'est pas nécessaire à la répression d'Aiolos. Les quatre types cellulaires testés possèdent en effet un promoteur déméthylé, indépendamment de l'expression ou non d'Aiolos. La méthylation de l'ADN pourrait donc représenter un mécanisme de répression spécifiquement impliqué lors de la tumorigénèse. Une telle absence de méthylation, associée à des gènes transcriptionnellement inactifs, a été observée pour des gènes comme la globine α ou le collagène $\alpha 2(1)$ (Bird *et al.*, 1987 ; McKeon *et al.*, 1982). On ne peut pas exclure cependant la présence de dinucléotides CpG méthylés dans d'autres domaines du promoteur aiolos, situés plus en amont du site d'initiation de la transcription.

2. Modifications des histones : un rôle prépondérant dans les cellules primaires et dans les lignées Aiolos positives

Les expériences de ChIP nous ont par ailleurs permis de confirmer le rôle prépondérant de l'acétylation et de la méthylation des histones H3 dans la régulation d'Aiolos. Les cellules exprimant Aiolos, tumorales (Daudi, Jurkat) ou primaires (Lymphocytes B et T), présentent des niveaux élevés de marques associées à l'euchromatine active (di et triméthylation des H3K4 – acétylation des H3K9) et une absence (sauf pour Jurkat, cf. ci-dessous) de marques associées à l'hétérochromatine (triméthylation des H3K9 et des H3K27). Les modifications des histones associées à une chromatine active comme l'acétylation des histones H3 et H4 pourraient activement exclure les Dnmt et ainsi empêcher la méthylation des promoteurs actifs. Un tel lien entre profils de méthylation d'H3K4 et activité du gène est également suggéré par Okitsu et Hsieh (Okitsu et Hsieh, 2007). Cette méthylation des H3K4 peut par ailleurs induire le recrutement de complexes de remodelage de la chromatine, d'ATPases ou des MBP qui, à leur tour, modulent l'activité des gènes. Ainsi, BPTF, un composant du complexe de remodelage de la chromatine NuRF reconnaît la triméthylation des lysines 4 des histones H3 par son domaine PHD et permet ainsi l'activation de l'expression du gène HOXC8 par l'intermédiaire de l'ATPase SNF2L (Wysocka *et al.*, 2006).

Les Jurkat présentent à la fois des modifications activatrices (H3K4me) et inhibitrices (H3K27me3), caractéristiques de domaines dits « bivalents ». Nos expériences ne nous permettent cependant pas de déterminer si ces deux marques sont présentes simultanément à la surface des cellules ou sont portées par deux sous-populations distinctes. Les domaines bivalents ont été observés pour la première fois par Bernstein *et coll* (2006) au cours de l'analyse d'éléments non codants fortement conservés dans les cellules souches

embryonnaires de souris (Bernstein *et al.*, 2006). La présence de ces deux types de modifications opposées est corrélée à une faible expression et est notamment trouvée dans les séquences promotrices de facteurs de transcription, présents dans les cellules souches murines et impliqués dans des processus de différenciation. Selon Bernstein *et coll.*, cette bivalence serait perdue au cours de la différenciation, les domaines conservant uniquement l'une ou l'autre des modifications (mais pas les deux). L'étude réalisée par Roh *et coll.* sur les modifications d'histones rencontrées dans les cellules T humaines semblent cependant indiquer que ces domaines bivalents sont plus largement répandus et ne sont pas restreints aux cellules souches (Roh *et al.*, 2006). En ce qui concerne Aiolos, leur présence dans les cellules Jurkat pourrait expliquer en partie la sous-expression d'Aiolos dans ces cellules par rapport au niveau observé dans les cellules Daudi (qui possèdent uniquement des marqueurs de chromatine active).

En dehors de la présence de marques d'hétérochromatine, on note par ailleurs une sous-méthylation de lysines 4 des histones H3 dans les Jurkat et les Lymphocytes T, par rapport aux Daudi et Lymphocytes B, qui est corrélée à la diminution d'expression d'Aiolos dans ces cellules. On sait que les groupements méthyl s'accumulent le long du cadre ouvert de lecture au fur et à mesure des transcriptions, définissant ainsi la région à transcrire (Pokholok *et al.*, 2005). La sous-méthylation des lysines 4 des histones 3 d'Aiolos dans les Jurkat et les lymphocytes T pourrait alors refléter la moindre activité transcriptionnelle du promoteur.

Les monocytes et mélanocytes, n'exprimant pas Aiolos, présentent le profil inverse avec un enrichissement en marques de l'hétérochromatine et notamment des niveaux élevés de triméthylation des lysines 9 et 27 des histones H3, et une absence de marques d'euchromatine. En revanche, les cellules U937 qui possèdent un promoteur densément méthylé ne présentent ni marques d'euchromatine, ni marques d'hétérochromatine. Les cellules 1106mel possèdent, quant à elle, un profil intermédiaire avec un promoteur partiellement méthylé et des H3K9 et H3K27 faiblement triméthylées. La triméthylation des H3K9 et des H3K27 pourrait donc jouer un rôle fondamental dans la répression d'Aiolos, en l'absence de méthylation de son ADN. Des travaux de Zhao (2005) sur la régulation du gène *mgmt* ont par ailleurs mis en évidence l'importance de la diméthylation des H3K9 et de la présence de MeCP2 dans ce type de répression (Zhao *et al.*, 2005). La méthylation des H3K9 induit le recrutement des protéines de l'hétérochromatine HP1 et la formation d'une structure fermée, associée à des activités désacétylases et méthyltransférases (Bannister *et al.*, 2001 ; Peters *et al.*, 2003 ; Rea *et al.*, 2000). La méthylation des H3K27 permet quant à

elle le recrutement de complexes Polycomb répresseurs de type PRC1 (Cao *et al.*, 2002 ; Kirmizis *et al.*, 2004 ; Koyanagi *et al.*, 2005).

L'ensemble des résultats présentés nous a donc permis de faire une distinction nette entre les mécanismes répresseurs impliqués dans les lignées tumorales et ceux impliqués dans les cellules primaires. La méthylation de l'ADN joue un rôle prépondérant dans les lignées tumorales et peut inhiber l'expression d'Aiolos sans surimposition de marques d'hétérochromatine. Dans les cellules primaires, en revanche, la triméthylation des lysines 9 et 27 des histones H3 prend le pas sur la méthylation de l'ADN et la rend inutile à la répression d'Aiolos. Il nous faut maintenant déterminer comment ces différents mécanismes interfèrent avec l'expression d'Aiolos et notamment s'ils agissent sur l'activité du facteur de transcription Ikaros, effecteur amont important d'Aiolos. D'autre part, la présence de mécanismes de régulation différents entre lignées tumorales et cellules primaires suggère que des modifications, à la fois dans les profils de méthylation de l'ADN et de méthylation/acétylation des histones, pourraient déréguler Aiolos et intervenir dans la tumorigénèse.

Chapitre II

Une augmentation de l'expression d'Aiolos
dans la LLC qui ne semble pas liée à des
modifications épigénétiques

I. Préambule

Le facteur de transcription Aiolos est impliqué d'une part dans la différenciation des cellules B, lors de la transition entre les stades pré-B et B immature, et d'autre part, dans la maturation des cellules B. Son inactivation chez la souris aboutit à une modification des proportions des différentes populations de cellules B matures et à leur hyper activation. Les cellules B des zones marginales sont absentes tandis que les cellules folliculaires sont augmentées et évoluent spontanément vers des centres germinatifs. Cette réponse, consécutive à des stimulus antigéniques normalement inefficaces, est due à une diminution du seuil nécessaire à l'activation du BCR. Il en résulte l'apparition de lymphomes B chez certaines souris.

L'inactivation d'Ikaros chez la souris est également associée à l'apparition de lymphomes. L'étude de son expression dans les hémopathies malignes humaines a montré l'existence de dérégulations dans la proportion des différentes isoformes. Ainsi, l'isoforme Ik-6 (DN) est surexprimée chez certains patients atteints de LAL ou LAM ainsi que dans la LMC. Cette surexpression est associée à une diminution de la mortalité cellulaire par apoptose. Aiolos intervient également dans la régulation de l'apoptose. Chez la souris, il contrôle l'activité du promoteur du gène bcl-2, il régule l'activité de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L en la séquestrant dans le cytoplasme et son absence est associée à une surexpression du récepteur Fas.

Le rôle d'Aiolos dans les hémopathies humaines est relativement peu documenté et les quelques études réalisées jusqu'à présent n'ont montré aucune dérégulation d'Aiolos, tant au niveau de l'expression de l'isoforme longue hAio1 que des isoformes DN. Les analyses réalisées se sont portées essentiellement sur des hémopathies des cellules B et T immatures (LAL). Aiolos étant principalement exprimé dans les cellules B matures, nous nous sommes concentrés sur des pathologies des cellules B matures, envahissant le sang périphérique, comme la LLC, les lymphomes du manteau ou les lymphomes des ZM. Nous avons étudié le niveau d'expression des différents transcrits Aiolos dans ces pathologies et cherché à déterminer s'il existait un déséquilibre entre les isoformes potentiellement oncogéniques d'Aiolos (à la manière de l'isoforme Ik6 d'Ikaros dans la LAL) et les isoformes longues. Nous nous sommes également intéressés au niveau global d'expression d'Aiolos. Les résultats obtenus font l'objet d'un article court (soumis) présenté en annexe 3.

II. Matériel et Méthodes

1. Échantillons biologiques

Les différents échantillons de lymphoproliférations ont été fournis par le Laboratoire d'Hématologie Biologique de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière. Ils sont constitués de PBMC, séparées du sang total par gradient de Ficoll puis conservées dans l'azote liquide.

Les cellules mononuclées des donneurs sains ont été isolées à partir d'anneaux de cytophèrese ou de sang total, fournis par l'établissement Français du Sang, puis ont été congelées afin de se rapprocher des conditions utilisées pour les patients.

2. Isolement des lymphocytes B

Les prélèvements sont décongelés à 37°C puis les cellules B sont triées positivement par billes magnétiques couplées à des Ac anti-CD19 (Dyna), selon les recommandations du fabricant. Les cellules et tampons utilisés sont maintenus à 4°C à toutes les étapes de purification afin de limiter la dégradation des ARN.

3. Extraction des ARN et contrôle qualité

Les lymphocytes B et les PBMC sont lysés en tampon RLT (RNeasy Mini de QIAGEN) et les ARN totaux sont extraits immédiatement selon les recommandations du fabricant. Les ARN obtenus sont dosés sur Nanodrop et leur qualité est vérifiée sur BioAnalyser2100 (Agilent Technologies).

4. Analyse des différents transcrits Aiolos exprimés

a) Par RT-PCR en une étape

500 ng d'ARN totaux (PBMC) sont inversement transcrits et amplifiés à l'aide du kit TITANIUM™ One-step RT-PCR de Clontech. Des oligonucléotides dT et des amorces spécifiques de régions situées respectivement dans les exons 1 et 8 d'Aiolos sont utilisés. Leurs séquences sont les suivantes : Aiolos sens 5'-GGCAGCGACATGGAAG-3' (exon 1), Aiolos anti-sens 5'-TAGCTGATGGCGTTATTGATGG-3' (exon 8). PBGD est utilisé comme contrôle interne : PBGD sens 5'-CTGGTAACGGCAATGCGGCT-3', PBGD anti-sens 5'-GCAGATGGCTCCGATGGTGA-3'. Afin de visualiser le plus grand nombre possible d'isoformes, nous avons procédé à 35 cycles d'amplification dans les conditions de températures suivantes : 94°C pendant 5 min, 35 cycles de 94°C - 30 s + 65°C - 30 s + 68°C - 1 min puis

68°C pendant 2 min. Les produits de PCR sont ensuite séparés sur gel d'agarose et visualisés par marquage au bromure d'éthidium.

b) Par RT-qPCR

500 ng d'ARN totaux (lymphocytes B de patient/donneur ou lignée contrôle Daudi) sont inversement transcrits en ADN complémentaire avec des oligonucléotides aléatoires et la transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen), dans un volume final de 25 µL, par 10 min à 70°C suivies d'1 h à 37°C.

La PCR quantitative est réalisée sur un ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems), à partir des 25 µL de RT précédente. Les couples sondes/amorces Hs00232635_m1, Hs00918017_m1 et Hs00245445_m1 (Applied Biosystems) ont été utilisés respectivement pour la détection de toutes les isoformes Aiolos (jonction entre exons 2 et 3), des isoformes hAio1 et hAio4 seulement (jonctions entre les exons 5 et 6) et de la kinase Abelson (Abl, contrôle interne), selon les recommandations du fabricant. Afin de corriger les différences d'efficacité de PCR entre les couples sondes/amorces Aiolos, des gammes sont réalisées, pour chaque couple et chaque plaque de lecture, à partir de plasmides pcDNA3.1-hAio1. Les échantillons sont dosés en triplicats et les quantités de transcrits obtenues sont normalisées par rapport au nombre de transcrits Abl (gammes réalisées sur ADNc Daudi).

5. Immunoprécipitation de la chromatine

Après tri des lymphocytes B avec des billes magnétiques anti-CD19 (Dynal), les billes sont détachées par 45 min d'incubation à température ambiante et sous agitation régulière en présence de DETACHaBEAD (Dynal), selon les recommandations du fabricant, puis la chromatine est extraite selon un protocole publié précédemment (Navarro *et al.*, 2006). Les ChIP sont réalisées avec les Ac anti-H3 trimeK4 (1/250, Abcam #AB8580) et aceK9 (1/100, Upstate #07352).

L'ADN immunoprécipité (IP) et une dilution au 1/100 de l'ADN total (« Input ») sont analysés par PCR en temps réel à l'aide du détecteur SYBR Green et d'un ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). Chaque qPCR est réalisée en duplicat. Les amorces utilisées reconnaissent l'îlot CpG d'Aiolos et des régions situées entre - 2kb et +2kb autour du site d'initiation de la transcription. Leurs séquences sont les suivantes : A1 sens 5'-TGGTCACTCCCCTTCTCT-3', A1 anti-sens 5'-TCCCAACACCCTCCCTACTG-3' ; A2 sens 5'-CAGTCCAGAGGGAAAACAAA-3', A2 anti-sens, 5'-TTGGTCCAAGTTTTTCAGACAGTTG-3' ; A3 sens 5'-GACAAAAGTTCCAGATCTTCCTCA-3', A3 anti-sens 5'-GTCAGCCTTGCTTCTTGGC-3' ; A4 sens 5'-GAGAGGCCGAGTAGCCACAG-3', A4 anti-sens 5'-TTGCACAGGTTAAGTTTCTCAAAGA-3' ; A5 sens 5'-TTGGCATTTCAGTTCCCTT-3', A5

anti-sens 5'-AACCTGATTTTTTGCCTGG-3' ; A6 sens 5'-TGGGCTGTTGTATACTATGGGAAA-3', A6 anti-sens 5'-CGGCTAGGAAAAATAGTGTGGGA-3'. Afin de standardiser les différentes expériences entre elles, le pourcentage d'immunoprécipitation est calculé en divisant la valeur moyenne obtenue pour l'IP par la valeur moyenne obtenue pour l'Input.

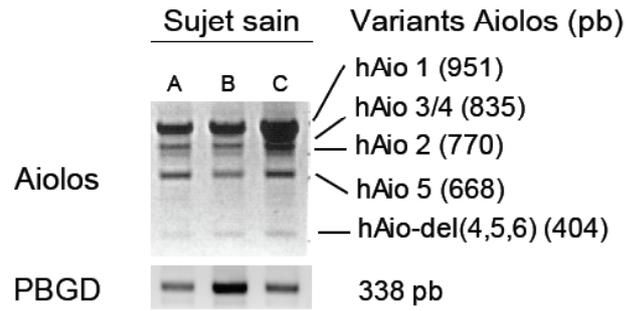
6. Western Blot

Les cellules sont lysées par incubation de 20 min à 4°C en tampon RIPA. 30 µg de protéines sont séparées par SDS-PAGE et transférées sur nitrocellulose. Les membranes sont bloquées avec du lait à 3% et de la BSA à 3% dans du TBST et sont incubées avec l'Ac primaire en présence de lait à 0,5% dans du TBS pendant une nuit. Les membranes sont lavées avec du TBST et incubées avec un Ac secondaire, couplé à la peroxydase, pendant une heure. Après trois lavages en TBS, les protéines sont révélées avec les systèmes ECL (Amersham) ou Femto (Pierce). Nous avons utilisé les Ac anti-Bcl-2 (1/250, BD biosciences #610539), anti-14-3-3 (1/250, Calbiochem #PC70) et les Ac secondaires de Dako (1/1000). Les Ac anti-Aiolos (1/100) ont été produits selon un protocole publié précédemment (Romero *et al.*, 1999).

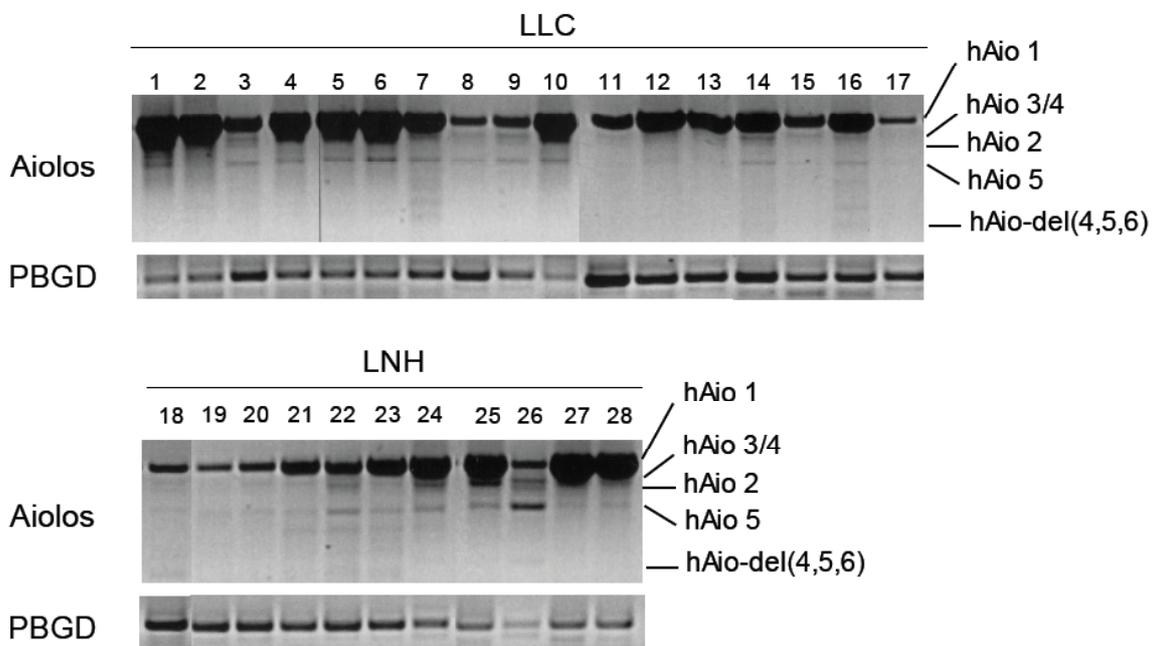
7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 4.0c (GraphPad Software), avec un test de Student impair. Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs lorsque $p \leq 0,05$, avec les degrés suivants : ns, non significatif, * $0,01 < p \leq 0,05$, ** $0,001 < p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

A



B



C

	LLC (n=17)	LNH (n=10)
Age moyen, années	62	71
Hommes, %	67	63
hAio1/PBGD, unité arbitraire	22 +/-14	19 +/-11

Figure 30 : Expression des isoformes Aiolos dans les PBMC de donneurs sains et de patients atteints de LLC ou de lymphomes B

A. Profils des isoformes Aiolos exprimées par les donneurs sains, obtenus par RT-PCR en une seule étape sur des ARNm extraits à partir de PBMC décongelés et non triés, déposés sur agarose 1,5% et révélés par marquage au bromure d'éthidium. **B.** Profils des isoformes Aiolos exprimées par des patients atteints de LLC ou de LNH. **C.** Caractéristiques des groupes de patients étudiés.

III. Résultats

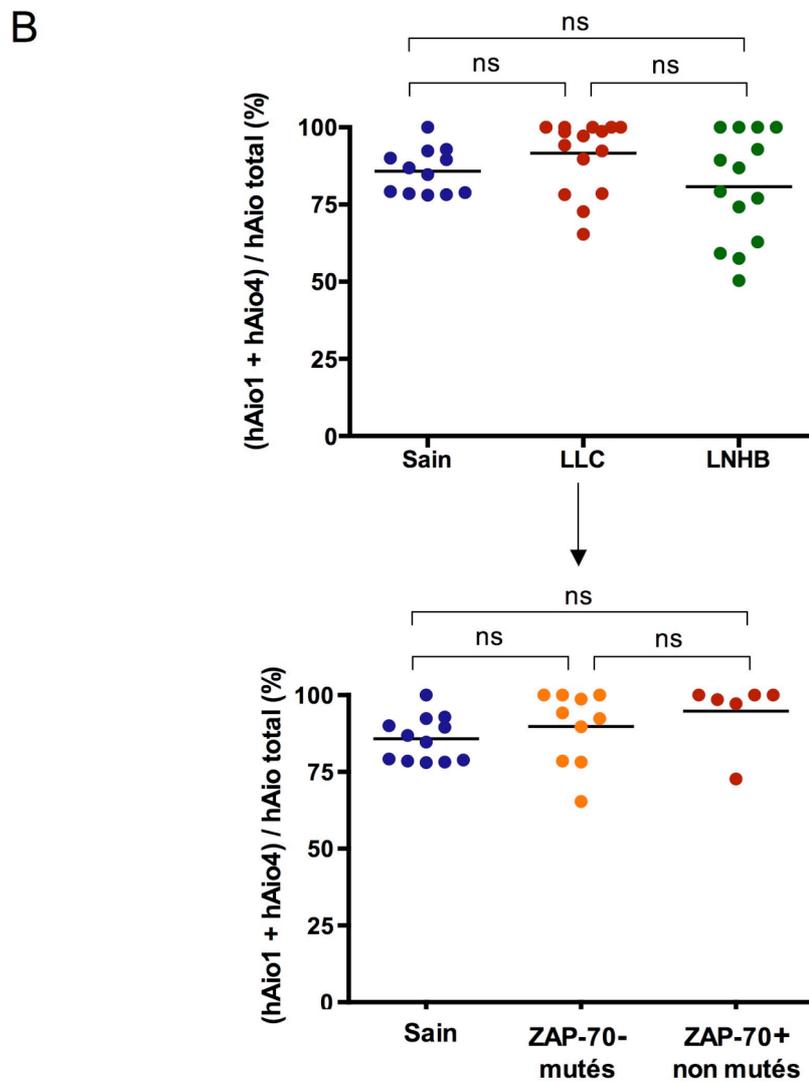
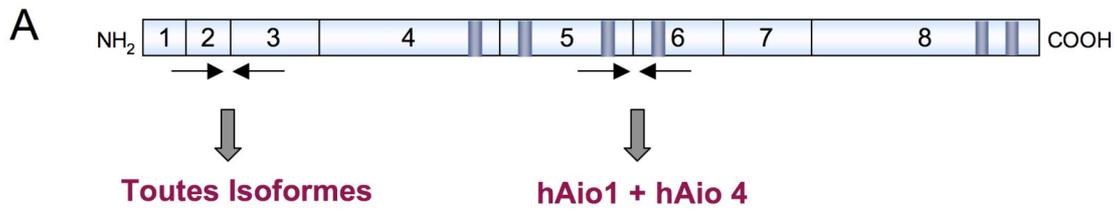
1. Les isoformes dominantes négatives d'Aiolos sont minoritaires chez les donneurs sains comme chez les patients atteints de LLC ou de LNH

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier les isoformes Aiolos exprimées par les cellules mononuclées du sang périphérique (lymphocytes B, T/NK et monocytes), chez des donneurs sains et chez des patients atteints de différents types d'hémopathies malignes des cellules B matures (LLC et LNH). L'analyse a été effectuée par RT-PCR en une seule étape sur des ARNm extraits à partir de PBMC de patients, décongelés et non triés.

Les 3 donneurs sains étudiés (Fig. 30A) présentent à la fois des isoformes fonctionnelles, hAio 1 et hAio 3/4, et des isoformes dominantes négatives, hAio 2, hAio 5 et hAio-del(4,5,6), cette dernière étant observée pour la première fois. hAio 1 est exprimée majoritairement mais varie cependant d'un donneur à l'autre. Les isoformes hAio 3/4 et hAio 5 présentent une expression légèrement inférieure tandis que hAio 2 et hAio-del(4,5,6) sont faiblement exprimées. Nous confirmons ainsi les résultats précédemment obtenus par Liippo *et coll* (Liippo *et al.*, 2001).

Nous avons ensuite étudié les profils d'isoformes Aiolos chez 17 patients atteints de LLC, 10 atteints de LNH (8 de la zone du manteau et 2 de la zone marginale) (Fig. 30B et 30C). Comme chez les donneurs sains, l'isoforme hAio 1 est majoritaire chez tous les patients atteints de LLC ou LNH testés. Son niveau d'expression varie fortement d'un patient à l'autre. Si l'on compare aux niveaux observés chez les donneurs sains, elle est surexprimée chez 11 LLC / 17 et 7 LNH / 10 et est sous-exprimée chez les autres. Les différentes populations de cellules mononuclées n'étant pas triées, les variations observées reflètent en partie les quantités relatives des différents types cellulaires et, en particulier des lymphocytes B présents, dans chaque échantillon. Les isoformes 3/4 sont visibles chez 11 LLC / 17 et chez 5 LNH / 10 mais à des niveaux d'expression globalement plus faibles que chez les donneurs sains. Il en est de même pour l'isoforme hAio 2 (10 LLC / 17 et 4 LNH / 10) et l'isoforme hAio 5 (11 LLC / 17 et 7 LNH / 10). Les autres isoformes ne sont pas détectées.

Sur les 27 patients étudiés ici, nous n'avons pas rencontré de patients exprimant une isoforme dominante négative de façon prépondérante. Au contraire, leurs transcrits semblent être en quantités inférieures à celles observées chez les donneurs sains. Il est probable que l'action d'Aiolos est régulée par une balance précise d'expression de ses différentes



C

	LLC		total (n=16)	LNH (n=14)	Sain n(12)
	ZAP70-/muté (n=10)	ZAP70+/non muté (n=6)			
Age moyen, années	63	53	58	72	57
Hommes, %	60	67	63	64	83
Ratio isoformes Aiolos, %	89,8 +/-11,9	94,7 +/-10,9	91,6 +/-11,4	80,7 +/-17,1	85,8 +/-7,3
Aio/Abl, quantités de transcrits	3,86 +/-0,9	4,28 +/-0,6	4,02 +/-0,8	2,86 +/-1,2	2,78 +/-0,4

Figure 31 : Proportions des isoformes Aiolos dans les lymphocytes B de patients atteints de LLC ou de lymphomes B et chez les sujets sains

A. Localisation des deux couples d'amorces utilisés par rapports aux exons Aiolos. **B.** Ratios (hAio1+hAio4) / hAio total dans les cellules B de sujets sains et de patients atteints de LLC ou de LNHB (tous patients confondus ou différents sous-groupes). Chaque point correspond à la moyenne des duplicats de deux RT-qPCR indépendantes. **C.** Caractéristiques des différents groupes de patients étudiés.

isoformes et en particulier de l'isoforme 1, plutôt que par l'expression prépondérante d'une isoforme dominante négative. Cette première série de patients est cependant trop hétérogène (proportions des différents types cellulaires, part des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines, ...) pour établir une corrélation précise. Nous avons donc choisi par la suite de nous concentrer spécifiquement sur les lymphocytes B d'une part et sur l'expression de l'isoforme 1, par rapport aux autres isoformes, d'autre part.

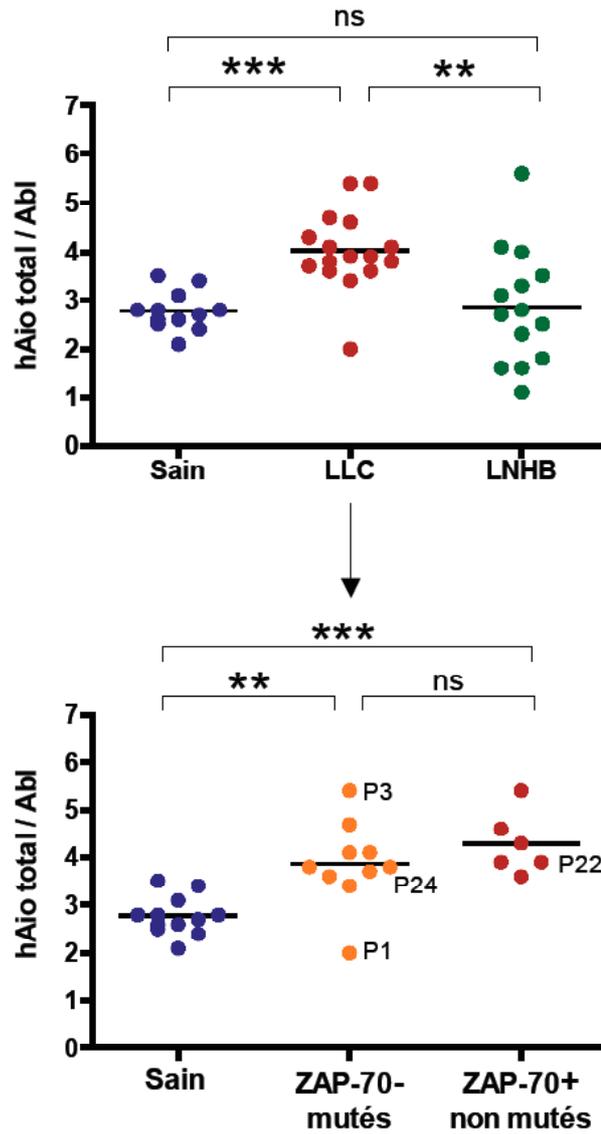
2. hAio 1 et hAio 4 représentent plus de 80% des isoformes Aiolos exprimées par les lymphocytes B, indépendamment de leur caractère cancéreux ou non

Afin de confirmer l'importance de l'isoforme hAio 1 dans les cellules B, saines et cancéreuses, nous avons défini une nouvelle série de 12 donneurs sains, 16 patients atteints de LLC, 13 patients atteints de lymphomes B (1 lymphome folliculaire, 4 lymphomes du manteau, 6 lymphomes de ZM et 2 lymphoproliférations atypiques) et 1 patient atteint de leucémie polyclonale (regroupé avec les LNH). Parmi les LLC, 10 patients ont un pronostic favorable (ZAP70-/IgV_H mutées) et 6 patients ont un pronostic défavorable (ZAP70+/IgV_H non mutées) (Fig. 31C). Nous avons analysé par RT-PCR quantitative la proportion des isoformes « longues », hAio 1 et hAio 4 (possédant leurs quatre doigts de zinc N-terminaux) par rapport à la totalité des isoformes présentes. Les analyses ont été réalisées sur des cellules décongelées puis triées par billes magnétiques anti-CD19 de sorte que seule la population B est étudiée.

Afin de quantifier les différentes isoformes, nous avons utilisé deux couples amorces/sondes différents se fixant, soit à la jonction entre les exons 2 et 3 et permettant de quantifier toutes les isoformes Aiolos, soit à la jonction entre les exons 5 et 6 et permettant de quantifier uniquement les isoformes hAio 1 et hAio 4 (Fig. 31A). Afin de corriger les différences d'efficacité de PCR entre les deux couples sondes/amorces, nous avons réalisé des gammes à partir de plasmides pcDNA3.1-hAio1. Les quantités absolues de transcrits, obtenues pour chaque couple sonde/amorces, sont ensuite normalisées par rapport au nombre de transcrits Abl.

La figure 31B présente les proportions relatives d'isoformes Aiolos obtenues. Les ratios hAio (1+4) / hAio total moyens observés chez les patients atteints de LLC (91,6%) sont légèrement supérieurs à ceux observés chez les donneurs sains (85,8%), mais non significativement différents. hAio 1 et hAio 4 représentent 89,8 % des isoformes Aiolos chez les patients à pronostic favorable et 94,7 % des isoformes Aiolos chez les patients à pronostic défavorable. Enfin, les ratios moyens observés dans les lymphomes B sont de

A



B

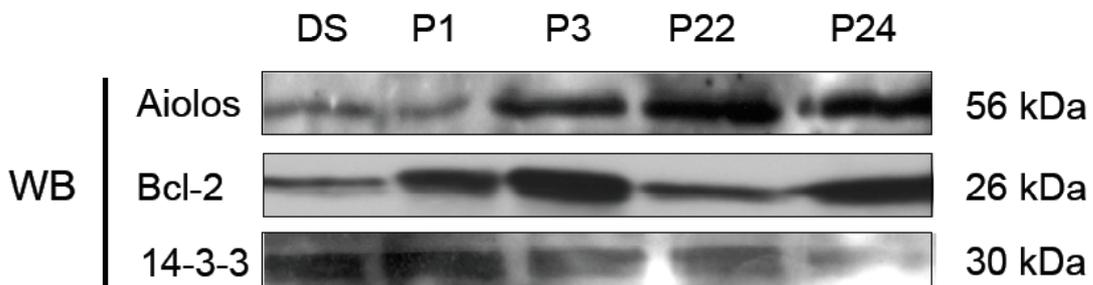


Figure 32 : Une surexpression d'Aiolos dans la LLC

A. Expression des ARNm Aiolos totaux (couple amorces/sonde exons2/3) chez les sujets sains et chez des patients atteints de LLC ou LNH (tous patients confondus ou différents sous-groupes). Les données sont normalisées par rapport au gène Abelson. Chaque point correspond à la moyenne de deux RT-qPCR indépendantes. **B.** WB Aiolos et Bcl-2 sur un donneur sain (DS) et sur quatre patients LLC, P1, P3, P22 et P24. La protéine 14-3-3 est utilisée en contrôle interne.

80,7% mais sont plus hétérogènes d'un patient à l'autre (Fig. 31C). Les faibles niveaux d'isoformes « courtes » présents dans les lymphocytes B suggèrent que l'action d'Aiolos s'exerce principalement par son isoforme longue hAio 1, dans les cellules saines comme dans les cellules tumorales. Cependant 1 LLC / 16 et 3 LNHB /14 présentent des ratios compris entre 50 et 70% qui témoignent d'une augmentation non négligeable des isoformes courtes. Nous ne savons pas à quel point ces isoformes courtes, qui restent en quantités inférieures à hAio 1, peuvent affecter le fonctionnement d'hAio1.

3. Les transcrits Aiolos sont augmentés dans la LLC, par rapport aux donneurs sains

Les proportions des différentes isoformes d'Aiolos les unes par rapport aux autres n'étant pas modifiées chez les patients étudiés, nous avons cherché à savoir s'il existait une dérégulation globale (augmentation ou diminution) des transcrits d'Aiolos. Pour cela, nous avons analysé les quantités de transcrits Aiolos chez les 12 donneurs sains, les 16 LLC et les 14 lymphomes utilisés pour la détermination des ratios d'isoformes (Fig. 31C). 15 patients atteints de LLC sur 16 présentent une augmentation de leurs transcrits Aiolos, les quantités obtenues étant en moyenne 1,5 fois plus importantes que chez les donneurs sains (Fig. 32A et 31C). Cette augmentation est valable pour les patients à pronostic favorable, comme pour les patients à pronostic défavorable. Seul le patient P1 présente un niveau d'expression comparable à celui observé chez les donneurs sains. Les quantités de transcrits Aiolos sont en revanche très hétérogènes dans les lymphomes B, comprises entre 2 fois moins et 2,5 fois plus que chez les sujets sains.

La réalisation de WB Aiolos chez un donneur sain (hAio total/Abl = 2,2), chez le patient P1 exprimant Aiolos à un niveau légèrement inférieur à celui du donneur sain moyen (hAio total/Abl = 2,0), chez le patient P3 (hAio total/Abl = 5,4) possédant 2,7 fois plus de transcrits Aiolos que P1 et chez les patients P22 et P24 à niveau intermédiaire (hAio total/Abl = 3,9 et 3,8 respectivement), nous a permis de confirmer la surexpression de la protéine Aiolos chez le patient P3, P22 et 24 (Fig. 32B). La protéine 14-3-3 est utilisée comme contrôle interne. Les conséquences de cette surexpression d'Aiolos sur le fonctionnement de la cellule tumorale restent à définir. Aiolos ayant été impliqué dans la régulation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans une lignée T murine (Romero *et al.*, 1999), nous avons analysé l'expression de Bcl-2 chez P1, P3, P22, P24 par rapport à un donneur sain (Fig. 32B). Bcl-2 est augmenté chez les quatre patients mais à des niveaux variables (très faiblement pour P22, seul patient à pronostic défavorable). Cette

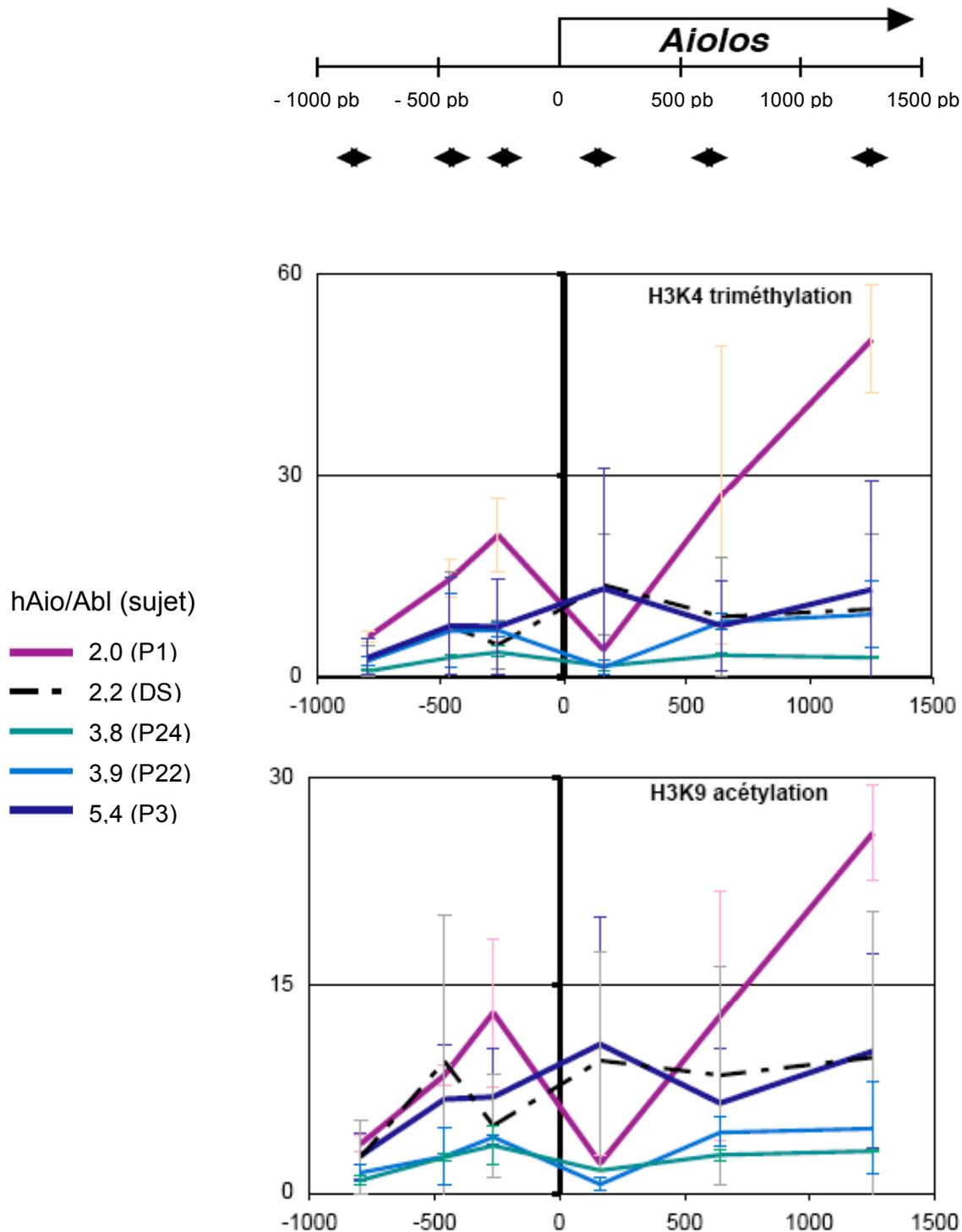


Figure 33 : Profils de modifications des histones au promoteur aiolos chez quatre patients LLC et chez un donneur sain

Analyse de la triméthylation des H3K4 et de l'acétylation des H3K9 chez le patient P1 à faible expression d'Aiolos, chez le patient P3 à forte expression d'Aiolos, chez deux patients à expression intermédiaire (P22 et P24) et chez un donneur sain (DS) par ChIP et qPCR. Chaque point correspond à la moyenne des duplicats de deux expériences indépendantes. La position des amorces utilisées, par rapport au site d'initiation de la transcription, figure également.

augmentation ne semble cependant pas être directement liée aux quantités de protéines Aiolos présentes dans les échantillons.

4. La surexpression d'Aiolos dans la LLC ne semble pas dépendre de modifications épigénétiques au promoteur aiolos

La surexpression d'Aiolos dans la LLC peut être due, d'une part à un accroissement de la durée de vie des ARNm d'Aiolos, d'autre part, à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de son promoteur. Nous avons vu précédemment que des modifications épigénétiques pouvaient intervenir dans la régulation transcriptionnelle d'aiolos. Nous avons donc étudié les profils de modifications d'histones au niveau du promoteur aiolos, chez un donneur sain (DS) et chez quatre patients exprimant Aiolos à des niveaux différents : 2,0 pour P1, 3,8 et 3,9 pour P24 et P22 respectivement, et 5,4 pour P3.

Afin de rester dans les mêmes conditions que précédemment, la chromatine a été extraite sur des cellules B, après décongélation et tri par billes magnétiques anti-CD19. Les faibles quantités de matériel obtenues ne nous ont permis d'étudier que deux marques de chromatine active : triméthylation des H3K4 et acétylation des H3K9. Aiolos étant exprimé à des niveaux équivalent (P1) ou supérieur (P22, P24 et P3) à ceux observés chez les donneurs sains et les marques d'hétérochromatine étant quasi-inexistantes dans les lymphocytes B sains (cf. Chap1), une modification de la triméthylation des H3K9 ou des H3K27 paraît peu probable. De même, il est peu probable que des modifications de la méthylation de l'ADN interviennent ici, l'ADN de la région promotrice d'Aiolos étant totalement déméthylé dans les lymphocytes B sains.

La figure 33 présente les profils obtenus. Les patients P22 et P24, à expression intermédiaire d'Aiolos, présentent les plus faibles degrés de méthylation et d'acétylation des histones. P3 possède un profil exactement superposable à celui du donneur sain, avec un maximum de marques d'euchromatine active en position +162 bp. P1 présente un profil inversé avec une diminution importante des marques d'euchromatine active en position +162 pb puis une forte augmentation en positions +642 et +1253 bp. En dehors de la position +1253 bp fortement acétylée et méthylée chez P1, les variations expérimentales sont cependant trop importantes pour nous permettre de conclure à une différence entre les profils de P1, P22 ou P24 et du DS. La surexpression d'Aiolos chez les patients atteints de LLC ne semble donc pas associée, dans nos conditions expérimentales, à des modifications des niveaux de méthylation des H3K4 et d'acétylation des H3K9.

IV. Discussion

Les membres de la famille Ikaros fonctionnent comme gènes suppresseurs de tumeur chez la souris, leur inactivation conduisant à l'apparition de lymphomes. Les mécanismes à l'origine de cette transformation néoplasique sont difficiles à déterminer, du fait de la complexité des modes d'action des protéines de cette famille et notamment de leur interaction avec des complexes de remodelage de la chromatine et de la présence de nombreuses isoformes qui viennent moduler leur activité initiale. Dans les hémopathies malignes humaines, le rôle des protéines Ikaros reste à définir. Des isoformes DN d'Ikaros ont été observées dans les LAL B et T de l'enfant et de l'adulte, dans les LAM et LMC (Nakase *et al.*, 2000 ; Nishii *et al.*, 2002 ; Ruiz *et al.*, 2004 ; Takanashi *et al.*, 2002 ; Tonnelles *et al.*, 2003 ; Yagi *et al.*, 2002) et ont été associées à une diminution de la mort cellulaire programmée. Le rôle d'Aiolos dans ces hémopathies a été beaucoup moins étudié et les analyses réalisées jusqu'alors n'avaient pas permis de démontrer la moindre dérégulation (Liippo *et al.*, 2001 ; Nakase *et al.*, 2000 ; Nakase *et al.*, 2002 ; Takanashi *et al.*, 2002).

Notre analyse de l'expression d'Aiolos a ciblé des lymphoproliférations des cellules B matures envahissant le sang périphérique (LLC et LNH). Nous avons observé l'existence d'une dérégulation de la protéine Aiolos dans la LLC qui passe, non pas par une modification des profils d'isoformes exprimées, mais par une augmentation de l'ensemble des transcrits Aiolos, en particulier de l'isoforme majoritaire hAio1.

A la différence d'Ikaros, les études réalisées par Liippo *et al.* (2001), Nakase *et al.* (2000, 2002), Takanashi *et al.* (2002) et nous même, n'ont pas permis de mettre en évidence la surexpression d'une isoforme dominante négative d'Aiolos dans les hémopathies malignes humaines, que ce soient des cellules immatures de la LAL ou des cellules matures de la LLC ou des LNH. Nos analyses par RT-PCR ont démontré l'expression de toutes les isoformes Aiolos, et en particulier de l'isoforme hAio1, par les cellules saines comme par les cellules cancéreuses. Nous retrouvons ainsi les résultats de Liippo *et coll* (2001). L'analyse par RT-qPCR confirme la prépondérance de l'isoforme hAio1 et démontre que les isoformes hAio 1 et hAio 4 représentent 80 à 95% des isoformes Aiolos, indépendamment du caractère cancéreux ou non des cellules B. La moindre importance des isoformes courtes, démontrée par la technique de PCR quantitative, par rapport à ce que laissaient penser les premières expériences de RT-PCR sur PBMC sains non triés, pourrait s'expliquer, d'une part par un biais envers les isoformes courtes de la technique de PCR (amplification plus efficace des fragments courts que des fragments longs) et, d'autre part par les différences de populations

cellulaires étudiées. En effet, les PBMC sont composés de 30% de monocytes (n'exprimant pas Aiolos) et de 70% de lymphocytes, majoritairement T (exprimant Aiolos à un niveau intermédiaire), populations qui ne possèdent peut-être pas le même profil d'isoformes Aiolos que les lymphocytes B.

L'absence de modifications significatives dans les profils d'isoformes exprimées par les cellules B cancéreuses, par rapport aux cellules saines, suggère que l'action d'Aiolos pourrait être davantage régulée par les quantités totales de protéines présentes, que par les proportions relatives de ses différentes isoformes. Dans la LLC, nous observons ainsi une augmentation significative des transcrits Aiolos exprimés par les cellules B cancéreuses par rapport aux lymphocytes B sains et aux lymphocytes B tumoraux des LNH. Cette augmentation est visible et équivalente dans les deux sous-groupes de LLC, indépendamment de l'expression de ZAP-70 et du status mutationnel des IgV_H, ce qui confirme que, du point de vue de la protéine Aiolos, ces deux entités définissent une seule et même pathologie (Klein *et al.*, 2001 ; Rosenwald *et al.*, 2001). Nos résultats ne nous permettent cependant pas de déterminer si l'augmentation d'Aiolos est un facteur à l'origine de la transformation néoplasique, une conséquence de la dérégulation d'un effecteur amont d'Aiolos dans la cellule cancéreuse ou le résultat de l'expansion clonale d'une cellule surexprimant Aiolos à l'origine.

L'augmentation des transcrits Aiolos chez les patients atteints de LLC pourrait être due à une translocation chromosomique juxtaposant Aiolos à un promoteur plus actif. Un tel réarrangement a été précédemment observé pour Ikaros dans les lymphomes diffus à grandes cellules (Hosokawa *et al.*, 2000). Elle pourrait par ailleurs être liée à un accroissement des quantités totales ou de l'activité des effecteurs amont d'Aiolos. Pax5 chez le poulet (Nera *et al.*, 2006), IRF4 et SLP-65 chez la souris (Thompson *et al.*, 2007), Ikaros ou NFκB chez l'homme (Ghadiri *et al.*, 2007) sont les seuls facteurs décrits actuellement comme pouvant exercer un rôle régulateur, direct ou non, sur la transcription d'Aiolos. Pax 5 et IRF4 sont surexprimés dans la LLC mais à des niveaux variables entre les sous-types mutés et non mutés et ne permettent donc pas d'expliquer l'augmentation globale d'Aiolos, indifféremment des marqueurs de pronostic (Chang *et al.*, 2002 ; Ferrer *et al.*, 2004 ; Krenacs *et al.*, 1998). NFκB est constitutivement surexprimé dans la LLC et pourrait représenter un facteur explicatif (Furman *et al.*, 2000). Il est également surexprimé dans les formes agressives de lymphome du manteau. En ce qui concerne Ikaros, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'expression entre le donneur sain et les patients P1 et P3 (données non présentées). Des modifications dans sa localisation nucléaire ou dans sa participation aux complexes de remodelage de la chromatine pourraient cependant intervenir

sur la régulation transcriptionnelle d'Aiolos, indépendamment de la quantité totale de protéines Ikaros.

L'absence de variations significatives dans les profils d'acétylation des H3K9 et de triméthylation des H3K4 au promoteur Aiolos suggère cependant que l'activité transcriptionnelle du promoteur Aiolos varie peu entre les sujets sains et les patients atteints de LLC. La surexpression d'Aiolos pourrait alors davantage être liée à une stabilisation de ses ARNm, phénomène déjà observé dans la LLC pour la protéine Bcl-2 (Otake *et al.*, 2007).

Les conséquences de la surexpression d'Aiolos sur l'apparition, le développement ou la survie de la cellule de LLC sont difficiles à déterminer étant donné le peu d'informations à notre disposition sur les cibles d'Aiolos et sur son mode de fonctionnement. Une seule cible directe d'Aiolos, le promoteur du gène bcl-2, a été décrite dans une lignée de cellules T murines, dépendantes pour leur croissance de la présence d'IL-2 (Romero *et al.*, 1999). Les cellules de LLC surexpriment Bcl-2 de manière constitutive par des mécanismes encore méconnus, faisant appel à une hypométhylation du promoteur bcl-2 (Hanada *et al.*, 1993), à une surexpression des microARN mi-R15 et mi-R16 (Calin *et al.*, 2005 ; Cimmino *et al.*, 2005) et/ou à une stabilisation des ARNm par la nucléoline (Otake *et al.*, 2007). P3, P22 et P24 surexpriment Aiolos de manière équivalente et présentent cependant des niveaux variables d'expression des protéines Bcl-2.

Parmi les effecteurs avals d'Aiolos définis chez la souris figurent également le facteur de transcription OBF-1 et la tyrosine kinase Btk, qui intervient dans la cascade de transduction des signaux émis par le BCR (Cariappa *et al.*, 2001 ; Sun *et al.*, 2003). Aucune dérégulation du facteur de transcription OBF-1 n'a été mise en évidence dans la LLC pour le moment. Btk et la cascade de transduction des signaux issus du BCR sont impliqués dans la réponse différentielle des sous-types mutés et non-mutés des cellules de LLC à une stimulation par un anti-IgM. La phosphorylation des tyrosines est augmentée chez 80% des cellules non mutées, contre seulement 20% des cellules mutées, et contribue au pronostic défavorable des cellules non mutées qui restent ainsi sensibles à la stimulation par les Ag et continuent à proliférer (Lanham *et al.*, 2003). Aiolos est sur-exprimé de manière équivalente par les deux sous-types de LLC. Sa contribution éventuelle à la régulation de la protéine Btk humaine pourrait cependant intervenir plus précocément dans la physiopathologie de la LLC.

Il a enfin été récemment démontré que l'isoforme hAio1 était d'une part capable d'interagir avec les complexes de désacétylation des histones et d'autre part, qu'elle pouvait s'associer spécifiquement au promoteur de SIRT1, une HDAC de classe III intervenant dans la formation de l'hétérochromatine facultative (Caballero *et al.*, 2007). L'augmentation d'Aiolos dans les cellules de LLC pourrait de ce fait avoir un impact sur les niveaux globaux d'acétylation et contribuer à des altérations épigénétiques (Raval *et al.*, 2006).

L'ensemble de nos travaux a permis pour la première fois de démontrer une dérégulation d'Aiolos dans une hémopathie maligne humaine qui, à la différence d'Ikaros, passe par une surexpression de l'ensemble des isoformes Aiolos (majoritairement hAio 1) et non par une modification des profils d'isoformes et la surexpression d'un dominant négatif. De nombreuses questions se posent maintenant sur les causes et les conséquences de cette surexpression sur l'apparition, le développement et la survie de la cellule de LLC. La réalisation de puces à ADN comparant des cellules sur-exprimant ou sous-exprimant artificiellement Aiolos à leur équivalent normal devrait nous permettre d'en savoir davantage sur les cibles de ce facteur de transcription et sa participation à la transformation néoplasique des cellules B.

Discussion/Perspectives

La différenciation des cellules hématopoïétiques, depuis la cellule souche pluripotente de la moelle osseuse jusqu'aux plasmocytes sécréteurs d'Ac à haute affinité pour l'Ag, est un processus complexe et étroitement régulé qui fait intervenir un très grand nombre d'acteurs. Chaque stade cellulaire peut faire l'objet d'une transformation néoplasique à l'origine d'une diversité de pathologies malignes, dont les caractéristiques, notamment moléculaires, et les origines ne sont pas complètement définies à l'heure actuelle. Parmi ces pathologies, la LLC représente la lymphoprolifération maligne chronique la plus fréquente chez l'adulte. Bien caractérisée sur le plan phénotypique et en terme de marqueurs pronostiques, de nombreuses questions subsistent cependant sur les mécanismes physiopathologiques responsables de la LLC et notamment sur la cellule saine dont elle dérive.

Parmi les acteurs intracellulaires nécessaires au déroulement normal de l'hématopoïèse figure une cascade de facteurs de transcription dont l'expression coordonnée assure l'engagement irréversible vers l'un des lignages hématopoïétiques, la différenciation des cellules au sein de ce lignage puis leur maturation. PU.1, Ikaros, E2A, EBF et Pax 5 sont parmi les principales protéines impliquées dans les étapes précoces de la différenciation lymphoïde B. Les travaux réalisés par notre équipe visent à comprendre le fonctionnement d'un facteur de transcription particulier appartenant à la famille Ikaros, la protéine Aiolos, dans la différenciation hématopoïétique humaine et notamment à caractériser ses effecteurs amont et aval et sa participation éventuelle aux hémopathies malignes.

La famille des facteurs de transcription Ikaros contribue de manière importante au développement du système immunitaire, en particulier lymphoïde. La réalisation de souris mutantes pour Ikaros et Aiolos a montré leur implication majeure à différentes étapes de la différenciation et leur rôle suppresseur de tumeur. Les fonctions exactes de ces protéines dans le déroulement de l'hématopoïèse sont cependant difficiles à déterminer du fait de la complexité de leurs mécanismes d'action. Ils passent notamment par la présence de nombreuses isoformes dont des dominants négatifs, l'hétérodimérisation des protéines de la famille les unes avec les autres et leur substitution potentielle ou la participation à des complexes de remodelage de transcription, activateurs ou répresseurs de la transcription. Si Ikaros a fait l'objet de nombreux travaux, Aiolos est peu étudié et les données caractérisant son fonctionnement sont très succinctes. Exprimé chez la souris à partir des stades Pré-T et Pré-B, Aiolos augmente avec la progression de la différenciation des cellules B et T pour atteindre un niveau maximal dans les cellules B matures. Ses fonctions décrites aujourd'hui concernent essentiellement la lymphopoïèse B et démontrent une participation, d'une part dans la moelle osseuse lors de la transition entre les stades pré-B et B immatures et, d'autre

part dans les organes lymphoïdes périphériques lors des étapes de maturation des lymphocytes B dépendantes de l'Ag.

Mes travaux de thèse ont permis d'affiner nos connaissances des mécanismes de régulation de l'expression des transcrits Aiolos au cours de l'hématopoïèse humaine et ont mis en évidence des différences épigénétiques majeures aux locus Aiolos présents dans les cellules B, T, myéloïdes et non hématopoïétiques, saines et cancéreuses. Nous avons d'autre part observé une augmentation d'Aiolos dans la LLC qui entraîne de nombreuses interrogations, tant sur le mode de fonctionnement d'Aiolos et notamment sur le rôle de ses isoformes DN, que sur ses cibles et en particulier son implication dans la transduction des signaux du BCR et dans la contrôle de l'apoptose.

1. Isoformes Aiolos et leucémogénèse

Le facteur de transcription Ikaros existe sous différentes isoformes, exprimées dans des proportions identiques chez la souris et chez l'homme, et qui contribuent de manière importante à l'exercice de sa fonction. Ainsi les isoformes dominantes négatives de type Ik-6, qui conservent leur capacité d'hétérodimérisation mais perdent leur capacité à lier l'ADN, diminuent fortement l'activité des isoformes longues (Koipally *et al.*, 1999). D'autres comme hIK-H favorisent la fixation d'hIk-1 à sa séquence promotrice cible en présence de deux sites de fixation et l'inhibent en présence d'un seul site (Koipally *et al.*, 1999). Par ailleurs, elles sont surexprimées chez certains patients atteints de leucémie lymphoïde aiguë ou de leucémie myéloïde (aiguë ou chronique) et participent à la régulation de la mort cellulaire, notamment en contrôlant l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-x_L (Yagi *et al.*, 2002).

Les différentes études réalisées sur Aiolos semblent montrer une importance moindre de l'épissage alternatif. Une seule isoforme, Aio1, est décrite chez la souris et, si des isoformes courtes (dont des DN) existent chez l'homme, nos travaux et ceux de Liippo *et al.* (2001), Nakase *et al.* (2000 – 2002) et Takanashi *et al.* (2002) ont montré qu'elles sont minoritaires et ne semblent pas intervenir dans les hémopathies malignes. En revanche, les quantités totales de protéines Aiolos et en particulier, leur augmentation à des étapes clé de la différenciation, assurent des fonctions majeures. Morgan *et coll* avaient déjà suggéré en 1997, l'importance, à un stade cellulaire donné, des quantités relatives de protéines Ikaros et Aiolos dans la progression de la différenciation (Morgan *et al.*, 1997). Thompson *et coll.* ont

démontré récemment (dans des cellules pré-B murines) que la répression complète de la pseudo-chaine légère $\lambda 5$ était permise par une augmentation brutale des transcrits et de la protéine Aiolos lors de la transition entre les stades pré-BI et pré-BII, venant ainsi augmenter l'occupation du promoteur du gène $\lambda 5$ et accentuer l'effet répresseur de la protéine Ikaros (Thompson *et al.*, 2007). Notre étude dans des hémopathies malignes humaines des cellules B matures a par ailleurs démontré une augmentation d'Aiolos dans la LLC par rapport aux sujets sains (alors que les quantités de protéines Ikaros ne sont pas modifiées) et semble confirmer l'importance des quantités de transcrits et de protéines Aiolos dans le déroulement normal de la différenciation et de la maturation des lymphocytes B, même si les conséquences de cette surexpression reste à définir. Il serait intéressant de caractériser plus finement les niveaux d'expression d'Aiolos dans les différents précurseurs B et dans les différentes sous populations B humaines à l'état sain (naïves, recirculantes, folliculaires, ZM, mémoires, plasmocytes). Nous pourrions ainsi déterminer si cette augmentation des transcrits et de la protéine Aiolos caractérise un sous-type particulier de lymphocyte B pré-existant chez les sujets sains, donnant alors des informations supplémentaires sur l'origine potentielle de la LLC, ou si elle est due à un dérèglement ponctuel et anormal dans la transcription ou la conservation des transcrits Aiolos, à l'origine ou en conséquence de la transformation néoplasique.

Outre les quantités de transcrits/protéines Aiolos totales, il serait également intéressant de caractériser plus finement la localisation cellulaire des différentes isoformes d'Aiolos et les protéines avec lesquelles elles sont associées chez l'homme. Chez la souris, Ikaros et Aiolos présentent une localisation variable dans la cellule : répartis de manière diffuse dans le noyau des cellules au repos, ils co-localisent avec l'HC-PC pendant la phase S puis sont libérés de ces structures au cours de la mitose (Brown *et al.*, 1997). La phosphorylation de certains résidus d'Ikaros intervient dans le contrôle de sa localisation (Cobb *et al.*, 2000 ; Dovat *et al.*, 2002 ; Gomez-del Arco *et al.*, 2004). De telles études des mécanismes de régulation post-traductionnelle restent à faire pour Aiolos. Romero *et al.* (1999) et Rebollo *et al.* (2001) ont montré, dans une lignée de cellules T murines, qu'Aiolos déphosphorylé était séquestré dans le cytoplasme. Si des mutations de la principale tyrosine impliquée dans cette séquestration ne semblent pas intervenir dans la LLC (Antica *et al.*, 2007), des degrés variables de phosphorylation, dues à des mutations sur d'autres résidus ou à l'absence de certains exons (isoformes DN), pourraient intervenir dans le contrôle de la localisation nucléaire des isoformes Aiolos et leur implication éventuelle dans la leucémogénèse.

Par ailleurs, Ikaros et Aiolos participent tous deux chez la souris à des complexes de désacétylation et de remodelage de la chromatine, activateurs de la transcription comme les

complexes SWI/SNF ou répresseurs comme les complexes NuRD et Sin3 (Kim *et al.*, 1999 ; Koipally *et al.*, 1999). Caballero *et coll* ont récemment démontré qu'hAio1 participait à de tels complexes chez l'homme (Caballero *et al.*, 2007). En revanche, ses isoformes DN en sont incapables et leur présence contribue à réduire l'activité HDAC, induisant une augmentation de l'acétylation globale des histones H3 et H4. Un déséquilibre, même faible, dans les proportions d'isoformes Aiolos pourraient alors intervenir dans le développement de tumeurs lymphoïdes en dérégulant notamment les processus moléculaires normaux de transcription.

2. Les cibles d'Aiolos ? Une intervention dans la transduction des signaux émis par le BCR et dans le contrôle de l'apoptose

La plupart des informations concernant les cibles d'Aiolos proviennent de souris ou de lignées Aio^{-/-} et ont montré son implication dans deux types de mécanismes : d'une part dans la transduction des signaux émis par le BCR et d'autre part dans le contrôle de l'apoptose.

Les souris Aio^{-/-}, réalisées par Wang *et coll*, voient augmenter la force des signaux émis par les BCR de leurs cellules B. Cette augmentation est due à une interférence avec les signaux régulateurs négatifs émis par les récepteurs aux Fc γ et à une induction des signaux régulateurs positifs émis par les BCR (Wang *et al.*, 1998). Ces BCR présentent une affinité plus faible pour leur Ag, réagissent à des concentrations antigéniques moindres et permettent la survie, au niveau de la zone claire des centres germinatifs, de cellules qui auraient été négligées en temps normal (Cariappa *et al.*, 2001). Plusieurs études récentes mettent en avant l'implication de l'affinité du BCR pour son Ag dans l'engagement de la cellule B vers une réaction folliculaire ou extrafolliculaire : une affinité faible serait associée à la formation de centres germinatifs tandis qu'une affinité forte conduirait davantage à des réactions extrafolliculaires (O'Connor *et al.*, 2006 ; Paus *et al.*, 2006). Cette théorie pourrait en partie expliquer la formation accrue de cellules folliculaires et de centres germinatifs dans les souris Aio^{-/-} (Wang *et al.*, 1998). Au niveau intracellulaire, la stimulation antigénique accrue est associée, dans une lignée DT40 Aio^{-/-}, à une augmentation de la phosphorylation des tyrosines kinases et de la concentration en calcium (Narvi *et al.*, 2007). Etant donné que nous remarquons une augmentation d'Aiolos dans la LLC, nous pourrions nous attendre dans ces cellules néoplasiques à observer les effets inverses : hypophosphorylation des tyrosines kinases et diminution des flux calciques intracellulaires, diminution des signaux émis par les BCR et augmentation des concentrations antigéniques nécessaires à

l'activation des cellules, qui pourraient induire une orientation préférentielle vers les réactions extrafolliculaires. Cependant, les deux sous-groupes mutés et non mutés de LLC présentent des réactions différentielles à la stimulation de leur BCR alors que nous n'observons pas de différence en termes d'expression des transcrits Aiolos. Les travaux de Allsup et coll (2005) ont montré notamment que seules les cellules non mutées étaient capables d'induire, après activation de leur BCR, une migration des BCR dans les rafts, une phosphorylation d'effecteurs précoces de la transduction du signal comme CD79a ou ERK-2 et une augmentation des concentrations en calcium intracellulaire (Allsup *et al.*, 2005). Les cellules mutées présentent quant à elles un phénotype qui se rapproche de cellules anergiques. Par ailleurs, l'expression par les cellules de LLC des jonctions d'adhésion JAM-C serait plutôt la signature de cellules dérivées des centres germinatifs (Ody *et al.*, 2007).

En revanche, la surexpression d'Aiolos dans les cellules de LLC corrèle avec l'augmentation de leur survie. Même si l'implication directe d'Aiolos dans le contrôle de l'expression de la protéine Bcl-2, démontrée dans une lignée T murine (Romero *et al.*, 1999), n'a pas été confirmée pour le moment dans le lignage B, sa participation à la survie des cellules ne fait aucun doute (Narvi *et al.*, 2007).

Par ailleurs, une étude récente réalisée sur des cellules pré-B de poulet a montré l'implication d'Aiolos dans la conversion des gènes des Ig par des mécanismes indépendants de l'AID (Activation-Induced cytidine deaminase) (Narvi *et al.*, 2007). Une implication d'Aiolos dans la maturation des gènes des Ig a également été montrée chez la souris. Les segments V_H des cellules mémoires des souris déficientes en Aiolos sont moins spécifiques de leur Ag cible et présentent un niveau de mutation moindre que dans les cellules sauvages (Cortes et Georgopoulos, 2004). Il serait intéressant d'examiner la participation d'Aiolos aux mécanismes de mutation des gènes des Ig chez l'homme, où se pose notamment le problème de l'origine des mutations des segments V_H des Ig des cellules mémoires des ZM (Weller *et al.*, 2005 ; Willenbrock *et al.*, 2005).

[3. Qui régule le régulateur ? Une composante génétique indissociable des mécanismes épigénétiques](#)

Peu d'effecteurs amont d'Aiolos ont été définis pour le moment. L'inhibition de Pax-5 dans la lignée DT40 induit une sous-expression d'Aiolos tandis que l'induction de SLP-65 en réponse à une stimulation du pré-BCR dans des lignées pré-B murines induit une augmentation brutale d'Aiolos (Nera *et al.*, 2006 ; Thompson *et al.*, 2007). Les travaux de

notre équipe sur les mécanismes génétiques de régulation d'Aiolos dans des lignées cellulaires humaines ont montré, d'une part que les lignées exprimant Aiolos comme celles ne l'exprimant pas possédaient la machinerie transcriptionnelle nécessaire à l'activité du promoteur Aiolos et, d'autre part que la protéine Ikaros était capable de contrôler l'expression d'Aiolos (Ghadiri *et al.*, 2007).

L'étude des profils de méthylation de l'ADN et de modifications des histones que nous avons réalisée par la suite a montré la surimposition de mécanismes épigénétiques et a permis d'expliquer en partie les différences d'expression des transcrits Aiolos dans des lignages distincts. Dans des cellules n'exprimant pas Aiolos (non hématopoïétiques ou appartenant au lignage myéloïde) la chromatine est rendue inaccessible par méthylation de l'ADN ou triméthylation des H3K9 et des H3K27, tandis que dans des cellules exprimant Aiolos (lignages lymphoïdes B et T), l'ADN n'est pas méthylé et les niveaux variables d'acétylation et de méthylation des histones reflètent la moindre expression d'Aiolos dans le lignage T par rapport au lignage B. Ces travaux et les résultats récents de Zhu *et coll.*, démontrant la régulation d'Ikaros par des modifications épigénétiques dans le système endocrinien, illustrent l'importance de l'épigénétique dans le fonctionnement des protéines de la famille Ikaros, à la fois en tant que mécanisme régulateur de leur transcription et en tant que moyen d'exercer leur propre fonction, par l'intermédiaire des complexes de désacétylation et de remodelage de la chromatine ou du contrôle de la transcription d'HDAC comme SIRT1 (Zhu *et al.*, 2007 ; Caballero *et al.*, 2007).

Il serait intéressant d'étudier plus en détails les mécanismes génétiques de contrôle de la transcription d'Aiolos dans ce contexte d'accessibilité variable de la chromatine. Notre équipe a montré que la surexpression d'Ikaros était capable d'induire une surexpression d'Aiolos dans les cellules U937 (Ghadiri *et al.*, 2007 – Annexe 1 Fig 7). Cette expérience ne prend cependant pas en compte la surimposition des mécanismes épigénétiques, la construction utilisée ayant été obtenue à partir de PBMC dans lesquels le promoteur Aiolos est totalement déméthylé, et ne reflète donc pas complètement le fonctionnement normal du gène *in vivo*. La méthylation du promoteur Aiolos dans les cellules U937 explique probablement la très faible fixation d'Ikaros, *in vivo*, au locus Aiolos (Ghadiri *et al.*, 2007 – Annexe 1 Fig 6), ce qu'il nous faudra démontrer.

Les différentes délétions du promoteur Aiolos (Ghadiri *et al.*, 2007) ont par ailleurs démontré l'existence de régions régulatrices supplémentaires notamment entre -370 et -175 bp dans Jurkat, Daudi et U937, entre -1575 bp et -670 pb dans Daudi et entre -3940 bp et -1975 bp dans U937. Il reste à étudier ces différents segments afin de déterminer les éléments régulateurs présents et leur importance dans le contrôle de l'expression d'Aiolos.

Parmi les séquences cibles figurent notamment des sites de fixations de Pax1/Pax2 (famille de Pax5), Oct1, E2F, STAT6, PU.1 ou GATA1/GATA3 montrant l'importance potentielle des facteurs de transcription clé de la lymphopoïèse B dans le déclenchement de l'expression d'Aiolos aussi bien lors des étapes précoces de la lymphopoïèse B que dans les étapes plus tardives de maturation.

L'épigénétique revêt une importance croissante dans la détermination des mécanismes à l'origine de l'expression séquentielle des gènes au cours des différentes étapes de la lymphopoïèse. La plupart des facteurs de transcription décrits ci-dessus est régulée par des mécanismes épigénétiques. D'autre part, des modifications dans la localisation cellulaire et dans la cinétique de réplication de l'ADN lors de l'interphase se surimposent à des profils de méthylation de l'ADN et un code histone déjà complexes. Les découvertes d'anomalies épigénétiques dans les cellules cancéreuses sont nombreuses depuis quelques années et démontrent l'importance de ces mécanismes dans la tumorigénèse (Galm *et al.*, 2006). Ainsi, dans la LLC, près de 200 gènes possèdent une méthylation aberrante de leur promoteur (Raval *et al.*, 2006 ; Rush *et al.*, 2004). Parmi eux, la surexpression constitutive de Bcl-2 est en partie due à une hypométhylation de son promoteur (Hanada *et al.*, 1993). Aiolos n'échappe pas à ce phénomène et nous avons mis en évidence des différences majeures entre cellules saines et cellules cancéreuses, confirmant l'implication de la méthylation de l'ADN dans ces dernières tandis que la régulation d'Aiolos repose davantage sur les degrés de triméthylation des H3K27 et des H3K9 dans les cellules saines.

Le promoteur Aiolos étant déméthylé dans les cellules B, une modification des profils de méthylation de l'ADN au locus Aiolos dans la LLC paraît peu compatible avec la surexpression d'Aiolos. L'acétylation des H3K9 et la triméthylation des H3K4 ne semblent pas non plus impliquées. D'autres types de modification d'histones comme la phosphorylation pourraient cependant intervenir. D'autre part, l'induction d'Aiolos dans des lignages comme le lignage myéloïde pourrait également contribuer à l'apparition d'hémopathies malignes. De nombreuses modifications épigénétiques ayant également été décrites dans les leucémies myéloïdes, une augmentation anormale de l'accessibilité de la chromatine Aiolos dans ces pathologies est envisageable.

En conclusion, nos travaux ont permis de voir plus clair dans les mécanismes de régulation de la transcription du facteur Aiolos au cours de l'hématopoïèse et ont démontré le rôle majeur de l'épigénétique. Nous avons d'autre part mis en évidence une augmentation homogène des transcrits et des protéines Aiolos dans la LLC, lymphoprolifération chronique

la plus fréquente chez le sujet adulte. Aiolos conserve toutefois une part importante de mystère, tant dans son mode de fonctionnement, que dans ses cibles et son implication dans la leucémogénèse, en particulier dans la physiopathologie de la LLC.

Le ciblage de l'épigénétique apparaît aujourd'hui comme une thérapeutique anti-cancéreuse prometteuse. De nombreux essais s'intéressent notamment aux inhibiteurs des Dnmt (Décitabine) ou aux inhibiteurs des HDAC (Depsipeptide) (Minucci et Pelicci, 2006). Une étude de phase I, portant en particulier sur 10 patients atteints de LLC, a ainsi montré une activité anti-tumorale du depsipeptide FK228 mais n'a pas permis d'induire de rémission (partielle ou complète) au sens strict du terme (Byrd *et al.*, 2005). Une modification des modalités d'injection devrait apporter une amélioration à ces résultats encourageants.

Bibliographie

- Adams, C.C. and Workman, J.L. (1995) Binding of disparate transcriptional activators to nucleosomal DNA is inherently cooperative. *Mol Cell Biol*, **15**, 1405-1421.
- Adkins, M.W., Howar, S.R. and Tyler, J.K. (2004) Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Mol Cell*, **14**, 657-666.
- Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M. and Jacobsen, S.E. (2005) Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, **121**, 295-306.
- Allsup, D.J., Kamiguti, A.S., Lin, K., Sherrington, P.D., Matrai, Z., Slupsky, J.R., Cawley, J.C. and Zuzel, M. (2005) B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*, **65**, 7328-7337.
- Antequera, F. and Bird, A. (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11995-11999.
- Antica, M., Dubravcic, K., Weber, I., Raic, L., Labar, B. and Batinic, D. (2007) A search for a mutation of the Aiolos phosphorylation domain in lymphocytes from patients with leukemia. *Haematologica*, **92**, 260-261.
- Arney, K.L. and Fisher, A.G. (2004) Epigenetic aspects of differentiation. *J Cell Sci*, **117**, 4355-4363.
- Austen, B., Powell, J.E., Alvi, A., Edwards, I., Hooper, L., Starczynski, J., Taylor, A.M., Fegan, C., Moss, P. and Stankovic, T. (2005) Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood*, **106**, 3175-3182.
- 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.
- Bai, S., Ghoshal, K., Datta, J., Majumder, S., Yoon, S.O. and Jacob, S.T. (2005) DNA methyltransferase 3b regulates nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells by recruiting histone deacetylase 2. *Mol Cell Biol*, **25**, 751-766.
- Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M. and *et al.* (1994) E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell*, **79**, 885-892.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
- Bea, S., Tort, F., Pinyol, M., Puig, X., Hernandez, L., Hernandez, S., Fernandez, P.L., van Lohuizen, M., Colomer, D. and Campo, E. (2001) BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res*, **61**, 2409-2412.

- Bereshchenko, O.R., Gu, W. and Dalla-Favera, R. (2002) Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet*, **32**, 606-613.
- Bergman, Y. and Cedar, H. (2004) A stepwise epigenetic process controls immunoglobulin allelic exclusion. *Nat Rev Immunol*, **4**, 753-761.
- Bernstein, B.E., Meissner, A. and Lander, E.S. (2007) The mammalian epigenome. *Cell*, **128**, 669-681.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L. and Lander, E.S. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, **125**, 315-326.
- Bertoni, F. and Ponzoni, M. (2007) The cellular origin of mantle cell lymphoma. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Bertoni, F. and Zucca, E. (2005) State-of-the-art therapeutics: marginal-zone lymphoma. *J Clin Oncol*, **23**, 6415-6420.
- Bestor, T.H. (1988) Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene*, **74**, 9-12.
- Bestor, T.H. (1992) Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *Embo J*, **11**, 2611-2617.
- Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M.T., Monconduit, M., Belabbes, S. and Gremy, F. (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, **48**, 198-206.
- Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, **16**, 6-21.
- Bird, A.P., Taggart, M.H., Nicholls, R.D. and Higgs, D.R. (1987) Non-methylated CpG-rich islands at the human alpha-globin locus: implications for evolution of the alpha-globin pseudogene. *Embo J*, **6**, 999-1004.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J.S. and Kornberg, R.D. (2004) Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Mol Cell*, **14**, 667-673.
- Bosselut, R. (2004) CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals. *Nat Rev Immunol*, **4**, 529-540.
- Brendolan, A., Rosado, M.M., Carsetti, R., Selleri, L. and Dear, T.N. (2007) Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays*, **29**, 166-177.
- Brown, K.E., Baxter, J., Graf, D., Merckenschlager, 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., Merckenschlager, M. and Fisher, A.G. (1997) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, **91**, 845-854.
- Bruniquel, D. and Schwartz, R.H. (2003) Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol*, **4**, 235-240.

- Bucceri, A., Kapitzka, K. and Thoma, F. (2006) Rapid accessibility of nucleosomal DNA in yeast on a second time scale. *Embo J*, **25**, 3123-3132.
- Byrd, J.C., Marcucci, G., Parthun, M.R., Xiao, J.J., Klisovic, R.B., Moran, M., Lin, T.S., Liu, S., Sklenar, A.R., Davis, M.E., Lucas, D.M., Fischer, B., Shank, R., Tejaswi, S.L., Binkley, P., Wright, J., Chan, K.K. and Grever, M.R. (2005) A phase 1 and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Blood*, **105**, 959-967.
- Caballero, R., Setien, F., Lopez-Serra, L., Boix-Chornet, M., Fraga, M.F., Ropero, S., Megias, D., Alaminos, M., Sanchez-Tapia, E.M., Montoya, M.C., Esteller, M., Gonzalez-Sarmiento, R. and Ballestar, E. (2007) Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos. *J Cell Sci*, **120**, 2619-2630.
- Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M. and Croce, C.M. (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, **353**, 1793-1801.
- Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myohanen, S., Herman, J.G. and Baylin, S.B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*, **21**, 103-107.
- Campanero, M.R., Armstrong, M.I. and Flemington, E.K. (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6481-6486.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S. and Zhang, Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, **298**, 1039-1043.
- Cariappa, A., Kim, T.J. and Pillai, S. (1999) Accelerated emigration of B lymphocytes in the Xid mouse. *J Immunol*, **162**, 4417-4423.
- Cariappa, A., Liou, H.C., Horwitz, B.H. and Pillai, S. (2000) Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *J Exp Med*, **192**, 1175-1182.
- Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K. and Pillai, S. (2001) The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity*, **14**, 603-615.
- Carsetti, R., Rosado, M.M. and Wardmann, H. (2004) Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev*, **197**, 179-191.
- Cattoretti, G., Chang, C.C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B.H., Falini, B., Louie, D.C., Offit, K., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R. (1995) BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*, **86**, 45-53.
- Chang, C.C., Lorek, J., Sabath, D.E., Li, Y., Chitambar, C.R., Logan, B., Kampalath, B. and Cleveland, R.P. (2002) Expression of MUM1/IRF4 correlates with clinical outcome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **100**, 4671-4675.

- Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A. and Kipps, T.J. (2002) Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **100**, 4609-4614.
- Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M. and Allis, C.D. (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*, **5**, 905-915.
- Chiorazzi, N., Rai, K.R. and Ferrarini, M. (2005) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, **352**, 804-815.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M. and Croce, C.M. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13944-13949.
- 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.
- Corcoran, L.M. and Karvelas, M. (1994) Oct-2 is required early in T cell-independent B cell activation for G1 progression and for proliferation. *Immunity*, **1**, 635-645.
- Cortes, M. and Georgopoulos, K. (2004) Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity. *J Exp Med*, **199**, 209-219.
- Cragg, M.S., Chan, H.T., Fox, M.D., Tutt, A., Smith, A., Oscier, D.G., Hamblin, T.J. and Glennie, M.J. (2002) The alternative transcript of CD79b is overexpressed in B-CLL and inhibits signaling for apoptosis. *Blood*, **100**, 3068-3076.
- Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E. andMontserrat, E. (2003) ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, **348**, 1764-1775.
- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*, **118**, 545-553.
- Czermin, B., Schotta, G., Hulsman, B.B., Brehm, A., Becker, P.B., Reuter, G. and Imhof, A. (2001) Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in Drosophila. *EMBO Rep*, **2**, 915-919.
- Damle, R.N., Batliwalla, F.M., Ghiotto, F., Valetto, A., Albesiano, E., Sison, C., Allen, S.L., Kolitz, J., Vinciguerra, V.P., Kudalkar, P., Wasil, T., Rai, K.R., Ferrarini, M., Gregersen, P.K. and Chiorazzi, N. (2004) Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood*, **103**, 375-382.
- Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K.R., Ferrarini, M.

- and Chiorazzi, N. (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**, 1840-1847.
- de Jong, D. (2005) Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol*, **23**, 6358-6363.
- De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V. and Boon, T. (1999) DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol*, **19**, 7327-7335.
- Deaglio, S., Vaisitti, T., Aydin, S., Ferrero, E. and Malavasi, F. (2006) In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **108**, 1135-1144.
- DeKoter, R.P., Lee, H.J. and Singh, H. (2002) PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity*, **16**, 297-309.
- DeKoter, R.P. and Singh, H. (2000) Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*, **288**, 1439-1441.
- DeKoter, R.P., Walsh, J.C. and Singh, H. (1998) PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *Embo J*, **17**, 4456-4468.
- Del Poeta, G., Maurillo, L., Venditti, A., Buccisano, F., Epiceno, A.M., Capelli, G., Tamburini, A., Suppo, G., Battaglia, A., Del Principe, M.I., Del Moro, B., Masi, M. and Amadori, S. (2001) Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **98**, 2633-2639.
- Deltour, S., Chopin, V. and Leprince, D. (2005) [Epigenetics and cancer]. *Med Sci (Paris)*, **21**, 405-411.
- Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., Allman, D. and Staudt, L.M. (1997) Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science*, **276**, 589-592.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
- Dohner, H., Fischer, K., Bentz, M., Hansen, K., Benner, A., Cabot, G., Diehl, D., Schlenk, R., Coy, J., Stilgenbauer, S. and *et al.* (1995) p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*, **85**, 1580-1589.
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M. and Lichter, P. (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, **343**, 1910-1916.
- 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., Kastner, P. and Chan, S. (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.
- El-Osta, A., Kantharidis, P., Zalcborg, J.R. and Wolffe, A.P. (2002) Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol Cell Biol*, **22**, 1844-1857.
- 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.
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S.L., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K., Rassenti, L.Z., Kipps, T.J., Dighiero, G., Schroeder, H.W., Jr., Ferrarini, M. and Chiorazzi, N. (1998) Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*, **102**, 1515-1525.
- Feinberg, A.P. and Tycko, B. (2004) The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, **4**, 143-153.
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K. and Zhang, Y. (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol*, **12**, 1052-1058.
- Fernandez, V., Hartmann, E., Ott, G., Campo, E. and Rosenwald, A. (2005) Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol*, **23**, 6364-6369.
- Ferrer, A., Ollila, J., Tobin, G., Nagy, B., Thunberg, U., Aalto, Y., Vihinen, M., Vilpo, J., Rosenquist, R. and Knuutila, S. (2004) Different gene expression in immunoglobulin-mutated and immunoglobulin-unmutated forms of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, **153**, 69-72.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N.G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J.A., Cano, A., Calasanz, M.J., Colomer, D., Piris, M.A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T. and Esteller, M. (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*, **37**, 391-400.
- Franco, V., Florena, A.M. and Iannitto, E. (2003) Splenic marginal zone lymphoma. *Blood*, **101**, 2464-2472.
- Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T. and Nakao, M. (2003) Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem*, **278**, 24132-24138.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L. and Kouzarides, T. (2000) DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*, **24**, 88-91.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Godin, N., Kasai, M. and Kouzarides, T. (2001) Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *Embo J*, **20**, 2536-2544.

- Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R. and Kouzarides, T. (2003a) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2305-2312.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P. and Kouzarides, T. (2003b) The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem*, **278**, 4035-4040.
- Furman, R.R., Asgary, Z., Mascarenhas, J.O., Liou, H.C. and Schattner, E.J. (2000) Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol*, **164**, 2200-2206.
- Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E. and Busslinger, M. (2004) Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev*, **18**, 411-422.
- Galm, O., Herman, J.G. and Baylin, S.B. (2006) The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev*, **20**, 1-13.
- Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, **196**, 261-282.
- Ge, Y.Z., Pu, M.T., Gowher, H., Wu, H.P., Ding, J.P., Jeltsch, A. and Xu, G.L. (2004) Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J Biol Chem*, **279**, 25447-25454.
- 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.
- Ghadiri, A., Duhamel, M., Fleischer, A., Reimann, A., Dessauge, F. and Rebollo, A. (2007) Critical function of Ikaros in controlling Aiolos gene expression. *FEBS Lett*, **581**, 1605-1616.
- Ghoshal, K., Datta, J., Majumder, S., Bai, S., Kutay, H., Motiwala, T. and Jacob, S.T. (2005) 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol*, **25**, 4727-4741.
- Ghoshal, K., Majumder, S. and Jacob, S.T. (2002) Analysis of promoter methylation and its role in silencing metallothionein I gene expression in tumor cells. *Methods Enzymol*, **353**, 476-486.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D. and Bernstein, E. (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, **128**, 635-638.
- Goldmit, M., Ji, Y., Skok, J., Roldan, E., Jung, S., Cedar, H. and Bergman, Y. (2005) Epigenetic ontogeny of the Igk locus during B cell development. *Nat Immunol*, **6**, 198-203.
- Goll, M.G. and Bestor, T.H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, **74**, 481-514.
- 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.

- Grabowski, P., Hultdin, M., Karlsson, K., Tobin, G., Aleskog, A., Thunberg, U., Laurell, A., Sundstrom, C., Rosenquist, R. and Roos, G. (2005) Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood*, **105**, 4807-4812.
- Gregoret, I.V., Lee, Y.M. and Goodson, H.V. (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*, **338**, 17-31.
- Grozinger, C.M. and Schreiber, S.L. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7835-7840.
- Guipaud, O., Deriano, L., Salin, H., Vallat, L., Sabatier, L., Merle-Beral, H. and Delic, J. (2003) B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet Oncol*, **4**, 505-514.
- Hahm, K., Cobb, B.S., McCarty, A.S., Brown, K.E., Klug, C.A., Lee, R., Akashi, K., Weissman, I.L., Fisher, A.G. and Smale, S.T. (1998) Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev*, **12**, 782-796.
- 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.
- Haire, R.N., Miracle, A.L., Rast, J.P. and Litman, G.W. (2000) Members of the Ikaros gene family are present in early representative vertebrates. *J Immunol*, **165**, 306-312.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. and Stevenson, F.K. (1999) Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**, 1848-1854.
- Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E. and Reed, J.C. (1993) bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **82**, 1820-1828.
- Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M. and Tilghman, S.M. (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*, **405**, 486-489.
- 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.
- Harris, M.B., Chang, C.C., Berton, M.T., Danial, N.N., Zhang, J., Kuehner, D., Ye, B.H., Kvatyuk, M., Pandolfi, P.P., Cattoretti, G., Dalla-Favera, R. and Rothman, P.B. (1999) Transcriptional repression of Stat6-dependent interleukin-4-induced genes by BCL-6: specific regulation of Iepsilon transcription and immunoglobulin E switching. *Mol Cell Biol*, **19**, 7264-7275.
- Hassan, A.H., Neely, K.E. and Workman, J.L. (2001) Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell*, **104**, 817-827.
- Hong, W., Kim, A.Y., Ky, S., Rakowski, C., Seo, S.B., Chakravarti, D., Atchison, M. and Blobel, G.A. (2002) Inhibition of CBP-mediated protein acetylation by the Ets family oncoprotein PU.1. *Mol Cell Biol*, **22**, 3729-3743.

- Hosokawa, Y., Maeda, Y., Ichinohasama, R., Miura, I., Taniwaki, M. and Seto, M. (2000) The Ikaros gene, a central regulator of lymphoid differentiation, fuses to the BCL6 gene as a result of t(3;7)(q27;p12) translocation in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **95**, 2719-2721.
- Hosokawa, Y., Maeda, Y., Takahashi, E., Suzuki, M. and Seto, M. (1999) Human aiolos, an ikaros-related zinc finger DNA binding protein: cDNA cloning, tissue expression pattern, and chromosomal mapping. *Genomics*, **61**, 326-329.
- Humbert, P.O. and Corcoran, L.M. (1997) oct-2 gene disruption eliminates the peritoneal B-1 lymphocyte lineage and attenuates B-2 cell maturation and function. *J Immunol*, **159**, 5273-5284.
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R.A., Jr., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S. and Halazonetis, T.D. (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature*, **432**, 406-411.
- Ibrahim, S., Keating, M., Do, K.A., O'Brien, S., Huh, Y.O., Jilani, I., Lerner, S., Kantarjian, H.M. and Albitar, M. (2001) CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **98**, 181-186.
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Carbone, R., Pearson, M., Pruneri, G., Viale, G., Appella, E., Pelicci, P. and Minucci, S. (2004) Impairment of p53 acetylation, stability and function by an oncogenic transcription factor. *Embo J*, **23**, 1144-1154.
- Issa, J.P., Kantarjian, H., Mohan, A., O'Brien, S., Cortes, J., Pierce, S. and Talpaz, M. (1999) Methylation of the ABL1 promoter in chronic myelogenous leukemia: lack of prognostic significance. *Blood*, **93**, 2075-2080.
- Iwakoshi, N.N., Lee, A.H. and Glimcher, L.H. (2003) The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev*, **194**, 29-38.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Jones, P.A. (2002) DNA methylation and cancer. *Oncogene*, **21**, 5358-5360.
- Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2007) The epigenomics of cancer. *Cell*, **128**, 683-692.
- Joshi, A.A. and Struhl, K. (2005) Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell*, **20**, 971-978.
- Kamakaka, R.T. and Biggins, S. (2005) Histone variants: deviants? *Genes Dev*, **19**, 295-310.
- Karray, S., Merle-Beral, H., Vazquez, A., Gerard, J.P., Debre, P. and Galanaud, P. (1987) Functional heterogeneity of B-CLL lymphocytes: dissociated responsiveness to growth factors and distinct requirements for a first activation signal. *Blood*, **70**, 1105-1110.
- 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.
- Kee, B.L. and Murre, C. (1998) Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med*, **188**, 699-713.

- 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.
- Khan, W.N., Alt, F.W., Gerstein, R.M., Malynn, B.A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A.B., Herzenberg, L.A. and *et al.* (1995) Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity*, **3**, 283-299.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R. and Georgopoulos, K. (1999) Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*, **10**, 345-355.
- Kim, U., Qin, X.F., Gong, S., Stevens, S., Luo, Y., Nussenzweig, M. and Roeder, R.G. (1996) The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature*, **383**, 542-547.
- Kioussis, D. and Ellmeier, W. (2002) Chromatin and CD4, CD8A and CD8B gene expression during thymic differentiation. *Nat Rev Immunol*, **2**, 909-919.
- Kirmizis, A., Bartley, S.M., Kuzmichev, A., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R. and Farnham, P.J. (2004) Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev*, **18**, 1592-1605.
- 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.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L., Neri, A., Califano, A. and Dalla-Favera, R. (2001) Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*, **194**, 1625-1638.
- Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C. and Maki, R.A. (1990) The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell*, **61**, 113-124.
- Klose, R.J. and Bird, A.P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, **31**, 89-97.
- Klose, R.J., Kallin, E.M. and Zhang, Y. (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet*, **7**, 715-727.
- Klug, C.A., Morrison, S.J., Masek, M., Hahm, K., Smale, S.T. and Weissman, I.L. (1998) Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 657-662.
- Kohonen, P., Nera, K.P. and Lassila, O. (2004) Avian Helios and evolution of the Ikaros family. *Scand J Immunol*, **60**, 100-107.
- 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. (2002a) Ikaros-CtIP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression. *J Biol Chem*, **277**, 23143-23149.

- Koipally, J. and Georgopoulos, K. (2002b) 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.
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J. and Georgopoulos, K. (1999) Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *Embo J*, **18**, 3090-3100.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, **98**, 285-294.
- Korz, C., Pscherer, A., Benner, A., Mertens, D., Schaffner, C., Leupolt, E., Dohner, H., Stilgenbauer, S. and Lichter, P. (2002) Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood*, **99**, 4554-4561.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705.
- Koyanagi, M., Baguet, A., Martens, J., Margueron, R., Jenuwein, T. and Bix, M. (2005) EZH2 and histone 3 trimethyl lysine 27 associated with Ii4 and Ii13 gene silencing in Th1 cells. *J Biol Chem*, **280**, 31470-31477.
- Krause, C.D., Yang, Z.H., Kim, Y.S., Lee, J.H., Cook, J.R. and Pestka, S. (2007) Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, **113**, 50-87.
- Krenacs, L., Himmelmann, A.W., Quintanilla-Martinez, L., Fest, T., Riva, A., Wellmann, A., Bagdi, E., Kehrl, J.H., Jaffe, E.S. and Raffeld, M. (1998) Transcription factor B-cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas. *Blood*, **92**, 1308-1316.
- Kuppers, R. (2005) Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, **5**, 251-262.
- Lai, A.Y. and Kondo, M. (2006) Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med*, **203**, 1867-1873.
- Laird, C.D., Pleasant, N.D., Clark, A.D., Sneeden, J.L., Hassan, K.M., Manley, N.C., Vary, J.C., Jr., Morgan, T., Hansen, R.S. and Stoger, R. (2004) Hairpin-bisulfite PCR: assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 204-209.
- Lanham, S., Hamblin, T., Oscier, D., Ibbotson, R., Stevenson, F. and Packham, G. (2003) Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **101**, 1087-1093.
- Lankester, A.C., van Schijndel, G.M., van der Schoot, C.E., van Oers, M.H., van Noesel, C.J. and van Lier, R.A. (1995) Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, **86**, 1090-1097.
- Lee, C.K., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B.D. and Lieb, J.D. (2004) Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet*, **36**, 900-905.

- Lee, J.H. and Skalnik, D.G. (2005) CpG-binding protein (CXXC finger protein 1) is a component of the mammalian Set1 histone H3-Lys4 methyltransferase complex, the analogue of the yeast Set1/COMPASS complex. *J Biol Chem*, **280**, 41725-41731.
- Lee, M.G., Wynder, C., Bochar, D.A., Hakimi, M.A., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2006) Functional interplay between histone demethylase and deacetylase enzymes. *Mol Cell Biol*, **26**, 6395-6402.
- Lee, S.C., Bottaro, A. and Insel, R.A. (2003) Activation of terminal B cell differentiation by inhibition of histone deacetylation. *Mol Immunol*, **39**, 923-932.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T. and Peters, A.H. (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol*, **13**, 1192-1200.
- Lemercier, C., Brocard, M.P., Puvion-Dutilleul, F., Kao, H.Y., Albagli, O. and Khochbin, S. (2002) Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor. *J Biol Chem*, **277**, 22045-22052.
- Li, B., Carey, M. and Workman, J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*, **128**, 707-719.
- Li, J., Wang, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J.M., Qin, J. and Wong, J. (2000) Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *Embo J*, **19**, 4342-4350.
- Li, Y., Okuno, Y., Zhang, P., Radomska, H.S., Chen, H., Iwasaki, H., Akashi, K., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Maki, R.A. and Tenen, D.G. (2001) Regulation of the PU.1 gene by distal elements. *Blood*, **98**, 2958-2965.
- Liippo, J., Mansikka, A. and Lassila, O. (1999) The evolutionarily conserved avian Aiolos gene encodes alternative isoforms. *Eur J Immunol*, **29**, 2651-2657.
- Liippo, J., Nera, K.P., Veistinen, E., Lahdesmaki, A., Postila, V., Kimby, E., Riikonen, P., Hammarstrom, L., Pelkonen, J. and Lassila, O. (2001) Both normal and leukemic B lymphocytes express multiple isoforms of the human Aiolos gene. *Eur J Immunol*, **31**, 3469-3474.
- Lin, H. and Grosschedl, R. (1995) Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature*, **376**, 263-267.
- Lin, K.I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C. and Calame, K. (2002) Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol*, **22**, 4771-4780.
- 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.
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R. and Berger, S.L. (2000) Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell*, **5**, 917-926.

- Lomberk, G., Bensi, D., Fernandez-Zapico, M.E. and Urrutia, R. (2006) Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol*, **8**, 407-415.
- Lorincz, M.C., Dickerson, D.R., Schmitt, M. and Groudine, M. (2004) Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1068-1075.
- Louie, D.C., Offit, K., Jaslow, R., Parsa, N.Z., Murty, V.V., Schluger, A. and Chaganti, R.S. (1995) p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). *Blood*, **86**, 2892-2899.
- Lu, R., Medina, K.L., Lancki, D.W. and Singh, H. (2003) IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes Dev*, **17**, 1703-1708.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Marmorstein, R. (2001) Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 422-432.
- Martin, C. and Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 838-849.
- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G. and Sun, Y.E. (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*, **302**, 890-893.
- Massari, M.E., Grant, P.A., Pray-Grant, M.G., Berger, S.L., Workman, J.L. and Murre, C. (1999) A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol Cell*, **4**, 63-73.
- Matthias, P. and Rolink, A.G. (2005) Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol*, **5**, 497-508.
- Mayer, W.E., O'Huigin, C., Tichy, H., Terzic, J. and Saraga-Babic, M. (2002) Identification of two Ikaros-like transcription factors in lamprey. *Scand J Immunol*, **55**, 162-170.
- McKeon, C., Ohkubo, H., Pastan, I. and de Crombrughe, B. (1982) Unusual methylation pattern of the alpha 2 (I) collagen gene. *Cell*, **29**, 203-210.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J. and Maki, R.A. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J*, **15**, 5647-5658.
- Messmer, B.T., Messmer, D., Allen, S.L., Koltz, J.E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E.J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R.N., Wasil, T., Rai, K.R., Hellerstein, M.K. and Chiorazzi, N. (2005) In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*, **115**, 755-764.
- Michel, F., Merle-Beral, H., Legac, E., Michel, A., Debre, P. and Bismuth, G. (1993) Defective calcium response in B-chronic lymphocytic leukemia cells. Alteration of early protein tyrosine phosphorylation and of the mechanism responsible for cell calcium influx. *J Immunol*, **150**, 3624-3633.

- Minucci, S., Nervi, C., Lo Coco, F. and Pelicci, P.G. (2001) Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene*, **20**, 3110-3115.
- Minucci, S. and Pelicci, P.G. (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 38-51.
- 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.
- Molnar, A., Wu, P., Largespada, D.A., Vortkamp, A., Scherer, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Bruns, G. and Georgopoulos, K. (1996) The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J Immunol*, **156**, 585-592.
- Morabito, F., Mangiola, M., Oliva, B., Stelitano, C., Callea, V., Deaglio, S., Iacopino, P., Brugiattelli, M. and Malavasi, F. (2001) Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, **25**, 927-932.
- Morales, V. and Richard-Foy, H. (2000) Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. *Mol Cell Biol*, **20**, 7230-7237.
- 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.
- Muller, C., Readhead, C., Diederichs, S., Idos, G., Yang, R., Tidow, N., Serve, H., Berdel, W.E. and Koeffler, H.P. (2000) Methylation of the cyclin A1 promoter correlates with gene silencing in somatic cell lines, while tissue-specific expression of cyclin A1 is methylation independent. *Mol Cell Biol*, **20**, 3316-3329.
- Mullighan, C.G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C.B., Coustan-Smith, E., Dalton, J.D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S.B., Su, X., Pui, C.H., Relling, M.V., Evans, W.E., Shurtleff, S.A. and Downing, J.R. (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, **446**, 758-764.
- Nakase, K., Ishimaru, F., Avitahl, N., Dansako, H., Matsuo, K., Fujii, K., Sezaki, N., Nakayama, H., Yano, T., Fukuda, S., Imajoh, K., Takeuchi, M., Miyata, A., Hara, M., Yasukawa, M., Takahashi, I., Taguchi, H., Matsue, K., Nakao, S., Niho, Y., Takenaka, K., Shinagawa, K., Ikeda, K., Niiya, K. and Harada, M. (2000) Dominant negative isoform of the Ikaros gene in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, **60**, 4062-4065.
- Nakase, K., Ishimaru, F., Fujii, K., Tabayashi, T., Kozuka, T., Sezaki, N., Matsuo, Y. and Harada, M. (2002) Overexpression of novel short isoforms of Helios in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol*, **30**, 313-317.
- Nakayama, H., Ishimaru, F., Avitahl, N., Sezaki, N., Fujii, N., Nakase, K., Ninomiya, Y., Harashima, A., Minowada, J., Tsuchiyama, J., Imajoh, K., Tsubota, T., Fukuda, S., Sezaki, T., Kojima, K., Hara, M., Takimoto, H., Yorimitsu, S., Takahashi, I., Miyata, A., Taniguchi, S., Tokunaga, Y., Gondo, H., Niho, Y., Harada, M. and *et al.* (1999) Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*, **59**, 3931-3934.

- Nakayama, M., Suzuki, H., Yamamoto-Nagamatsu, N., Barman, H.K., Kikuchi, H., Takami, Y., Toyonaga, K., Yamashita, K. and Nakayama, T. (2007) HDAC2 controls IgM H- and L-chain gene expressions via EBF1, Pax5, Ikaros, Aiolos and E2A gene expressions. *Genes Cells*, **12**, 359-373.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-389.
- Narvi, E., Nera, K.P., Terho, P., Mustonen, L., Granberg, J. and Lassila, O. (2007) Aiolos controls gene conversion and cell death in DT40 B cells. *Scand J Immunol*, **65**, 503-513.
- Navarro, P., Page, D.R., Avner, P. and Rougeulle, C. (2006) Tsix-mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program. *Genes Dev*, **20**, 2787-2792.
- Nera, K.P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J.M. and Lassila, O. (2006) Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity*, **24**, 283-293.
- Nerlov, C., Querfurth, E., Kulesa, H. and Graf, T. (2000) GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood*, **95**, 2543-2551.
- Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A. (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, **23**, 58-61.
- Ng, S.Y., Yoshida, T. and Georgopoulos, K. (2007) Ikaros and chromatin regulation in early hematopoiesis. *Curr Opin Immunol*, **19**, 116-122.
- Nguyen, C.T., Weisenberger, D.J., Velicescu, M., Gonzales, F.A., Lin, J.C., Liang, G. and Jones, P.A. (2002) Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res*, **62**, 6456-6461.
- Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C. and Georgopoulos, K. (1999) Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med*, **190**, 1201-1214.
- Nielsen, P.J., Georgiev, O., Lorenz, B. and Schaffner, W. (1996) B lymphocytes are impaired in mice lacking the transcriptional co-activator Bob1/OCA-B/OBF1. *Eur J Immunol*, **26**, 3214-3218.
- Nietfeld, W. and Meyerhans, A. (1996) Cloning and sequencing of hIk-1, a cDNA encoding a human homologue of mouse Ikaros/LyF-1. *Immunol Lett*, **49**, 139-141.
- Nishii, K., Katayama, N., Miwa, H., Shikami, M., Usui, E., Masuya, M., Araki, H., Lorenzo, F., Ogawa, T., Kyo, T., Nasu, K., Shiku, H. and Kita, K. (2002) Non-DNA-binding Ikaros isoform gene expressed in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **16**, 1285-1292.
- Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G. and Busslinger, M. (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*, **401**, 556-562.
- Nutt, S.L., Morrison, A.M., Dorfler, P., Rolink, A. and Busslinger, M. (1998) Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *Embo J*, **17**, 2319-2333.

- O'Connor, B.P., Vogel, L.A., Zhang, W., Loo, W., Shnider, D., Lind, E.F., Ratliff, M., Noelle, R.J. and Erickson, L.D. (2006) Imprinting the fate of antigen-reactive B cells through the affinity of the B cell receptor. *J Immunol*, **177**, 7723-7732.
- O'Neill, D.W., Schoetz, S.S., Lopez, R.A., Castle, M., Rabinowitz, L., Shor, E., Krawchuk, D., Goll, M.G., Renz, M., Seelig, H.P., Han, S., Seong, R.H., Park, S.D., Agalioti, T., Munshi, N., Thanos, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Bank, A. (2000) An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 7572-7582.
- O'Riordan, M. and Grosschedl, R. (1999) Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity*, **11**, 21-31.
- Ody, C., Jungblut-Ruault, S., Cossali, D., Barnet, M., Aurrand-Lions, M., Imhof, B.A. and Matthes, T. (2007) Junctional adhesion molecule C (JAM-C) distinguishes CD27+ germinal center B lymphocytes from non-germinal center cells and constitutes a new diagnostic tool for B-cell malignancies. *Leukemia*, **21**, 1285-1293.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. and Li, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, **99**, 247-257.
- Okano, M., Xie, S. and Li, E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, **19**, 219-220.
- Okitsu, C.Y. and Hsieh, C.L. (2007) DNA methylation dictates histone H3K4 methylation. *Mol Cell Biol*, **27**, 2746-2757.
- Olson, M.C., Scott, E.W., Hack, A.A., Su, G.H., Tenen, D.G., Singh, H. and Simon, M.C. (1995) PU. 1 is not essential for early myeloid gene expression but is required for terminal myeloid differentiation. *Immunity*, **3**, 703-714.
- Oppezzo, P., Vasconcelos, Y., Settegrana, C., Jeannel, D., Vuillier, F., Legarff-Tavernier, M., Kimura, E.Y., Bechet, S., Dumas, G., Brissard, M., Merle-Beral, H., Yamamoto, M., Dighiero, G. and Davi, F. (2005) The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **106**, 650-657.
- Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Davis, Z., Wiestner, A., Rosenwald, A., Thomas, P.W., Hamblin, T.J., Staudt, L.M. and Oscier, D.G. (2004) ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, **363**, 105-111.
- Otake, Y., Soundararajan, S., Sengupta, T.K., Kio, E.A., Smith, J.C., Pineda-Roman, M., Stuart, R.K., Spicer, E.K. and Fernandes, D.J. (2007) Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood*, **109**, 3069-3075.
- Palmisano, W.A., Crume, K.P., Grimes, M.J., Winters, S.A., Toyota, M., Esteller, M., Joste, N., Baylin, S.B. and Belinsky, S.A. (2003) Aberrant promoter methylation of the transcription factor genes PAX5 alpha and beta in human cancers. *Cancer Res*, **63**, 4620-4625.
- 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.

- Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A. and Brink, R. (2006) Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med*, **203**, 1081-1091.
- Payelle-Brogard, B., Magnac, C., Alcover, A., Roux, P. and Dighiero, G. (2002) Defective assembly of the B-cell receptor chains accounts for its low expression in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, **118**, 976-985.
- Payne, K.J., Huang, G., Sahakian, E., Zhu, J.Y., Barteneva, N.S., Barsky, L.W., Payne, M.A. and Crooks, G.M. (2003) Ikaros isoform x is selectively expressed in myeloid differentiation. *J Immunol*, **170**, 3091-3098.
- Payne, K.J., Nicolas, J.H., Zhu, J.Y., Barsky, L.W. and Crooks, G.M. (2001) Cutting edge: predominant expression of a novel Ikaros isoform in normal human hemopoiesis. *J Immunol*, **167**, 1867-1870.
- 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., Martens, J.H. and Jenuwein, T. (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell*, **12**, 1577-1589.
- Pinyol, M., Hernandez, L., Cazorla, M., Balbin, M., Jares, P., Fernandez, P.L., Montserrat, E., Cardesa, A., Lopez-Otin, C. and Campo, E. (1997) Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*, **89**, 272-280.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K. and Young, R.A. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, **122**, 517-527.
- Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd and Grant, P.A. (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature*, **433**, 434-438.
- Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N. and Pasternack, B.S. (1975) Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **46**, 219-234.
- Rao, B., Shibata, Y., Strahl, B.D. and Lieb, J.D. (2005) Dimethylation of histone H3 at lysine 36 demarcates regulatory and nonregulatory chromatin genome-wide. *Mol Cell Biol*, **25**, 9447-9459.
- Rassenti, L.Z., Huynh, L., Toy, T.L., Chen, L., Keating, M.J., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., Flinn, I.W., Rai, K.R., Byrd, J.C., Kay, N.E., Greaves, A., Weiss, A. and Kipps, T.J. (2004) ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, **351**, 893-901.
- Raval, A., Byrd, J.C. and Plass, C. (2006) Epigenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*, **33**, 157-166.
- Ray-Gallet, D., Gerard, A., Polo, S. and Almouzni, G. (2005) [Variations on the topic of the "histone code"]. *Med Sci (Paris)*, **21**, 384-389.

- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- Rebollo, A., Ayllon, V., Fleischer, A., Martinez, C.A. and Zaballos, A. (2001) The association of Aiolos transcription factor and Bcl-xL is involved in the control of apoptosis. *J Immunol*, **167**, 6366-6373.
- Rice, J.C., Briggs, S.D., Ueberheide, B., Barber, C.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Shinkai, Y. and Allis, C.D. (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell*, **12**, 1591-1598.
- Rietveld, L.E., Caldenhoven, E. and Stunnenberg, H.G. (2002) In vivo repression of an erythroid-specific gene by distinct corepressor complexes. *Embo J*, **21**, 1389-1397.
- Roh, T.Y., Cuddapah, S., Cui, K. and Zhao, K. (2006) The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15782-15787.
- Romanow, W.J., Langerak, A.W., Goebel, P., Wolvers-Tettero, I.L., van Dongen, J.J., Feeney, A.J. and Murre, C. (2000) E2A and EBF act in synergy with the V(D)J recombinase to generate a diverse immunoglobulin repertoire in nonlymphoid cells. *Mol Cell*, **5**, 343-353.
- Romero, F., Martinez, A.C., Camonis, J. and Rebollo, A. (1999) Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization. *Embo J*, **18**, 3419-3430.
- Ronni, T., Payne, K.J., Ho, S., Bradley, M.N., Dorsam, G. and Dovat, S. (2007) Human Ikaros function in activated T cells is regulated by coordinated expression of its largest isoforms. *J Biol Chem*, **282**, 2538-2547.
- Rosenbauer, F. and Tenen, D.G. (2007) Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*, **7**, 105-117.
- Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J., Botstein, D., Byrd, J.C., Grever, M.R., Cheson, B.D., Chiorazzi, N., Wilson, W.H., Kipps, T.J., Brown, P.O. and Staudt, L.M. (2001) Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, **194**, 1639-1647.
- Ruiz, A., Jiang, J., Kempfski, H. and Brady, H.J. (2004) Overexpression of the Ikaros 6 isoform is restricted to t(4;11) acute lymphoblastic leukaemia in children and infants and has a role in B-cell survival. *Br J Haematol*, **125**, 31-37.
- Ruiz-Ballesteros, E., Mollejo, M., Rodriguez, A., Camacho, F.I., Algara, P., Martinez, N., Pollan, M., Sanchez-Aguilera, A., Menarguez, J., Campo, E., Martinez, P., Mateo, M. and Piris, M.A. (2005) Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood*, **106**, 1831-1838.
- Rush, L.J., Raval, A., Funchain, P., Johnson, A.J., Smith, L., Lucas, D.M., Bembea, M., Liu, T.H., Heerema, N.A., Rassenti, L., Liyanarachchi, S., Davuluri, R., Byrd, J.C. and Plass, C. (2004) Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer Res*, **64**, 2424-2433.

- 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.
- Sagaert, X., Sprangers, B. and De Wolf-Peeters, C. (2007) The dynamics of the B follicle: understanding the normal counterpart of B-cell-derived malignancies. *Leukemia*, **21**, 1378-1386.
- Saha, A., Wittmeyer, J. and Cairns, B.R. (2006) Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 437-447.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D. and Jenuwein, T. (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*, **18**, 1251-1262.
- Schubart, D.B., Rolink, A., Kosco-Vilbois, M.H., Botteri, F. and Matthias, P. (1996) B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature*, **383**, 538-542.
- Selker, E.U. (1998) Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9430-9435.
- Sezaki, N., Ishimaru, F., Takata, M., Tabayashi, T., Nakase, K., Kozuka, T., Fujii, K., Nakayama, H., Teshima, T., Harada, M. and Tanimoto, M. (2003) Over-expression of the dominant-negative isoform of Ikaros confers resistance to dexamethasone-induced and anti-IgM-induced apoptosis. *Br J Haematol*, **121**, 165-169.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J.W., Calame, K., Glimcher, L.H. and Staudt, L.M. (2004) XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*, **21**, 81-93.
- Shapiro-Shelef, M. and Calame, K. (2005) Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*, **5**, 230-242.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G. and Calame, K. (2003) Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*, **19**, 607-620.
- Sharma, D., Blum, J., Yang, X., Beaulieu, N., Macleod, A.R. and Davidson, N.E. (2005) Release of methyl CpG binding proteins and histone deacetylase 1 from the Estrogen receptor alpha (ER) promoter upon reactivation in ER-negative human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, **19**, 1740-1751.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A. and Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941-953.
- Siegfried, Z., Eden, S., Mendelsohn, M., Feng, X., Tsuberi, B.Z. and Cedar, H. (1999) DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet*, **22**, 203-206.

- Sigvardsson, M., O'Riordan, M. and Grosschedl, R. (1997) EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity*, **7**, 25-36.
- Sims, G.P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G. and Lipsky, P.E. (2005a) Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*, **105**, 4390-4398.
- Sims, R.J., 3rd, Chen, C.F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S. and Reinberg, D. (2005b) Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem*, **280**, 41789-41792.
- Smale, S.T. and Dorshkind, K. (2006) Hematopoiesis flies high with Ikaros. *Nat Immunol*, **7**, 367-369.
- Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M. and Busslinger, M. (2002) Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity*, **17**, 781-793.
- Spencer, J., Perry, M.E. and Dunn-Walters, D.K. (1998) Human marginal-zone B cells. *Immunol Today*, **19**, 421-426.
- Stamatopoulos, K., Belessi, C., Moreno, C., Boudjograh, M., Guida, G., Smilevska, T., Belhoul, L., Stella, S., Stavroyianni, N., Crespo, M., Hadzidimitriou, A., Sutton, L., Bosch, F., Laoutaris, N., Anagnostopoulos, A., Montserrat, E., Fassas, A., Dighiero, G., Caligaris-Cappio, F., Merle-Beral, H., Ghia, P. and Davi, F. (2007) Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*, **109**, 259-270.
- Stankovic, T., Weber, P., Stewart, G., Bedenham, T., Murray, J., Byrd, P.J., Moss, P.A. and Taylor, A.M. (1999) Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, **353**, 26-29.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 435-459.
- Stilgenbauer, S., Winkler, D., Ott, G., Schaffner, C., Leupolt, E., Bentz, M., Moller, P., Muller-Hermelink, H.K., James, M.R., Lichter, P. and Dohner, H. (1999) Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood*, **94**, 3262-3264.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Sun, J., Matthias, G., Mihatsch, M.J., Georgopoulos, K. and Matthias, P. (2003) Lack of the transcriptional coactivator OBF-1 prevents the development of systemic lupus erythematosus-like phenotypes in Aiolos mutant mice. *J Immunol*, **170**, 1699-1706.
- Sun, L., Crotty, M.L., Sensel, M., Sather, H., Navara, C., Nachman, J., Steinherz, P.G., Gaynon, P.S., Seibel, N., Mao, C., Vassilev, A., Reaman, G.H. and Uckun, F.M. (1999a) Expression of dominant-negative Ikaros isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, **5**, 2112-2120.
- 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., Seibel, N., Vassilev, A., Juran, B.D., Reaman, G.H. and Uckun, F.M. (1999b) Expression of aberrantly spliced oncogenic Ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, **17**, 3753-3766.

- 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.
- Surani, M.A., Hayashi, K. and Hajkova, P. (2007) Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*, **128**, 747-762.
- Szutorisz, H., Canzonetta, C., Georgiou, A., Chow, C.M., Tora, L. and Dillon, N. (2005) Formation of an active tissue-specific chromatin domain initiated by epigenetic marking at the embryonic stem cell stage. *Mol Cell Biol*, **25**, 1804-1820.
- Takanashi, M., Yagi, T., Imamura, T., Tabata, Y., Morimoto, A., Hibi, S., Ishii, E. and Imashuku, S. (2002) Expression of the Ikaros gene family in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, **117**, 525-530.
- Thompson, E.C., Cobb, B.S., Sabbattini, P., Meixlsperger, S., Parelho, V., Liberg, D., Taylor, B., Dillon, N., Georgopoulos, K., Jumaa, H., Smale, S.T., Fisher, A.G. and Merkenschlager, M. (2007) Ikaros DNA-binding proteins as integral components of B cell developmental-stage-specific regulatory circuits. *Immunity*, **26**, 335-344.
- Tobin, G., Thunberg, U., Johnson, A., Thorn, I., Soderberg, O., Hultdin, M., Botling, J., Enblad, G., Sallstrom, J., Sundstrom, C., Roos, G. and Rosenquist, R. (2002) Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **99**, 2262-2264.
- Tonnelle, C., Imbert, M.C., Sainty, D., Granjeaud, S., N'Guyen, C. and Chabannon, C. (2003) Overexpression of dominant-negative Ikaros 6 protein is restricted to a subset of B common adult acute lymphoblastic leukemias that express high levels of the CD34 antigen. *Hematol J*, **4**, 104-109.
- Trbusek, M., Malcikova, J., Smardova, J., Kuhrova, V., Mentzlova, D., Francova, H., Bukovska, S., Svitakova, M., Kuglik, P., Linkova, V., Doubek, M., Brychtova, Y., Zagal, J., Kujickova, J., Pospisilova, S., Dvorakova, D., Vorlicek, J. and Mayer, J. (2006) Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia*, **20**, 1159-1161.
- 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.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. and Croce, C.M. (1984a) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, **226**, 1097-1099.

- Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P.C. and Croce, C.M. (1984b) Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science*, **224**, 1403-1406.
- Turner, C.A., Jr., Mack, D.H. and Davis, M.M. (1994) Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell*, **77**, 297-306.
- Urbanek, P., Wang, Z.Q., Fetka, I., Wagner, E.F. and Busslinger, M. (1994) Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell*, **79**, 901-912.
- Vakoc, C.R., Sachdeva, M.M., Wang, H. and Blobel, G.A. (2006) Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol Cell Biol*, **26**, 9185-9195.
- Vuillier, F., Dumas, G., Magnac, C., Prevost, M.C., Lalanne, A.I., Opezzo, P., Melanitou, E., Dighiero, G. and Payelle-Brogard, B. (2005) Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains. *Blood*, **105**, 2933-2940.
- Wade, P.A., Jones, P.L., Vermaak, D. and Wolffe, A.P. (1998) A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr Biol*, **8**, 843-846.
- Wang, J.H., Avitahl, N., Cariappa, A., Friedrich, C., Ikeda, T., Renold, A., Andrikopoulos, K., Liang, L., Pillai, S., Morgan, B.A. and Georgopoulos, K. (1998) Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity*, **9**, 543-553.
- 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, X., Moore, S.C., Laszckzak, M. and Ausio, J. (2000) Acetylation increases the alpha-helical content of the histone tails of the nucleosome. *J Biol Chem*, **275**, 35013-35020.
- Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., Roeder, R.G., Clarke, S., Stallcup, M.R., Allis, C.D. and Coonrod, S.A. (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminium. *Science*, **306**, 279-283.
- Watanabe, K., Towatari, M., Ozawa, Y., Miyata, Y., Okamoto, M., Abe, A., Naoe, T. and Saito, H. (2003) Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. *Oncogene*, **22**, 9176-9184.
- Weih, D.S., Yilmaz, Z.B. and Weih, F. (2001) Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. *J Immunol*, **167**, 1909-1919.
- Weissman, I.L., Anderson, D.J. and Gage, F. (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 387-403.
- Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., Tchernia, G., Steiniger, B., Staudt, L.M., Casanova, J.L., Reynaud, C.A. and Weill, J.C. (2004) Human blood IgM "memory" B cells are

- circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*, **104**, 3647-3654.
- Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M.C., Le Deist, F.F., de Saint Basile, G.G., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C.A. and Weill, J.C. (2001) CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1166-1170.
- Weller, S., Reynaud, C.A. and Weill, J.C. (2005) Splenic marginal zone B cells in humans: where do they mutate their Ig receptor? *Eur J Immunol*, **35**, 2789-2792.
- Willenbrock, K., Jungnickel, B., Hansmann, M.L. and Kuppers, R. (2005) Human splenic marginal zone B cells lack expression of activation-induced cytidine deaminase. *Eur J Immunol*, **35**, 3002-3007.
- 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.
- Wolfe, S.A., Nekudova, L. and Pabo, C.O. (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **29**, 183-212.
- Workman, J.L. (2006) Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev*, **20**, 2009-2017.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H. and Allis, C.D. (2005) WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell*, **121**, 859-872.
- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., Wu, C. and Allis, C.D. (2006) A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*, **442**, 86-90.
- Xu, G.L., Bestor, T.H., Bourc'his, D., Hsieh, C.L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J.J. and Viegas-Pequignot, E. (1999) Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, **402**, 187-191.
- 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.
- Yagi, T., Hibi, S., Takanashi, M., Kano, G., Tabata, Y., Imamura, T., Inaba, T., Morimoto, A., Todo, S. and Imashuku, S. (2002) High frequency of Ikaros isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: implications for up-regulation of the antiapoptotic protein Bcl-XL in leukemogenesis. *Blood*, **99**, 1350-1355.
- Yang, X.J. and Seto, E. (2003) Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 143-153.
- 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, J., Angelin-Duclos, C., Greenwood, J., Liao, J. and Calame, K. (2000) Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol Cell Biol*, **20**, 2592-2603.

- Zanton, S.J. and Pugh, B.F. (2006) Full and partial genome-wide assembly and disassembly of the yeast transcription machinery in response to heat shock. *Genes Dev*, **20**, 2250-2265.
- Zhang, H., Roberts, D.N. and Cairns, B.R. (2005) Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell*, **123**, 219-231.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. and Reinberg, D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*, **13**, 1924-1935.
- Zhao, W., Soejima, H., Higashimoto, K., Nakagawachi, T., Urano, T., Kudo, S., Matsukura, S., Matsuo, S., Joh, K. and Mukai, T. (2005) The essential role of histone H3 Lys9 di-methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island. *J Biochem (Tokyo)*, **137**, 431-440.
- Zhu, X., Asa, S.L. and Ezzat, S. (2007) Ikaros is regulated through multiple histone modifications and deoxyribonucleic acid methylation in the pituitary. *Mol Endocrinol*, **21**, 1205-1215.

Annexes

Critical function of Ikaros in controlling Aiolos gene expression

Ata Ghadiri^{a,b,1}, Marianne Duhamel^{a,b,1}, Aarne Fleischer^{a,b}, Andreas Reimann^c,
Frederic Dessauge^{a,b,2}, Angelita Rebollo^{a,b,*}

^a Immunologie Cellulaire et Tissulaire, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Bâtiment CERVI, U543 Inserm, 83, Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

^b Université Pierre et Marie Curie, Place Jussieu, Paris VI, France

^c Expression génétique et maladies. FRE 2850 CNRS. Institut Pasteur, 25, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

Received 17 November 2006; revised 4 March 2007; accepted 6 March 2007

Available online 20 March 2007

Edited by Frances Shannon

Abstract To characterize the regulation of lymphoid Aiolos transcription factor, we have cloned its promoter. Full promoter and nested deletions were expressed in lymphoid and non-lymphoid cell lines. The minimal promoter activity could be considered as a 172 bp upstream from the ATG for Jurkat and HEK293 cells and as a 370 bp fragment for U937 cells. Moreover, we have mapped the transcription initiation site. Retardation gels showed binding activity for Ikaros, NFκB and AP4 transcription factors and mutations in their binding sites abolish Aiolos promoter activity. Chromatin immunoprecipitation assay revealed that Ikaros, NFκB and AP4 are bound to Aiolos promoter. The important function of Ikaros and NFκB is underlined by their over expression, which results in the trans-activation of the promoter and drives Aiolos expression in cell lines and in freshly isolated B and T cells, while over expression of a dominant negative Ikaros isoform is able to block Aiolos expression. © 2007 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Aiolos; Ikaros; Transcription factor; Promoter; NFκB

1. Introduction

The regulation of gene expression is required for the progressive restriction of a pluripotent hematopoietic stem cell to one of the various lineages and it may be mediated, in part, by nuclear transcription factors. A candidate is Ikaros, a family of zinc finger DNA-binding proteins known to be a master regulator of lymphocyte differentiation [1,2]. Aiolos is a lymphoid transcription factor that was identified as an homologue of the largest Ikaros isoform with similarities in the DNA binding, activation and dimerization domains [3].

Aiolos is not present in primitive hematopoietic populations and is first detected at low levels in pro-B and double negative CD4/CD8 thymocyte precursors and is up-regulated as these cells progress to the pre-B and double positive CD4/CD8

stages of differentiation [4]. Aiolos is expressed in mature peripheral B cells, but not significantly in splenic cells [1,2,4]. The physiological effect of Aiolos gene inactivation in knock out mice is an increase in B cell precursors, a spontaneous production of autoantibodies and the development of B cell lymphomas. In contrast, peritoneal, marginal and recirculating B cells are severely depleted [4]. This phenotype is consistent with a diminution of the activation threshold through B-cell antigen receptor. Finally, T cell development in Aiolos null mice is relatively unaffected.

The Aiolos transcription factor has been reported to control T cell death by regulating the expression of Bcl-2 [5], suggesting the possibility that evasion of apoptotic cell death is a common mechanism by which Ikaros family proteins participate in leukemogenesis. It has also been shown that the association of Aiolos and the anti-apoptotic molecule Bcl-x is involved in the control of apoptosis via IL-4 receptor signaling [6].

Both Ikaros and Aiolos can activate reporter genes expressed under the control of a promoter with binding sites for these transcription factors [1,7,8]. Binding sequences for Ikaros proteins were also found in the promoters of both CD4 and CD2 genes, and in the promoters for genes encoding the early pre-B cell differentiation antigen mb-1, IL-2R α , PRDII element of the β interferon gene, the anti-apoptotic protein Bcl-2 and in the enhancer of the H-2k^b gene, as well as in the E-A^d promoter [5,9–20]. Moreover, it has been shown that the λ 5 gene is a target for repression by Ikaros, acting on a binding site located in the λ 5 promoter through a mechanism that does not require heterochromatin relocation [21]. The finding that mutation of a single binding site in the λ 5 promoter causes loss of repression suggest a direct repressive effect of Ikaros binding on the promoter.

Several studies provide evidence that Ikaros splice variants are translated to protein isoforms with alternate functional and structural properties. These isoforms are thought to have a dominant negative function because they prevent binding of the dimer to the DNA [22–27]. Contrary to the mouse, five human Aiolos isoforms have been reported, including dominant negative variants with less than three DNA-binding domains [24]. It is therefore possible that stoichiometric alterations or functional disequilibrium between putative oncogenic and antioncogenic Aiolos isoforms may play a role in pathogenesis of B cell malignancies.

We present here the cloning and characterization of the human Aiolos promoter. We have delineated a positive regulatory region important for the promoter activity of the Aiolos

*Corresponding author. Address: Immunologie Cellulaire et Tissulaire, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Bâtiment CERVI, U543 Inserm, 83, Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Fax: +33 142177490. E-mail address: rebollo@chups.jussieu.fr (A. Rebollo).

¹The two first authors equally contributed to this work.

²Present address: INRA, Unité Mixte de Recherche, 35590 Saint Gilles, France.

gene. Within this positive regulatory region, NF κ B, Ikaros and AP4-binding sites are critical for Aiolos promoter activity *in vitro* and *in vivo*. Mutation of their binding sites abrogates promoter activity and finally, overexpression of Ikaros and NF κ B is able to activate the promoter resulting in Aiolos expression in cell lines as well as in freshly isolated T and B cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and cell culture

Daudi (human Burkitt's lymphoma), U937 (human histiocytic lymphoma), Jurkat (human T lymphocyte acute leukemia) and HEK293 (human embryonic kidney) cell lines were used in this study. Daudi, Jurkat and U937 were cultured in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum, 2 mM glutamine, 10 mM HEPES. HEK293 cell line was cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine. T and B cells, as well as monocytes, have been freshly isolated from blood. Spleen and liver tissues were obtained from Hôpital Pitié-Salpêtrière.

2.2. Reagents, antibodies and plasmids

Anti-CD3, anti-CD14 and anti-CD19 magnetic beads and B and T cell negative isolation kits were from DYNAL (Oslo, Norway). 5'-RACE-PCR system for rapid cDNA amplification and Advantage 2 PCR kit were purchased from BD Biosciences (Palo Alto, CA). Quick-change site-directed mutagenesis kit was from Stratagene (La Jolla, CA). The pGL3 basic and pRL-CMV vectors as well as the dual luciferase reporter assay kit were purchased from Promega (Madison, WI). Human T and B Nucleofactor™ kits were from Amaxa (Gaithersburg, MD). Anti-Ikaros and anti-AP4 antibodies were from Santa Cruz (Santa Cruz, CA). Anti-Aiolos antibody was generated in our lab as previously described [5]. Anti-NF κ B antibody was from BD Biosciences (San Jose, CA) and anti-histone antibody was from Chemicon International (Temecula, CA).

2.3. Bioinformatic analysis

Aiolos promoter was identified using a comparative genomic approach and the Genomatix software tool. Transcription binding sites sequence analyses were conducted using MatInspector Professional program (Genomatix Software, Germany).

2.4. Cloning, sequencing and mutagenesis of the Aiolos promoter

Based on the published sequence of human chromosome 17, a 3.9 kb fragment spanning 3956 nucleotides of human Aiolos promoter was obtained by PCR using as template genomic DNA from peripheral blood mononuclear cells.

The resulting fragment was cloned into the pCRII-Topo vector using the TOPO-TA cloning kit. The pTopo-3.9 was then used as a PCR template to generate the following deletion constructs: pTopo-1.5 kb, pTopo-1.1 kb, pTopo-920 bp, pTopo-670 bp, pTopo-370 bp, pTopo-175 bp and pTopo-92 bp. The deletion fragments were cloned into the pGL3 basic luciferase reporter vector. Site-directed mutagenesis of the ATG translation initiation site and potential binding sites for Ikaros, NF κ B and AP4 were performed using the Quick Change site-directed mutagenesis kit.

2.5. Transient transfection and luciferase assay

Jurkat, U937 and HEK 293 cells were transiently transfected using lipofectamine 2000 reagent. Daudi cells were transfected by electroporation. Cells were cotransfected with different fragments of Aiolos promoter and pRL, containing the renilla reporter gene as an internal control. Transfection of Ikaros and NF κ B in Jurkat and U937 cells was done using cell line Nucleofactor™ kit, according to the manufacturer's instructions. Daudi was transfected using DEAE-dextran. Luciferase assay was performed according to the manufacturer's protocol. Finally, freshly isolated T or B cells were transfected using the Human T or B cell Nucleofactor™ kit.

2.6. Western blot analysis

Western blot was performed as previously described [5].

2.7. Radioactive end labelling

Oligonucleotides containing binding sites for the NF κ B, AP4 and Ikaros transcription factors were synthesized with the addition of ATTA at the 5'-termini to allow radiolabelling, after annealing, by Klenow fill-in reaction using 32 P- γ ATP.

2.8. Nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and supershift

Nuclear extracts, EMSA and supershift were made as previously described [5].

2.9. Chromatin immunoprecipitation

Quantification of chromatin immunoprecipitated (ChIP) DNA fragments was carried out on an ABI PRISM® 7300 sequence detection system using SYBR® green according to standard protocols. Primers were designed with PrimerExpress 2.0® software (Applied Biosystems) and were used at a final concentration of 600 nM each. The specific primer set matches the proximal promoter of Aiolos, whereas reference primers match a sequence upstream of Aiolos' 3'-end. Primers were calibrated with serial dilutions of input DNA from the same chromatin batch also used for ChIP. Relative fold *in vivo* enrichment of DNA fragments was calculated determining the ratio of ChIP_{promoter}/ChIP_{3'-end} and non-specific background enrichment was defined as 1-fold enrichment. All reactions were run in triplicate and included no template controls.

2.10. Human monocytes, B and T cells isolation

After Ficoll-Hypaque mononuclear cell separation, we obtained specific lineages by positive or negative selection, depending on further use. For RACE-PCR, we isolated monocytes, T and B cells using anti-CD14, anti-CD3 or anti-CD19 Dynal magnetic beads, respectively, according to the manufacturer's instructions. For transfection of Ikaros and NF κ B in B cells, we made negative sorting with Dynal B or T cells Negative isolation kit.

2.11. RACE-PCR analysis and transcription start site mapping

We mapped the transcription start site using the 5'-RACE system for rapid amplification of cDNA ends, according to the procedure described by the manufacturer. PCR fragments were purified and cloned into a pTOPO TA vector.

2.12. RT-PCR and RT-qPCR analysis

Total RNA was first purified using the RNeasy kit and oligo(dT)-primed first strand cDNA were synthesised using Superscript II reverse transcriptase. Quantitative PCR was carried out on an ABI PRISM 7700 detection system. We used pre-developed TaqMan assay reagents (primer and probes) for detection of human Aiolos and the absolute qPCR Rox mix, according to the manufacturers' instructions.

3. Results

3.1. Structure of the human Aiolos gene

To characterize the regulation of the gene encoding Aiolos, we have isolated, sequenced and characterized its promoter. Analysis of the chromosomal region 17q21 allowed us to delineate the putative promoter region of Aiolos. Fig. 1A shows the structure of Aiolos gene with 8 exons and the promoter region upstream of the ATG initiation codon. We screened by PCR a human genomic DNA from peripheral blood mononuclear cells using oligonucleotides specific for the 5'-untranslated region and the ATG region of Aiolos (for primers, see supporting information). We isolated a clone containing a 3.9 kb fragment including the initiation codon, which was subsequently mutated in order to avoid transcription of luciferase

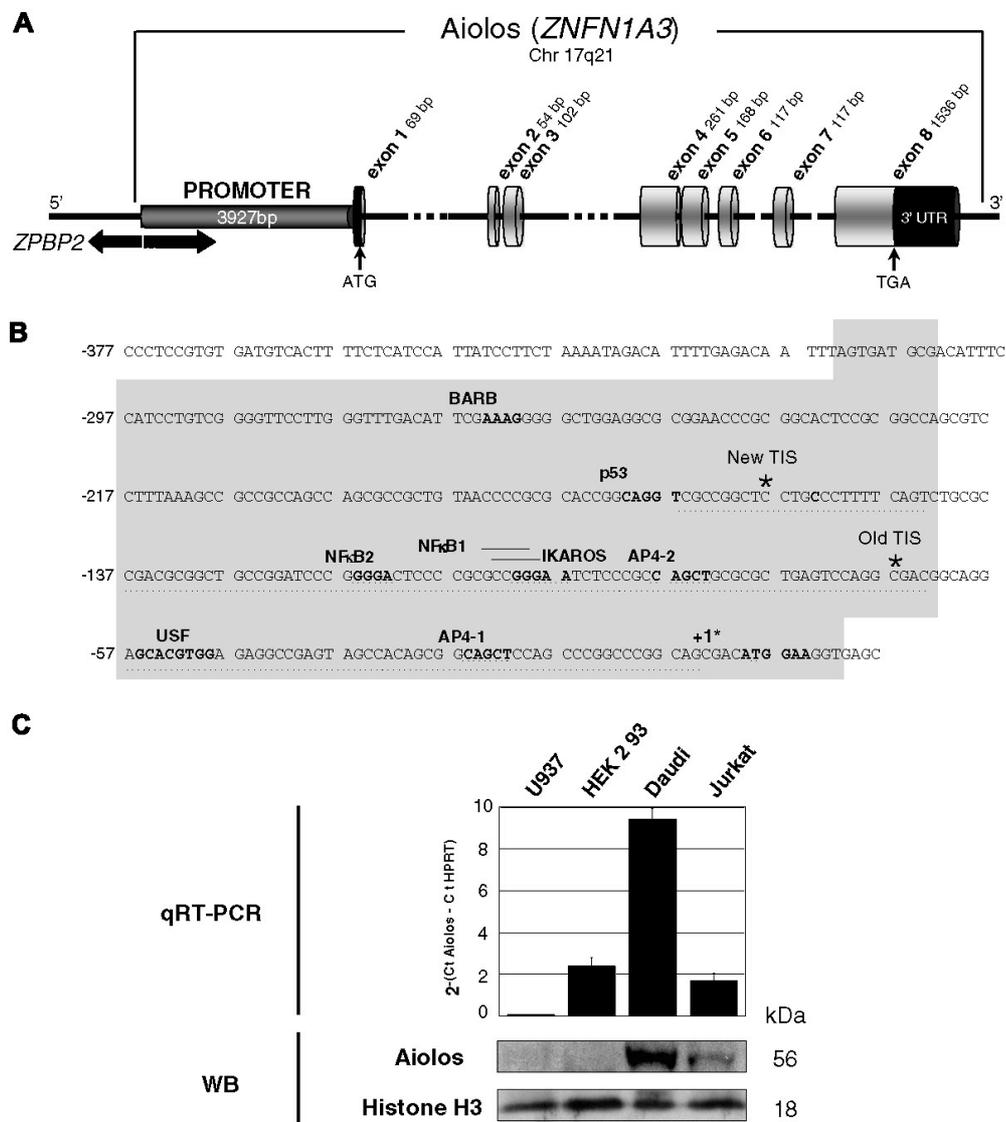


Fig. 1. Aiolos gene structure and its promoter region. (A) Human Aiolos gene is located on chromosome 17 and is composed by eight exons. The size of the different exons, as well as the promoter upstream of the ATG is shown. (B) The nucleotide sequence of 377 bp of the 5' flanking region of the Aiolos gene is shown. The ATG codon is in bold type. The old and the new transcription initiation site (TIS) are labelled with a star. The Ikaros, AP4-1, AP4-2, NFκB1 and NFκB2 binding sites are in bold and underlined. Other hypothetical binding sites in the promoter are shown. The CpG island is in grey. The minimal Aiolos promoter is dotted. (C) Four different cell lines representative of lymphoid and non-lymphoid (Daudi, Jurkat, U937 and HEK293) were analyzed for Aiolos expression at the RNA level by RT-qPCR and at the protein level by western blot. Anti-histones antibody and HPRT were used as internal control.

gene from the Aiolos ATG. Sequence analysis of this fragment showed that it contains precisely 3927 bp. Fig. 1B shows 377 bp upstream from the ATG, which correspond to the CpG island of Aiolos promoter.

Analysis of this DNA sequence using the Mat Inspector software showed, among others, potential binding sites for the NFκB, Ikaros, p53, BARB and AP4 transcription factors.

No TATA or CAAT box could be identified although a CpG island was detected (Fig. 1B). For the functional analysis of Aiolos promoter, four different cell lines representative of lymphoid and non-lymphoid lineages, with different Aiolos expression level, were transfected with the luciferase expression vector constructs. First, Aiolos expression was tested in the different cell lines at the RNA and protein level (Fig. 1C). U937

(promonocyte) cells are negative for Aiolos expression, in our experimental conditions, at both RNA and protein level, as detected by quantitative RT-PCR and by western blot, while HEK293 (embryonic kidney) cells are positive for Aiolos expression at the RNA, but not at the protein level. Finally, Jurkat (T cell line) and Daudi (B cell line) cells are positive for Aiolos expression, at the RNA and protein levels (Fig. 1C).

In addition, we mapped the transcription initiation site using the SMART RACE cDNA amplification method. RNA from liver, spleen, as well as from different cell lines was used as template. RACE-PCR analysis was performed using an oligonucleotide derived from the coding region and an adapter primer provided with the Kit (for oligonucleotides, see Table 1, supplementary data). An extended cDNA was amplified using universal primer and Aiolos-exon IV primer (Fig. 2A). The specific PCR product was cloned and sequenced, resulting in a fragment of 392 bp observed in Daudi, Jurkat, HEK293 and spleen. No PCR product was detected in U937 and liver (Fig. 2B). The RT-PCR confirmed the transcription initiation site observed by RACE-PCR (Fig. 2B). To corroborate that in freshly isolated human cells the transcription initiation site was identical to that found in cell lines, we made a RT-PCR using RNA from freshly isolated human T and B cells as well as

monocytes (Fig. 2B). No PCR product was observed in monocytes. Our results show that TIS is located 153 bp upstream of the ATG (Fig. 2C).

3.2. Identification of Aiolos minimal promoter region

We cloned the 3.9 kb fragment, in a -sense orientation, in front of the luciferase reporter gene present in the pGL3 basic vector and the enzymatic activity was measured using the dual luciferase reporter assay (luciferase and renillase) system. Supporting information schematically shows the full-length Aiolos promoter and the different 5' nested deletion promoter-luciferase constructs used in this study (Table 2).

The full-length Aiolos promoter, pGL3-3940, shows luciferase activity in Jurkat, Daudi, U937 and HEK cells after transient transfection, although the level of enzymatic activity was different among the cell lines tested (Fig. 3). To delineate the regulatory elements in the cloned Aiolos promoter, as well as the minimal promoter, we examined the nested 5' deletions of Aiolos promoter luciferase constructs generated by PCR. Deleted promoter constructs were transfected in the mentioned cell lines.

Deletion of 2465 bp (pGL3-1575) did not modify the luciferase activity compared to the level of the full-length promoter activity in transfected Jurkat cells. Moderate decrease of the enzymatic activity was detected in deletions comprised between pGL3-1170 and pGL3-670. Luciferase activity was strongly increased in the pGL3-175 deletion construct, suggesting the presence of negative regulatory elements (Fig. 3). Finally, no luciferase activity was detected after transfection in Jurkat cells with pGL3-92.

Promoter constructs harbouring nested deletions were also transfected into the Daudi cell line (Fig. 3). All transfected constructs, except pGL3-92, displayed luciferase activity although the pGL3-175 and pGL3-920 showed lower enzymatic activity compared to the full-length promoter construct, suggesting again the presence of negative regulatory elements.

Deletions of Aiolos promoter were transfected into the promonocytic cell line U937, which does not express Aiolos (Fig. 3). The enzymatic activity of the deletions was reduced, compared to the full-length promoter, with a significant increase of luciferase activity in pGL3-175. This result suggests a potential inhibitory region upstream of 3.9 kb in the endogenous Aiolos promoter. No luciferase activity was detected in U937 cell after transfection of pGL3-92.

When the nested promoter deletions were transfected in HEK293 cells (Fig. 3), we observed that deletions comprised between pGL3-1575 and pGL3-370 did not significantly modify the luciferase activity compared to the full-length promoter. No luciferase activity was detected in HEK293 cells upon transfection of the pGL3-92 promoter deletion and the highest luciferase activity was detected upon transfection of the pGL3-175 construct. Statistical analyses are shown to demonstrate the significance of the differences. Comparison of pGL3-92 versus pGL3-basic vector did not show significant differences. Taken together, these results allow us to delineate the minimum region with promoter activity, located between the ATG and the -175 bp for Jurkat and HEK293 cell lines and a minimum promoter located between the ATG and -370 bp for Daudi cells. For U937, the highest promoter activity is detected using the total cloned promoter. These results also highlight the presence of putative negative regulatory elements in the Aiolos promoter, since promoter activity is significantly

Table 1
Oligonucleotides used in this study

RACE-PCR	
Aiolos-IV-R	5'-AGGCTCTTCTGTCATTTCCCA-3'
RT-PCR	
Aiolos-I-F	5'-CGGCAGCGACATGGAAG-3'
Aiolos-II-R	5'-CACAGACTGCTCCTGAGTGC-3'
Aiolos-VIII-R	5'-TAGCTGATGGCGTTATTGATGG-3'
PBGD-F	5'-CTGGTAACGGCAATGCGGCT-3'
PBGD-R	5'-GCAGATGGCTCCGATGGTGA-3'
Cloning and nested deletions	
3940-F	5'-CGGAAGGCAGGAAGAGAATAAAGGAAAA-3'
1575-F	5'-ATCCTCATACCATCCCTGTGAAAT-3'
1170-F	5'-ATATGGACAGCTGATGCACAAAC-3'
920-F	5'-GGGTGTTGGGAGAAGATGTTGACT-3'
670-F	5'-GTGCCAAAATCCTTTCCAACTGTG-3'
370-F	5'-CTCCCGGTGATGTCACCTTTCTC-3'
175-F	5'-GGCTCCCTGCGCTTTTCAGTCT-3'
92-F	5'-ATTAGCTAGCTGAGTCCAGGCGACGGCAGGA-3'
Aio (AT*G)-R	5'-CTGGAGGCTCACCTTCCCTGTC-3'
Mutagenesis	
AP4-1-F	5'-GAGTAGCCACAGCGGCATCTCCAGCC - CGGCCCGGCAG-3'
AP4-2-F	5'-AATGTCCTCCGCCATATGCGCGGTGAGTC-3'
NFKB2-F	5'-CTGCCGGATCCCGATAACTCCCGCG-3'
Ikaros-F	5'-GACTCCCGCGCGGGGCTTCCCGCCAGCTGC-3'
NFKB/Ikaros-F	5'-GACTCCCGCGCGGGGAGATCTCCCGCCAGCTGC-3'
EMSA	
AP4-F	5'-ATTACACAGCGGCAGCTCCAGCCCGG-3'
Ikaros-F	5'-ATTACCGCGCGGGAAATCTCCCGCCA-3'
NFKB-F	5'-ATTACCGGATCCCGGGGACTCCCGCG-3'
AP4-m-F	5'-ATTACACAGCGGATATTCAGCCCGG-3'
Ikaros-m-F	5'-ATTACCGCGCGGAATTCTCCCGCCA-3'
NFKB-m-F	5'-ATTACCGGATCCCGATAACTCCCGCG-3'
ChIP	
Aio-5'-F	5'-CCTTTTCGAATGTCAAAACCAAG-3'
Aio-5'-R	5'-GATGCGACATTTCCATCCTGT-3'
Aio-3'-F	5'-TGTGCACTTGTTCCTCCAGTACT-3'
Aio-3'-R	5'-CAGGTGATCCTCCGACCTCA-3'

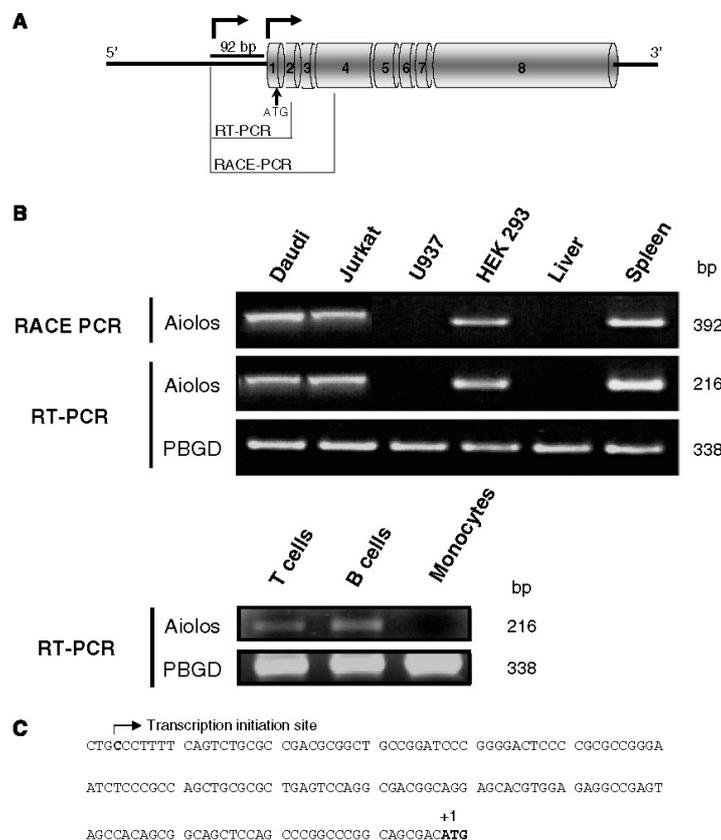


Fig. 2. Determination of the transcription initiation site (TIS). (A) Schematic representation of the approach used to map the transcription initiation site showing the location of the primers used for RT- and RACE-PCR. (B) Products of the RACE and RT-PCR. Daudi, Jurkat, U937, HEK cell lines, as well as liver, spleen, B and T cells and monocytes were used for determination of the transcription initiation site. PBGD was used as internal control. (C) DNA sequence of Aiolos promoter showing the TIS.

Table 2
Summary of 5'-nested Aiolos promoter deletions

Aiolos promoter constructs	Size of the promoter insert (bp)
pGL3-3940	3927
pGL3-1575	1562
pGL3-1170	1157
pGL3-920	907
pGL3-670	657
pGL3-370	357
GL3-175	162
pGL3-92	79
pGL3-basic	0

increased by deletion of some of its regions. In addition, these results also suggest that, independently of the cell line used, the full-length promoter, as well as the deletions show promoter activity.

3.3. Characterization of the proteins binding to Aiolos minimal promoter

Since the pGL3-175 deletion appears to be the shortest fragment with promoter activity and since additional deletions of this fragment did not show luciferase activity, we focused

our attention on the identification of putative binding sites for transcription factors in this promoter fragment. Fig. 4A shows the predicted binding sites detected in pGL3-175 promoter deletion: two binding sites for the transcription factor NFκB, one binding site for Ikaros and two binding sites for AP4. The presence of binding sites for AP4, NFκB and Ikaros in the promoter suggests that these proteins might be involved in the regulation of Aiolos transcription. On this basis, we analyze whether cells used in this study expressed these proteins. For this purpose, we isolated nuclear proteins from Daudi, Jurkat, U937 and HEK293 and analyzed the expression of Ikaros, NFκB and AP4 by western blot. As shown in Fig. 4B, all cell lines tested express at similar level NFκB and AP4 transcription factors. Ikaros was abundantly expressed in Daudi and Jurkat cells, while U937 and HEK cells expressed lower level of the protein.

To test if DNA-binding forms of Ikaros, AP4 and NFκB were present in Daudi, Jurkat, U937 or HEK293 cells, we performed electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and competition using double-stranded oligonucleotides corresponding to the identified NFκB, AP4 and Ikaros-binding sites. We detected protein-binding activity to Ikaros oligonucleotides when using nuclear extracts from Daudi, Jurkat, U937 and HEK293

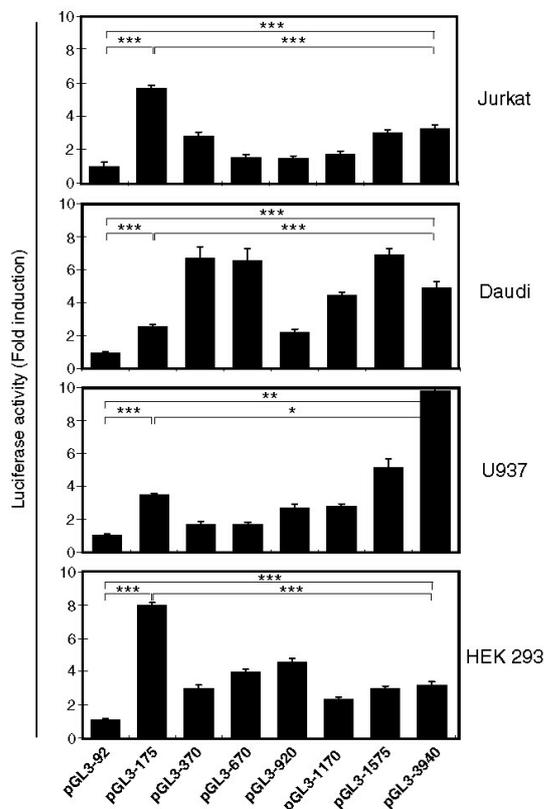


Fig. 3. Aiolos promoter activity of full length and 5'-nested deletions. Aiolos full length promoter and 5'-nested deletions were transiently transfected in Jurkat, Daudi, U937 and HEK293 cell lines and luciferase activity was analyzed. Results were normalized to Renilla luciferase activity and compared to the activity of the empty pGL3-basic vector. Standard deviation is shown where $n = 4$. *Significant value of $0.01 < P \leq 0.05$; **significant value of $0.001 < P \leq 0.01$; ***significant value of $P < 0.001$.

cells (Fig. 4C). In the case of Jurkat and U937 extracts, two retarded DNA-protein complexes were observed. The retarded bands were specific since excess of unlabelled Ikaros oligonucleotides inhibited formation of the complex (Fig. 4C). Similarly, we also detected protein-binding activity to NF κ B oligonucleotides when using nuclear extracts from Daudi, Jurkat, U937 and HEK293 (Fig. 4C). The same result was observed when using AP4 oligonucleotides (Fig. 4C). The NF κ B and AP4 complex formed were specific since an excess of unlabelled NF κ B and AP4 was able to inhibit the formation of complex. These results were also confirmed by supershift using specific antibodies in order to identify these bands as specific proteins. As shown in Fig. 4B, we observed a supershift of the bands using antibodies against NF κ B, AP4 and Ikaros.

To corroborate the role of Ikaros-, NF κ B- and AP4-binding sites, we generated oligonucleotides harbouring mutated binding sites for these transcription factors and we were unable to detect protein binding activity when using nuclear extracts from Daudi, Jurkat, U937 and HEK293 cells (Fig. 4C). The data suggest that AP4, Ikaros and NF κ B transcription factors

may be responsible for the transactivation of the Aiolos promoter.

To further evaluate the functional role of NF κ B, AP4 and Ikaros transcription factors in the control of Aiolos promoter activity, we mutated the corresponding binding sites in the Aiolos promoter (Fig. 5A). We transiently transfected these mutated constructs in Daudi, Jurkat, U937 and HEK293 cells and analyzed the luciferase activity. Fig. 5B shows mutation of the NF κ B2-binding sites in Aiolos promoter significantly reduces luciferase activity in Jurkat (70%), Daudi (24%) and HEK293 (100%) compared to pGL3-175 control (Fig. 5B). Mutation of the AP4-1 and AP4-2-binding sites in the Aiolos promoter also reduced luciferase activity in Jurkat (48% and 45%, respectively), Daudi (56% and 71%, respectively), U937 (71% and 65%, respectively) and HEK293 (23% and 88%, respectively) compared to pGL3-175 control (Fig. 5B). Mutation of the Ikaros/NF κ B-binding site in Aiolos promoter reduces luciferase activity in Jurkat (16%), Daudi (65%), U937 (51%) and HEK293 (15%) cell lines, compared to pGL3-175 control. Mutation of the Ikaros-binding site reduces luciferase activity in Jurkat (43%), Daudi (50%), U937 (71%) and HEK293 (40%). Finally, mutation of the Ikaros/AP4/NF κ B-binding sites in Aiolos promoter reduces luciferase activity in Jurkat (61%), Daudi (56%), U937 (72%) and HEK293 (74%). Statistical analysis is shown to demonstrate the significance of the differences. Comparison of pGL3-92 versus pGL3-basic did not show significant differences. These results suggest that AP4, Ikaros and NF κ B transcription factors contribute to Aiolos promoter transactivation.

3.4. Binding of Ikaros, AP4 and NF κ B to Aiolos regulatory elements *in vivo*

To investigate whether Aiolos transcription is directly controlled by Ikaros, NF κ B and AP4, *in vivo*, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays to determine if these transcription factors are physically bound to the Aiolos promoter. Using an antibody against Ikaros we obtained a significant enrichment in Jurkat and Daudi cells (Fig. 6). The use of an antibody against NF κ B showed a moderate enrichment in Daudi cells whereas no enrichment was observed in Jurkat, HEK293 and U937 (Fig. 6). Finally, an anti-AP4 antibody showed a moderate enrichment in Jurkat cells. These results indicate that Ikaros specifically bind to Aiolos promoter.

3.5. Ikaros and NF κ B induce Aiolos expression

Since mutation of the NF κ B- and Ikaros-binding sites in Aiolos promoter abolished DNA binding and strongly reduces luciferase activity and since ChIP experiments showed a direct *in vivo* interaction of NF κ B and Ikaros, we asked whether NF κ B and Ikaros overexpression would be able to induce luciferase activity and Aiolos expression. Jurkat, Daudi and U937 were transiently co-transfected with a mixture of pGL3-175 and the either wild-type Ikaros (Ik2), the dominant negative isoform of Ikaros (Ik8) or wild-type NF κ B. After transfection, cells were analyzed for luciferase activity and Aiolos expression (Fig. 7A).

Jurkat, U937 and Daudi cells transfected with Ik2 showed higher luciferase activity than control cells transfected with pGL3-175. Similar results were obtained when NF κ B was transfected, except for Jurkat cells. On the contrary, cells transfected with the dominant negative Ik8 showed lower level of luciferase activity compared to control pGL3-175 (Fig. 7A).

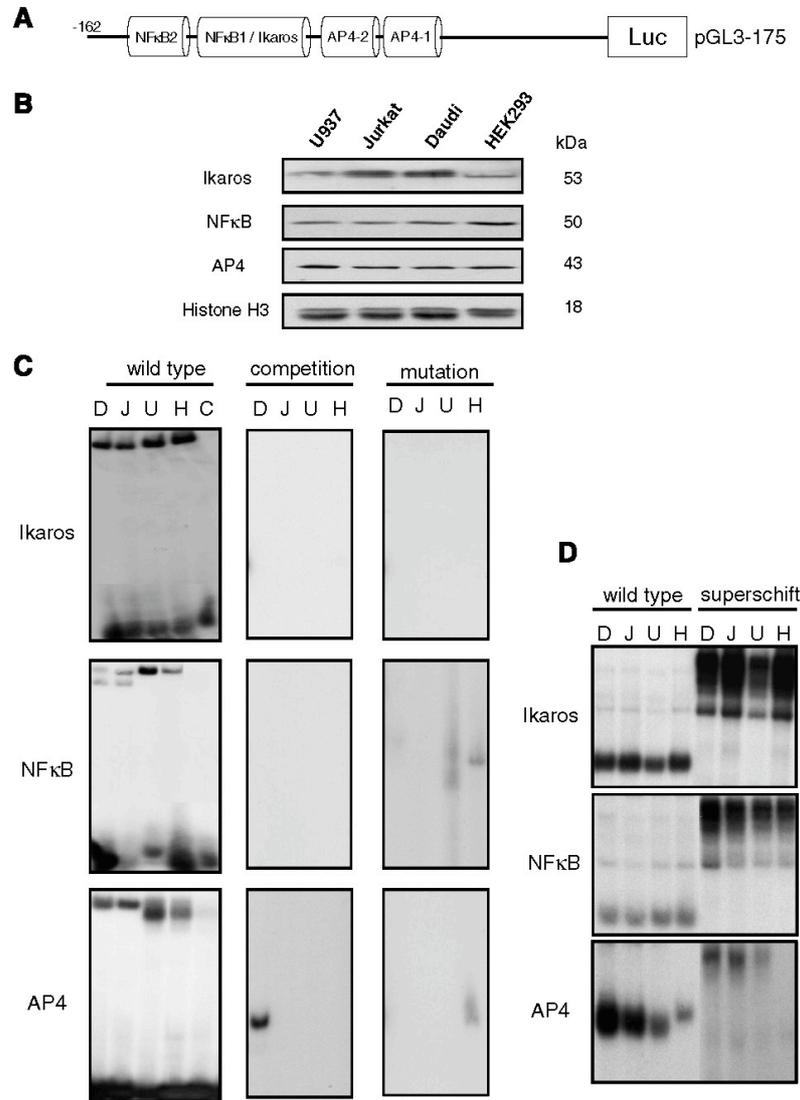


Fig. 4. Deletion mutant of Aiolos promoter and *in vitro* binding of AP4, Ikaros and NFκB to Aiolos promoter. (A) Schematic representation of NFκB1, NFκB2, AP4-1, AP4-2 and Ikaros binding sites in the minimal Aiolos promoter. (B) Nuclear proteins were separated by SDS PAGE, transferred to nitrocellulose and probed with anti-NFκB, anti-Ikaros, anti-AP4 or anti-histones antibody, the latter as internal control of protein loading. Similar results were obtained in two independent experiments. (C) EMSA was performed using ³²P-end-radiolabeled oligonucleotides containing wild-type or mutated binding sites for Ikaros, AP4 and NFκB. Protein-DNA complexes were separated by PAGE, dried and exposed to X-ray film. Unlabelled competitors were used at 20-fold molar excess. Similar results were obtained in three independent experiments. (D) Supershift was made using specific antibodies anti-Ikaros, anti-NFκB and anti-AP4. D: Daudi, J: Jurkat, U: U937, H: HEK293, C: Control.

Interestingly, overexpression of Ik2 and NFκB induced Aiolos expression in Jurkat, Daudi and U937 cells (Fig. 7A) while overexpression of Ik8 inhibited Aiolos expression. Expression of transiently transfected Ik2, Ik8 and NFκB was confirmed by direct comparison of protein levels in Ik2, Ik8 and NFκB in PGL3-175 transfected cells. Concerning AP4, we are analyzing more in detail the contribution of this transcription factor to the control of Aiolos expression. Statistical analysis is shown to demonstrate the significance of the differences. Com-

parison of pGL3-92 versus pGL3-basic vector did not show significant differences.

The role of Ikaros and NFκB in the control of Aiolos expression was also tested in freshly isolated B and T cells. B and T cells were transiently co-transfected with pGFP and either Ik2, Ik8 or NFκB. After transfection, cells were analyzed for Aiolos expression. Interestingly, overexpression of Ik2 and NFκB induces Aiolos expression in freshly isolated B and T cells, while overexpression of the dominant negative

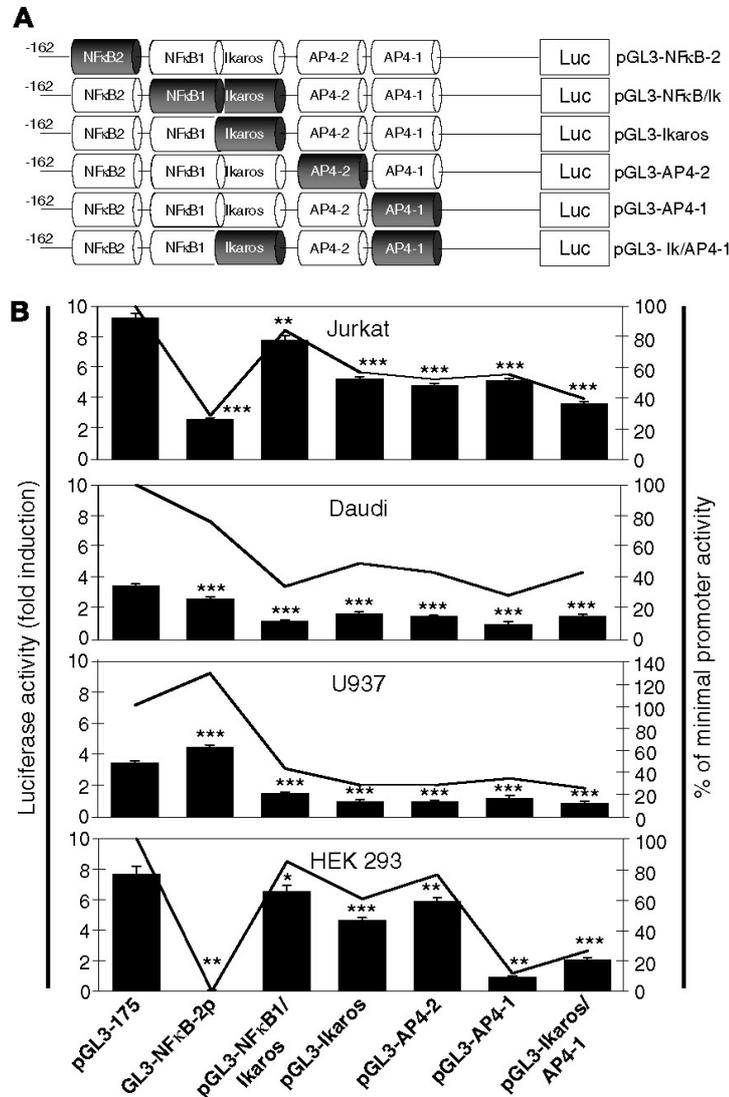


Fig. 5. Ikaros, NFκB and AP4 mutation strongly reduces Aiolos promoter activity. (A) Schematic representation of mutated NFκB, Ikaros and/or AP4 binding sites in the minimal promoter. (B) Cells were transiently transfected with wild-type or wild-type pGL3-175 promoter containing mutated AP4, Ikaros and/or NFκB binding sites. After transfection, cells were analyzed for luciferase activity. Results were normalized to Renilla luciferase activity. S.D. is shown where $n = 4$. The curve represents the percentage of luciferase activity relative to the minimal promoter. For significant values, see legend to the Fig. 3.

Ik8 inhibits its expression (Fig. 7B). The expression of Ik2, Ik8 and NFκB was monitored by Western blot. As internal control of transfection, we analyzed the GFP expression by FACS. These results suggest that Ikaros and NFκB trans-activate the Aiolos promoter and induce Aiolos expression in cell lines, as well as in freshly isolated B and T cells.

4. Discussion

For a more complete understanding of the regulation of Aiolos expression, we cloned and characterized the promoter

region of human Aiolos gene. The isolated DNA fragment contained part of the exon 1 and the 5' upstream region. We showed that major regulatory elements, which control the activation of transcription, are located 175 bp upstream of the ATG start codon in Jurkat and HEK293 cells and 370 bp upstream of the ATG in Daudi cells. Maximal transactivation of the Aiolos promoter requires the NFκB, Ikaros and, probably also, AP4 transcription factors as shown by luciferase activity and ChIP experiments. The different promoter activity, in the different cell lines, may imply that a functional interaction occurs between these transcription factors. Alternatively, it may imply a different status of DNA methylation. We also

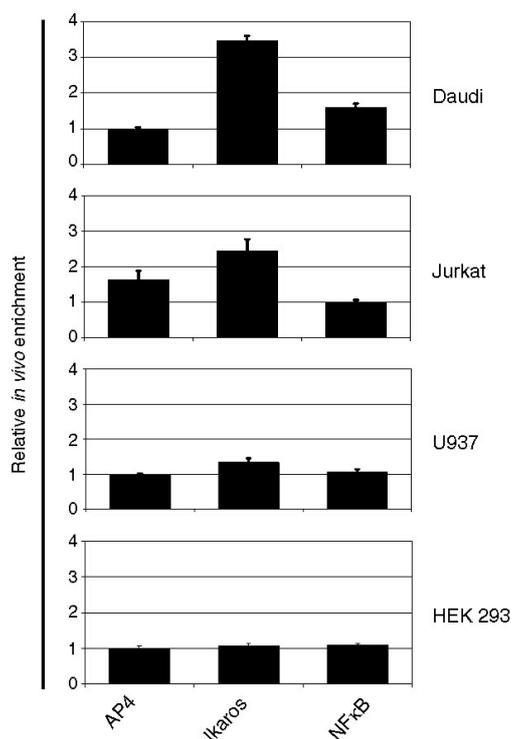


Fig. 6. ChIP assay to detect *in vivo* binding of Ikaros, AP4 and NFκB to Aiolos promoter. The cross-linked protein/DNA complex isolated from Daudi, Jurkat, U937 and HEK293 cells were immunoprecipitated with anti-AP4, anti-NFκB or anti-Ikaros antibodies. qPCR experiments were performed in triplicate and the standard deviations are shown as error bars. The relative fold enrichment for each DNA fragment is indicated.

have investigated the role of the Ikaros and NFκB transcription factors in the control of Aiolos expression, showing that both nuclear proteins are able to induce Aiolos expression in cell lines, as well as in freshly isolated B and T cells.

The DNA-binding potential of Ikaros, AP4 and NFκB was examined by EMSA. The retarded bands were specific since excess of unlabeled Ikaros, NFκB and AP4 oligonucleotides inhibited formation of the complexes whereas oligonucleotides with mutated binding sites did not. In addition, the specificity of bound proteins was confirmed by supershift using specific antibodies. In addition, mutation of NFκB-, AP4- and Ikaros-binding sites diminished basal promoter activity. Finally, *in vivo* binding of Ikaros and moderated binding of AP4 and NFκB was also identified by ChIP assay. In the Aiolos promoter, one of the putative NFκB-binding sites overlaps with an Ikaros-binding site. Similarly, in the ϵ promoter, one of the putative Ikaros-binding elements overlaps with a STAT6 binding site and two others with NFκB-binding sites. Using the ChIP assay, we showed that NFκB, AP4 and Ikaros specifically bind to the Aiolos promoter in Daudi, Jurkat and U937 cells but not in HEK293 cells *in vivo*, although the binding of AP4 and NFκB is moderated. It is interesting to notice the difference between the *in vitro* (luciferase) and *in vivo* (ChIP) results in HEK293 and U937 cells: while we were able to detect

luciferase activity in both cell lines, we were not able to detect binding of Ikaros, NFκB and AP4 to the chromatin in HEK293 cells and only moderated binding of Ikaros in U937 cells. This could be explained by the possibility that a multiprotein complex is formed between Ikaros, AP4 and/or NFκB and other transcription factors and that HEK293 and U937 cells may lack unidentified binding factor(s) necessary to form this complex. Alternatively, an inhibitory transcription factor(s) binds to this site in HEK293 and U937 cells, preventing the binding of other transcription factors to this region. Finally, we do not rule out the possibility that other transcription factors, different from Ikaros, NFκB and AP4 might be sufficient to drive expression in HEK293 and U937 cells.

A number of reports have identified the presence of Ikaros binding sites in the promoters of a variety of lymphoid-specific genes [21,28,29]. The Ikaros transcription factor was originally isolated as a T cell specific gene encoding a zinc finger protein that binds to an enhancer element in the CD3 ϵ gene [30]. More recent studies have shown that this protein plays a key role in the development of mature T and B lymphocytes and natural killer cells. Moreover, Ikaros binds to the promoter region of the human T cell specific gene that encodes the Grz B serine protease, reinforcing the hypothesis of a pivotal role for this transcription factor in lymphoid-specific gene expression [31]. Ikaros binding sites have also been detected in the promoter of human STAT4 gene [32]. It has also been shown that the T cell specific gene CD8 α is an *in vivo* target of Ikaros, which binds CD8 regulatory elements *in vivo* in a sequence-specific manner. In addition, we do not rule out the possibility that Aiolos auto-regulates its own expression.

It is believed that transcription factors are the final pathway driving differentiation. For instance, marginal zone B cells fail to develop in the absence of Aiolos as well as in the absence of NFκB p50 [4,33]. Finally, it is interesting to remark that NFκB and AP4 binding sites are well conserved between human and mouse Aiolos promoter.

Ikaros is known to act both as an activator and repressor of transcription [34]. It has also been reported that Ikaros may act together with other transcription factors to modulate promoter activity [35]. For instance, IK2, an upstream stimulatory factor, has been reported to synergize in transactivating the promoter of the mouse opioid receptor gene.

The exact molecular mechanism by which AP4 influences transcription is not known and in several cases AP4 has been proposed to repress gene expression. For example, binding of AP4 to the HIV-1 TATA element *in vitro* was found to compete for TATA-box binding protein binding to this element and to inhibit *in vitro* transcription from the HIV-1 long terminal repeat [36]. Within the late promoter region of SV40, AP4 appears to be involved in conferring significant levels of nuclease sensitivity, implicating AP4 in chromatin remodelling [37]. It has been proposed that AP4 might bind to its target sequence in the transcription factor Myc and Max, allowing other transcription factors to bind in a co-operative manner [37]. The role of AP4 in the control of Aiolos expression is an ongoing project in our lab.

Four cell lines representative of lymphoid and non-lymphoid cells with differential Aiolos expression were transfected with luciferase expression vectors containing 5' deletions of the Aiolos promoter. Further 5' deletions up to position 175 essentially abolished the promoter activity, suggesting that the core promoter might be located between the ATG and -175

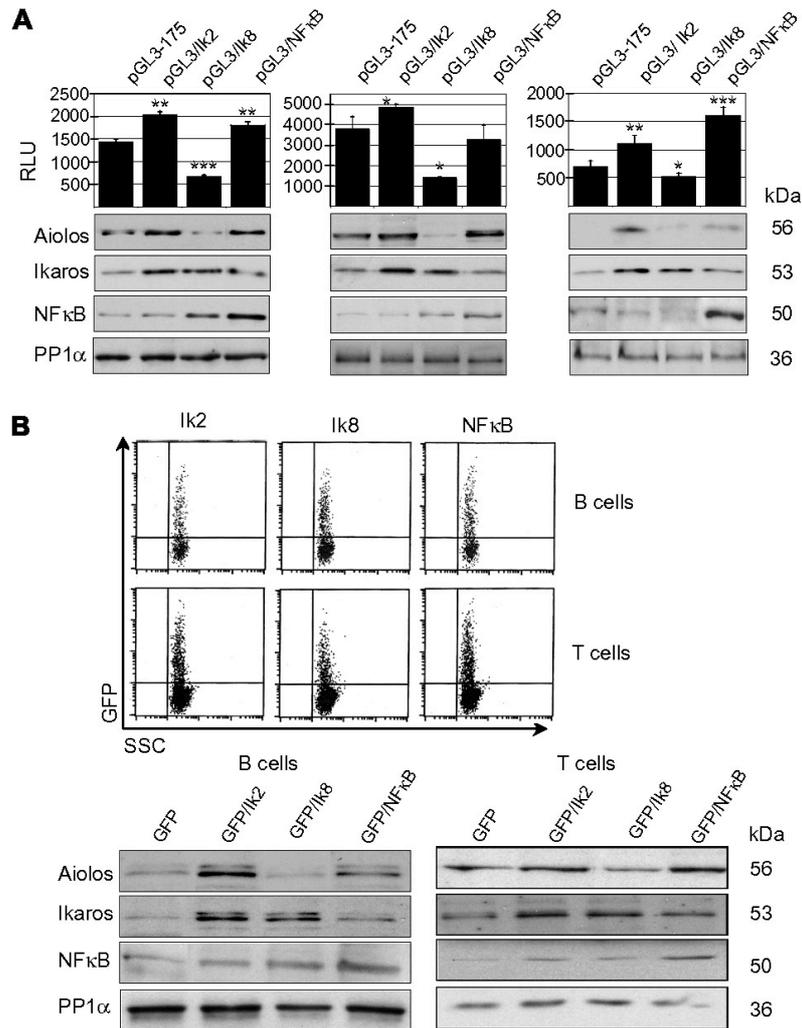


Fig. 7. Transfection of Ikaros and NFκB induce luciferase activity and Aiolos expression. (A) Daudi, Jurkat and U937 cells were transiently transfected with pGL3-175 and Ik2, Ik8 or NFκB expression vectors. After transfection, cells were assayed for luciferase activity. Standard deviation is shown where *n* = 3. For significant values, see legend to the Fig. 3. Cells also were analyzed for Aiolos expression. As internal control of transfection, the blot was probed with anti-Ikaros and anti-NFκB antibody. As internal control of loading, the blot was probed with anti-PP1α antibody. Data are representative of three independent experiments. (B) Freshly isolated T or B cells were transfected with pGFP and Ik2, Ik8 or NFκB expression vectors. After transfection cells were analyzed for Aiolos expression as above. As a control of transfection, GFP expression was analyzed by FACS. The blot was probed with anti-PP1α as internal control of loading.

upstream of the ATG for Jurkat and HEK293 and –370 upstream of the ATG for Daudi cells. The promoter lacks TATA and CAAT boxes, but a potential CpG islands was identified between +13 and –306 bp, all characteristics of house keeping genes. The transcription initiation site was located 153 bp upstream of the ATG start codon, as expected for eukaryotic genes, where the transcription start is usually located 50–150 bp upstream of the ATG. It is interesting to notice that the promoter is cell-type independent. Results from luciferase activity of the full length promoter, as well as the 5' nested deletions suggest the presence of negative regulatory elements in the promoter, as well as upstream of the 3.9 kb fragment.

It is clear from our results that Ikaros and NFκB have the potential to stimulate Aiolos expression, suggesting that these transcription factors may be considered as upstream Aiolos effectors. Interestingly, Ikaros knock out mice express Aiolos [38]. This result is not in contradiction with our data since in the mouse Aiolos promoter there is no binding site for Ikaros transcription factor. But in the human context, Aiolos expression depends on Ikaros. Aiolos knock out mice lack marginal zone B cells [4]. Similarly, this subset of peripheral B cells also fails to emerge in mice lacking NFκB p50. However, we do not exclude the hypothesis that Ikaros and NFκB may facilitate other protein interactions rather than being activators per se.

Taken together, our results show for the first time that Ikaros and NF κ B are important transcription factors involved in the control of Aiolos expression. Our data provide a mechanistic understanding of the regulation of Aiolos at transcriptional level, providing a direct link between Ikaros/NF κ B/ and Aiolos. Further studies are in progress in order to determine whether other members of the Ikaros family, as well as AP4, are able to control Aiolos expression.

Acknowledgements: This work was supported by Inserm AVENIR Fund. M.D. is supported by a predoctoral fellowship from La Ligue Contre Le Cancer. Thanks are given to Dr. Israel (Institut Pasteur, Paris) for generous gift of the expression vector for NF κ B, to Dr. Matherly (Karmanos Cancer Institut, Detroit) for the pCDNA.Ik2 and pCNDNA.Ik3 expression vectors and to Dr. Gordon Langsley for critical reading of the manuscript.

References

- 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.
- 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.
- Wang, J.H., Avitahl, N., Cariappa, A., Friedrich, C., Ikeda, T., Renold, A., Andrikopoulos, K., Liang, L., Pillai, S., Morgan, B.A. and Georgopoulos, K. (1998) Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity* 9, 543–553.
- Romero, F., Martinez, A.C., Camonis, J. and Rebollo, A. (1999) Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization. *EMBO J.* 18, 3419–3430.
- Rebollo, A., Ayllon, V., Fleischer, A., Martinez, C.A. and Zaballos, A. (2001) The association of Aiolos transcription factor and Bcl-xL is involved in the control of apoptosis. *J. Immunol.* 167, 6366–6373.
- 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.
- Hosokawa, Y., Maeda, Y., Takahashi, E., Suzuki, M. and Seto, M. (1999) Human aiolos, an ikaros-related zinc finger DNA binding protein: cDNA cloning, tissue expression pattern, and chromosomal mapping. *Genomics* 61, 326–329.
- Redondo, J.M., Hata, S., Brocklehurst, C. and Krangel, M.S. (1990) A T cell-specific transcriptional enhancer within the human T cell receptor delta locus. *Science* 247, 1225–1229.
- Clevers, H., Dunlap, S., Lacy, E. and Terhorst, C. (1989) An enhancer located in a CpG-island 3' to the TCR/CD3-epsilon gene confers T lymphocyte-specificity to its promoter. *EMBO J.* 9, 2527–2535.
- Gottschalk, L.J. (1990) Identification and functional characterization of the human T-cell receptor beta gene transcriptional enhancer: common nuclear proteins interact with the transcriptional regulatory elements of the T-cell receptor alpha and beta genes. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5486–5495.
- Hagman, J., Travis, A. and Grosschedl, R. (1991) A novel lineage-specific nuclear factor regulates mb-1 gene transcription at the early stages of B cell differentiation. *EMBO J.* 10, 3409–3417.
- Ho, I.C., Bhat, N.K., Gottschalk, L.R., Lindsten, T., Thompson, C.B., Papas, T.S. and Leiden, J.M. (1990) Sequence-specific binding of human Ets-1 to the T cell receptor alpha gene enhancer. *Science* 250, 814–818.
- Serfling, E., Pfeuffer, I., Schenk, B., Zarius, S., Swoboda, R., Mercurio, F. and Karin, M. (1989) Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes. *EMBO J.* 8, 465–473.
- 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.
- Clevers, H., Lomberg, N., Dunlap, S., Lacy, E. and Terhorst, C. (1989) An enhancer located in a CpG-island 3' to the TCR/CD3-epsilon gene confers T lymphocyte-specificity to its promoter. *EMBO J.* 8, 2527–2535.
- Gottschalk, L.R. and Leiden, J.M. (1990) Identification and functional characterization of the human T-cell receptor beta gene transcriptional enhancer: common nuclear proteins interact with the transcriptional regulatory elements of the T-cell receptor alpha and beta genes. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5486–5495.
- Hagman, J., Travis, A. and Grosschedl, R. (1991) A novel lineage-specific nuclear factor regulates mb-1 gene transcription at the early stages of B cell differentiation. *EMBO J.* 10, 3409–3417.
- Serfling, E., Barthelmas, R., Pfeuffer, I., Schenk, B., Zarius, S., Swoboda, R., Mercurio, F. and Karin, M. (1989) Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes. *EMBO J.* 8, 465–473.
- 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.
- Georgopoulos, K. (1997) Transcription factors required for lymphoid lineage commitment. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 222–227.
- Liippo, J., Mansikka, A. and Lassila, O. (1999) The evolutionarily conserved avian Aiolos gene encodes alternative isoforms. *Eur. J. Immunol.* 29, 2651–2657.
- Liippo, J., Nera, K.P., Veistinen, E., Lahdesmaki, A., Postila, V., Kimby, E., Riikonen, P., Hammarstrom, L., Pelkonen, J. and Lassila, O. (2001) Both normal and leukemic B lymphocytes express multiple isoforms of the human Aiolos gene. *Eur. J. Immunol.* 31, 3469–3474.
- Liippo, J., Koskela, K. and Lassila, O. (2000) Prethymic progenitors from the avian para-aortic mesoderm express GATA-3 and distinct chTcf isoforms but still lack T-cell receptor-gamma rearrangements. *Scand. J. Immunol.* 52, 502–509.
- Nakase, K., Ishimaru, F., Avitahl, N., Dansako, H., Matsuo, K., Fujii, K., Sezaki, N., Nakayama, H., Yano, T., Fukuda, S., Imajoh, K., Takeuchi, M., Miyata, A., Hara, M., Yasukawa, M., Takahashi, I., Taguchi, H., Matsue, K., Nakao, S., Niho, Y., Takenaka, K., Shinagawa, K., Ikeda, K., Niya, K. and Harada, M. (2000) Dominant negative isoform of the Ikaros gene in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 60, 4062–4065.
- Georgopoulos, K. (2002) Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 162–174.
- 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.
- 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.
- Mermod, W.T. and Tjian, R. (1998) Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro. *Nature* 334, 218–224.
- Wargnier, S., Bosselut, R., Bourge, J.F., Lafaurie, C., Ghysdael, C.J., Sasportes, M. and Paul, P. (1995) Identification of human granzyme B promoter regulatory elements interacting with activated T-cell-specific proteins: implication of Ikaros and CBF binding sites in promoter activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6930–6934.
- Aranburu, A., Carlsson, R., Persson, C. and Leanderson, T. (2001) Transcription factor AP-4 is a ligand for immunoglobulin-kappa promoter E-box elements. *Biochem. J.* 354, 431–438.

- [32] Cariappa, A., Liou, H.C., Horwitz, B.H. and Pillai, S. (2000) Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 192, 1175–1182.
- [33] Littlewood, T.D. and Evan, G.I. (1995) Transcription factors 2: helix loop helix. *Protein Profile* 2, 621–702.
- [34] Sambrook, J. and Gething, M.J. (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342, 224–225.
- [35] Ou, M.L., Paulssen, E.J. and Gaynor, R.B. (1994) Role of flanking E box motifs in human immunodeficiency virus type 1 TATA element function. *J. Virol.* 68, 7188–7199.
- [36] Friez, R. and Milavetz, B. (1999) Chromatin structure of the simian virus 40 late promoter: a deletional analysis. *J. Virol.* 70, 1990–1997.
- [37] 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.
- [38] Cereghini, S., Raymondjean, M., Carranca, A.G., Herbomel, P. and Yaniv, M. (1987) Factors involved in control of tissue-specific expression of albumin gene. *Cell* 50, 627–638.

ANNEXE 2 :

DIFFERENTIAL EPIGENETIC REGULATION OF AIOLOS EXPRESSION IN HUMAN TUMORAL CELL LINES AND PRIMARY CELLS

Marianne Duhamel¹, Pablo Navarro², Muriel Cario-Andre³ and Angelita Rebollo^{1,4}

1- Immunologie Cellulaire et Tissulaire, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Bâtiment CERVI, U543 Inserm, 83, Bd de l'Hôpital, 75013 Paris and Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. France.

2- Institut Pasteur, Mouse Molecular Genetics Unit, 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France.

3- Université V Segalen, Inserm U876, 33076 Bordeaux, France.

4- Correspondence to: Angelita REBOLLO Immunologie Cellulaire et Tissulaire, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Bâtiment CERVI, U543 Inserm, 83, Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Tel: 33-142177527 / Fax: 33-142177490

e-mail: rebollo@chups.jussieu.fr

Key word: Aiolos/ CpG island/ DNA methylation/ histone modification/tumoral cells/primary cells/transcriptional regulation

Running title: Epigenetic modifications controlling Aiolos expression

Total characters: 30,629

ABSTRACT

The parameters implicated in the regulation of Aiolos, a tumor suppressor gene involved in T and B cell differentiation, are largely unknown. In order to investigate the epigenetic component of Aiolos regulation, we analyzed in various tumor cell lines and primary cells, representative of lymphoid, myeloid and non-hematopoietic cells, the methylation status of its 5' CpG island in relation to histone modifications.

Inhibition of CpG methylation by treatment with 5-Aza-dC restores Aiolos expression, as well as euchromatin-associated markers, in U937 and 1106mel cell lines that normally fail to express Aiolos. Dense DNA methylation and low levels of euchromatin-associated signatures (namely H3K4 di- and tri-methylation and H3K9 acetylation) of Aiolos promoter are observed in U937 and 1106mel cell lines, while the opposite pattern characterizes Daudi and Jurkat cell lines and freshly isolated T and B cells. Interestingly, CpG methylation is not necessary to repress transcription in Aiolos non-expressing monocytes and melanocytes where silencing mechanism involves the enrichment for the heterochromatin-associated histone signature H3K27 and H3K9 tri-methylated.

Our study provides evidence that DNA methylation of Aiolos promoter directs Aiolos silencing and chromatin status in tumor cell lines, while expression of Aiolos in primary cells is mainly regulated by histone modifications.

INTRODUCTION

The development and maintenance of a functional immune system is dependent on the integration of extracellular signals that eventually result in controlling nuclear gene expression. This highly regulated program begins in uncommitted hematopoietic progenitors and continues throughout lymphoid development (1). A number of transcription factors have been shown to play a critical role at specific stages of T and B cell differentiation regulating appropriate gene expression (1, 2). Among these transcription regulators are the Ikaros family zinc-finger nuclear proteins (3-9). These proteins are essential for normal lymphocyte development and appear to function as tumor suppressors since their down-regulation in mice leads to leukemias and lymphomas (10-13).

The Aiolos transcription factor has been identified as a homologue of the Ikaros transcription factor. Aiolos shows extensive homology to the largest Ikaros isoform throughout the DNA binding and C-terminal domain (7). Aiolos is expressed in the late fetal thymus and in the adult lymphoid organs. Within adult hemopoietic progenitors, Aiolos is not expressed in pluripotent stem cells but is detected at low levels in multipotent progenitors. Its expression is upregulated as these progenitors become restricted into the T and B lymphoid pathways (7).

Gene targeting studies have shown that Aiolos is not required during the early specification of the B and T lymphoid lineages from the hematopoietic stem cells, but plays an essential role during B cell proliferation and maturation. Furthermore, development of B cell lymphomas was frequently seen among Aiolos mutant mice (12). Human Aiolos shares identity with genes from mouse, chicken and fish. As in the case of Ikaros, multiple isoforms of human Aiolos have been found in both normal and leukemic B cells (14). The Aiolos transcription factor has been reported to control T cell death by regulating the expression and localization of the anti-apoptotic molecule Bcl-2 (15), raising the possibility that evasion of apoptotic cell death is a common mechanism by which Ikaros family proteins participate in leukemogenesis. Taken together, these observations highlight the importance of Aiolos regulation for both normal development and tumorigenesis.

DNA and histone modifications, the molecular actors of epigenetic processes in mammals, participate in the establishment of local chromatin structures that render gene promoter regions permissive or refractory for transcription (16-19). Depending on the set of histone modifications of the nucleosomes spanning the promoter, a given gene is therefore marked for transcriptional activation or silencing. Among such marks, covalent modifications of lysine 4, 9 and 27 of the histone H3 tail (H3K4, H3K9 and H3K27 respectively) are known to play

crucial roles. Indeed, H3K4 di- and tri-methylation and H3K9 acetylation have been extensively associated with active regions of the genome (euchromatin) while H3K9 and K27 tri-methylation participate in the establishment and maintenance of silent domains (heterochromatin) (20, 21).

In contrast to differential outcomes of histone modifications, methylation of cytosine residues of the CpG islands located at the promoter region of several genes is responsible for transcriptional silencing (22-24). The silenced genes can be re-expressed after either 5-Aza-dC (inhibitor of DNA methyl transferase) or TSA (inhibitor of histone deacetylase) treatment (25) but adding both drugs together does not result in additional re-expression, suggesting that DNA methylation and histone deacetylation cooperate to silence gene expression (25). It has been shown that 5-Aza-dC and TSA (26) act in a synergistic fashion to re-express silenced genes in colorectal carcinoma cells (27).

The role of epigenetic modifications of chromatin in the generation and/or maintenance of gene expression patterns specifying the hematopoietic pathway are poorly understood. For instance, during thymocyte differentiation, the precise control of CD4 and CD8 expression is the result of fundamental changes to the chromatin structure of their coding loci and could involve the transcription factor Ikaros (28, 29). Other studies have revealed that tri-methylated H3K4 histones are associated with active genes required for T cell function (30). Goldmit et al (31) have shown that early B lymphoid epigenetic changes generate differential structures that serve as the basis for allelic exclusion. Furthermore, it has been shown that Ikaros expression in mouse pituitary cells is regulated through histone modifications as well as DNA methylation (32).

In this manuscript we have investigated the epigenetic component of Aiolos regulation and show that Aiolos promoter methylation forms the basis of its silencing in cancer cell lines, while Aiolos expression in primary cells is mainly mediated by histone modifications.

RESULTS

A CpG island flanks the human Aiolos promoter

To characterize the molecular mechanisms of Aiolos transcriptional regulation, we have isolated, sequenced and characterized its promoter (33). The main CpG island was detected between -344 bp and the ATG codon by Methprimer software analysis. Figure 1A shows the GC percentage curve obtained with CpG islands in grey. We analyzed, at both, the RNA and protein level, Aiolos expression in different cell lines (Daudi, Jurkat, U937 and 1106mel) as well as in freshly isolated T and B cells, monocytes and melanocytes. Daudi (B cell line) and Jurkat (T cell line) are positive for Aiolos expression at the RNA and protein level although the level of expression was quite different being higher expressed in Daudi cells. U937 (promonocyte) and 1106mel (melanoma) are negative for Aiolos expression in our experimental conditions, at both RNA and protein level as detected by RT-PCR and western blot (Fig 1B). Anti-histone antibody and PBDG were used as internal control. Freshly isolated T and B cells are positive for Aiolos expression at both mRNA and protein level (Fig 1C). Monocytes show a background expression at the mRNA level, but not at the protein level. Finally, melanocytes are negative at both, mRNA and protein level (Fig 1C).

Aiolos expression is increased in Aiolos positive and negative cell lines after treatment with 5-Aza-deoxycytidine and/or trichostatin

To clarify whether DNA methylation and histone acetylation are involved in transcriptional regulation of Aiolos, Daudi, Jurkat, U937 and 1106mel cell lines were treated with 5-Aza-deoxycytidine (5-Aza-dC) and/or trichostatin (TSA). Cells were treated for different periods of time and changes in Aiolos expression were measured by PCR or qPCR. Aiolos mRNA expression was up-regulated upon 24 h of treatment of Daudi cells with 5-Aza-dC reaching the maximal level of expression following 72 h of treatment (Fig 2A). Similarly, Aiolos expression was upregulated in 5-Aza-dC-treated Jurkat cells after 24 h of treatment, reaching the highest level following 144 h of treatment (Fig 2A). In the same way, Aiolos expression was induced in U937 and 1106mel cells upon 48 h of 5-Aza-dC treatment (Fig 2A). This result demonstrates that DNA methylation is sufficient to block Aiolos expression.

Similar results of Aiolos expression upregulation were obtained upon treatment of Daudi and Jurkat cells with TSA for 24 h. Longer treatment of the cells slightly increased the level of Aiolos expression observed after 24 h of treatment (Fig 2A). Treatment of 1106mel with TSA induced Aiolos expression upon 24 h, reaching the maximum level of expression after 144 h of

treatment (Fig 2A). Finally, no Aiolos expression was detected in U937 TSA-treated cells (Fig 2A) suggesting that histone acetylation alone is not able to restore Aiolos expression in this cell line.

After simultaneous treatment with 2 mM of 5-Aza-dC for different periods of time followed by 24 h treatment with 50 nM of TSA, Aiolos expression slightly increased in Daudi cells, compared to non treated cells, reaching a maximum of 1.5 fold induction. On the contrary, the same treatment of Jurkat cells for 24 h showed an additive effect of both drugs, compared to the individual treatment with these reagents: 7.2 fold induction versus 2 and 3.7. Longer treatment did not have additional effect (Fig 2B). Similar treatment of U937 cells showed a synergistic effect of both drugs, which increased as the incubation time is increased (Fig 2B). Finally, treatment of 1106mel cells with 5mM of 5-Aza-dC for different periods of time followed by 24h treatment with 300 mM TSA confirmed the importance of histone acetylation in Aiolos regulation. A 24h treatment with TSA alone induced 12.7 fold Aiolos mRNA expression compared to untreated cells whereas the same 5-Aza-dC treatment had a weak effect. Longer treatment with 5-Aza-dC alone induced a moderate increase of Aiolos expression (4.3 fold) upon 72 h treatment (Fig 2B).

These results demonstrate that inhibition of DNA methylation or histone deacetylation restores Aiolos expression in Daudi, Jurkat, U937 and 1106mel cells. They also clearly suggest that Aiolos is repressed by two distinct mechanisms in U937 and 1106mel cell lines. Indeed, DNA demethylation restores Aiolos expression in U937 cells whereas its expression is restored by either DNA demethylation or histone acetylation in 1106mel cells.

Demethylation of Aiolos promoter CpG island correlates with Aiolos expression in cell lines but not in primary cells

We explored whether methylation patterns of the CpG rich region of the Aiolos promoter are linked to Aiolos expression. We hypothesized that Aiolos non-expressing cells might have an hypermethylated promoter, as a part of the mechanism that silence transcription. In order to test this hypothesis, we examined the methylation status of the CpG island by sodium bisulfite sequencing. This method relies on the fact that cytosines, but not methylcytosines are changed into uracil by sodium bisulfite. The Aiolos promoter fragment (-306 to +36 bp) was amplified by PCR using genomic DNA treated with sodium bisulfite. The PCR products were cloned and 10 clones were sequenced, each sequence representing the methylation profile of an individual DNA molecule. We observed that Daudi and Jurkat cells have demethylated promoters in the ten analyzed clones and demethylation correlates with Aiolos expression

(Fig 3A). On the contrary, Aiolos promoter is densely methylated (98 and 71% respectively) in U937 and 1106mel cell lines (Fig 3A), which correlates with Aiolos silencing. This result confirms our hypothesis that methylation of the promoter region is associated with gene silencing since treatment of the cells with 5-Aza-dC restored Aiolos gene expression.

We further analyzed whether there was also a correlation between CpG promoter methylation and Aiolos expression in freshly isolated T, B, monocytes and melanocytes. Fig 3B shows that in B and T cells, the Aiolos promoter is densely demethylated in eight and nine respectively, out of the ten analyzed clones showing a correlation between DNA demethylation and Aiolos expression. Quite different is the result observed in monocytes and melanocytes, since in this case, the Aiolos promoter is also demethylated but cells do not express Aiolos (Fig 3B).

U937 and 1106mel cells, which do not express Aiolos, were incubated for 8 days with 1 mM 5-Aza-dC and then cloned by limiting dilution. This treatment induced Aiolos expression in both cell lines as shown by PCR (Fig 4A). The fold induction of Aiolos expression in U937 and 1106mel cells was 13 and 17 respectively. The methylation status of the Aiolos promoter in U937 and 1106mel-treated cells was also analyzed (Fig 4B). Sequencing of bisulfite-treated DNA indicated that the 5' Aiolos promoter has lower level of methylation upon 5-Aza-dC treatment compared to the methylation level observed in non-treated cells (Fig 4B). 5-Aza-dC treatment strongly reduces the percentage of DNA methylation from 98% to 60% in U937 cells and from 71% to 40% in 1106mel cells. These results show the influence of Aiolos CpG island methylation in transcriptional silencing of Aiolos gene in cell lines.

***In vitro* methylation of Aiolos promoter prevents its transcriptional activity**

To verify that CpG island methylation is able to modify Aiolos promoter activity, a construct with a luciferase reporter gene under the control of the Aiolos promoter was *in vitro* methylated with the enzyme SssI, which methylates every CpG dinucleotide. The methylated and unmethylated constructs were transfected in Daudi, Jurkat, U937 and 1106mel cell lines, and tested for luciferase activity. Figure 5A shows the control using HpaII methylation sensitive enzyme. Cells transfected with the unmethylated construct displayed luciferase activity (Fig 5B). In contrast, those transfected with the methylated construct showed no luciferase activity. This result confirms the role of CpG island methylation as part of the mechanism that silences transcription.

Histone modification patterns confirm that Aiolos is silenced by two distinct mechanisms in U937 and 1106mel cells

To assess the role of histone modification in the transcriptional repression of Aiolos, as well as its relationship with DNA methylation, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using anti-histone H3 antibodies (H3 di and trimethylated and acetylated). PCR was carried out using primers spanning a 2 kb region upstream and downstream of the translation initiation site (from -1000 to +1500 bp, primers A1 to A6).

Figure 6 shows that in the Daudi cell line, that expresses Aiolos at high levels, with an unmethylated CpG island, the levels of H3K4 di- and tri-methylated histones and the level of H3K9 acetylated histone are very high, showing a significant increase at -461 bp, followed by a decline around the CpG island. On the contrary, the level of the heterochromatin markers H3K9 and H3K27 tri-methylated histones remains insignificant throughout the studied region. In the Jurkat cell line, that shows moderated Aiolos expression and unmethylated DNA, the histone modification pattern is bivalent. Indeed, the level of H3K4 di-methylated histone is high, while the level of H3K4 tri-methylated and H3K9 acetylated H3 histone, is insignificant. The heterochromatin marker tri-methylated H3K9 is negative, whereas tri-methylated H3K27 is positive. The level of di-methylated H3K4 enrichment is inferior to that reached by Daudi, which could explain the different Aiolos-specific mRNA and protein levels between the two cell lines.

Quite different is the case of the Aiolos non-expressing cells U937 and 1106mel which have methylated DNA. In both cases, the euchromatin markers di and tri-methylated H3K4, as well as acetylated H3K9, are negative or barely detectable. The heterochromatin markers tri-methylated H3K9 and H3K27 are enriched in 1106mel cells principally in the CpG island region and are low or very low in U937 cells.

Some studies suggest that CpG methylation-dependent silencing is linked to histone deacetylation (34). To test whether CpG methylation is able to control histone modifications, we treated U937 and 1106mel cell lines with 5-Aza-dC in order to demethylate the promoter (for treatment condition, see Fig 4). Once the demethylation was confirmed by bisulfite sequencing (Fig 4), we analyzed the status of histones. Interesting, demethylation of Aiolos promoter in U937 and 1106mel cell lines restored an euchromatin-associated signature, namely H3K9 di- and tri-methylated and H3K9 acetylated, which corresponds to the pattern of histone modification of an Aiolos-expressing cell line (Fig 7). The heterochromatin markers were not modified (data not shown).

Taken together, these results confirm the existence of two different mechanisms for silencing Aiolos expression in myeloid U937 and the non-hematopoietic 1106mel cells. U937 cells presents neither euchromatin activation nor heterochromatin recruitment (Fig 9). The main mechanism of silencing Aiolos expression involves DNA methylation of the CpG island, as shown by 5-Aza-dC and TSA treatment. Aiolos chromatin is partially inaccessible in 1106mel cells as determined by H3K9 and H3K27 tri-methylation. As shown upon 5-Aza-dC and TSA treatment, DNA methylation seems to be a supplementary silencing mechanism sufficient, but not necessary to repress Aiolos expression (Fig 9).

Aiolos expression is regulated by histone modifications in primary cells

Figure 8 shows that freshly isolated T and B cells, that express Aiolos, show a high enrichment in H3 K4 di- and tri-methylated histones as well as in the acetylation of histone H3K9. There is a difference in the tri-methylated H3K4 enrichment between the two types of cells, which could explain the different level of Aiolos expression. The tri-methylated H3K9 and H3K27 heterochromatin markers are negatives in both cells, indicating an open chromatin structure. Monocytes, as well as melanocytes, which do not express Aiolos, show a significant enrichment in histone markers of heterochromatin, H3K9 and H3K27 tri-methylated while the euchromatin markers are negative. The histone modifications are detected preferentially downstream of the Aiolos promoter in monocytes while they are distributed upstream and downstream of the ATG in T and B cells and melanocytes. These results show a significant heterochromatinization of Aiolos in monocytes and melanocytes and suggest that Aiolos expression in primary cells is mainly controlled by histone modifications rather than DNA methylation. The significant closing of chromatin in monocytes and melanocytes could explain the silencing of the Aiolos gene, making CpG islands methylation unnecessary in monocytes and melanocytes while it is still important in the 1106mel and U937 cell lines (Fig 9). We can not exclude the involvement of other isolated CpG dinucleotides in Aiolos promoter.

DISCUSSION

Aiolos is an essential regulator of lymphoid differentiation and homeostasis. However, nothing is known concerning the molecular mechanism that control its expression. In this manuscript, we analyzed the contribution of epigenetic modifications controlling silencing of Aiolos transcription in two scenarios: cancer cell lines and primary cells. We have found that DNA methylation is required to maintain Aiolos silencing in tumor cell lines (U937 and 1106mel), but not in freshly isolated monocytes and melanocytes, where the silencing mechanism relies on post-translational modifications of histone H3.

We have identified a CpG island located at the Aiolos promoter, which exhibits differential methylation between Aiolos expressing (Daudi and Jurkat) and non-expressing (U937 and 1106mel) cell lines. This suggests that DNA methylation of Aiolos 5' CpG island participates into the maintenance of Aiolos silencing in non-expressing cell lines. We tested this hypothesis *in vitro* and *in vivo*. Treatment with 5-Aza-dC of Aiolos non-expressing U937 and 1106mel cells induced DNA demethylation and Aiolos expression. In addition, withdrawal of the demethylating agent in positive clones derived from the treated cell lines did not re-induce Aiolos silencing, indicating that demethylation of Aiolos 5' CpG island induces its shift to an active epigenetic state that favours long term expression. Finally, transfection of a luciferase reporter gene under the control of the DNA-methylated Aiolos promoter was not able to induce luciferase activity neither in Daudi and Jurkat, nor in U937 and 1106mel. All together, those results demonstrate that DNA methylation of the CpG island is responsible for silencing Aiolos in tumoral cell lines. Our results are compatible with the notion that Aiolos expressing and non-expressing cells have the transcription factors necessary for Aiolos expression, independently of whether or not they express the gene.

A correlation between gene silencing and CpG methylation around the transcription start site has been reported for genes on the inactive X chromosome (35, 36) such as HPRT and PGK1, that contain a CpG rich TATA less promoter. It has been suggested that the methylation of CpG island near the transcription start site inhibits binding of the basal transcription machinery on these genes and therefore repress their expression. This mechanism has been observed in the regulation of E2F activity, where methylation of E2F binding site inhibits binding of E2F1 and changes the promoter response (37). This does not exclude that methylation of CpG sites located further from the transcription initiation site might contribute to the silencing of Aiolos (38, 39). The spread of methylation into the region around the transcription start site is thus critical for the silencing of the gene which suggests that

alteration of cis or trans-acting factors, that normally protect this region, may be key to its methylation (40).

Having shown that DNA methylation silences Aiolos in U937 and 1106mel, we addressed whether this epigenetic mechanism is also responsible for Aiolos silencing in primary cells. We analyzed DNA methylation patterns of the Aiolos 5' CpG island in Aiolos expressing (T and B cells) and non-expressing (monocytes and melanocytes) freshly isolated cells. In contrast to our expectation, we did not find any significant methylation of Aiolos promoter region in non of the primary cells. This indicates that DNA methylation is not required to silence Aiolos in primary cells and suggests that additional regulation (histone modifications) is required to control Aiolos expression. In the same direction, absence of DNA methylation has been associated with transcriptionally inactive genes such as alpha-globin and collagen (41, 42).

In addition to DNA methylation of CpG islands, modification of the N-terminal tail of histones play crucial role in chromatin organization and function. Epigenetic regulation of gene expression is mediated, in part, by posttranscriptional modifications of histone proteins, that in turn modulate chromatin structure (43, 44). The core histones are subject to several different modifications, including acetylation, methylation and phosphorylation. Histones H3 K4 (lysine 4) and K27 (lysine 27) methylation are of particular interest since lysine 4 methylation positively regulates transcription by recruiting nucleosome remodelling enzymes and histone acetylases (45-48) while lysine 27 methylation negatively regulates transcription by promoting a compact chromatin structure (49, 50).

We asked whether a particular set of histone modification marks the Aiolos 5' region in the cellular models used in this study. We have established by chromatin immunoprecipitation the pattern of the euchromatin-associated marks, H3K4 di- and tri-methylation and H3K9 acetylation and of the heterochromatin-associated marks H3K9 and H3K27 tri-methylation across the Aiolos 5' region. In Aiolos expressing cells, either tumoral cell lines (Daudi, Jurkat) or freshly isolated T and B cells, high level of the euchromatin-associated marks were observed across the Aiolos 5' region. In particular, Daudi, T and B cells, but not Jurkat cells displayed high level of the three tested marks. The pattern of euchromatin marks was perfectly correlated with that of heterochromatin marks, since in Daudi, T and B cells neither H3K9 nor H3K27 were tri-methylated along the analyzed region. This clearly shows that Aiolos expressing cells, which contain an unmethylated promoter, display a fully euchromatic structure around Aiolos 5' region. Interestingly, in Jurkat cells, where only H3K4 di-methylation marks the promoter region, consistent level of the H3K27 tri-methylated mark

were detected. This structure is reminiscent of that described in genes moderately expressed in undifferentiated ES cells that are poised for activation or differentiation. Studies in primary fibroblast revealed several genomic sites associated with lysine 4 methylation (51, 52), however little is known about the genomic distribution of repressive marker lysine 27 methylation (53-55). This novel chromatin modification pattern named bivalent chromatin, consists of large regions of lysine 27 methylation harbouring smaller regions of Lys 4 methylation. These regions thus harbour both repressive and activating chromatin modifications. We do not know whether the observed bivalent domain in Jurkat cells reflects the simultaneous presence of both Lys4 and Lys 27 methylation or perhaps two subpopulations with distinct characteristics, or one population alternating between two states. It has been previously described that bivalent domains are associated with low levels of gene expression (56), which is consistent with Aiolos expression observed in Jurkat cells, that express lower level of Aiolos than Daudi cells. In addition, it is known that the presence of Lys 4 methylation is associated with high gene transcription when it occurs in the absence of Lys 27 methylation, but with low gene transcription when it occurs together with Lys 27 methylation (56). Our results observed in Daudi and Jurkat cells agree with this observation. It has also been suggested that bivalent chromatin is characteristic of pluripotent cells, silencing developmental genes while keeping them poised for induction upon initiation of specific developmental pathways. The presence or absence of bivalent domains may provide valuable markers of cell identity and differentiation potential, both in normal and pathological cases.

More importantly, in Aiolos non expressing cell, we found no enrichment for the euchromatin marks neither in U937 and 1106mel nor in monocytes and melanocytes. This result confirm the relationship between gene silencing and absence of euchromatin marks over the promoter. The lack of euchromatin marks was accompanied by the enrichment in heterochromatin marks in 1106mel cell line but not in U937. This indicates that DNA methylation and not histone modifications is the common mechanism to induce lost of transcriptional activity of the Aiolos promoter in tumoral cell lines. In contrast, in Aiolos non-expressing primary cells, such as melanocytes and monocytes, where the methylation of the Aiolos CpG island is absent, both H3K9 and H3K27 tri-methylated were highly enriched over the Aiolos 5' region. This highlights methylation of H3K9 and H3K27 as a fundamental mechanism of Aiolos repression in primary cells without requirement of DNA methylation.

The recover of Aiolos expression in U937 and 1106mel cell lines upon 5-Aza-dC treatment, as well as the euchromatin-associated signature (H3K4 di- and tri-methylated and H3K9

acetylated), suggests a connection between DNA methylation and histones modification. DNA methylation silences expression of multiple tumor suppressor genes by inducing repressive chromatin structures mediated by binding of methyl-CpG binding proteins to methylated DNA, all associated with histone deacetylase activity and chromatin remodeling factors. Treatment with DNA demethylating drugs reactivates the expression of silenced genes by alleviating methylation-mediated repression.

Treatment of the cells with inhibitors of histone deacetylases results in accumulation of hyperacetylated histones and activation of repressed genes. Hypoacetylated, methylated promoters of chromosomal origin are not, usually turned on after treatment with methyl transferase and histone deacetylase inhibitors alone (57-59). Interesting, some methylated promoters e.g. MLH1, TIMP3, INKN2A, INKN2B, ER and MDR1 can be activated with TSA after partial demethylation with 5-Aza-dC (27). The mechanism of the synergistic effect of these two inhibitors on the expression of the methylated genes has not been explored (58).

It has been reported that TSA treatment can affect DNA methylation state (60, 61). Another potential mechanism by which TSA plus 5-Aza-dC function synergistically may be through the activation of a key transcription factor that regulates Aiolos expression. Alternatively, TSA treatment may alter posttranscriptional modifications, facilitating increased association with the Aiolos promoter. Inhibition of histone deacetylase activity by TSA alone restored Aiolos expression in the methylated 1106mel cell line. Demethylation of Aiolos promoter in these cells has only minor effects compared to acetylation. This result indicates that in 1106mel cells stable repression of Aiolos promoter is mainly mediated by histone deacetylation-dependent mechanism. Similar results have been obtained with cyclin A1 in HeLa cells . It has been recently shown that histone modification, as well as DNA methylation, are important elements in the modulation of Ikaros gene expression in pituitary tumour cells (32).

Our results suggest that fundamentally different mechanisms trigger Aiolos repression in tumor cell lines and hematopoietic primary cells. In the first case, DNA methylation seems to be an important epigenetic modification controlling Aiolos expression and chromatin modifications while in hematopoietic primary cells, histone modifications are the main epigenetic modification involved in the control of Aiolos expression. Taken together, our data highlight the critical role of epigenetic mechanisms, as a part of Aiolos silencing.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture

Daudi (human Burkitt's lymphoma), Jurkat (human T lymphocyte acute leukemia), U937 (human histiocytic lymphoma) and 1106mel (melanoma) cell lines were used in this study. Daudi, Jurkat and U937 were cultured in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum and 2 mM glutamine. 1106mel cell line was cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum, 2 mM glutamine, non-essential amino acids and 1 mM sodium pyruvate.

Isolation of haematopoietic and non-haematopoietic primary cells

Human melanocytes were obtained from skin samples of normal adults undergoing plastic surgery or children's foreskin obtained at circumcision. Fresh skin samples were cut into 2mm x 2mm pieces and incubated in a solution of trypsin (0,25%)-EDTA (0.1M) overnight at 4°C. Trypsin induces dissociation of epidermis from the basal layer. After neutralization with FCS, cells from the basal layer were scrapped, centrifuged at 1,200 rpm and seeded at 100,000 cells/ cm² in M2 medium (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany). Fresh medium was added three times per week. After one week of culture, melanocytes were separated from contaminating keratinocytes by tripsinization.

Blood was obtained from the Etablissement Français du Sang. After Ficoll-Hypaque mononuclear cell separation, we isolated monocytes, T and B cells using positive selection by anti-CD14, anti-CD3 or anti-CD19 Dynal (Oslo, Norway) magnetic beads respectively, according to manufacturer's instructions. One part of each lineage was centrifuged and stored at -80°C before being processed for genomic DNA or protein isolation. The rest of the cells were lysed in RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at -80°C before RNA extraction. For ChIP experiments, monocytes, B and T cells were isolated using Dynal negative isolation kits and chromatin was prepared as described below.

Treatment with chromatin-remodeling drugs and cloning of the treated cell lines

Daudi, Jurkat and U937 cells, at a density of 0.5×10^6 /ml were treated with 2 μ M 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or 50 nM Trichostatin A (TSA, Sigma-Aldrich) every 48h for different periods of time. 1106mel cells were treated with 5 μ M 5-Aza-dC or 300 nM TSA. Cells were washed before RNA, DNA and protein extraction.

For U937 and 1106mel cloning, cells were washed after eight days of culture with 1 μ M 5-Aza-dC, diluted at 10 cells/ml, and 100 μ l aliquots of these suspensions were plated in 96-well plates. Cells were then incubated in fresh, drug-free medium, amplified and RNA was extracted between days 35 and 52 after 5-Aza-dC removal. Clones were then tested for Aiolos expression by RT-(q)PCR. The remaining cells were stored at -80°C before being processed for genomic DNA or protein isolation.

RT-PCR and RT-qPCR analysis

Total RNA extraction was done using Qiagen RNeasy® kit according to manufacturers' instructions. Then we synthesized oligo(dT)-primed first strand cDNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Aiolos PCR amplifications were done under the following conditions: 94°C for 2 min, followed by 28 to 35 cycles of 94°C for 30s, 60°C for 1 min and 72°C for 30 sec and completed by 72°C for 7 min. Primer sequences were as follow: Aiolos forward, 5'-GGCAGCGACATGGAAG-3', Aiolos reverse, 5'-TAGCTGATGGCGTTATTGATGG-3'. We used PBGD or Abelson as internal control with the following primer sequences: PBGD forward, 5'-CTGGTAACGGCAATGCGGCT-3', PBGD reverse, 5'-GCAGATGGCTCCGATGGTGA-3'; Abelson forward, 5'-AGTCCAGCTCTACTACCTACGTTTG-3', Abelson reverse, 5'-GAGCAGGAACTCCACAGATAAAA-3'. The RT-PCR products were resolved by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

Quantitative PCR was carried out on an ABI PRISM 7300 detection system. We used pre-developed TaqMan gene expression assays (Applied biosystems, Cheshire, UK) for quantitative detection of human Aiolos (Hs00232635_m1) and the absolute qPCR Rox mix (Abgene, Epsom, UK) according to the manufacturers' instructions. Data from triplicates are expressed as normalized expression by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculation method and the HPRT reference gene (Hs99999909_m1).

Sodium bisulfite treatment and sequencing

Genomic DNA was prepared using Qiagen DNeasy Kit according to manufacturers' instructions. Samples (500ng) were then treated with sodium bisulfite using MethylDetector™ bisulfite modification kit (Active Motif, Carlsbad, CA). 4 μ l of modified DNA were used for nested PCR amplification under the following conditions: 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30s, 55°C for 90s and 72°C for 1 min and completed by

72°C for 7 min. The primer sequences were as follow: forward, 5'-TTTTTTTAAAATAGATATTTTGAGATAATT-3' and reverse, 5'-AACTAAAAACTCACCTTCCATATC-3'. The nested PCR was realized as above using 2 µl of the first PCR and 25 cycles of amplification. PCR products were gel-purified, cloned using TOPO TA cloning® kit (Invitrogen) and transformed into TOP10 cells. Plasmid DNA obtained from ten single colonies was then sequenced with BigDye® terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems).

Chromatin immunoprecipitation

ChIP assays were carried out essentially as described (62). H3 tri-meK4 (Abcam, Cambridge, UK), H3 di-meK4, tri-meK9, tri-meK27 and acK9 (Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA) antibodies were used for immunoprecipitation of the chromatin. Irrelevant HA Abs (Santa Cruz) were used as a control. The immunoprecipitated (IP) DNA and a 1/100 dilution of the input DNA were analyzed by real-time PCR using SYBR Green Universal Mix and an ABI Prism 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems). Each PCR was run in duplicate to control for PCR variation. The specific primer set matches the CpG island, as well as upstream and downstream of the CpG island. Sequences are as follows: A1 forward, 5'-TGGTCACTTCCCCTTTCCTCT-3', A1 reverse, 5'-TCCCAACACCCTCCCTACTG-3' ; A2 forward, 5'-CAGTTCCCAGAGGGAAAACAAA-3', A2 reverse, 5'-TTGGTCCAAGTTTTTCAGACAGTTG-3'; A3 forward, 5'-GACAAAAAGTTCCAGATCTTCCTCA-3', A3 reverse, 5'-GTCAGCCTTGCTTTCTTGGC-3'; A4 forward, 5'-GAGAGGCCGAGTAGCCACAG-3', A4 reverse, 5'-TTGCACAGGTTAAGTTTCTCAAAGA-3'; A5 forward, 5'-TTGGCATTGTCAGTTCCTT-3', A5 reverse, 5'-AACCTGATTTTTTGCGCTGG-3'; A6 forward, 5'-TGGGCTGTTGTATACTATGGGAAA-3', A6 reverse, 5'-CGGCTAGGAAAAATAGTGTGGA-3'. To standardize between experiments, we calculated the percentage of immunoprecipitation by dividing the average value of the IP by the average value of the corresponding input, both values first being normalized for dilution factors.

Western blot analysis

Cells were lysed in RIPA sample buffer, and protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, blocked with 5% of non-fat dry milk in TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% tween 20) and incubated with primary antibody in TBS-0.5% non-fat dry milk. Membrane was washed in TBST and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody. Protein detection was performed using the ECL system.

The following antibodies were used according to standard protocols: anti-Histones Abs (Chemicon), PO-conjugated secondary Abs (DAKO, Glostrup, Denmark). Anti-Aiolos Abs were generated in our lab as previously described (15).

In vitro methylation

A 370 pb fragment spanning the complete human Aiolos promoter CpG island was obtained by PCR using genomic DNA from peripheral blood mononuclear cells as template. The primers used were as follow: 370-forward, 5'-CCTCCGTGTGATGTCACTTTTCTC-3' and Aio(AT*G)-reverse, 5'-CTGGAGGCTCACCTTCCTTGTC-3'. The resulting fragment was first cloned into the pCRII-Topo vector using the TOPO-TA cloning kit (Invitrogen) and then transferred into the pGL3-basic reporter vector, containing the luciferase reporter gene (Promega, Madison, WI) (33). A total of 50 µg of plasmid DNA were treated in 1 ml with S-adenosylmethionine (160 µM) and SssI methylase (1U/µg, New England Biolabs, Ipswich, MA), which methylates every CpG site. Complete methylation was verified by digestion with the methylation-sensitive restriction enzyme HpaII (New England Biolabs).

Transient transfection and luciferase assay

A total of 2×10^6 Jurkat, 1×10^6 U937 and Daudi or 5×10^4 1106mel were transiently cotransfected with 1 µg pGL3-370 Aiolos promoter (methylated or not) and 50 ng pRL-CMV vector, containing the renillase reporter gene as an internal control (Promega). We used the following transfection methods: Jurkat and U937 with cell line Nucleofactor™ V from Amaxa (Gaithersburg, MD), Daudi with DEAE-dextran and 1106mel with JetPEI™ (Polyplus transfection, San Marcos, CA).

After transfection (24 h), cells were washed with PBS and lysed by 45 min incubation in 50 to 100 µl of passive lysis buffer. Cell lysates (20 µl) were added to 50 µl of luciferase assay reagent II and the resulting luciferase activity was measured using a Berthold L99501 luminometer. Subsequently, 50 µl of stop reagent were added to each sample and the renilla luciferase activity was measured. Luminescence values were normalized by calculating the ratio of firefly/renilla, expressed as relative luminescence units.

Statistical analysis

We used Prism4.0c (GraphPad Software, San Diego, CA) for statistical analysis. Unpaired t tests with Welch's correction were realized and statistical significance was set at $p < 0.05$ with the following degrees: * $0.01 < p \leq 0.05$, ** $0.001 < p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$.

AKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Inserm AVENIR Fund. MD is supported by a pre-doctoral fellowship from La Ligue Contre Le Cancer. Thanks are given to Dr Gordon Langsley for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Glimcher, L.H., and H. Singh. 1999. Transcription factors in lymphocyte development--T and B cells get together. *Cell* 96:13-23.
2. Matthias, P., and A.G. Rolink. 2005. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* 5:497-508.
3. Hahm, K., B.S. Cobb, A.S. McCarty, K.E. Brown, C.A. Klug, R. Lee, K. Akashi, I.L. Weissman, A.G. Fisher, and S.T. Smale. 1998. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* 12:782-796.
4. Georgopoulos, K., D.D. Moore, and B. Derfler. 1992. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 258:808-812.
5. Hahm, K., P. Ernst, K. Lo, G.S. Kim, C. Turck, and S.T. Smale. 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.
6. Molnar, A., and K. Georgopoulos. 1994. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 14:8292-8303.
7. Morgan, B., L. Sun, N. Avitahl, K. Andrikopoulos, T. Ikeda, E. Gonzales, P. Wu, S. Neben, and K. Georgopoulos. 1997. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *Embo J* 16:2004-2013.
8. Kelley, C.M., T. Ikeda, J. Koipally, N. Avitahl, L. Wu, K. Georgopoulos, and B.A. Morgan. 1998. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol* 8:508-515.
9. Rebollo, A., and C. Schmitt. 2003. Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol Cell Biol* 81:171-175.
10. Winandy, S., P. Wu, and K. Georgopoulos. 1995. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* 83:289-299.
11. Wang, J.H., A. Nichogiannopoulou, L. Wu, L. Sun, A.H. Sharpe, M. Bigby, and K. Georgopoulos. 1996. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 5:537-549.
12. Wang, J.H., N. Avitahl, A. Cariappa, C. Friedrich, T. Ikeda, A. Renold, K. Andrikopoulos, L. Liang, S. Pillai, B.A. Morgan, and K. Georgopoulos. 1998. Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity* 9:543-553.
13. Nakase, K., F. Ishimaru, K. Fujii, T. Tabayashi, T. Kozuka, N. Sezaki, Y. Matsuo, and M. Harada. 2002. Overexpression of novel short isoforms of Helios in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol* 30:313-317.

14. Liippo, J., K.P. Nera, E. Veistinen, A. Lahdesmaki, V. Postila, E. Kimby, P. Riikonen, L. Hammarstrom, J. Pelkonen, and O. Lassila. 2001. Both normal and leukemic B lymphocytes express multiple isoforms of the human Aiolos gene. *Eur J Immunol* 31:3469-3474.
15. Romero, F., A.C. Martinez, J. Camonis, and A. Rebollo. 1999. Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization. *Embo J* 18:3419-3430.
16. Kingston, R.E., and G.J. Narlikar. 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13:2339-2352.
17. Vignali, M., A.H. Hassan, K.E. Neely, and J.L. Workman. 2000. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 20:1899-1910.
18. Wu, J., and M. Grunstein. 2000. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* 25:619-623.
19. Kornberg, R.D., and Y. Lorch. 1999. Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr Opin Genet Dev* 9:148-151.
20. Lee, D.Y., J.J. Hayes, D. Pruss, and A.P. Wolffe. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72:73-84.
21. Vettese-Dadey, M., P.A. Grant, T.R. Hebbes, C. Crane-Robinson, C.D. Allis, and J.L. Workman. 1996. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *Embo J* 15:2508-2518.
22. Kass, S.U., D. Pruss, and A.P. Wolffe. 1997. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 13:444-449.
23. Cross, S.H., and A.P. Bird. 1995. CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev* 5:309-314.
24. Jones, P.A. 1996. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 56:2463-2467.
25. Chen, Z.J., and C.S. Pikaard. 1997. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes Dev* 11:2124-2136.
26. Zhu, W.G., and G.A. Otterson. 2003. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 3:187-199.
27. Cameron, E.E., K.E. Bachman, S. Myohanen, J.G. Herman, and S.B. Baylin. 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21:103-107.
28. Kioussi, C., P. Briata, S.H. Baek, D.W. Rose, N.S. Hamblet, T. Herman, K.A. Ohgi, C. Lin, A. Gleiberman, J. Wang, V. Brault, P. Ruiz-Lozano, H.D. Nguyen, R. Kemler, C.K. Glass, A. Wynshaw-Boris, and M.G. Rosenfeld. 2002. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* 111:673-685.

29. Kioussis, D., and W. Ellmeier. 2002. Chromatin and CD4, CD8A and CD8B gene expression during thymic differentiation. *Nat Rev Immunol* 2:909-919.
30. Roh, T.Y., S. Cuddapah, K. Cui, and K. Zhao. 2006. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15782-15787.
31. Goldmit, M., Y. Ji, J. Skok, E. Roldan, S. Jung, H. Cedar, and Y. Bergman. 2005. Epigenetic ontogeny of the I κ g locus during B cell development. *Nat Immunol* 6:198-203.
32. Zhu, X., S.L. Asa, and S. Ezzat. 2007. Ikaros is Regulated Through Multiple Histone Modifications and DNA Methylation in the Pituitary. *Mol Endocrinol*
33. Ghadiri, A., M. Duhamel, A. Fleischer, A. Reimann, F. Dessauge, and A. Rebollo. 2007. Critical function of Ikaros in controlling Aiolos gene expression. *FEBS Lett*
34. Bird, A.P., and A.P. Wolffe. 1999. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99:451-454.
35. Park, J.G., and V.M. Chapman. 1994. CpG island promoter region methylation patterns of the inactive-X-chromosome hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt) gene. *Mol Cell Biol* 14:7975-7983.
36. Pfeifer, G.P., S.D. Steigerwald, R.S. Hansen, S.M. Gartler, and A.D. Riggs. 1990. Polymerase chain reaction-aided genomic sequencing of an X chromosome-linked CpG island: methylation patterns suggest clonal inheritance, CpG site autonomy, and an explanation of activity state stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8252-8256.
37. Campanero, M.R., M.I. Armstrong, and E.K. Flemington. 2000. CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6481-6486.
38. Kass, S.U., N. Landsberger, and A.P. Wolffe. 1997. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 7:157-165.
39. Kirillov, A., B. Kistler, R. Mostoslavsky, H. Cedar, T. Wirth, and Y. Bergman. 1996. A role for nuclear NF-kappaB in B-cell-specific demethylation of the I κ g locus. *Nat Genet* 13:435-441.
40. Mummaneni, P., P. Yates, J. Simpson, J. Rose, and M.S. Turker. 1998. The primary function of a redundant Sp1 binding site in the mouse aprt gene promoter is to block epigenetic gene inactivation. *Nucleic Acids Res* 26:5163-5169.
41. McKeon, C., H. Ohkubo, I. Pastan, and B. de Crombrughe. 1982. Unusual methylation pattern of the alpha 2 (I) collagen gene. *Cell* 29:203-210.
42. Bird, A.P., M.H. Taggart, R.D. Nicholls, and D.R. Higgs. 1987. Non-methylated CpG-rich islands at the human alpha-globin locus: implications for evolution of the alpha-globin pseudogene. *Embo J* 6:999-1004.
43. Jenuwein, T., and C.D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.
44. Margueron, R., P. Trojer, and D. Reinberg. 2005. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 15:163-176.

45. Santos-Rosa, H., R. Schneider, B.E. Bernstein, N. Karabetsov, A. Morillon, C. Weise, S.L. Schreiber, J. Mellor, and T. Kouzarides. 2003. Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol Cell* 12:1325-1332.
46. Pray-Grant, M.G., J.A. Daniel, D. Schieltz, J.R. Yates, 3rd, and P.A. Grant. 2005. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 433:434-438.
47. Sims, R.J., 3rd, C.F. Chen, H. Santos-Rosa, T. Kouzarides, S.S. Patel, and D. Reinberg. 2005. Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem* 280:41789-41792.
48. Wysocka, J., T. Swigut, T.A. Milne, Y. Dou, X. Zhang, A.L. Burlingame, R.G. Roeder, A.H. Brivanlou, and C.D. Allis. 2005. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121:859-872.
49. Francis, N.J., R.E. Kingston, and C.L. Woodcock. 2004. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 306:1574-1577.
50. Ringrose, L., H. Ehret, and R. Paro. 2004. Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Mol Cell* 16:641-653.
51. Bernstein, B.E., M. Kamal, K. Lindblad-Toh, S. Bekiranov, D.K. Bailey, D.J. Huebert, S. McMahon, E.K. Karlsson, E.J. Kulbokas, 3rd, T.R. Gingeras, S.L. Schreiber, and E.S. Lander. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120:169-181.
52. Kim, T.H., L.O. Barrera, M. Zheng, C. Qu, M.A. Singer, T.A. Richmond, Y. Wu, R.D. Green, and B. Ren. 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436:876-880.
53. Cao, R., and Y. Zhang. 2004. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 15:57-67.
54. Kirmizis, A., S.M. Bartley, A. Kuzmichev, R. Margueron, D. Reinberg, R. Green, and P.J. Farnham. 2004. Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev* 18:1592-1605.
55. Koyanagi, M., A. Baguet, J. Martens, R. Margueron, T. Jenuwein, and M. Bix. 2005. EZH2 and histone 3 trimethyl lysine 27 associated with Il4 and Il13 gene silencing in Th1 cells. *J Biol Chem* 280:31470-31477.
56. Bernstein, B.E., T.S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D.J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S.L. Schreiber, and E.S. Lander. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125:315-326.
57. Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6-21.

58. El-Osta, A., P. Kantharidis, J.R. Zalcberg, and A.P. Wolffe. 2002. Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol Cell Biol* 22:1844-1857.
59. Wade, P.A. 2001. Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* 20:3166-3173.
60. Milutinovic, S., Q. Zhuang, and M. Szyf. 2002. Proliferating cell nuclear antigen associates with histone deacetylase activity, integrating DNA replication and chromatin modification. *J Biol Chem* 277:20974-20978.
61. Selker, E.U. 1998. Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9430-9435.
62. Navarro, P., D.R. Page, P. Avner, and C. Rougeulle. 2006. Tsix-mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program. *Genes Dev* 20:2787-2792.

LEGEND TO THE FIGURES

Figure 1. Aiolos gene CG profil and expression in primary cells and cell lines.

A) The 5' flanking region of the Aiolos gene contains a 342 bp CpG island, including the exon 1 (rectangle) and the transcription initiation site (arrow). The CG percentage curve obtained by Meth Primer analysis is shown. B) Four different cell lines, representative of lymphoid and non lymphoid (Daudi; D, Jurkat; J, U937; U and 1106mel; M) cells were analyzed for Aiolos expression at the RNA level by RT-PCR and at the protein level by western blot. Anti-histone antibody and PBGD were used as internal control. Molecular weight of the proteins and size of the PCR inserts are shown. C) Freshly isolated T and B cells, monocytes and melanocytes were analyzed as in B) for Aiolos expression.

Figure 2. Analysis of Aiolos expression in cell lines treated with 5-Aza-dC and/or TSA.

A) Daudi (D), Jurkat (J) and U937 (U) were either untreated or treated with 2 μ M of 5-Aza-dC or 50 nM of TSA. 1106mel (M) cells were treated with 5 μ M 5-Aza-dC or 300 nM TSA. Aiolos mRNA was detected by PCR with 28 (Daudi), 32 (Jurkat) and 35 (U937 and 1106mel) cycles of amplification. Kinase abelson was used as internal control. B) Cells were treated for different periods of time with 5-Aza-dC followed by 24 h treatment with TSA and then Aiolos expression was estimated by RT q-PCR. HPRT was used as internal control of q-PCR. Data from triplicates are expressed as fold induction of treated cells compared to untreated ones.

Figure 3. Methylation status of Aiolos in cell lines and primary cells.

A) Genomic DNA isolated from primary cells and cell lines was treated with sodium bisulfite to convert unmethylated cytosines to uracils. The Aiolos CpG island was then amplified by PCR, cloned and sequenced. For each cell line (Daudi, Jurkat, U937 and 1106mel) or primary cell B) (T, B, monocyte and melanocyte), the methylation pattern of ten clones is shown. Black circles correspond to methylated cytosines, empty circles correspond to unmethylated cytosines. For each cell type, the percentage of methylation as well as the Aiolos expression is shown.

Figure 4. Methylation status of Aiolos in cell lines treated with 5-Aza-dC.

A) Cell lines U937 and 1106mel were treated with 1 μ M 5-Aza-dC for eight days and then cloned by limiting dilution. Clones were analyzed for Aiolos expression by RT-PCR, RT-qPCR and western blott. B) Cell lines U937 and 1106mel were treated as above and the methylation pattern of ten clones was analyzed using the sodium bisulfite DNA procedure. Black circles corresponds to methylated cytosines and white circles to unmethylated cytosines. The percentage of DNA methylation, as well as Aiolos expression is also shown.

Figure 5. Lack of Aiolos expression after *in vitro* methylation.

A) A construct containing the CpG island (-360 to + 36bp) of Aiolos promoter fused to a luciferase reporter gene was methylated with SssI. Methylation was verified by digestion with the methylation sensitive restriction enzyme HpaII. B) Daudi, Jurkat, U937 and 1106mel cells were transiently transfected with the above construct, either methylated or unmethylated. Transcription directed by the Aiolos promoter was detected by measuring the luciferase activity in the transfectants and normalized to renillase reporter gene activity. The experiment was repeated at least five times. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$ with the following degrees: * $0.01 < p \leq 0.05$, ** $0.001 < p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Figure 6. Chromatin immunoprecipitation of histone modifications in cell lines.

A) Schematic representation of the position of the primer pairs used to analyze chromatin remodelling within Aiolos promoter. B) Analysis of di- and tri-methylation H3K4 histone, H3K9 acetylation and H3K9 and H3K27 tri-methylation in Daudi, Jurkat, U937 and 1106mel cells. For each pannel, the average percent of immunoprecipitation calculated for each position is plotted against genomic localization with respect to Aiolos transcription initiation site.

Figure 7. Chromatin immunoprecipitation of histone modifications in 5-Aza-dC-treated cells.

Analysis of histone H3K4 di- and tri-methylation and H3K9 acetylation in U937 and 1106mel cells treated with 5-Aza-dC. Results were analyzed as above. NT; non treated cells. The corresponding methylated profiles are shown in figure 4.

Figure 8. Chromatin immunoprecipitation of histone modifications in primary cells.

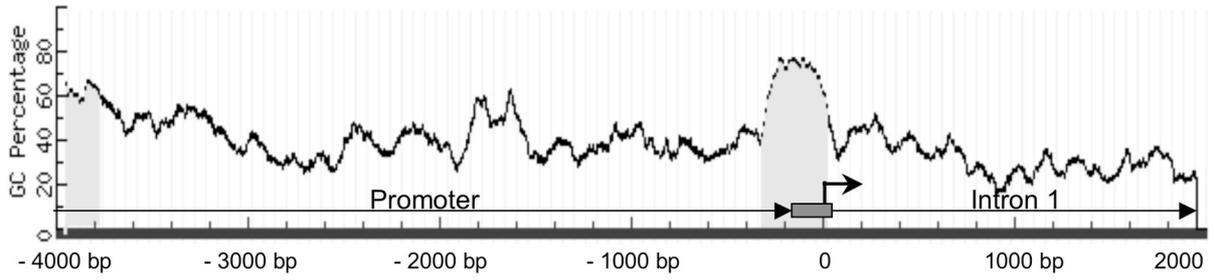
A) Schematic representation of the position of the primer pairs used to analyze chromatin remodelling within Aiolos promoter. B) Analysis of histone H3K4 di- and tri-methylation,

H3K9 acetylation and H3K9 and H3K27 tri-methylation in primary cells; T and B cells, monocytes and melanocytes. Results were analyzed as above.

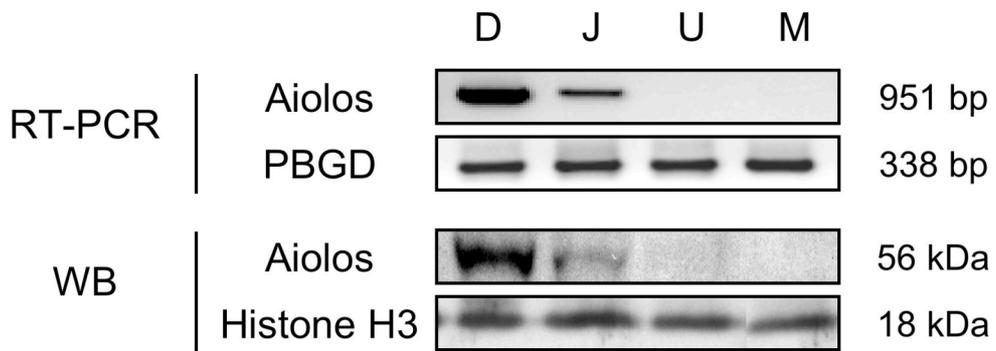
Figure 9. Model of the putative genetic silencing mechanisms involved in regulation of Aiolos transcription.

Black circles correspond to methylated cytosine, empty circles to unmethylated cytosines. Activation markers of euchromatin are in green whereas heterochromatin markers are in red. Aiolos mRNA levels associated to each cell are also shown.

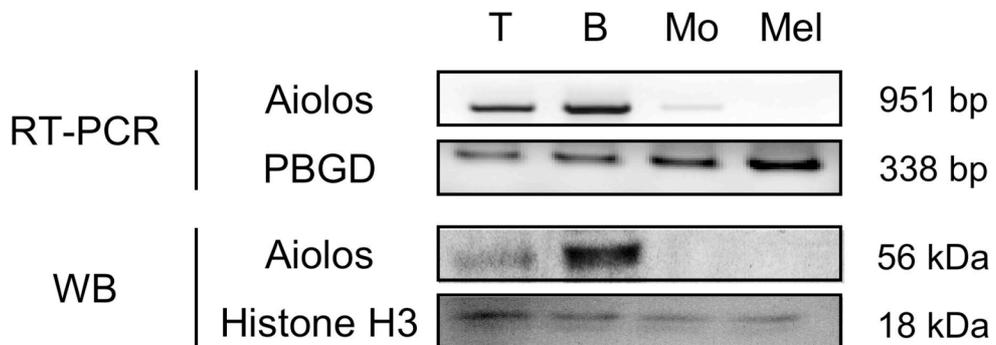
A



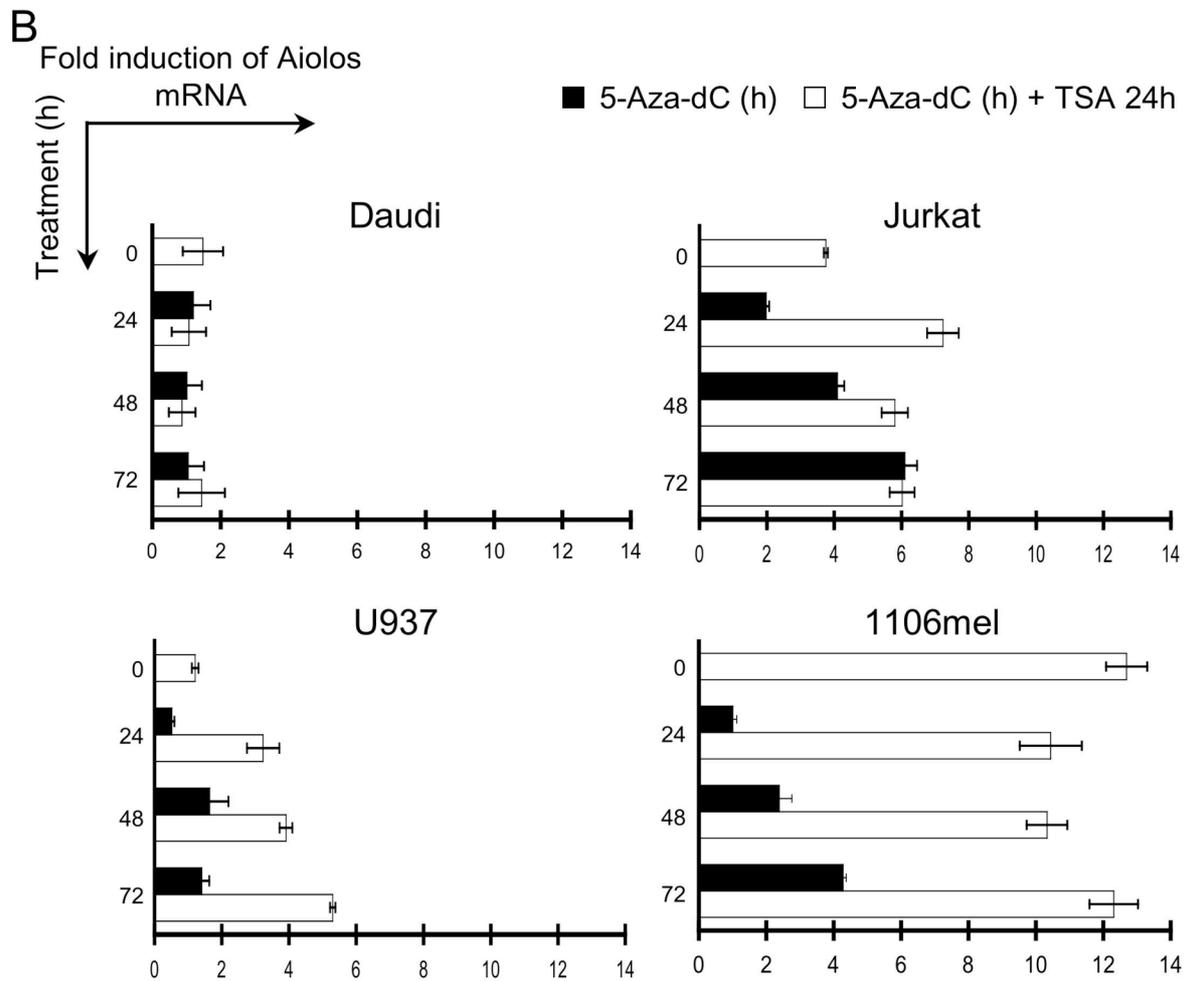
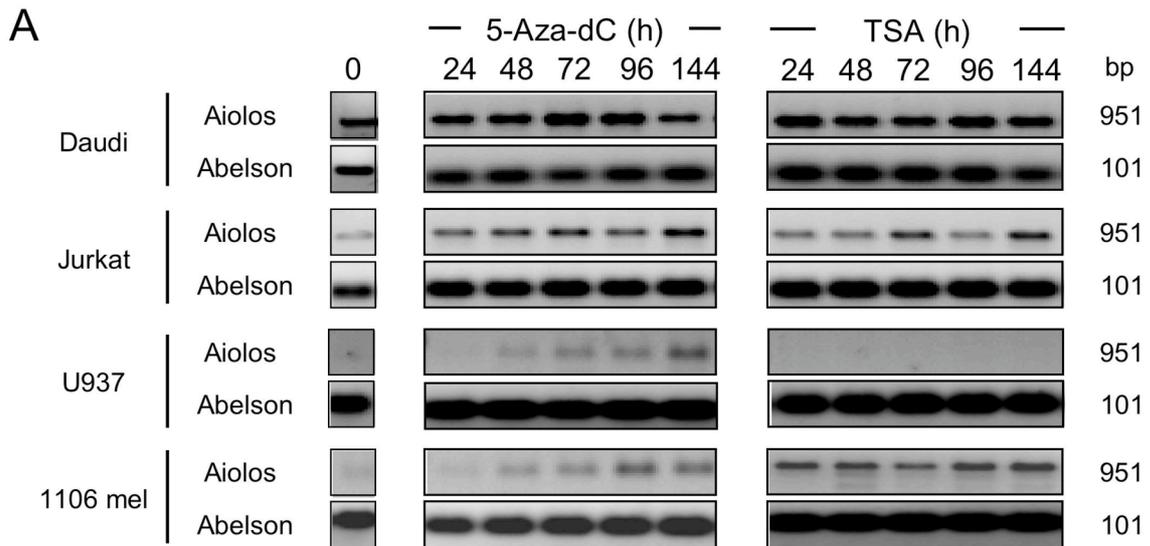
B



C

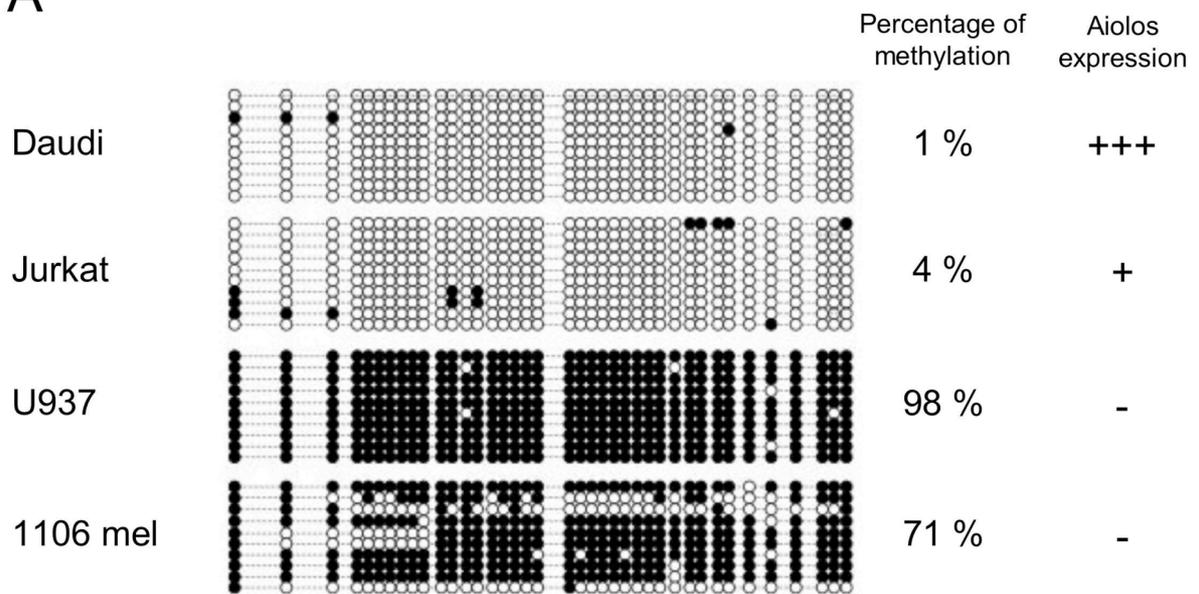


Duhamel et al., 2007, Figure 1

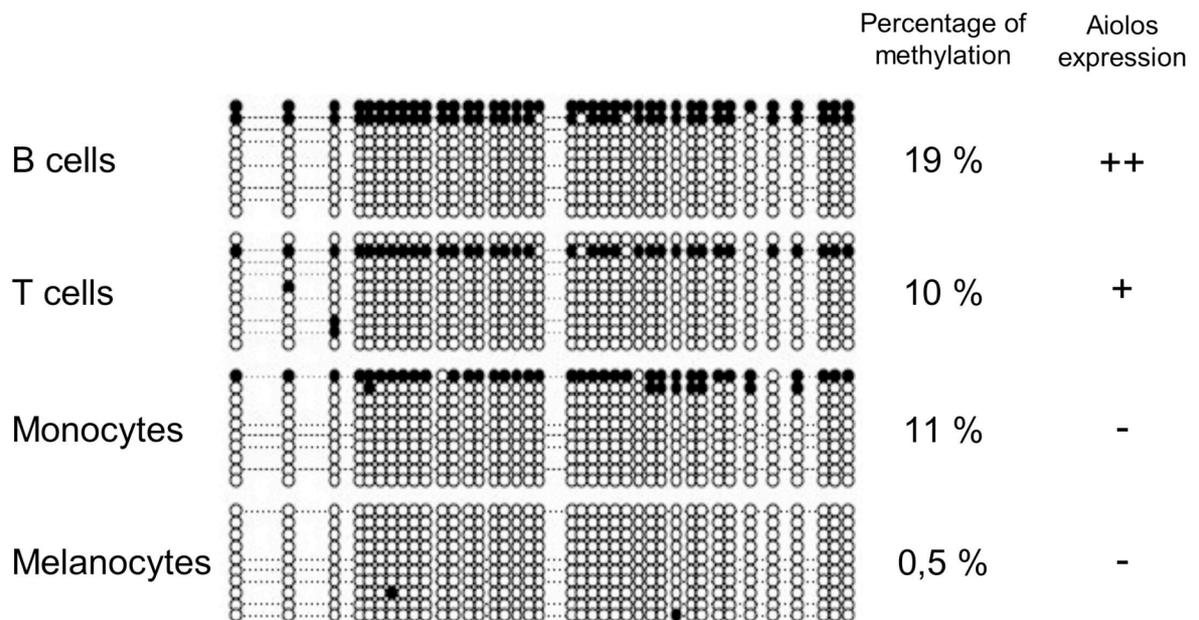


Duhamel et al., 2007, Figure 2

A

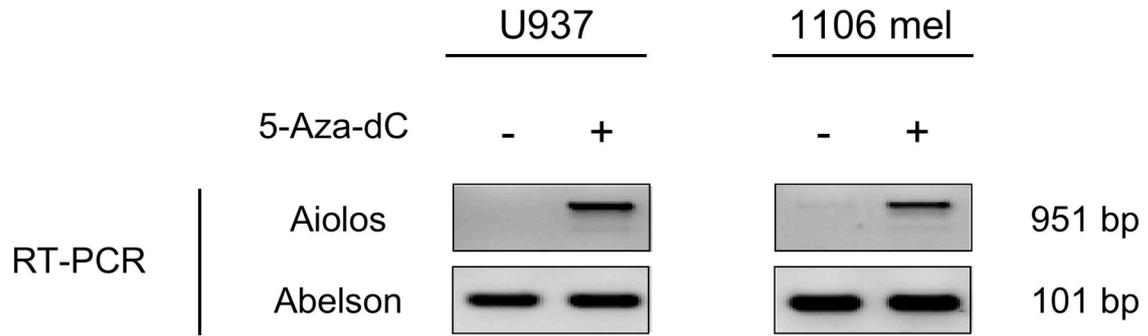


B

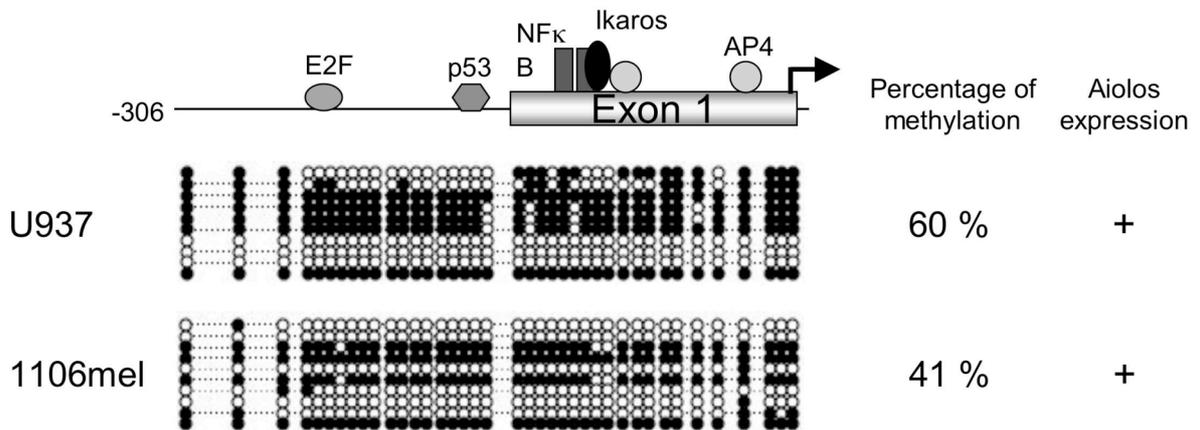


Duhamel et al., 2007, Figure 3

A

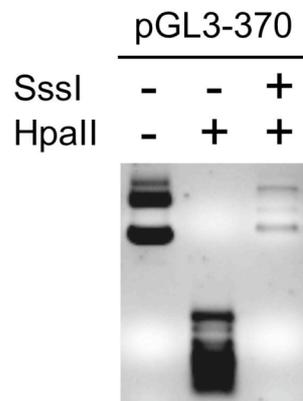


B

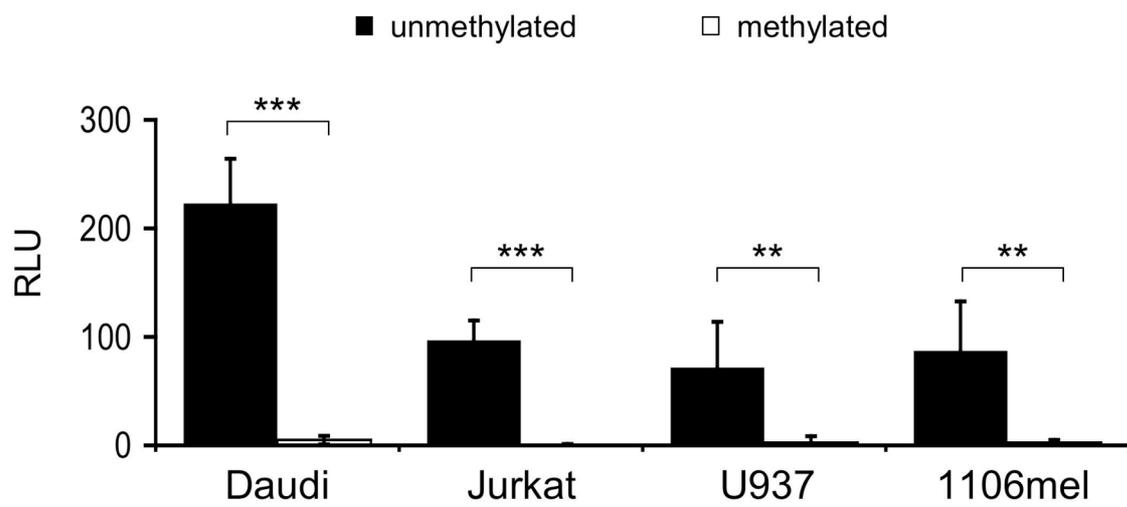


Duhamel et al., 2007, Figure 4

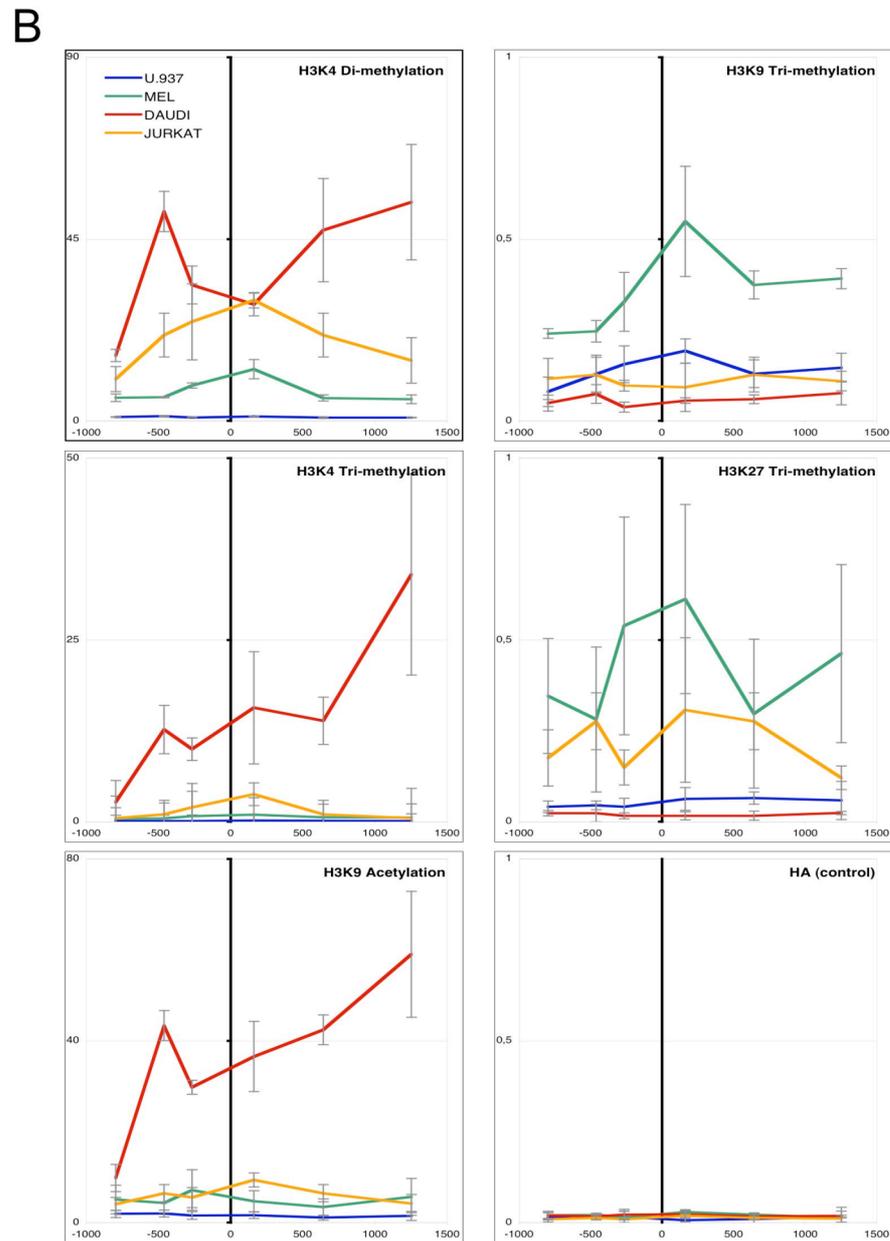
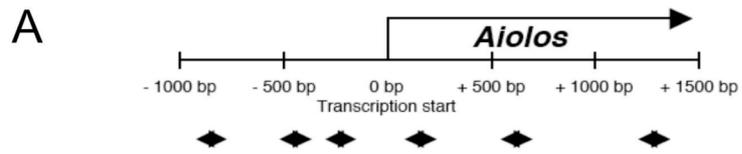
A



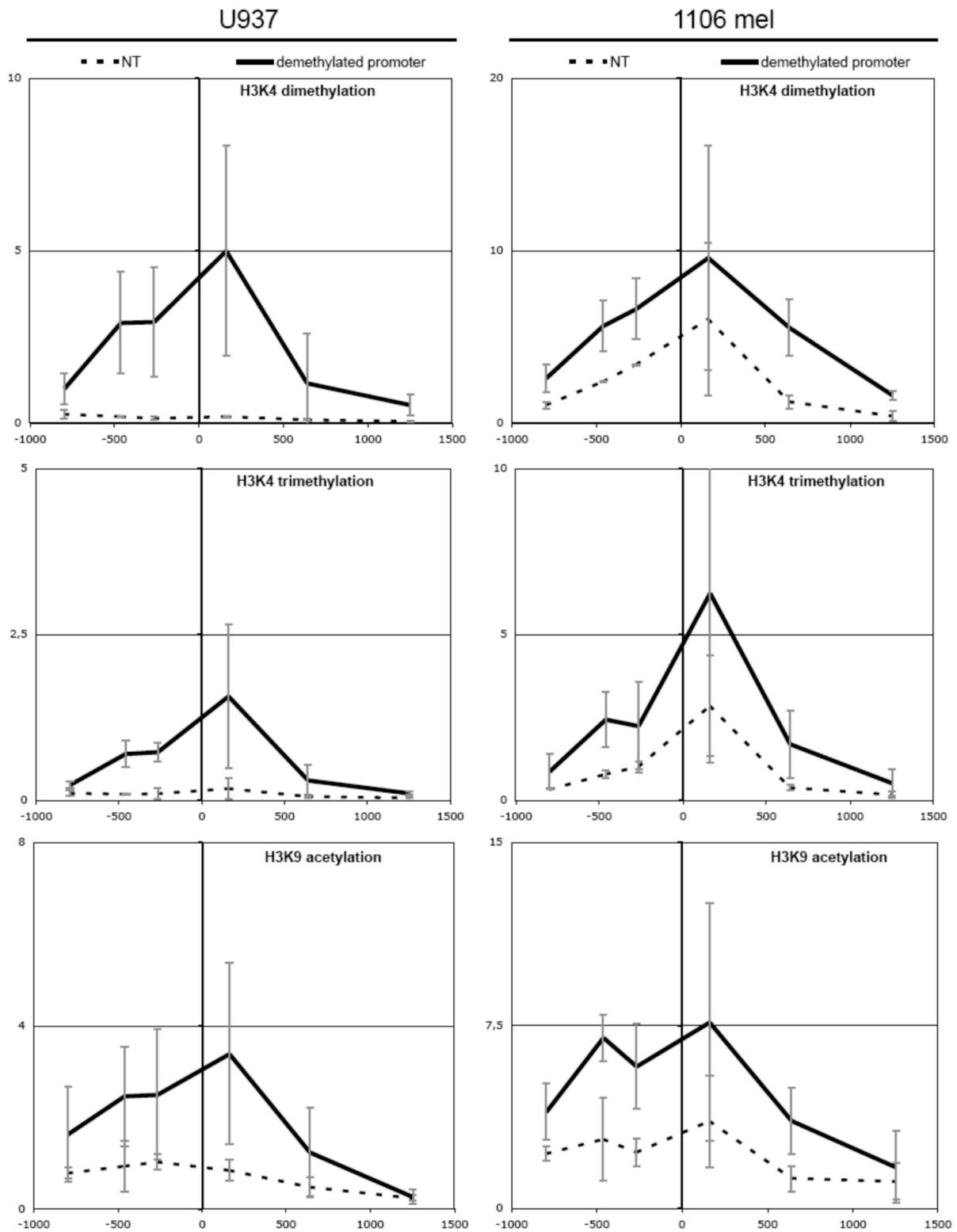
B



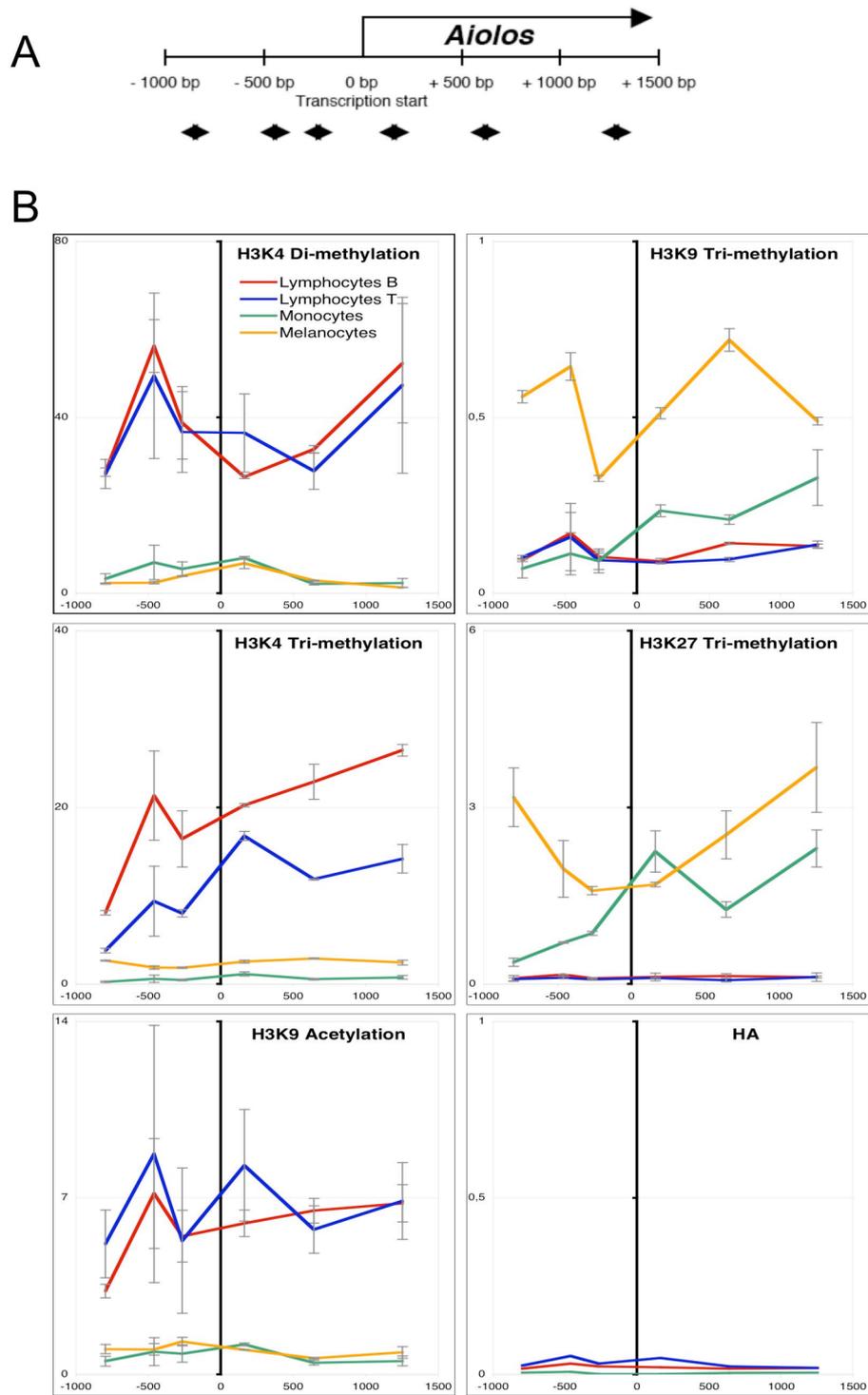
Duhamel et al., 2007, Figure 5



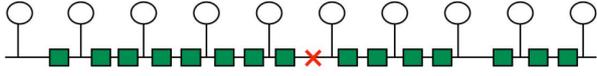
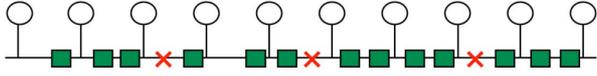
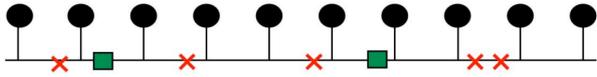
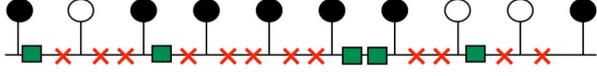
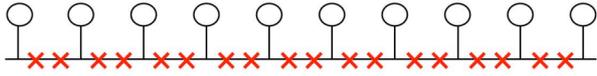
Duhamel et al., 2007, Figure 6



Duhamel et al., 2007, Figure 7



Duhamel et al., 2007, Figure 8

Cell type	DNA/chromatin structure	Aiolos mRNA
Daudi / B lymphocytes	 <p>opened DNA/chromatin</p>	++
Jurkat / T lymphocytes	 <p>opened DNA/chromatin</p>	+
U937	 <p>closed DNA</p>	-
1106mel	 <p>partially closed DNA /chromatin</p>	-
Monocytes / Melanocytes	 <p>closed chromatin</p>	-

Duhamel et al., 2007, Figure 9

ANNEXE 3 :

THE AIOLOS TRANSCRIPTION FACTOR IS UP-REGULATED IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Marianne Duhamel¹, Issam Arrouss¹, Hélène Merle-B  ral² and Angelita Rebollo¹

1- Immunologie Cellulaire et Tissulaire, INSERM U543 and Université Pierre et Marie Curie Paris VI, Hôpital Pitié-Salp  tr  re, Bâtiment CERVI, 83, Bd de l'Hôpital, 75013 Paris France.

2- Service d'Hématologie Biologique, AP-HP, Université Pierre et Marie Curie Paris VI and INSERM U543, Hôpital Pitié-Salp  tr  re, 83, Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Correspondence to: Angelita Rebollo, Immunologie Cellulaire et Tissulaire INSERM U543, Hôpital Pitié-Salp  tr  re, Bâtiment CERVI, 83, Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Tel: 33-142177527 / Fax: 33-142177490

e-mail: rebollo@chups.jussieu.fr

Key words: Aiolos isoforms, CLL, NHL, histone, epigenetic modifications

Running title: Overexpression of Aiolos in CLL

Scientific category: Neoplasia

Word counts: 1201

Abstract counts: 140

ABSTRACT

The Aiolos transcription factor, member of the Ikaros family of zinc-finger proteins, plays an important role in the control of mature B lymphocyte differentiation and proliferation and its function appears to be modulated through alternative splicing. In order to assess Aiolos isoform role in humans' pathologies, we studied Aiolos variant distribution and expression in mature B lymphoproliferative disorders (chronic lymphocytic leukemia and B non Hodgkin lymphoma). We demonstrated that over 80% of expressed Aiolos in normal as well as in malignant B cells is of the hAio1 type and we showed for the first time a homogeneous overexpression of the total amounts of Aiolos transcripts in the B cells of CLL patients, independently of ZAP-70 and IgV_H mutational status prognosis factors. This up-regulation of Aiolos, confirmed at protein level, seems independent of Aiolos promoter H3K9 acetylation and H3K4 trimethylation.

INTRODUCTION

B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) and non-Hodgkin lymphomas (NHL) represent frequent malignancies of mature B cells whose cell derivation and pathogenesis are unknown^{1,2}. Here we focused on Aiolos, a hematopoietic chromatin remodeller and transcription factor of the Ikaros family that plays critical roles in B cell differentiation³⁻⁶ and we examined whether a dysregulation of its expression was an integral part of malignant transformation in CLL and NHL.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Subjects and B-cell isolation

Cryopreserved PBMC samples were obtained after informed consent from CLL or NHL patients followed at the Hematological Department of Pitié-Salpêtrière Hospital, according to a protocol approved by the institutional ethic committee. Fresh blood from healthy donors was collected by the Etablissement Français du Sang and PBMC were frozen after density gradient isolation. Total RNA extraction was done after B cells isolation by anti-CD19 magnetic beads (Dyna).

RT-(q)PCR analysis

RNA (500ng) was reversed transcribed and amplified, either by Titanium one-step RT-PCR (Clontech) or by Superscript II (Invitrogen) and quantitative PCR done using pre-developed TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) (primer sequences available on request).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Anti-CD19 Dynal beads were detached by DETACHaBEAD before proceeding to chromatin cross-link. ChIP assays were carried out as previously described⁷ with primers spanning a 2 kb region upstream and downstream of the Aiolos translation initiation site (primer sequences available on request).

Western blot analysis (WB)

WB were carried out as previously described⁸.

RESULTS AND DISCUSSION

The hAio1 transcript represents over 80% of the Aiolos isoforms in B cells

We first investigated the expression pattern of different Aiolos isoforms in PBMC of individuals diagnosed with mature B cell malignancies (17 CLL, 8 mantle zone and 2 marginal zone lymphomas) (Fig. 1A set 1, Fig. 1B). Analysis of healthy donors revealed the presence of 6 Aiolos variants. Five corresponded to hAio1, hAio2, hAio3/4 and hAio5 as previously described ⁹. A new shorter variant was observed and identified by direct sequencing of the PCR products as hAio-del(4,5,6), lacking the four N-terminal zing fingers. No major differences in the distribution of Aiolos isoforms were detected between healthy donors and CLL/NHL patients except for the absence of Aio-del(4,5,6). In all cases, hAio1 was the most abundant mRNA species, although varying according to lymphocytes quantities. The shorter variants were equal or slightly decreased in patients compared to controls.

To confirm the predominance of hAio1 variant we performed quantitative analysis of Aiolos isoforms on CD19-positive peripheral blood cells in a new group of 16 CLL, 13 NHL (4 mantle zone, 6 marginal zone, 1 follicular and 2 atypical lymphomas), 1 prolymphocytic leukemia and 12 healthy donors (Fig. 1A set 2). We calculated the ratio of the copy numbers for (hAio1+hAio4) / total Aiolos. Although homogenous in controls, with a mean value of 85.8%, the ratios were more fluctuating in patient samples (particularly for lymphoma specimens) rising from 50.4 % to 100% (Fig. 1C). However mean values (91.6% and 80.7%, for CLL and NHL respectively) were not significantly different from healthy subjects. The two CLL subgroups, with indolent or aggressive disease as determined by ZAP-70 expression and IgV_H mutational status, showed similar Aiolos isoform distribution (89.8% and 94.7% respectively).

In contrast to Ikaros, these results did not reveal any significant overexpression of Aiolos dominant negative isoforms in mature B cell lymphoproliferations compared to healthy donors and demonstrated the predominance of the hAio1 variant in normal and malignant B cells. A slight imbalance between dominant negative and anti-oncogenic Aiolos isoforms, as observed in some of our patients, might be involved in the pathogenesis of B cell malignancies, by disturbing Aiolos sub-cellular localization and its association with HDAC-containing complexes ⁶.

Aiolos is up-regulated in B cells of CLL patients

Considering the total amounts of Aiolos transcripts expressed by B cells of healthy donors and patients, we observed a homogeneous 1.5-fold increase of Aiolos transcripts in CLL samples (except for the patient P1) compared to healthy donors (Fig. 2A) whereas Aiolos was highly fluctuating among NHL samples. We analyzed Aiolos protein expression in a healthy donor (H) and four CLL patients showing different Aiolos expression levels: P1 (hAio/Abl=2.0), P22 (hAio/Abl=3.9), P24 (hAio/Abl=3.8) and P3 (hAio/Abl=5.4) (Fig. 2C). We confirmed Aiolos up-regulation in P3, P22 and P24 (Fig. 2B).

Consequences of this up-regulation have to be determined. Aiolos has been implicated in the direct control of the bcl-2 gene promoter activity in T cells¹⁰ but its implication in B cell has not been demonstrated so far¹¹. In our patients, Bcl-2 expression seems independent of Aiolos levels (Fig. 2B)¹²⁻¹⁴. Aiolos also appears to inhibit the threshold of BCR activation in part by modulating tyrosine kinase phosphorylation and calcium release to the cytoplasm^{4,11}. The two Ig-mutated and Ig-unmutated subgroups of CLL showed distinct patterns of response following BCR cross-linking^{15,16} whereas we observed a homogenous CLL profile considering Aiolos expression. However our results do not determine whether Aiolos overexpression is the cause or the consequence of the malignant transformation. It was recently demonstrated that hAio-1 interacts with HDAC-containing complexes and specifically associates with the promoter of SIRT1, a class III histone deacetylase thought to participate in the formation of facultative heterochromatin⁶. Its overexpression could therefore have a global impact on acetylation levels and contribute to epigenetic alterations in CLL cells¹⁷.

An Aiolos overexpression in CLL patients that seems independent of Aiolos promoter epigenetic modifications

To this day, Pax5¹⁸, SLP-65¹⁹ and Ikaros⁸ are the only factors described as controlling, directly or indirectly, Aiolos expression. A raise of their quantities in CLL patients may be at the origin of Aiolos up-regulation. Pax5 is differentially expressed in CLL patients with higher levels in the Ig mutated subgroup²⁰. We did not observe any variation in Ikaros expression between CLL and healthy samples (data not shown). However, modifications in its sub-cellular localization and its ability to associate with HDAC-containing complexes may be involved²¹. We have recently shown (Duhamel *et al.*, submitted) that Aiolos promoter activity is regulated by epigenetic mechanisms. To assess the involvement of this type of regulation in the CLL Aiolos up-regulation, we performed ChIP assays on one healthy donor

(H) and the four CLL patients P1, P3, P22 and P24 (Fig. 2C). In our experimental conditions, we observed no significant modifications of the trimethylated H3K4 and acetylated H3K9 euchromatin markers throughout the Aiolos promoter (except at position +1253 bp for P1) between CLL patients and healthy donor. These results highlight an homogeneous transcriptional activity of the Aiolos promoter in normal and malignant cells²² and suggest that other mechanisms, such as mRNA half-life stabilization, could be involved in Aiolos up-regulation. However, we can not exclude the implication of other types of histone modifications.

To conclude, we report for the first time an Aiolos expression dysregulation in a B cell malignancy, which does not implicate isoforms imbalance but an increase in the Aiolos transcript and protein amounts. The exact causes and consequences of this up-regulation on the survival of CLL B cells and on mechanisms of their malignant transformation have to be determined.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Inserm AVENIR and ARC Funds. MD is supported by a predoctoral fellowship from La Ligue Contre Le Cancer.

REFERENCES

1. Chiorazzi N, Hatzi K, Albesiano E. B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1062:1-12.
2. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:251-262.
3. Morgan B, Sun L, Avitahl N, et al. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *Embo J.* 1997;16:2004-2013.
4. Wang JH, Avitahl N, Cariappa A, et al. Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity.* 1998;9:543-553.
5. Kim J, Sif S, Jones B, et al. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity.* 1999;10:345-355.
6. Caballero R, Setien F, Lopez-Serra L, et al. Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos. *J Cell Sci.* 2007;120:2619-2630.
7. Navarro P, Page DR, Avner P, Rougeulle C. Tsix-mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program. *Genes Dev.* 2006;20:2787-2792.
8. Ghadiri A, Duhamel M, Fleischer A, Reimann A, Dessauge F, Rebollo A. Critical function of Ikaros in controlling Aiolos gene expression. *FEBS Lett.* 2007;581:1605-1616.
9. Liippo J, Nera KP, Veistinen E, et al. Both normal and leukemic B lymphocytes express multiple isoforms of the human Aiolos gene. *Eur J Immunol.* 2001;31:3469-3474.
10. Romero F, Martinez AC, Camonis J, Rebollo A. Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization. *Embo J.* 1999;18:3419-3430.
11. Narvi E, Nera KP, Terho P, Mustonen L, Granberg J, Lassila O. Aiolos controls gene conversion and cell death in DT40 B cells. *Scand J Immunol.* 2007;65:503-513.
12. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1993;82:1820-1828.
13. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;353:1793-1801.

14. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13944-13949.
15. Allsup DJ, Kamiguti AS, Lin K, et al. B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2005;65:7328-7337.
16. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101:1087-1093.
17. Raval A, Byrd JC, Plass C. Epigenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006;33:157-166.
18. Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, et al. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*. 2005;122:517-527.
19. Nera KP, Kohonen P, Narvi E, et al. Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity*. 2006;24:283-293.
20. Thompson EC, Cobb BS, Sabbattini P, et al. Ikaros DNA-binding proteins as integral components of B cell developmental-stage-specific regulatory circuits. *Immunity*. 2007;26:335-344.
21. Ferrer A, Ollila J, Tobin G, et al. Different gene expression in immunoglobulin-mutated and immunoglobulin-unmutated forms of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;153:69-72.
22. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:162-174.

LEGEND TO THE FIGURES

Figure 1. hAio1 is the most abundant Aiolos isoform in normal and malignant B cells

A. Characteristics of the 2 sets of patients used in this study according to the type of pathology and to CLL main prognostic factors (ZAP-70 and IgV_H mutational status). B. Representative results of Aiolos isoforms expression in 2 healthy subjects (#1,2), 7 CLL (#3-9) and 7 NHL (#10-16) patients of the set 1 after one-step RT-PCR amplification of PBMC's RNA. PBGD is used as internal control. C. Ratio of copy numbers obtained using RT-qPCR between primer pair/probe couple 1 (exons 2-3 junction, hAio1-5+hAio-del(4,5,6)) and primer pair/probe couple 2 (exons 5-6 junction, hAio1+hAio4) of each subgroup of patients and healthy subjects of the set 2 (B cells). Differences between groups were tested using the Student test: ns $p > 0.05$, * $0.01 < p \leq 0.05$, ** $0.001 < p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 2. An Aiolos overexpression in CLL patients that seems independent of Aiolos promoter epigenetic modifications

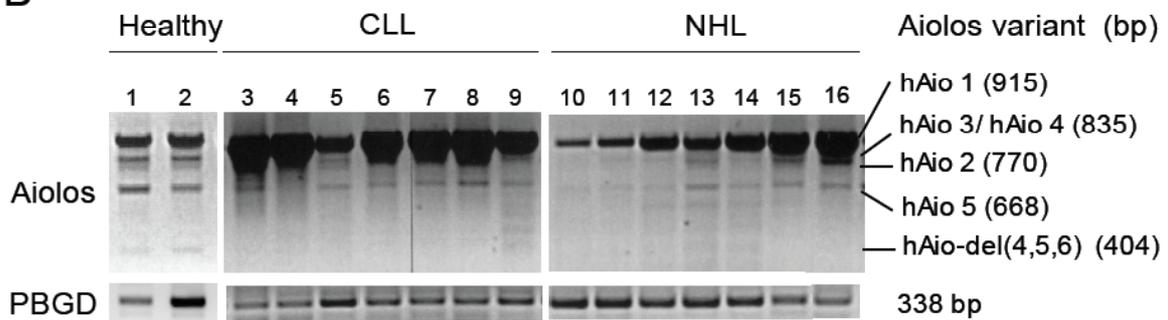
A. Total amounts of Aiolos transcripts in each subgroup of patients and healthy subjects of the set 2 (Fig. 1A) obtained by RT-qPCR of B cells' RNA by the primer pair/probe couple 1 and normalized to the Abelson gene (Abl). Differences between groups were tested using the Student test: ns $p > 0.05$, * $0.01 < p \leq 0.05$, ** $0.001 < p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$. B. Western Blot analysis of Aiolos and Bcl-2 expression in a healthy donor (H) and in the CLL patients P1, P3, P22 and P24. 14-3-3 protein is used as internal control. Molecular weights of the proteins are shown. C. Schematic representation of the position of the primer pairs used to analyze chromatin remodelling and levels of trimethylated H3K4 (Abcam) and acetylated H3K9 (Upstate) obtained in the CLL patients P1, P3, P22 and P24, and in one healthy donor H. The corresponding Aiolos transcript amounts are shown.

A

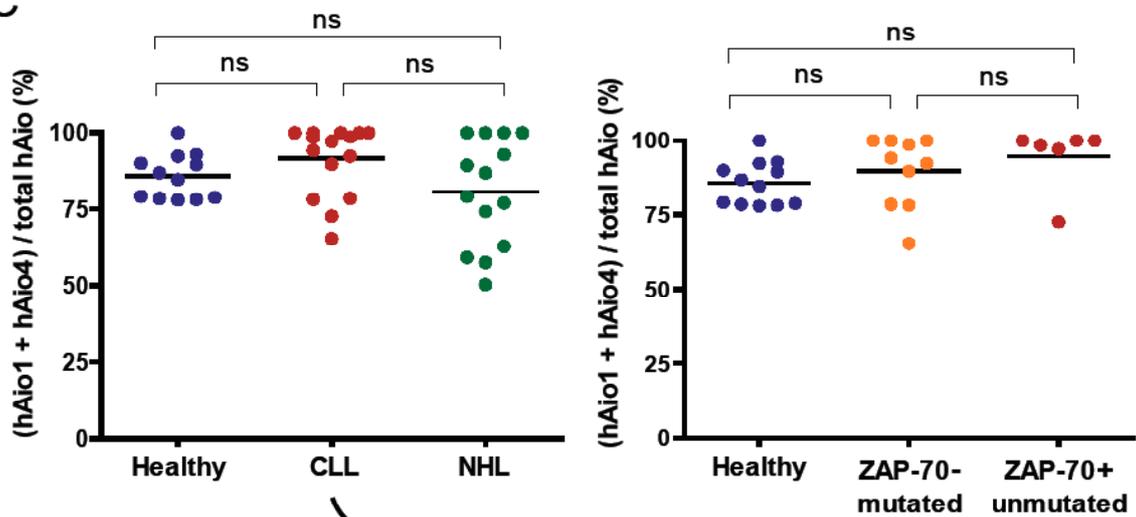
		CLL (n=17)	NHL (n=10)
Set 1 (PBMC)	Mean age, yrs	62	71
	Male, %	67	63
	hAio1/PBGD, arbitrary units	22 +/-14	19 +/-11

		CLL			NHL	Healthy
		ZAP70-/mutated (n=10)	ZAP70+/unmutated (n=6)	total (n=16)	(n=14)	n(12)
Set 2 (B cells)	Mean age, yrs	63	53	58	72	57
	Male, %	60	67	63	64	83
	Aiolos ratios,%	89,8 +/-11,9	94,7 +/-10,9	91,6 +/-11,4	80,7 +/-17,1	85,8 +/-7,3
	Aio/Abl, transcript amounts	3,86 +/-0,9	4,28 +/-0,6	4,02 +/-0,8	2,86 +/-1,2	2,78 +/-0,4

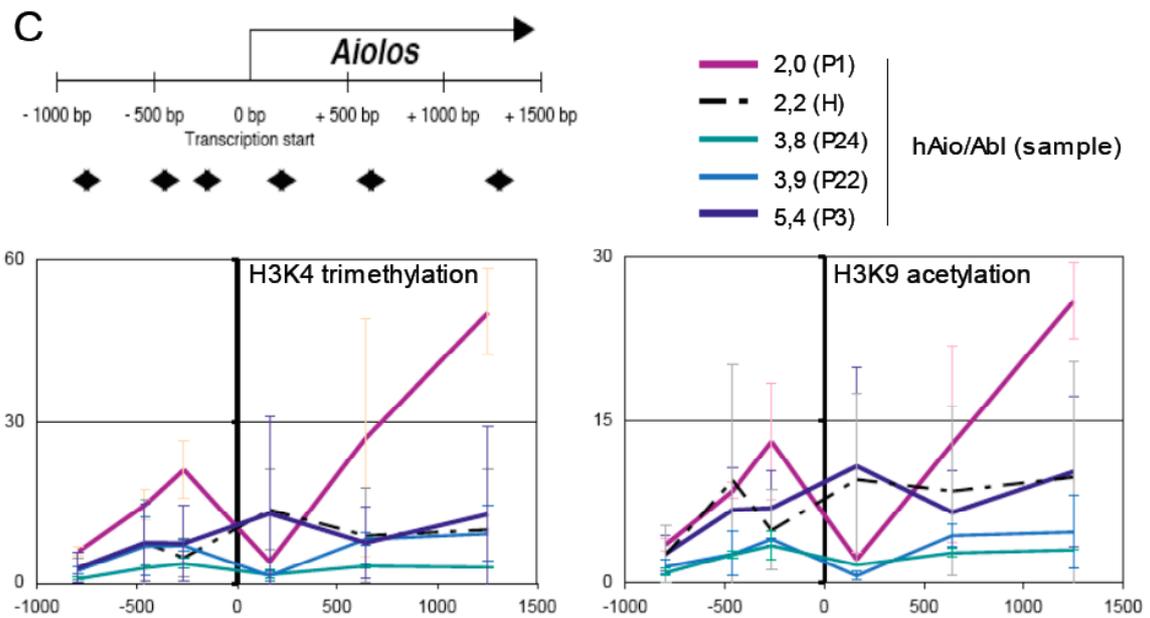
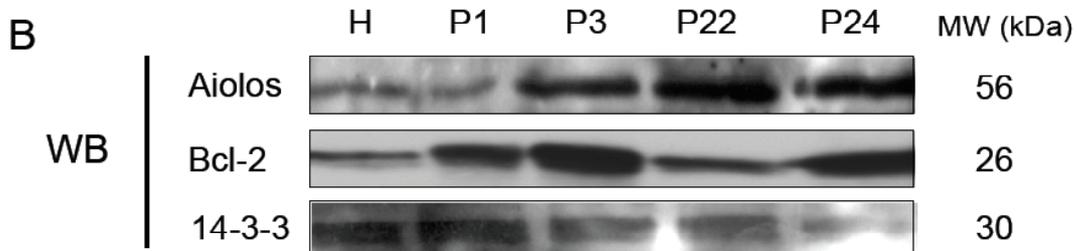
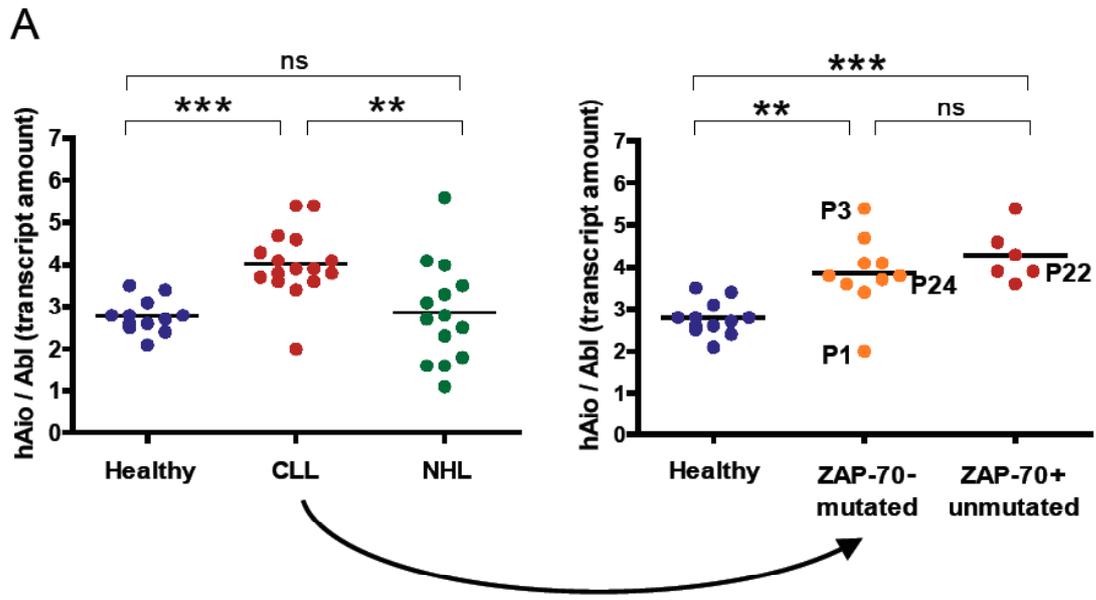
B



C



Duhamel et al., 2007 - Figure 1



Duhamel et al., 2007 - Figure 2

ANNEXE 4 : AUTRES PUBLICATIONS

Fleischer A., **Duhamel M.**, Lopez-Fernandez L.A., Munoz M., Galio L., and Rebollo A. (2007) Cascade of transcriptional induction and repression during IL-2 deprivation-induced apoptosis. *Immunol Lett. Sous presse*

Dessaige F., Cayla X., Albar J.P., Fleischer A., Ghadiri A., **Duhamel M.** and Rebollo A. (2006) Identification of PP1 α as a caspase-9 regulator in IL-2 deprivation induced apoptosis. *J Immunol.* 177(4):241-51.

Fleischer A., Ghadiri A., Dessaige F., **Duhamel M.**, Paz Rebollo M., Alvarez-Franco F., and Rebollo A. (2006) Modulating apoptosis as a target for effective therapy. *Molecular Immunology.* 43(8):1065-79.

Fleischer A., Ghadiri A., Dessaige F., **Duhamel M.**, Cayla X., Garcia A. and Rebollo A. (2004) Bad-Dependent Rafts Alteration Is a Consequence of an Early Intracellular Signal Triggered by Interleukin-4 Deprivation. *Mol Cancer Res.* 2(12):674–684.

EPIGENETIC REGULATION OF THE AIOLOS HEMATOPOIETIC TRANSCRIPTION FACTOR EXPRESSION AND INVOLVEMENT IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Commitment of hematopoietic progenitors into the lymphoid lineage, as well as the choice of effector function at later stages of this differentiation pathway, is dependent upon the tightly controlled activation and repression of gene expression. A number of transcription regulators that play pivotal role in lymphocyte differentiation have been described. Among these proteins, Aiolos, a member of the Ikaros family of zinc-finger transcription factors, plays an important role in the control of mouse mature B lymphocyte differentiation and induces B lymphomas when disrupted. In humans however, its functions and the parameters involved in its transcriptional regulation are largely unknown and have to be better defined.

The first objective of my thesis was to dissect the parameters involved in the human aiolos gene transcription regulation. We focused on the epigenetic component and analyzed methylation status of aiolos' 5' CpG island in relation to histone modifications in various tumor cell lines and primary cells, representative of lymphoid, myeloid and non-hematopoietic cells. We first inhibited DNA methyltransferases by treatment with 5-Aza-dC and we induced Aiolos expression in the Aiolos negative U937 and 1106mel cell lines. Treatment with TSA histone deacetylation drug was only able to induce Aiolos expression in 1106mel cells. We then transfected Aiolos expressing and non-expressing cell lines with a luciferase reporter gene under the control of DNA-methylated Aiolos promoter and confirmed that DNA-methylation was able to block Aiolos promoter activity. Next we analyzed CpG island methylation and histone modification profiles using sodium bisulfite sequencing and chromatin immunoprecipitation assays respectively. Dense DNA methylation and low levels of euchromatin-associated signatures (namely H3K4 di- and tri-methylation and H3K9 acetylation) of Aiolos promoter were observed in U937 and 1106mel cell lines, while the opposite pattern characterized the Aiolos expressing cell lines and primary cells. Interestingly, CpG methylation was not necessary to repress transcription in Aiolos non-expressing monocytes and melanocytes where silencing mechanisms involved enrichment with the trimethylated H3K27 and H3K9 heterochromatin-associated signature. This study provided evidence that DNA methylation of Aiolos promoter controls Aiolos silencing in tumor cell lines, while expression of Aiolos in primary cells is mainly regulated by histone modifications. The next step will be to study how epigenetic modifications could alter the fixation of Ikaros and other Aiolos upstream transcription factors to aiolos promoter sequence.

The second objective of my work was to study the involvement of Aiolos transcription factor in humans' mature B lymphoproliferative disorders. We used quantitative PCR to assess Aiolos variant expression in B cells of healthy donors and patients with chronic lymphocytic leukemia or B non Hodgkin lymphoma. We demonstrated that over 80% of expressed Aiolos in normal as well as in malignant B cells was of the hAio1 type and we showed for the first time a homogeneous overexpression of the total amounts of Aiolos transcripts in the B cells of CLL patients, independently of ZAP-70 and IgV_H mutational status prognosis factors. In order to determine whether epigenetic modifications could participate to this up-regulation, we analyzed Aiolos promoter H3K9 acetylation and H3K4 trimethylation profiles using chromatin immunoprecipitation. However, in our experimental conditions, we did not find any significant variations between malignant CLL B cell and healthy donor B cells. The exact causes and consequences of Aiolos up-regulation on the survival of CLL B cells and on mechanisms of their malignant transformation have now to be determined.

Key words: Aiolos, transcriptional regulation, epigenetic, CpG island, methylation, acetylation, histones, isoformes, CLL, NHL.

RESUME

L'engagement des progéniteurs hématopoïétiques vers le lignage lymphoïde puis leur maturation au sein de ces lignages repose sur une régulation étroite de l'expression des gènes. Un grand nombre de régulateurs transcriptionnels ont été décrits. Parmi eux, la protéine Aiolos, membre de la famille des facteurs de transcription à doigts de zinc de type Ikaros, joue un rôle important dans la maturation des lymphocytes B murins et induit le développement de lymphomes B lorsqu'elle est inhibée. Chez l'homme cependant, ses fonctions et les paramètres qui contrôlent la régulation de sa transcription restent à préciser.

Le premier objectif de mon travail de thèse a été de définir les mécanismes épigénétiques impliqués dans la régulation de la transcription du gène *aiolos* humain. Pour cela, nous avons analysé la méthylation de l'îlot CpG d'*Aiolos* et les modifications de ses histones dans différentes lignées et cellules primaires, représentatives de cellules lymphoïdes, myéloïdes ou non-hématopoïétiques. Dans un premier temps, nous avons inhibé les dinucléotide méthyl transférases par un traitement avec la 5-Aza-dC et nous avons induit l'expression d'*Aiolos* dans les lignées *Aiolos* négatives U937 et 1106mel. Le traitement avec la TSA, un inhibiteur des histones désacétylases, a induit l'expression d'*Aiolos* uniquement dans la lignée 1106mel. Par la suite nous avons transfecté des lignées, exprimant ou non *Aiolos*, avec le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur *aiolos* et nous avons confirmé que la méthylation de l'ADN était capable de bloquer l'activité du promoteur *aiolos*. Enfin, nous avons analysé les profils de méthylation de l'ADN et de modifications des histones, respectivement par séquençage au bisulfite de sodium et par immunoprécipitation de la chromatine. Nous avons observé une méthylation dense de l'îlot CpG, associée à des niveaux faibles de marques d'euchromatine active (di et triméthylation des H3K4, acétylation des H3K9) dans les lignées U937 et 1106mel, tandis que les cellules exprimant *Aiolos* présentaient les caractéristiques opposées. De manière surprenante, la méthylation de l'ADN n'est pas nécessaire à l'inhibition de la transcription d'*Aiolos* dans les monocytes et mélanocytes primaires *Aiolos* négatifs. Dans ces cellules, la répression d'*Aiolos* est associée à une augmentation des marques d'hétérochromatine (triméthylation des H3K9 et H3K27). Notre étude a ainsi permis de mettre en évidence l'importance de la méthylation de l'ADN dans le contrôle de l'expression d'*Aiolos* dans les lignées cellulaires, tandis que dans les cellules primaires, cette régulation repose davantage sur les modifications des histones. Il nous faut déterminer maintenant comment ces modifications épigénétiques peuvent interférer sur la fixation d'Ikaros et des autres facteurs de transcription amont d'*Aiolos*, à sa séquence promotrice.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'implication d'*Aiolos* dans les syndromes lymphoprolifératifs des cellules B matures chez l'homme. Par une technique de PCR quantitative, nous avons étudié l'expression des différentes isoformes d'*Aiolos* dans les cellules B périphériques de donneurs sains et de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique ou de lymphomes B non hodgkiniens. Nous avons démontré que plus de 80% des isoformes *Aiolos* exprimées dans les cellules B, saines comme cancéreuses, étaient du type hAio1. Nous avons par ailleurs observé une augmentation globale des transcrits *Aiolos* chez les patients atteints de LLC, indépendamment des marqueurs pronostiques que sont l'expression de ZAP-70 et le statut mutationnel des IgV_H. Afin de déterminer si des modifications épigénétiques pouvaient en partie expliquer cette surexpression, nous avons analysé les niveaux de triméthylation des H3K4 et d'acétylation des H3K9. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons cependant pas mis en évidence de différences notables entre les cellules de LLC et les cellules saines. Il nous reste maintenant à déterminer les causes exactes et les conséquences de cette augmentation d'*Aiolos* sur la physiopathologie de la cellule de LLC.

Mots clés : *Aiolos*, régulation transcriptionnelle, épigénétique, îlot CpG, méthylation, acétylation, histones, isoformes, LLC, LNH.