

Analyse de la régulation des réarrangements précoces du TCRδ dans la lymphopoïèse normale et les anomalies oncogéniques associées dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T

Sandrine Le Noir

▶ **To cite this version:**

Sandrine Le Noir. Analyse de la régulation des réarrangements précoces du TCRδ dans la lymphopoïèse normale et les anomalies oncogéniques associées dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T. Biologie cellulaire. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2012. Français. NNT : . tel-00741229

HAL Id: tel-00741229

https://theses.hal.science/tel-00741229

Submitted on 12 Oct 2012

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

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

UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT – Paris 7

ÉCOLE DOCTORALE B2T

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de

Docteur de l'Université Paris 7
Spécialité Biologie des cellules sanguines

Présentée et soutenue publiquement par

Sandrine Le Noir

Le 2 Octobre 2012

Analyse de la régulation des réarrangements précoces du TCRδ dans la lymphopoïèse normale et les anomalies oncogéniques associées dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T

Thèse dirigée par le Pr Vahid Asnafi

Jury

Monsieur le Professeur Jean Soulier	Président du Jury
Madame le Docteur Isabelle André-Schmutz	Rapporteur
Monsieur le Professeur Michel Cogné	Rapporteur
Madame le Professeur Judith Landman-Parker	Examinateur
Monsieur le Professeur Hervé Dombret	Examinateur

Remerciements

A l'issue de cette thèse, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis d'avancer.

Aux membres du Jury,

A Monsieur le Professeur Jean Soulier, vous qui me faites l'honneur aujourd'hui de présider ce jury de thèse et de juger ce travail.

A Madame le Docteur Isabelle André-Schmutz et à Monsieur le Professeur Michel Cogné, vous me faites l'honneur d'accepter de rapporter ce travail de thèse. Veuillez recevoir ma très respectueuse considération.

A Madame le Professeur Judith Landam-Parker et à Monsieur le Professeur Hervé Dombret, vous avez accepté d'être membre du jury de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Vahid Asnafi

Merci pour ton encadrement scientifique exceptionnel, tes conseils toujours avisés, ta grande disponibilité, pour ta passion et ton enthousiasme au cours de chacune de nos discussions, pour ta confiance et ta bonne humeur quotidienne. J'espère avoir été digne de la confiance que tu m'as accordée. Je suis très honorée de t'avoir eu pour encadrant.

A Madame le Professeur Elizabeth Macintyre

Vous m'avez accueillie avec beaucoup de bienveillance au sein du laboratoire depuis plusieurs années et je vous remercie de la confiance que vous m'accordée.

A Monsieur le Docteur Bertrand Nadel de m'avoir accueilli dans votre laboratoire.

A Madame le Docteur Dominique Payet-Bornet

Merci de ton accueil chaleureux chaque fois que je suis venue à Marseille et pour toute l'aide que tu m'as apportée lors de manip. Merci pour ta grande implication dans ce projet. Merci Domie.

A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Necker Enfants Malades

Veuillez trouver ici ma très grande gratitude pour votre aide et votre disponibilité. Vous allez me manquer.

Ludo, compagnon de thèse, un grand merci pour ton aide précieuse et pour les heures passées devant le FACS (Elles sont positives ces cellules ?). Très bonne continuation à toi, j'espère que nos chemins se recroiseront un jour.

Aurore, depuis ta première PCR, nous avons partagé de très bons moments. Trouve ici le témoignage de mon amitié. Très bonne continuation à toi.

Anne, petite Anne, ta joie de vivre et ta grande gentillesse ont illuminé le bureau de bonne humeur (et de plantes vertes…). Bonne continuation, je suis sûre que tu obtiendras tout ce que tu souhaites professionnellement et personnellement.

Agata, Amélie, Raouf, Nawel, Etienne, Aurélie, vous avez été des compagnons de recherche scientifique formidables et toujours de bonne humeur. Ne changez rien.

Patrick, roi du débuggage informatique. Merci, Merci pour tout.

Caroline, maîtresse des commandes, pour ta grande gentillesse au labo et en dehors. **Chantal**, pour ta bonne humeur constante, pour les moments de rigolades et le grand respect du planning de PCR.

Fadhila, pour ta grande gentillesse et ta taquinerie sans faille. Tu prends ton créneau de taqman ?

Patricia, pour le troc de gels d'acrylamide contre chocolats.

Petite Aurore et **Naïma,** merci pour votre aide sans faille pour faire fonctionner le trieur dans ces mauvais jours.

Fathia, merci pour ton aide et ta grande disponibilité.

Sophie, Amandine, Daniel, **Marie-Claude**, **Yvette**, **Aurore, Danielle**, **Bernard**, **Jean Marie** merci pour votre soutien.

A toute l'équipe du laboratoire de cytogénétique de l'hôpital Necker Enfants Malades.

A Monsieur le Docteur Serge Romana et **Madame le Docteur Isabelle Radford-Weiss** de m'avoir initiée à l'hybridation *in situ*.

Marc, merci pour ton aide précieuse.

JC, Fabienne, Sylvie, Catherine, Susanne, Hera. Je vous remercie pour votre gentillesse. J'espère pouvoir revenir vous voir au plus vite. Je vous souhaite à tous beaucoup de bonheur.

A **Els**, pour ton soutien et ton aide précieuse pour la production des lentivirus.
A **Thomas Dumet** et la banque du sang de cordon pour les poches de sang de cordon
A **Marie-Lou**, un très grand merci pour la collecte des thymus.

A **Soazig**, ma binôme depuis le début de la fac. Merci à toi pour ton soutien sans faille, malgré la distance. Je sais que tu obtiendras tout ce que tu souhaites professionnellement et que tu feras une grande chercheuse. Bon courage pour la suite.

A **Maman** et **Jacky**
Merci pour votre soutien et votre patience pendant ces longues années d'étude. Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma reconnaissance.

A ma petite sœur, Priscilla
Mes chaleureux remerciements à toi que j'adore, tu n'as cessé de me soutenir malgré les kilomètres qui nous séparent. Je n'ai pas été aussi disponible que je l'aurai souhaité, j'espère pouvoir un jour rattraper le retard accumulé. Merci à toi.

A mes grands-parents.
Merci pour toutes vos attentions et votre soutien sans faille depuis le début.

A Malou et René
Merci pour votre soutien .Un merci tout spécial à Malou pour la relecture de ses yeux avisés.

A Alan,
Enfin, merci à ma moitié pour ton soutien quotidien indéfectible et ton enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Je te dois beaucoup.

Sommaire

INTRODUCTION ..... - 1 -

I. LE DEVELOPPEMENT LYMPHOÏDE T NORMAL ..... - 3 -

I.1. Les précurseurs hématopoïétiques ..... - 3 -

I.2. Le développement lymphocytaire T intrathymique ..... - 4 -
I.2.1. Le thymus, organe de la lymphopoïèse – Colonisation thymique ..... - 4 -
I.2.1.1. Le thymus ..... - 4 -
I.2.1.2. La colonisation thymique ..... - 5 -
I.2.2. Description phénotypique et immunogénétique des étapes de la différenciation thymique ..... - 7 -
I.2.2.1. Stade Double Négatif (DN) ..... - 8 -
I.2.2.2. Stade Immature Simple Positif (4ISP) ..... - 9 -
I.2.2.3. Stade Double positif (DP) ..... - 10 -
I.2.2.4. Stade Simple positif (SP) ..... - 10 -
I.2.3. Les étapes décisives de la maturation thymique ..... - 11 -
I.2.3.1. La transition 4ISP-DP : la β-sélection ..... - 11 -
Le pré-TCR ..... - 11 -
I.2.3.2. La transition DP-SP, la sélection positive et négative ..... - 12 -
I.2.3.3. Détermination des lignées αβ versus γδ ..... - 13 -
Modèle des réarrangements séquentiels ..... - 13 -
Modèle de lignée distincte ou de pré-engagement ..... - 14 -

I.3. Les loci des TCRs ..... - 14 -
I.3.1. Généralités ..... - 14 -
I.3.2. Description des différents loci ..... - 15 -
I.3.2.1. Le TCR α/δ ..... - 15 -
Le locus TCRδ ..... - 15 -
Le locus TCRα ..... - 16 -
I.3.2.2. Le TCR γ ..... - 17 -
I.3.2.3. Le TCR β ..... - 18 -

I.4. Principales différences entre les lymphopoïèses humaine et murine ..... - 19 -
I.4.1. Différences phénotypiques ..... - 19 -
I.4.2. Différences dans la configuration des loci des TCRs ..... - 20 -

I.5. La régulation de la thymopoïèse ..... - 21 -
I.5.1. Le rôle de NOTCH1 ..... - 22 -
I.5.2. Le rôle des facteurs de transcription ..... - 24 -
I.5.2.1. AML1/RUNX1 ..... - 24 -
I.5.2.2. ETS1 ..... - 26 -
I.5.2.3. Les autres facteurs de transcription ..... - 27 -
I.5.3. Le rôle des cytokines ..... - 28 -
I.5.3.1. Interleukine 7 ..... - 29 -
I.5.3.2. SCF ..... - 30 -

II. LA RECOMBINAISON V(D)J ..... - 31 -

II.1. Mécanismes de la recombinaison V(D)J ..... - 31 -
II.1.1. Acteurs de la recombinaison V(D)J ..... - 31 -
II.1.1.1. Les Séquences Signal de Recombinaison (RSS) ..... - 31 -
La règle 12/23 et la restriction B12/23 ..... - 32 -

II.1.1.2. Les protéines RAG1/2 ..... - 33 -
Régulation de l'expression des protéines RAG ..... - 35 -
II.1.2. Biochimie de la recombinaison V(D)J ..... - 36 -
II.1.2.1. Généralités ..... - 36 -
II.1.2.2. Les cassures de l'ADN RAG induites ..... - 36 -
II.1.2.3. Mécanismes de réparation ..... - 39 -
Les protéines du complexe NHEJ ..... - 41 -
Les protéines Ku ..... - 42 -
La protéine DNA-PK_{cs} ..... - 42 -
Artemis ..... - 42 -
DNA ligase IV et XRCC4 ..... - 43 -
XLF-Cernunnos ..... - 44 -
Les autres protéines ..... - 44 -

II.2. Régulation de la recombinaison V(D)J ..... - 44 -
II.2.1. Accessibilité chromatinienne ..... - 45 -
II.2.1.1. Généralités ..... - 45 -
II.2.1.2. Dans la recombinaison V(D)J ..... - 46 -
II.2.2. Rôle des éléments *cis*-régulateurs ..... - 48 -
II.2.3. Localisation nucléaire et architecture du locus ..... - 49 -
II.2.4. Rôle des facteurs de transcription ..... - 50 -

II.3. Produits alternatifs de la recombinaison V(D)J ..... - 51 -
II.3.1. Les joints hybrides ..... - 52 -
II.3.2. Les joints Open and Shut ..... - 53 -
II.3.3. Les joints pseudo-hybrides ..... - 53 -

II.4. Recombinaison V(D)J illégitime ..... - 54 -
II.4.1. Recombinaison en *trans* ..... - 54 -
II.4.1. Délétions sous-microscopiques ..... - 55 -
II.4.2. Les translocations impliquant le TCR ..... - 56 -
II.4.2.1. Translocation de type I ..... - 57 -
II.4.2.2. Translocation de type II ..... - 58 -

III. LES LEUCEMIES AIGUËS LYMPHOBLASTIQUES T ..... - 61 -

III.1. Généralités ..... - 61 -
III.1.1. Définitions ..... - 61 -
III.1.2. Epidémiologie et étiologie ..... - 61 -
III.1.3. Clinique et traitement ..... - 62 -

III.2. Classification immunophénotypique ..... - 63 -

III.3. Classification par le TCR ..... - 64 -
III.3.1. Les LAL-T immatures ..... - 65 -
III.3.2. Les LAL-T pré $\alpha\beta$ ..... - 65 -
III.3.3. Les LAL-T matures ..... - 66 -

III.4. Les Anomalies oncogéniques ..... - 66 -
III.4.1. Oncogènes de type A ..... - 68 -
III.4.1.1. Sous-groupe TAL/LMO ..... - 68 -
III.4.1.2. Sous-groupe C-MYB ..... - 70 -
III.4.1.3. Les protéines à homéodomaine, HOXA, TLX1, TLX3 ..... - 70 -
Sous-groupe HOXA ..... - 72 -
Sous-groupe TLX1 ..... - 73 -
Sous-groupe TLX3 ..... - 74 -

III.4.2. Oncogènes de type B ..... - 74 -
Anomalies du cycle cellulaire (Type B1) ..... - 75 -
Activation de la voie NOTCH1 (Type B2) ..... - 76 -
Anomalies dans la voie de signalisation du pré-TCR (Type B3) ..... - 77 -
Dérégulation additionnelle de la différenciation T (Type B4) ..... - 77 -
Anomalies d'autres tyrosines kinases (Type B5) ..... - 78 -
III.4.3. Dérégulation de RUNX1 ..... - 78 -

RESULTATS ..... - 81 -

De l'ontogenèse… ..... - 83 -
Article 1 : Rôle de RUNX1 dans les réarrangements précoces du TCRδ ..... - 85 -

A l'oncogenèse des LAL-T ..... - 115 -
Article 2 : Etude des translocations TCR-oncogènes et le mécanisme de dérégulation associé ..... - 117 -
Article 3 : Etude du blocage de maturation dans les LAL-T TLX positives ..... - 165 -

DISCUSSION ..... - 169 -

Le développement T précoce, réarrangement du locus du TCRδ ..... - 171 -

L'oncogenèse des LAL-T ..... - 175 -
Les translocations avec le TCR ..... - 175 -
Mécanisme de la translocation ..... - 175 -
Rôle de RUNX1 dans la survenue de la translocation ..... - 176 -
Découplage entre la survenue de la translocation et l'activation de l'oncogène ..... - 177 -
Différence dans le mécanisme d'activation de l'oncogène en fonction du TCR impliqué ..... - 178 -
Autosélection du clone "pré-leucémique" en fonction de la configuration de la translocation ..... - 179 -
Rôle oncogénique de TLX1 et perspective thérapeutique ..... - 180 -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... - 183 -

ANNEXES ..... - 209 -
Annexe 1 : Etude des mutations de JAK1 dans les LAL-T ..... - 211 -
Annexe 2 : Etude des mutations de NOTCH1 et FBXW7 dans les LAL-T ..... - 213 -
Annexe 3 : Recombinaison V(D)J normale et pathologique ..... - 215 -

Liste des abréviations

AT	Ataxie Télangectasie
BCR	B Cell Receptor
BE	Broken End
CDB	Coupure Double Brin
CE	Extrémité Codante
CGH Array	Array Comparative Genomic Hybridization
CJ	Joint Codant
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMH	Complexe Majeur Histocompatibilité
CMP	Common Myeloid Progenitor
CPC	Complexe Post Clivage
cRSS	RSS cryptique
CSB	Coupure Simple Brin
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
DC	Dentritic Cell
DN	Double Négatif
DP	Double Positif
Eδ / Eα	Enhancer δ / Enhancer α
EDP	Early DP
ETP	Early T Progenitor
ETP-ALL	Early Thymic Precursor - Acute Lymphoblasitc Leukemia
FAIRE	Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FTOC	Fœtal Thymic Organ Culture
GMP	Granulocytic Myelomonocytic Progenitor
HD	HoméoDomaine
HDAC	Histone Dé-ACétylase
HJ	Joint Hybrid
HMGB	High Mobility Group Protein
HR	Recombinaison Homologue
ISP	Immature Simple Positif
LAL-T	Leucémie Aiguë Lymphoblastique T
LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
LT-HSC	Long Term - Hematopoietic Stem Cell
MEP	Megakaryocyte Erythroid Progenitor
MJ	Joint Mixte
MO	Moelle Osseuse
MPP	MultiPotent Progenitor
MRD	Minimal Residual Disease
NBD	Nonamere Binding Domain
NHEJ	Non Homologeous End Joining
NK	Natural Killer
NRE	Negative Regulation Element
OSJ	Open and Shut Joint

PBL	Peripheral Blood Lymphocyte
PEST	Proline Glutamate Sérine Thréonine
PHD	Plant Homeo Domain
pTα	Pré-Tα
RAG	Recombination Activating Gene
RSS	Recombination Signal Sequence
SCF	Stem Cell Factor
SCID	Syndrome sévère d'Immunodéficience Combiné
SE	Extrémité Signal
SEC	Signal End Complex
SJ	Joint Signal
SP	Simple Positif
ST-HSC	Short Term - Hematopoietic Stem Cell
Tc	Lymphocyte T cytotoxique
TCR	T Cell Receptor
TDT	Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase
TEA	T Early Alpha
Th	Lymphocyte T helper
TREC	T-cell Receptor End Coding
TSP	Thymus Seeding Progenitor
ψHJ	Joint Pseudo-Hybride

Introduction

I. Le développement lymphoïde T normal

I.1. ***Les précurseurs hématopoïétiques***

L'hématopoïèse est le processus assurant la production, le développement et la maturation des cellules sanguines. Elle se déroule principalement dans la moelle osseuse (MO). Les travaux accumulés ces quarante dernières années ont progressivement mis en évidence une cellule souche hématopoïétique (CSH) pluripotente capable de se différencier pour assurer le développement de l'ensemble des précurseurs hématopoïétiques (**Figure 1**). Le système hématopoïétique a été le premier système pour lequel des cellules souches spécifiques ont ainsi été identifiées.

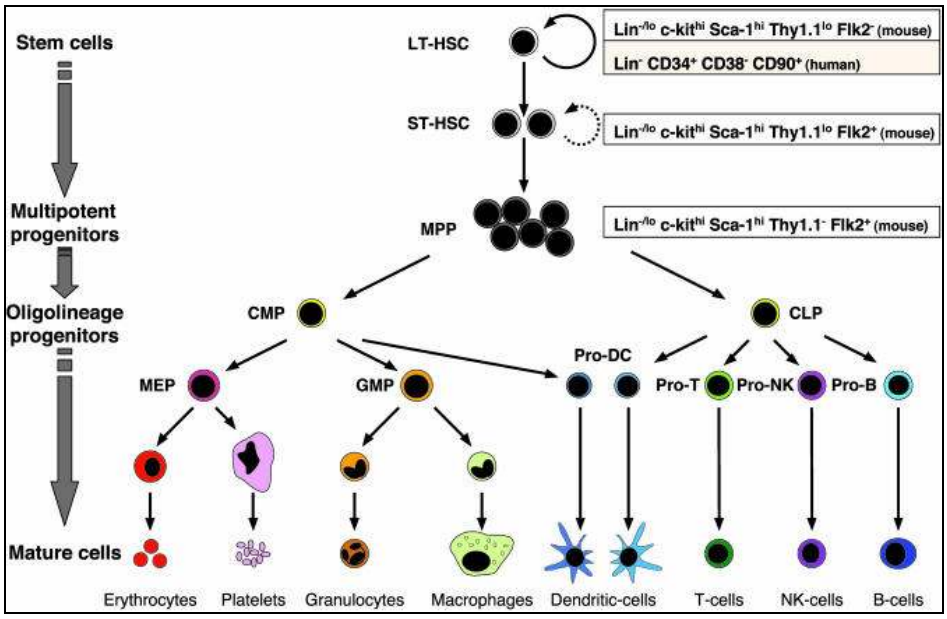


Figure 1: Les différentes lignées de l'hématopoïèse et leur progéniteur.
Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont localisées dans des niches cellulaires qui régulent les choix d'autorenouvellement ou de différenciation des CSH. Les CSH peuvent se différencier uniquement en monocytes, granulocytes, érythrocytes, mégacaryocytes lymphocytes ou NK (Natural Killer). LT-HSC: Long Term-Hematopoietic Stem Cell. ST-HSC: Short Term6Hematopoietic Stem Cell. MPP: MultiPotent Progenitor. CMP: Common Myeloid Progenitor. CLP: Common Lymphoid Progenitor. MEP: Megakaryocyte Erythroid Progenitor. GMP: Granulocytic-Myelomonocytic Progenitor. DC: Dentritic Cell.
(Passegue et al., 2003).

Les CSH sont dotées de deux propriétés majeures : l'autorenouvellement, c'est-à-dire la capacité de se multiplier et de générer une cellule fille identique à elle-même à « l'infini », elles maintiennent de cette façon leur pool à un taux constant et la pluripotence, c'est-à-dire la capacité à générer tous les types cellulaires du système hématopoïétique. Ces caractéristiques sont perdues lorsque les cellules deviennent matures.

Chez l'Homme, les CSH se définissent par les marqueurs phénotypiques Lin^- / $CD34^+$ / $CD38^-$ / $CD90^+$ / $CD45RA^-$ (Seita and Weissman, 2010). Dans des études de greffes secondaires chez la souris immunodéficiente, deux catégories de CSH ont pu être distinguées. La première catégorie : les LT-CSH (Long Term-CSH) a une capacité de reconstitution de l'hématopoïèse à long terme, pendant au moins 6 mois. La seconde possède une capacité de reconstitution plus limitée dans le temps : les ST-CSH (Short Term-CSH) (Yin and Li, 2006). Les CSH se trouvent dans la moelle osseuse, au niveau de sites spécifiques appelés niches, qui constituent un microenvironnement nécessaire au maintien de ces cellules et permettent la régulation de leurs fonctions. Les interactions entre les CSH et leur environnement local permettent de réguler la balance entre l'auto-renouvellement et la différenciation, nécessaire au maintien de leur fonction tout au long de leur vie. Toutes ces cellules effectuent leur maturation dans la moelle osseuse, excepté les cellules à destinée T qui poursuivent leur maturation dans le thymus.

I.2. Le développement lymphocytaire T intrathymique

I.2.1. Le thymus, organe de la lymphopoïèse – Colonisation thymique

I.2.1.1. Le thymus

Le thymus est un organe situé dans le médiastin antéro-supérieur et antéro-moyen au-dessus du cœur. C'est un organe bilobé qui se divise en trois zones : la capsule, le cortex, et la médulla **(Figure 2)**. Son poids d'environ 15g à la naissance régresse proportionnellement par rapport au poids total jusqu'à la puberté pour atteindre 20-30g. Ensuite, un phénomène nommé l'involution thymique engendre une décroissance au rythme théorique d'1 % par an (Aspinall and Andrew, 2000). Chez l'enfant, le thymus est rouge sombre en raison de sa riche vascularisation, il devient progressivement gris puis jaune chez la personne âgée en raison de l'involution adipeuse.

Chez les mammifères, le thymus est l'organe spécialisé dans la différenciation lymphocytaire T (Miller, 1967). Le cortex représente 85 % du thymus et contient la majorité des thymocytes immatures qui prolifèrent activement. La partie externe du cortex contient des cellules épithéliales, appelées cellules nourricières, qui secrètent de nombreuses cytokines assurant l'adhésion, la survie et la prolifération des précurseurs. La médulla contient les thymocytes plus matures qui prolifèrent peu. Les cellules matures compétentes ressortent au niveau des vaisseaux sanguins à la jonction cortico-médullaire où se côtoient précurseurs et cellules matures. Les cellules matures rejoignent les ganglions et la rate par les vaisseaux sanguins.
Le déficit immunitaire sévère qui accompagne l'athymie congénitale du syndrome de Di George reflète parfaitement bien la fonction importante et centrale du thymus dans la lymphopoïèse T (Bockman, 1997).

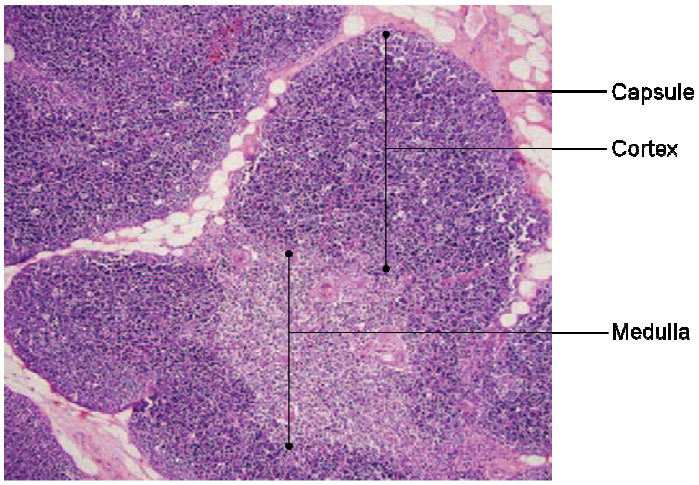


Figure 2 : Photographie d'un lobule de thymus.
Grossissement X10. Coloration à l'hématoxyline.
Inspiré de (Nishino et al., 2006).

I.2.1.2. La colonisation thymique

Les précurseurs lymphoïdes entrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire, zone très vascularisée, par vagues successives tout au long de la vie par des précurseurs non T restreints d'origine médullaire : les TSP (Thymus Seeding Progenitors). Les TSP sont phénotypiquement $CD34^{+}$ / $CD7^{++}$ / $CD45RA^{++}$ / lin^{-}. Cependant, la population $CD7^{+}$ abondante dans le sang de cordon, décline après la naissance (Haddad et al., 2006). Le

progéniteur colonisant le thymus reste cependant en suspens chez l'adulte. Une étude a identifié une population enrichie en potentiel lymphoïde, de phénotype $CD34^+$ / $CD10^+$ / $CD24^-$, dans le sang de cordon et la moelle osseuse (Six et al., 2007). Cette population a également été identifiée dans le sang circulant et le thymus.

Il a été démontré chez la Souris que l'entrée des cellules s'effectue en deux phases : les CSH colonisent les niches pendant une semaine suivie d'une période réfractaire de trois semaines (Foss et al., 2001). La colonisation thymique est donc finement régulée par la disponibilité des niches (Goldschneider, 2006). Le thymus a besoin d'être colonisé en permanence car les cellules qui y rentrent ne s'auto-renouvellent pas (**Figure 3**).

Chez l'Homme, l'ébauche thymique est capable de recevoir ces précurseurs à la $7^{ème}$ semaine de gestation et le développement T y est détectable dès la $8^{ème}$ semaine. A ce stade, les précurseurs thymiques proviennent du foie fœtal (Gale, 1987). A la $16^{ème}$ semaine de gestation, les précurseurs du foie fœtal colonisent la moelle osseuse et qui deviennent source de précurseurs thymiques à partir de la $22^{ème}$ semaine et durant toute la vie post natale (Haynes and Heinly, 1995).

Des molécules d'adressage ainsi que des cytokines jouent un rôle très important dans le processus de « homing » de ces précurseurs vers le thymus. Il est bien établi aujourd'hui, chez la souris, que les récepteurs aux chimiokines CCR9 et CCR7 (C-C Chemokine Receptor type 7 ou 9) jouent un rôle crucial dans la colonisation du thymus (Schwarz et al., 2007; Zlotoff et al., 2010). En effet, des expériences chez la Souris montrent que les cellules de moelle osseuse déficientes en CCR9 ou en CCR7 sont incapables de coloniser le thymus et de générer une lymphopoïèse intra-thymique (Krueger et al., 2010). En revanche, ces mêmes cellules injectées directement dans le thymus sont capables de générer une lymphopoïèse. Les défauts de colonisation du thymus sont plus sévères lorsque les progéniteurs ont un déficit combiné en CCR7 et en CCR9. Ceci montre l'importance de CCR7 et CCR9 dans la colonisation thymique mais pas dans les étapes intra-thymiques de la lymphopoïèse. Les cytokines ont probablement un rôle tout aussi important chez l'Homme mais de telles données ne sont pas disponibles dans la littérature.

La colonisation thymique, dans les conditions physiologiques, dépend donc de l'action coordonnée de l'ensemble des cytokines, molécules d'adhésion et molécules chimiotactiques dont la description exhaustive sort du cadre de ce travail (pour revue voir (Nitta et al., 2011)).

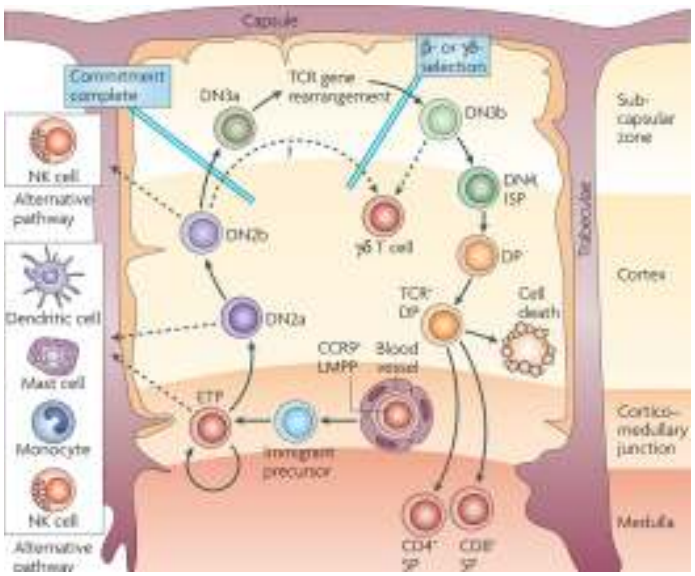


Figure 3: Etapes de la maturation lymphoïde selon les compartiments thymiques.
ETP : Early T Progenitor ; DN : Double Négatif ; ISP : Immature Simple Positif ; DP : Double Positif ; SP : Simple Positif ; NK : Natural Killer.
(Rothenberg et al., 2008).

*I.2.2. **Description phénotypique et immunogénétique des étapes de la différenciation thymique***

Le système immunitaire se caractérise par sa capacité à reconnaître spécifiquement une grande diversité de motifs protéiques (antigènes) et à les combattre lorsqu'ils n'appartiennent pas au soi. Cette reconnaissance se fait grâce aux récepteurs présents sur les lymphocytes : le récepteur des lymphocytes T (TCR) et le récepteur des lymphocytes B (BCR). La différenciation lymphocytaire thymique résulte en la génération des différentes sous-populations lymphocytaires fonctionnelles. Au cours de la maturation thymique, la capacité de différenciation se restreint à la lignée T. Ces étapes se caractérisent à la fois par des marqueurs phénotypiques membranaires et cytoplasmiques bien définis ainsi que par les réarrangements des loci des TCRs. Les réarrangements des différents loci du TCR s'effectuent dans un ordre précis lors de la maturation thymique : premièrement le locus δ suivi du γ et β et du locus α (Blom et al., 1998). Par conséquent, l'absence ou la présence de ces marqueurs phénotypiques ainsi que l'état de réarrangement des quatre loci des TCRs définissent les stades de maturation suivants : le stade Double Négatif (DN), le stade Immature Simple Positif (ISP), le stade Double Positif (DP) et le stade Simple Positif (SP) (**Figure 4**).

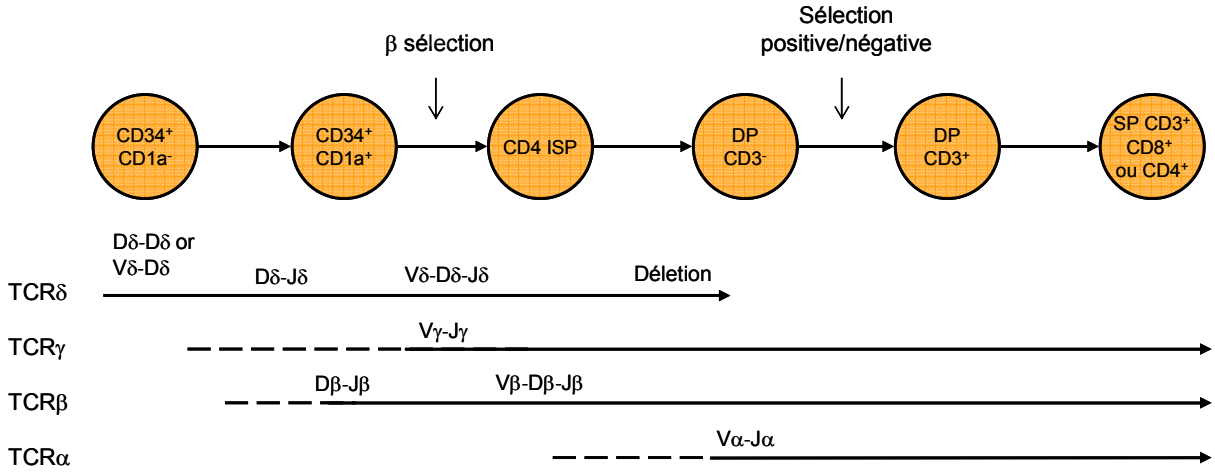


Figure 4 : Description phénotypique et génétique des étapes de la différenciation thymique.
Les cercles représentent les étapes de maturation thymique selon les marqueurs phénotypiques. La partie basse du schéma représente la cinétique des réarrangements des quatre loci du TCR lors de la maturation thymique. ISP : Immature Simple Positif, DP : Double Positif, SP : Simple Positif, TCR : T Cell Receptor.

I.2.2.1. Stade Double Négatif (DN)

Les TSP n'expriment aucun marqueur T précoce tel que CD5, CD2 ou CD1a et ont un potentiel de différenciation T, B, NK et GM (lignées granulocytiques/monocytiques) (Haddad et al., 2004; Hao et al., 2001). Après leur entrée dans le thymus, les TSP se différencient pour donner les thymocytes doubles négatifs. Les DN sont des cellules très immatures qui n'expriment ni le CD4 ni le CD8 ni le CD3. Elles peuvent exprimer des marqueurs d'immaturité tels que le CD13 et le CD33 ainsi que le CD34. Cette catégorie immature de thymocytes $CD34^+$ peut être scindée en deux sous-catégories. La division la plus fréquente s'effectue selon le marqueur CD1a. Les cellules $CD34^+$ / $CD1a^-$ les plus immatures deviennent $CD34^+$ / $CD1a^+$. Les thymocytes $CD34^+$ / $CD1a^-$ peuvent être à leur tour subdivisés selon le marqueur CD38 (Dik et al., 2005b), une catégorie $CD34^+$ / $CD1a^-$ / $CD38^-$ qui devient $CD34^+$ / $CD1a^-$ / $CD38^+$. Cette dernière est nommée ETP pour Early T-Cell Precursors. Ce sont les progéniteurs intra-thymiques de la lignée T les plus immatures. Leur phénotype complet est $CD34^+$ / $CD38^+$ / $CD45RA^+$ / $cCD3^+$ / $CD7^+$ / $CD1a^-$ et $CD5^{dim}$. Les cellules ETP possèdent un potentiel de différenciation T, dendritique et NK (Rothenberg et al., 2008).

Les cellules $CD34^+$ / $CD1a^+$, appelées pré-T, commencent à exprimer des marqueurs T précoces tels que le CD2 et le CD5 et perdent le potentiel de différenciation dendritique et NK

pour ne conserver que la capacité de différenciation en cellules T (Dalloul et al., 1999; Res and Spits, 1999).

Ces thymocytes se définissent également en fonction de l'état des réarrangements des loci des TCRs. La majorité des thymocytes immatures présente les quatre loci en configuration germinale. Cependant, un faible contingent représentant environ 5 % des thymocytes $CD34^+$ / $CD1a^-$ effectuent les réarrangements précoces et incomplets du TCRδ de type Dδ2-Dδ3, Vδ2-Dδ3 et Dδ2-Jδ1 (Blom et al., 1999b). L'utilisation du segment Jδ1 à ce stade laisse suggérer que certaines de ces cellules sont déjà restreintes à la lignée T (Lauzurica and Krangel, 1994). Au stade $CD34^+$ / $CD1a^+$, moins de 15 % des thymocytes ont encore le locus du TCRδ en configuration germinale et des réarrangements complets Vδ1-Jδ1 ou Vδ2-Jδ1 commencent à être observés. De plus, le TCRγ commence à se réarranger et ainsi que le TCRβ avec des réarrangements incomplets Dβ-Jβ voire des réarrangements complets (Dik et al., 2005b). Le locus du TCRα est en configuration germinale.

I.2.2.2. Stade Immature Simple Positif (4ISP)

Ces cellules se caractérisent par le gain de CD4 (sans le CD8) et peuvent être divisées en deux catégories en fonction de l'expression de la chaîne TCRβ intra-cytoplasmique (cTCRβ). Les thymocytes 4ISP exprimant la chaîne TCRβ intra-cytoplasmique ($cTCR\beta^+$) représentent une minorité puisqu'ils ne sont que 10 à 20 % de la population 4ISP totale. Taghon et *al* définissent ces deux sous-catégories selon deux autres marqueurs phénotypiques, les cellules $cTCR\beta^-$ sont $CD28^-$ et $CD71^-$ alors que les thymocytes $cTCR\beta^+$ expriment à la fois le CD28 et le CD71 (Taghon et al., 2009). Ces thymocytes $cTCR\beta^+$ sont en phase de prolifération importante et expriment fortement le CD1a, le CD4 et le CD45RO. Ce stade se caractérise par l'engagement vers la lignée αβ de façon irréversible, les cellules ayant perdu toute autre capacité de différenciation.

Les thymocytes continuent les réarrangements du TCRδ avec des réarrangements complets VDJ de type Vδ1-Jδ1 et Vδ2-Jδ1 majoritairement. Ils poursuivent également les réarrangements du TCRγ avec l'utilisation prioritaire des segments proximaux Vγ10 et Vγ11 (Krangel et al., 1990). Les réarrangements des TCRγ et TCRδ permettront ainsi l'expression d'un récepteur de surface TCR. Les réarrangements complets du TCRβ continuent à

s'effectuer à cette étape. Les thymocytes qui auront effectué un réarrangement productif entreront dans le processus de la β-sélection (Voir paragraphe I.2.3.1).

I.2.2.3. Stade Double positif (DP)

Le stade EDP (Early DP) est un stade intermédiaire, très transitoire, entre les stades 4ISP et double positif. Les thymocytes EDP se caractérisent phénotypiquement selon la combinaison phénotypique $CD4^+$ / $CD8\alpha^+\beta^-$ / $CD3^{dim}$.

Au stade double positif, les cellules expriment les marqueurs CD4 et CD8. Cette catégorie se subdivise en deux, en fonction du marqueur CD3 : les thymocytes $CD4^+$ / $CD8^+$ / CD3 deviennent ensuite $CD4^+$ / $CD8^+$ / $CD3^+$. L'expression du CD3 est concomitante de l'expression d'un TCR de surface αβ ou γδ. Les cellules ayant passé la β-sélection s'engagent dans la lignée αβ. Les thymocytes qui n'avaient pas effectué de réarrangement complet productif du TCRβ au stade 4ISP l'effectuent à ce stade ou deviennent des thymocytes de la lignée γδ. Ainsi, les cellules qui n'ont pas atteint l'étape de β-sélection au stade ISP l'atteignent au stade DP. Par conséquent, l'étape de β-sélection est partagée entre les étapes ISP et DP.

Les réarrangements du locus du TCRα commencent après la β-sélection. Les réarrangements de TCRα induisent une délétion du TCRδ (Voir paragraphe I.3.2.1). Après le réarrangement fonctionnel du locus du TCRα, les cellules se mettent à exprimer un TCRαβ de surface. Les cellules qui n'ont un réarrangement productif du locus du TCRα deviennent quiescentes et meurent par apoptose. Les DP représentent 85-90 % des cellules d'un thymus adulte et, après avoir réarrangé le locus TCRα, subissent la sélection positive et négative (Voir paragraphe I.2.3.2).

I.2.2.4. Stade Simple positif (SP)

Ces cellules représentent environ 15 % des thymocytes. Ce sont les cellules DP qui ont passé avec succès la double sélection positive/négative (Voir paragraphe I.2.3.2) et expriment soit le CD4 soit le CD8 et fortement le complexe CD3/TCR. Les SP correspondent aux cellules T matures sélectionnées. Elles quittent ensuite le thymus et deviennent des lymphocytes T circulants pour accomplir leurs fonctions effectrices. Les lymphocytes Tαβ $CD4^+$ ou $CD8^+$ se

nomment également lymphocytes T auxiliaires (Th) et lymphocytes T cytotoxiques (Tc) respectivement.

I.2.3. ***Les étapes décisives de la maturation thymique***

I.2.3.1. La transition 4ISP-DP : la β-sélection

Les cellules ayant effectué un réarrangement complet productif du TCRβ expriment la chaîne TCRβ intra-cytoplasmique qui va s'associer au pré-Tα (pTα) (Voir ci-dessous) pour exprimer à la surface un pré-TCR. Il s'ensuit alors le phénomène de la β-sélection. Cette étape déterminante de la lymphopoïèse se déroule à la transition CD4ISP – EDP. Ce point de contrôle permet la sélection des thymocytes qui ont réalisé un réarrangement productif du TCRβ. L'expression d'une chaîne TCRβ fonctionnelle conduit à l'inhibition des réarrangements sur le second allèle *via* le signal du pré-TCR. Ce phénomène est connu sous le terme « d'exclusion allélique ». En effet, une étude chez un modèle murin $pT\alpha^{-/-}$ a mis en évidence l'absence d'exclusion allélique (Mombaerts et al., 1992). Après la β-sélection, les thymocytes vont entrer dans une phase de prolifération accrue et continuer leur différenciation en réarrangeant le TCRα tandis que les autres mourront par apoptose. Ainsi, les cellules filles partagent le même réarrangement du TCRβ, mais une chaîne TCRα différente, résultant en une multitude de cellules portant un TCRαβ différent, créant de la diversité supplémentaire. Ce point de contrôle assure l'élimination des thymocytes engagés dans la lignée αβ n'ayant pas réussi à exprimer une chaîne β fonctionnelle.

Le pré-TCR

Le pré-TCR est constitué de la chaîne TCRβ et de la chaîne invariante pTα liées par un pont disulfure et des sous unités ε, γ et δ du CD3. Le pTα est une glycoprotéine de 33 kDa localisée sur le bras court du chromosome 6 (Hayes et al., 2003). Le transcrit du pTα est détectable avant le réarrangement du TCRβ à des niveaux faibles. Son expression est maximale au moment de la β-sélection, et devient indétectable aux stades plus matures (Del Porto et al., 1995; Ramiro et al., 1996). Ce transcrit est restreint à la lignée T. En effet, les cellules $Thy1^{-}$ / $c\text{-}kit^{+}$ du sang fœtal, qui contient des progéniteurs hématopoïétiques, n'expriment pas le transcrit pTα. Aucun ligand n'a été identifié pour le pré-TCR suggérant la

transmission du signal de manière autonome (Irving et al., 1998). En effet, le niveau d'expression très faible du pré-TCR est également un argument en faveur de l'absence de nécessité d'un ligand. Le pré-TCR continue à être exprimé à la surface jusqu'à l'apparition d'un TCRαβ, synonyme de la fin de la β-sélection. De plus, les fonctions du TCR et du pré-TCR ne sont pas interchangeables. En effet, l'expression d'une chaîne TCRα, sans expression du pTα, au stade DN3, provoque des défauts importants lors de la maturation. De plus, des formes tronquées du pTα induisent également des défauts importants suggérant que le pTα est requis dans son intégralité (von Boehmer and Fehling, 1997). Des souris déficientes pour pTα présentent une expression de la chaîne du TCRδ deux à quatre fois plus importante que celle observée chez les souris normales et une expansion des thymocytes γδ (von Boehmer and Fehling, 1997).

I.2.3.2. La transition DP-SP, la sélection positive et négative

Parce que la production des récepteurs antigéniques se fait de manière aléatoire, les récepteurs peuvent être dirigés contre des antigènes étrangers mais aussi contre des antigènes du soi. Cette double sélection positive/négative aboutit à l'élimination d'environ 90 % des thymocytes DP (pour revue (Starr et al., 2003)).

Le processus de sélection positive s'effectue à la jonction cortico-médullaire. Cette première étape sélectionne les thymocytes qui présentent un TCRαβ de surface capable de reconnaître un antigène présenté en association avec une molécule du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) du soi. L'interaction avec une molécule du CMH de classe I conduit à un lymphocyte T SP $CD8^+$ alors que l'interaction avec une molécule du CMH de classe II aboutit à un lymphocyte T SP $CD4^+$.

La sélection négative intervient dans la zone médullaire et permet l'élimination des clones auto-réactifs, c'est-à-dire l'élimination des thymocytes exprimant un TCRαβ capable de reconnaître des peptides du soi. Les cellules T possédant un récepteur incapable de reconnaître une molécule de CMH ne reçoivent aucun signal et vont mourir. En revanche, les cellules T qui reconnaissent les molécules du CMH avec une faible affinité vont passer avec succès la sélection négative et vont devenir des cellules matures.

L'éducation thymique assure ainsi la génération des différentes populations lymphocytaires T, non auto-réactives et immunocompétentes, qui vont par la suite quitter le thymus et migrer dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques).

I.2.3.3. Détermination des lignées αβ versus γδ

Les lymphocytes T matures se caractérisent par l'expression d'un TCR de surface αβ ou γδ. Cette expression de surface est mutuellement exclusive. Les étapes successives qui aboutissent à l'expression d'un TCRαβ ou d'un TCRγδ à la surface d'un lymphocyte sont très différentes.

La lignée γδ dérive très tôt à partir d'un précurseur DN, elle ne passe ni par le stade DP ni par la β-sélection. Ces lymphocytes Tγδ sont majoritairement DN. La lignée αβ, quant à elle, passe par le stade DP et la β-sélection et les cellules matures αβ expriment soit le marqueur CD4 soit le CD8.

Les lymphocytes Tγδ représentent environ 5 % des lymphocytes T périphériques. Les 95 % restants sont des lymphocytes Tαβ.

Deux grandes théories s'opposent pour expliquer le développement Tαβ *versus* Tγδ. Elles sont basées essentiellement sur la cinétique et le caractère productif ou non des remaniements des TCRs δ, γ et β.

<u>Modèle des réarrangements séquentiels</u> (Dudley et al., 1995)

Selon ce modèle, la cinétique des réarrangements des TCRs est déterminante pour le choix de la lignée αβ ou γδ. Durant le développement T, les loci des TCRδ et γ sont les premiers à se réarranger. Si ces deux réarrangements sont productifs, cela serait suffisant pour induire un engagement vers la lignée γδ. Si les réarrangements ne sont pas productifs, la cellule peut alors réarranger les loci des TCRβ et TCRα et devenir une cellule de la lignée αβ. Cela est suggéré par le fait que des réarrangements non productifs des TCRδ et TCRγ sont identifiés dans des cellules αβ. Une cellule qui est devenue αβ ne peut plus revenir vers la lignée γδ du fait de la délétion du locus du TCRδ lors du réarrangement du TCRα.

Une variante de ce même modèle existe dans lequel une cellule pourrait devenir αβ ou γδ selon que le TCRβ ou les TCRγ et TCRδ effectuent des réarrangements productifs en premier.

Dans ce cas, de nombreux réarrangements non productifs de TCRβ seraient identifiés dans la ligne γδ. Il serait plus facile de devenir une cellule αβ car un seul réarrangement productif est nécessaire, celui du locus du TCRβ, contrairement à deux dans le cas de la voie γδ (Livak et al., 1997).

Modèle de lignée distincte ou de pré-engagement

Dans ce modèle, le précurseur est pré-engagé vers la lignée αβ ou γδ avant même le début des réarrangements des TCRs. Des réarrangements productifs et l'expression à la surface d'un TCR appropriée (Pré-Tα ou TCRγδ) seraient nécessaires pour permettre la maturation du précurseur pré-engagé (Ciofani et al., 2006; Haks et al., 2005; Hayes et al., 2005).
Dans une variante de ce modèle, la prédétermination vers la lignée αβ serait régulée par la délétion du locus *via* le réarrangement δrec-ψJα {de Villartay, 1988 #424}. En effet ces remaniements non fonctionnels sont retrouvés, très fréquemment, dans les thymocytes humains et ont pour conséquence le rapprochement des segments Vα et Jα ce qui facilitera leur réarrangement.
De plus, une étude chez la souris a identifié *Sox13* comme un gène spécifique de la lignée γδ. Un modèle murin transgénique Sox13 a permis de montrer que ce facteur de transcription promeut la différenciation vers la lignée γδ mais pas αβ. En revanche, un modèle déficient pour Sox13, montre une absence de différenciation vers la lignée γδ au profit de la ligne αβ (Melichar et al., 2007).

I.3. Les loci des TCRs

I.3.1. Généralités

Le TCR exprimé à la surface des lymphocytes T, est un hétérodimère glycoprotéique transmembranaire constitué de deux chaînes (αβ ou γδ) unies par un pont disulfure et associées de façon non covalente aux chaînes du CD3 (ε, ζ, δ et γ). Chaque chaîne du TCR comporte un domaine variable (V) et un domaine constant (C).
Les gènes qui codent pour chacune des chaînes du TCR présentent une organisation similaire et comparable à celle des gènes des Ig (Immunoglobuline). Ils subissent un réarrangement

somatique avant de devenir fonctionnels. La partie variable résulte de l'assemblage de différents segments géniques : V (Variable), D (Diversité, uniquement pour les chaînes β et δ), et J (Jonction), séparés par de l'ADN intronique sur des distances importantes. Leur recombinaison crée une séquence unique clono-spécifique.

I.3.2. ***Description des différents loci***

I.3.2.1. Le TCR α/δ

Le locus TCRα/δ humain se situe sur le bras court du chromosome 14 en position q11 et s'étend sur 1 Mb. Il se caractérise par l'inclusion du locus TCRδ au sein de locus TCRα. (**Figure 5**).

Le locus TCRδ

Le locus du TCRδ se délimite par les segments δrec et ψJα. Il se compose de trois segments D, de quatre segments J et de huit segments V dont trois qui lui sont propres (Vδ2, Vδ1 et Vδ3), les cinq autres segments V (Vδ4/Vα14, Vδ5/Vα23, Vδ6/Vα29, Vδ7/Vα36 et Vδ8/Vα38-2) sont communs avec le locus du TCRα. Le segment Vδ3 est particulier par son orientation inverse et sa position en aval du segment Cδ, suggérant un mécanisme d'inversion (Voir paragraphe II.1.2.1) lors du réarrangement (Takihara et al., 1988).

Les réarrangements incomplets du locus du TCRδ s'effectuent aux stades les plus précoces de la thymopoïèse ($CD34^+$ / $CD1a^-$) avec l'utilisation des segments non T restreints (Vδ2, Dδ2 et Dδ3). En effet, l'utilisation du segment Jδ1 signifie l'entrée définitive dans la lignée T (Lauzurica and Krangel, 1994). Les cellules de LAL-B (Leucémies Aiguës Lymphoblastiques B) peuvent présenter des réarrangements incomplets de TCRδ de type Dδ2-Dδ3 ou Vδ2-Dδ3 mais ces cellules n'utilisent jamais le segment Jδ1, exclusivement réservé à la lignée T (Lauzurica and Krangel, 1994). Les réarrangements complets de type V(D)J s'effectuent au stade $CD34^+$ / $CD1a^+$. Il est intéressant de noter que le segment Dδ1 n'est que peu ou pas utilisé lors des réarrangements de ce locus. Le locus de TCRδ, de par sa position, est délété lors du réarrangement Vα-Jα du locus TCRα.

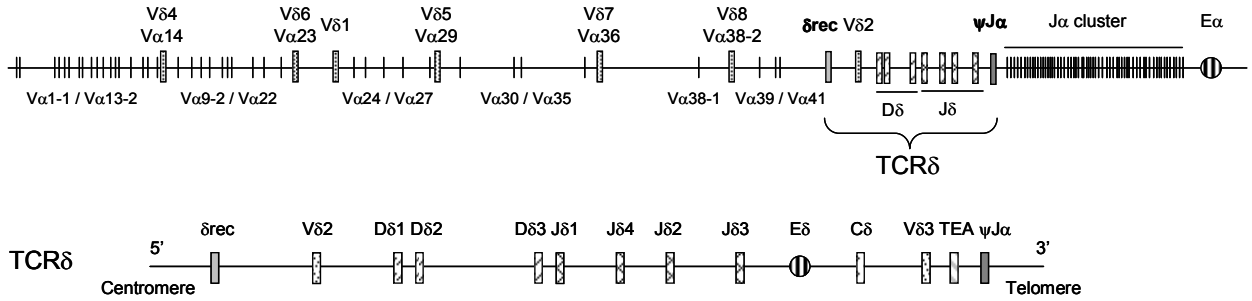


Figure 5 : Représentation schématique du locus TCRα/δ.
Représentation globale du locus α/δ avec le locus TCRδ enchâssé dans le locus du TCRα (schéma du haut). Zoom sur le locus du TCRδ (schéma du bas), δrec et ψJα délimitant le locus du TCRδ.

Le locus TCRα

Ce locus se compose de cinquante-quatre segments V, de soixante et un segments J et d'aucun segment D. Ces segments V et J se divisent en trois classes, les segments proximaux, les segments centraux et les segments distaux (Hawwari and Krangel, 2007).

Lors du réarrangement de ce locus au stade DP, les segments V proximaux se réarrangent plus volontiers avec les segments J proximaux. Si le réarrangement produit n'est pas productif, le processus d' « on-going » se met en place avec une utilisation des segments V et J plus distaux jusqu'à l'obtention d'un réarrangement productif (**Figure 6**). Cette délétion peut survenir à un stade plus précoce lors de réarrangements de type δrec et ψJα, limitant le locus du TCRδ (**Figure 5**). Les réarrangements Vα-Jα se produisent sur les deux allèles de façon relativement synchrone aboutissant à l'absence d'exclusion allélique (Malissen et al., 1992).

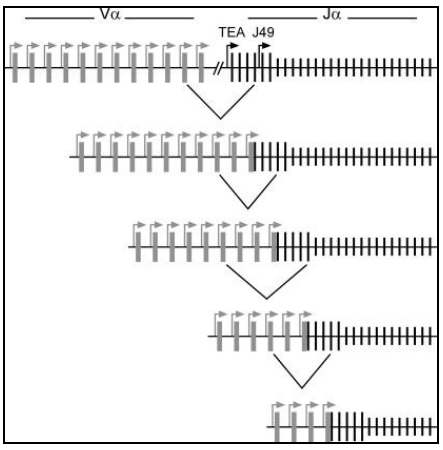


Figure 6 : Modèle de recombinaison « on-going » du TCRα.
Les barres grises et les barres noires représentent les segments V et les segments J respectivement. TEA ; T Early Alpha.
(Hawwari and Krangel, 2007).

Avant le début du réarrangement du TCRα, un transcrit stérile est détectable, il s'agit d'un transcrit débutant au niveau du promoteur TEA (T Early α) jusqu'au segment Cα (**Figure 7**). Ce transcrit subit ensuite un épissage rapprochant les segments TEA et Cα, synonyme de la mise en place de réarrangements génomiques du TCRα {Wilson, 1996 #427}. Il a été proposé que ce transcrit jouerait un rôle dans l'ouverture du locus TCRα (Mauvieux et al., 2001; Wilson et al., 1996).

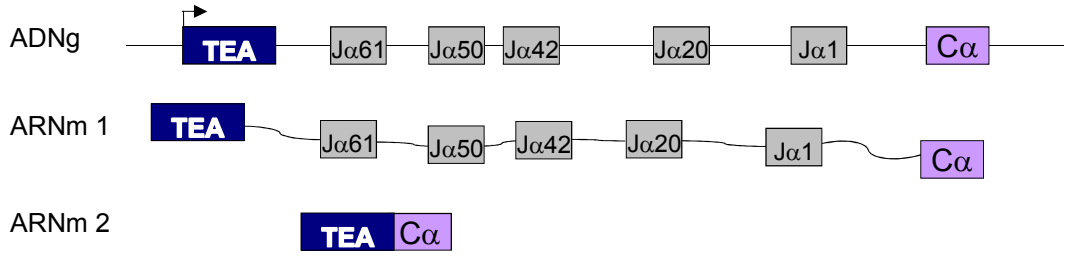


Figure 7: Représentation schématique de la transcription germinale du TCRα.
ARNm1 représente la transcription totale du locus, ARNm2 représente le transcrit après épissage.
TEA : T Early α.

I.3.2.2. Le TCR γ

Le locus du TCRγ est situé sur le bras court du chromosome 7 (7p14) et s'étend sur 160 kb. Il est composé de quatorze segments V et de cinq segments J. Il n'existe pas de segment D dans ce locus. Les segments Vγ2, Vγ3, Vγ4, Vγ5 et Vγ8 sont très homologues et sont regroupés dans la famille VγfI. Les segments Vγ9, Vγ10 et Vγ11 constituent chacun une famille, respectivement VγfII, VγfIII et VγfIV. Les segments Jγ se divisent en deux groupes : un premier groupe situé en amont du segment Cγ1 qui se compose des segments JP1, JP et Jγ1 et le second groupe situé en amont du segment Cγ2 composé des segments JP2 et Jγ2 (**Figure 8**). Les réarrangements impliquant les segments Vγ9/10/11 et les Jγ (JP et JP1/2) sont plus fréquents pendant la vie fœtale, et sont donc considérés comme des remaniements immatures comparés aux réarrangements effectués avec les segments distaux (VγfI/Jγ1/2) (Krangel et al., 1990).

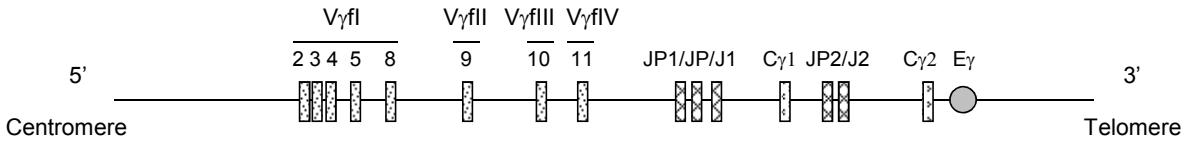


Figure 8 : Représentation schématique du locus du TCRγ.

I.3.2.3. Le TCR β

Le locus du TCRβ est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q35) et s'étend sur 620 kb. Il est composé de quarante-huit segments V fonctionnels et de deux clusters D-J : un premier cluster qui comprend le segment Dβ1 et six segments Jβ1 de Jβ1.1 à Jβ1.6 et un second cluster avec le segment Dβ2 et sept segments Jβ2, de Jβ2.1 à Jβ2.7. Le segment Vβ30 est un segment particulier du fait de sa position en aval des segments Jβ (**Figure 9**).

Les premiers réarrangements du TCRβ impliquent les segments Dβ et Jβ avec des réarrangements Dβ1-Jβ1/2 et Dβ2-Jβ2. Cependant de rares réarrangements Dβ2-Jβ1 peuvent être effectués lors de remaniements inter-alléliques. Les segments V sont utilisés dans un second temps. Il est acquis que les deux allèles β se réarrangent au même moment pour faire deux Dβ-Jβ, contrairement au remaniement complet Vβ-Dβ-Jβ qui s'effectue sur un allèle. De ce fait, lorsqu'il est productif, il empêche le réarrangement VDJβ sur le second allèle. Ainsi, un même thymocyte ne peut réaliser qu'une seule chaîne du TCRβ. Ce processus est appelé exclusion allélique et n'a été démontré que dans le locus du TCRβ au sein des loci des TCR (pour revue (Krangel, 2009)).

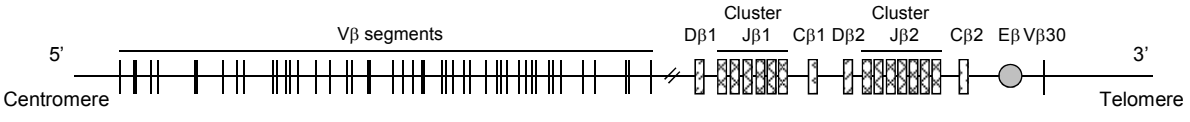


Figure 9 : Représentation schématique du locus du TCRβ.

I.4. ***Principales différences entre les lymphopoïèses humaine et murine***

Bien que les lymphopoïèses humaine et murine soient proches, il n'en demeure pas moins qu'il existe des différences au niveau phénotypique et au niveau de la structure des loci des TCRs.

I.4.1. ***Différences phénotypiques***

Les différences phénotypiques sont majeures puisque chez la souris les stades DN se caractérisent par les marqueurs CD44 et CD25 (non le CD34 et le CD1a). Ces deux marqueurs ne sont pas exprimés chez l'Homme au même stade. Les marqueurs CD44, CD25 et CD117 ainsi que l'état de réarrangements des loci des TCRs ont permis de définir quatre sous-groupes au sein des populations immatures : DN1 à DN4 (**Figure 10**).
Les thymocytes au stade DN1 sont $CD44^+$ / $CD25^-$ / $CD117^-$ et portent l'ensemble des loci des TCRs en configuration germinale. Ces cellules correspondent aux cellules les plus immatures identifiables et gardent un potentiel de différenciation B, NK et monocytaires (Ardavin et al., 1993; Godfrey et al., 1993). Elles se différencient ensuite en DN2, stade marqué par l'acquisition du CD25 et du CD117. À ce stade, les réarrangements du locus du TCRδ commencent alors que tous les autres loci restent en configuration germinale. Ces cellules gardent uniquement un potentiel de différenciation T, NK et dendritique (Godfrey et al., 1992; Moore and Zlotnik, 1995; Wu et al., 1996). Le stade DN3 se caractérise par la perte des marqueurs CD44 et CD117. Ce groupe peut être divisé en deux sous-groupes selon le marqueur CD27 qui identifie positivement les cellules ayant réalisé un réarrangement productif du TCRβ. Un réarrangement productif permettra l'association avec le pré-Tα et l'entrée en β-sélection synonyme de passage au stade DN4. Le marqueur CD25 disparaît et la chaîne β est fortement exprimée. À ce stade, l'engagement Tαβ est irréversible (Ciofani et al., 2006). Ensuite, arrive l'étape ISP caractérisée chez la Souris par l'expression isolée du CD8 (Blom et al., 1998), puis le stade DP marqué par le réarrangement du locus TCRα et l'expression du TCRαβ de surface. Enfin, comme chez l'Homme, la sélection du répertoire va aboutir aux populations SP CD4 ou CD8.

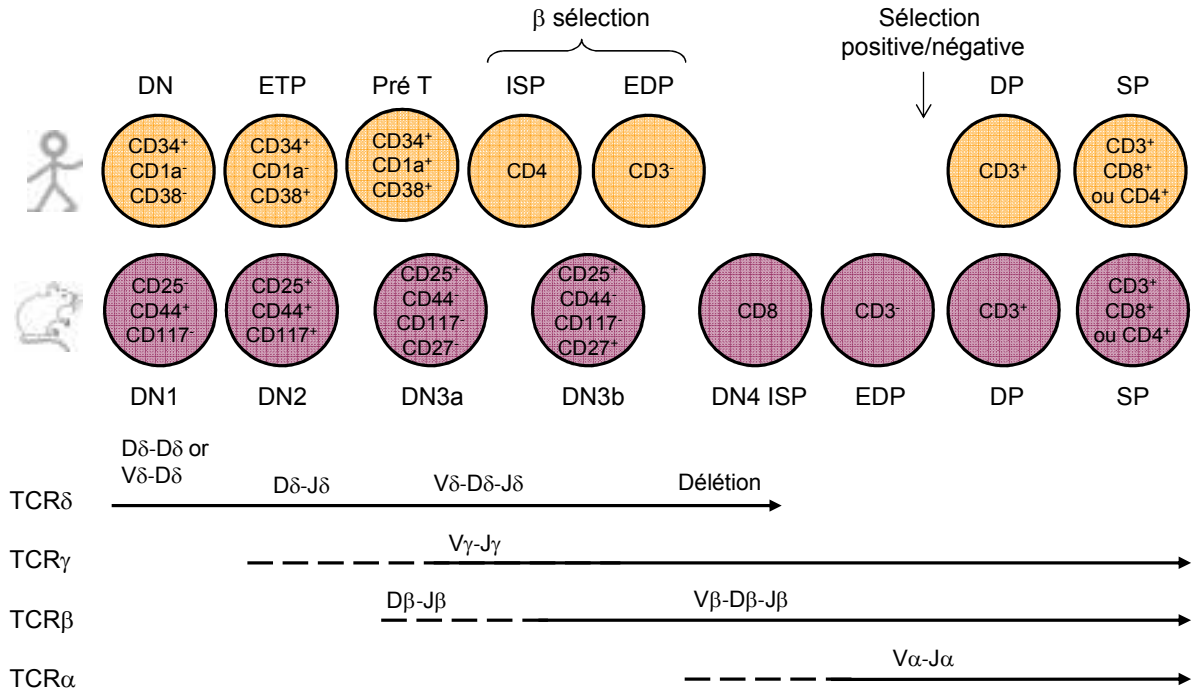


Figure 10 : Principales différences phénotypiques et génotypiques entre l'Homme et la Souris.
DN: Double négatif, ISP: Immature Simple Positif, DP: Double positif.

*I.4.2. **Différences dans la configuration des loci des TCRs***

Bien que la cinétique des réarrangements des différents loci des TCRs soit identique entre l'Homme et la Souris, il existe des différences notables dans la configuration génomique des loci et dans la séquence des segments. Je développerai à titre d'exemple le locus du TCRδ.

Le locus du TCRδ murin se compose de deux segments Dδ, deux segments Jδ et cinq segments Vδ qui lui sont spécifiques, les autres segments V étant partagés avec le locus du TCRα. Cette première différence est structurelle ; il existe des différences également dans la séquence génomique des segments et des RSS (Recombination Signal Sequence) (**Figure 11**). Toutes ces divergences laissent suggérer des différences de régulation lors du processus de recombinaison.

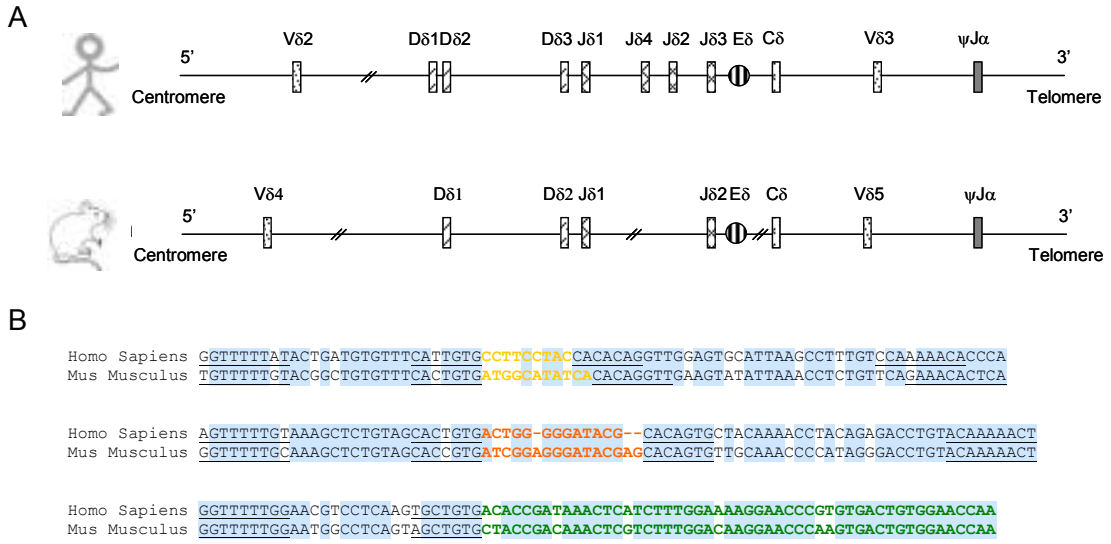


Figure 11 : Différences entre les loci des TCRδ humain et murin.
A. Schéma représentant le locus du TCRδ chez l'Homme et la Souris.
B. Alignement de séquences des segments Dδ2 (jaune) Dδ3 (rouge) et Jδ1 (vert) chez l'Homme et la Souris. Les séquences des heptamères et nonamères des RSS sont soulignés. Les nucléotides surlignés en bleu sont identiques entre les deux espèces.

I.5. La régulation de la thymopoïèse

Le développement lymphoïde T est hautement régulé tout au long des différentes étapes qui se succèdent, chacune étant caractérisée par le gain et/ou la perte de marqueurs phénotypiques et la mise en place séquentielle des réarrangements des loci des TCRs. La figure 12 représente la complexité des facteurs intervenant dans la régulation de l'ontogénie T (**Figure 12**). Cependant, je ne développerai ici que les facteurs importants à la compréhension des résultats présents dans ce travail.

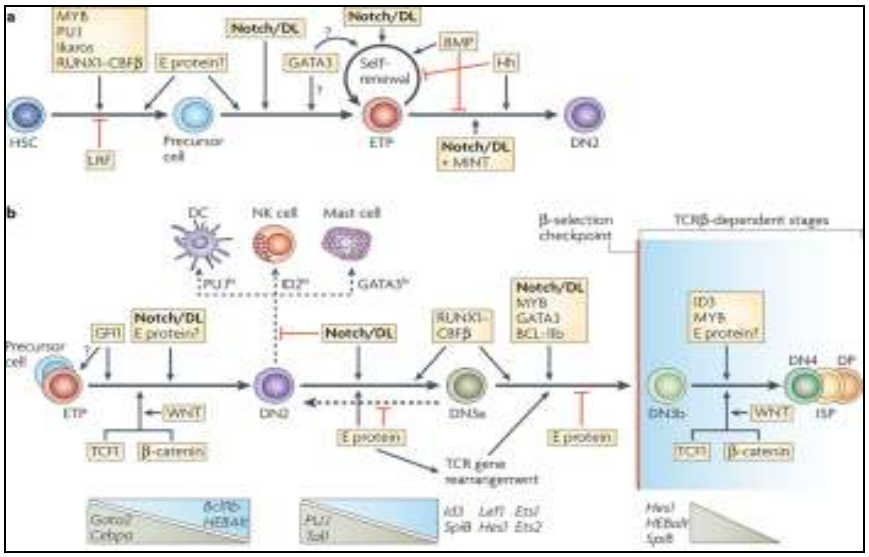


Figure 12 : Représentation des facteurs essentiels lors du développement T précoce.
(Rothenberg et al., 2008).

I.5.1. ***Le rôle de NOTCH1***

Il existe chez les mammifères quatre récepteurs NOTCH (1 à 4), très conservés au cours de l'évolution, dont la plupart des fonctions sont distinctes et non redondantes (Tanigaki and Honjo, 2007). Le récepteur NOTCH1 est codé par le gène *NOTCH1*, localisé sur le chromosome 9 en p34.3. La protéine NOTCH1 est un récepteur membranaire possédant trois parties distinctes : une partie extracellulaire, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire. Les ligands spécifiques de NOTCH1 appartiennent à deux familles : la famille Jagged (Jagged 1 et 2) et la famille Delta-Like (DL1, DL3 et DL4).

L'activation de cette voie s'effectue par la fixation du ligand à son récepteur ce qui induit deux clivages successifs, le premier, par une métalloprotéase de la famille des ADAM, libérant ainsi la partie extracellulaire et le second par une γ-secrétase clivant la partie transmembranaire libérant ainsi la zone intracellulaire de NOTCH1 (ICN1) (Aster et al., 2008; Brown et al., 2000). La forme ICN1 va ensuite être transloquée dans le noyau et se fixer sur les promoteurs de ces gènes cibles, tels que *HES1*, *HEY1, DTX1* (Deltex1), GATA3 et MYC permettant ainsi l'activation de leur transcription. La voie NOTCH1est régulée par la protéine FBXW7 (F-Box and WD repeat domain containing 7) (Maser et al., 2007; O'Neil et al., 2007; Thompson et al., 2007). Cette protéine fait partie de la famille des E3 ligases. Elle se fixe sur un domaine spécifique de NOTCH1: le domaine PEST (proline, glutamic-acid,

serine and threonine rich) et entraîne ainsi l'ubiquitinilation de NOTCH1 et sa dégradation par le protéasome (**Figure 13**).

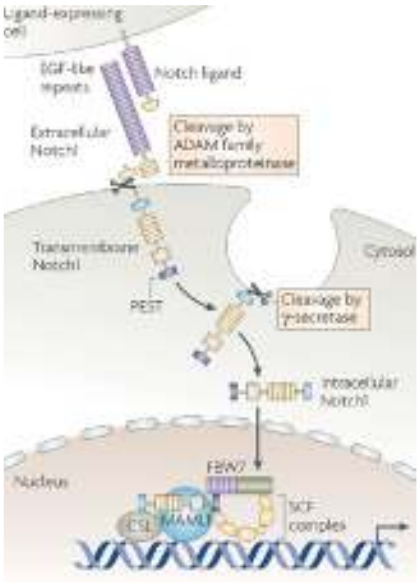


Figure 13 : Voie d'activation de NOTCH1.
(Aifantis et al., 2008)

La communication entre les thymocytes exprimant les récepteurs NOTCH d'une part et les cellules stromales exprimant leur ligand d'autre part est capitale au développement des lymphocytes T. Le rôle de cette protéine est donc essentiel lors du développement T et son action intervient à différentes étapes du développement.

NOTCH1 jouerait tout d'abord un rôle dans la génération et le maintien des CSH au cours de l'embryogenèse (Varnum-Finney et al., 2000). L'implication la plus importante est dans la spécification de la lignée T. Il a été démontré que l'activation de NOTCH1 dans la moelle osseuse induit le développement de cellules T alors que son extinction dans le thymus permet l'apparition de lymphocytes B immatures (Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999). NOTCH1 intervient également à un stade un peu plus tardif, lors de la β-sélection. En effet, l'inactivation de NOTCH1 avant le stade DN3 altère fortement la lignée αβ mais pas la voie γδ et bloque partiellement le développement des thymocytes au stade précédant la β-sélection (Wolfer et al., 2002). Juste après la β-sélection, NOTCH1 joue un rôle au niveau de la prolifération. En effet, Taghon et *al*. ont montré que la co-culture de progéniteurs $CD34^+$ / $CD1a^+$ sur des cellules stromales OP9 (sans ligand de NOTCH1) entraîne une différenciation

en DP en l'absence de prolifération. Enfin, NOTCH1 joue également un rôle important dans l'engagement vers la lignée αβ. La surexpression de NOTCH1 dans des thymocytes induit une différenciation αβ alors qu'une mutation hétérozygote conduit vers la lignée γδ.
De façon générale, le système de culture OP9-DL1 démontre bien l'importance de la voie NOTCH1 dans l'orientation T. La co-culture de cellules $CD34^+$ de sang de cordon sur ces cellules stromales permet la différenciation en cellules T matures alors que la culture de ces mêmes cellules sur les cellules stromales sans DL1 ne permet pas la différenciation vers la lignée T (Porritt et al., 2004).

I.5.2. ***Le rôle des facteurs de transcription***

Les facteurs de transcription sont des protéines majoritairement nucléaires qui permettent l'activation ou l'inhibition de gènes cibles par fixation sur des séquences ADN promotrices ou enhancers.

I.5.2.1. AML1/RUNX1

RUNX1/AML1 (Acute Myeloid Leukemia 1) fait partie d'une famille composée de quatre membres : *RUNX1*, *RUNX2*, *RUNX3* et *CBFβ.* Cette famille se caractérise par la présence d'un domaine de 128 pb appelé « runt domain ». Le domaine runt permet la liaison à l'ADN *via* une séquence consensus TGTGGT. CBFβ est un co-facteur qui s'hétérodimérise avec RUNX1, il correspond à la sous-unité β du « core binding factor ». CBFβ ne se lie pas directement à l'ADN mais augmente de six à dix l'affinité du domaine runt de RUNX1 pour l'ADN (Ogawa et al., 1993) et le protège de la protéolyse (Huang et al., 2001). Le gène *RUNX1* s'étend sur 260 kb sur le bras long du chromosome 21. Il contient neuf exons et deux promoteurs : un promoteur distal (P1) et un promoteur proximal (P2) (Ghozi et al., 1996). Douze isoformes différentes peuvent être générées et par conséquent de multiples protéines comprises entre 20 kDa et 52 kDa sont décrites (**Figure 14**). Le promoteur P2 joue un rôle majeur dans l'hématopoïèse embryonnaire et la thymopoïèse puis est remplacé par le promoteur P1 dans les étapes plus tardives (Pozner et al., 2007).

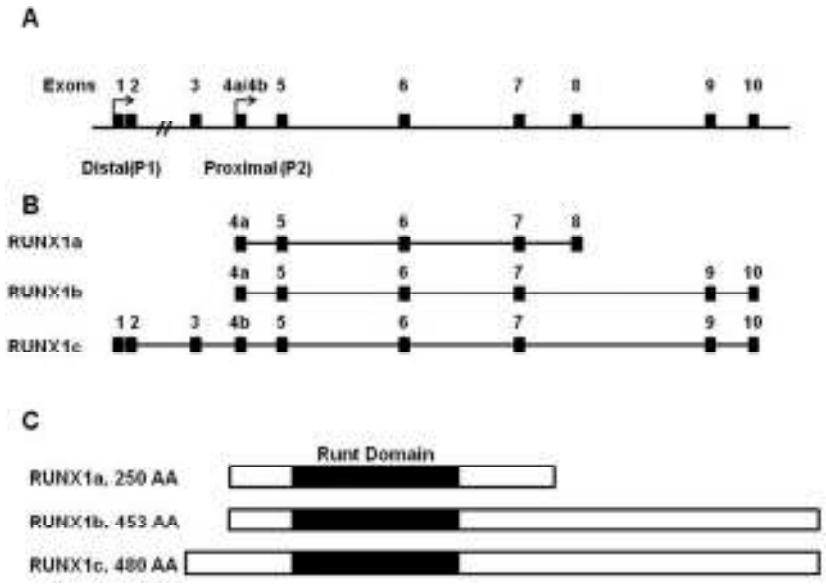


Figure 14 : Représentation schématique du gène, des transcrits et des protéines de RUNX1.
A. Le locus de *RUNX1* avec la position des deux promoteurs : P1 (promoteur distal) et P2 (promoteur proximal).
B. Représentation des trois transcrits générés en fonction du promoteur et du codon stop utilisé.
C. Représentation des trois isoformes protéiques majoritaires.
(Lam and Zhang, 2012).

Le rôle de RUNX1 a d'abord été décrit durant l'hématopoïèse définitive. En effet, le KO (Knock Out) homozygote de RUNX1 ou de CBFβ chez des embryons de souris entraîne les mêmes conséquences : un profond blocage de l'hématopoïèse définitive et une mortalité embryonnaire entre E12.5 et E13.5 (Wang et al., 1996). Son rôle a ensuite été décrit lors de la thymopoïèse. Deux modèles murins de KO pour RUNX1 ont été décrits, le Mx1-Cre (Taniuchi et al., 2002) et le lck-Cre (Ichikawa et al., 2004). Le premier modèle de KO RUNX1 dans des cellules de moelle osseuse transplantées dans une souris receveuse irradiée a révélé une incapacité totale de développement de la lignée T. L'analyse des thymocytes a révélé un profond blocage de maturation au stade DN2 des cellules du donneur. Cependant, aucun gène cible de RUNX1 et aucun mécanisme moléculaire n'ont été mis en évidence pour expliquer ce blocage au stade DN2. Le modèle lck-Cre, quant à lui, induit une augmentation de la proportion des thymocytes au stade DN3 au détriment des thymocytes DN4. La différence entre ces deux modèles peut s'expliquer par l'apparition plus tardive de l'expression lck-Cre par rapport à Mx1-Cre pendant la thymopoïèse. RUNX1 joue également un rôle très important dans la régulation de l'expression du CD4. En effet, RUNX1 se fixe sur le silencer du CD4 ce qui permet l'absence d'expression de ce marqueur dans les thymocytes immatures alors qu'au stade DP, RUNX1 permet l'activation du CD8. Cette protéine a également un rôle plus tardif puisqu'il a été montré que la diminution par deux du dosage de

RUNX1 ou sa surexpression dans des cellules DN affecte la différenciation T. La plupart des modèles murins présentant une diminution du dosage de RUNX1 montre une diminution du nombre de thymocytes et un ratio SP4/SP8 anormal (Hayashi et al., 2000) sans présenter de blocage dans la différenciation. La surexpression du domaine runt de RUNX1 par le promoteur du CD2 dans des cellules T bloque la transition DP-SP (Hayashi et al., 2000). Enfin, RUNX1 joue un rôle très important dans la régulation des réarrangements des TCRβ et TCRα en se fixant sur l'enhancer β et α (Voir paragraphe suivant).

I.5.2.2. ETS1

ETS1 fait partie de la famille des facteurs de transcription ETS (E26-*Transformation Specific*). Cette famille se définit par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN ; le domaine ETS. Ce domaine reconnaît spécifiquement les séquences d'ADN présentant le motif GGAA/T. Le gène *ETS1* humain peut donner deux protéines, une forme longue (p54) et une forme courte (p42), ces deux formes sont souvent co-exprimées. La protéine ETS1 est divisée en six domaines (**Figure 15**). Les domaines A, B, D et F sont des domaines de régulation et le domaine C est un domaine d'activation. Le domaine E est le domaine de liaison à l'ADN (domaine ETS). La protéine ETS1 est majoritairement localisée dans le noyau. La délétion du domaine ETS relocalise la protéine dans le cytoplasme démontrant que le NLS (Nuclear Localization Signal) se situe dans ce domaine (Boulukos et al., 1989). ETS1 interagit fonctionnellement et physiquement avec de nombreuses autres protéines. Les interactions protéiques peuvent s'effectuer avec n'importe quel domaine d'ETS1 et peuvent à la fois induire l'activation de gènes, réprimer l'activité de ETS1 ou réprimer l'activité de gènes cibles. La protéine ETS1 est produite dans de nombreux tissus. Cependant chez l'adulte, l'expression d'ETS1 est restreinte aux tissus lymphoïdes (Ghysdael et al., 1986) et est exprimée dans les cellules B et T à tous les stades du développement (Anderson et al., 1999).

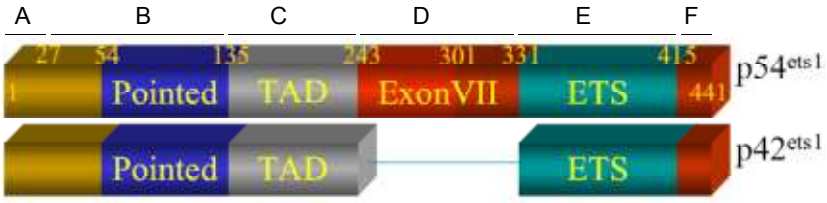


Figure 15 : Protéines ETS1.
Chaque lettre (A, B, C, D, E, F) correspond à un domaine de la protéine ETS1. TAD : Transcription Activation Domain.
Inspiré de (Dittmer, 2003).

La fonction majeure d'ETS1 se situe dans le développement hématopoïétique. En effet, une étude a montré que chez des souris déficientes pour ETS1, les cellules T présentent un défaut dans la réponse aux signaux d'activation et meurent par apoptose (Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995). ETS1 se fixe sur le « core » de l'enhancer alpha (Eα) avec deux autres partenaires protéiques RUNX1 et LEF-1, pour ainsi former l'enhanceosome alpha (Giese et al., 1995) (**Figure 16**). La fixation de ces trois protéines sur le « core » de Eα induit les réarrangements génomiques du TCRα (Giese et al., 1995; Ho et al., 1990; Ho et al., 1989; Roberts et al., 1997). Les séquences consensus de liaison d'ETS1 et de RUNX1 sont très souvent concomitantes.

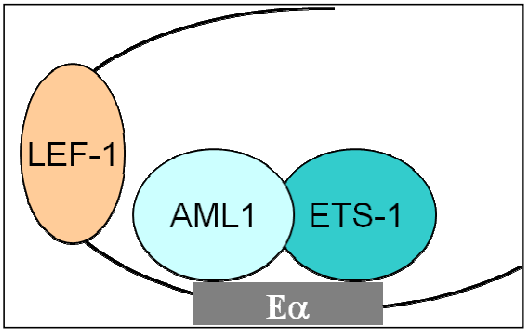


Figure 16 : Schéma de l'enhanceosome Alpha.

I.5.2.3. Les autres facteurs de transcription

Les membres de la famille bHLH (Helix-Loop-Helix) tels que *E12*, *E47*, *HEB*/*TCF12* (TransCription Factor 12) et *E2-2* sont également impliqués dans le développement T (Engel

and Murre, 2001). Les antagonistes naturels des E protéines, les Id protéines induisent une inhibition totale du développement T lorsqu'elles sont surexprimées au profit des cellules NK (Blom et al., 1999a; Heemskerk et al., 1997). Il est donc important que les expressions des E et Id protéines soient finement régulées en fonction de la destinée T ou NK de la cellule.
Un autre facteur de transcription fortement impliqué dans le développement T est *GATA3* (Pai et al., 2003). Ce dernier joue un rôle dans le développement précoce. En effet sa surexpression dans des précurseurs thymiques $CD34^+$ induit le développement de cellules DP (Taghon et al., 2001). De plus, l'absence de GATA3 dans les ETP n'augmente pas l'apoptose et ne dérégule pas le cycle cellulaire (Hosoya et al., 2009). Ceci suggère que GATA3 régule la différenciation T mais pas la survie ou la prolifération des progéniteurs T précoces. Enfin, l'expression de GATA3 diminue fortement autour de la β-sélection, suggérant un rôle dans le réarrangement et/ou la traduction du TCRβ. En effet, la surexpression de GATA3 induit une diminution de la protéine TCRβ (Taghon et al., 2001).
Certaines études ont suggéré que de nombreux autres facteurs de transcription comme *Ikaros*, *Myb* et *TCF1* jouent également un rôle important dans la production et/ou la différenciation des premiers progéniteurs de la lignée T (Emambokus et al., 2003; Schilham et al., 1998). La description exhaustive de ces facteurs sort du cadre spécifique de cet exposé.

I.5.3. ***Le rôle des cytokines***

Une grande variété de facteurs solubles sont produits par les cellules stromales thymiques ; ceci influence probablement le processus de maturation thymique. Des études utilisant des anticorps bloquants ont permis de mettre en évidence de nombreuses cytokines et récepteurs à cytokines impliqués à différents stades du développement intrathymique (Moore and Zlotnik, 1995). Cependant, des modèles murins déficients pour les récepteurs ou les cytokines ne présentent pas de troubles dans le développement thymique. Deux cytokines majeures ont été identifiées : l'interleukine 7 (IL-7) et le SCF (Stem Cell Factor).

I.5.3.1. Interleukine 7

Le gène de l'interleukine 7 (*IL-7*) se situe sur le bras court du chromosome 8 et code pour une protéine de 177 acides aminés de 20 kDa. Le récepteur à l'IL-7 (IL-7R) est composé de deux chaînes : IL-7Rα et γc.

Des défauts au niveau des gènes codant pour *IL-7Rα* (Giliani et al., 2005; Puel et al., 1998) ou *γc* (Noguchi et al., 1993; Russell et al., 1993) sont liés au syndrome sévère d'immunodéficience combiné (SCID) et à une réduction extrême du nombre de cellules T. L'inhibition du récepteur à l'IL-7 par un anticorps empêche l'expansion et la différenciation du développement T. Ces données montrent le rôle majeur de l'IL-7 dans la survie et la prolifération des précurseurs lymphoïdes. Des cultures FTOC (Fetal Thymic Organ Culture) de précurseurs $CD34^+$ en présence d'anticorps anti-IL-7R montrent un blocage total au stade $CD34^+$ / $CD1a^+$ (Plum et al., 1996) et l'absence de réarrangement complet du TCRβ (Sleasman et al., 1994).

La signalisation de l'IL-7 passe par la voie JAK/STAT et par la voie PI3K/AKT **(Figure 17)**. Ces deux voies promeuvent la survie, l'une en activant *BCL-2* (B Cell Leukemia/Lymphoma 2) et *MCL-1* (Myeloid Cell Leukemia 1) l'autre en phosphorylant la protéine pro-apoptotique *BAD* (BCL2-Associated agonist of cell Death). Cette phosphorylation protège la cellule de la mort en séquestrant BAD dans le cytosol (Jiang et al., 2005).

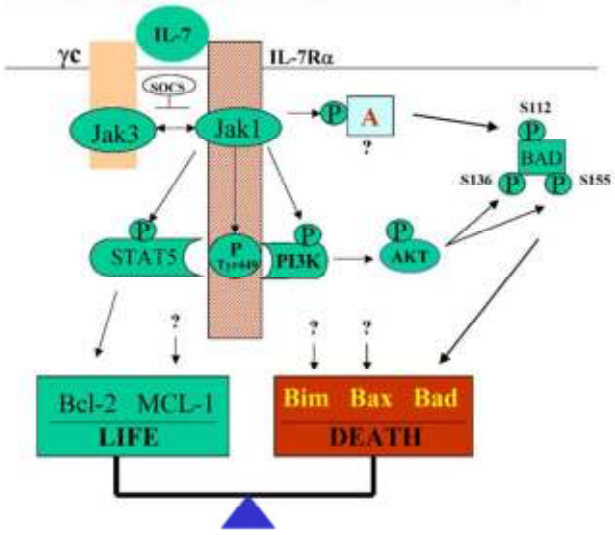


Figure 17 : Voie d'activation de l'IL-7.
(Jiang et al., 2005).

I.5.3.2. SCF

Le facteur SCF interagit avec son récepteur c-kit (CD117) exprimé par les précurseurs lymphoïdes aux stades précoces. Son expression s'éteint dès l'engagement dans la lignée T, c'est-à-dire au stade DN3, après les réarrangements complets du TCRβ. Des mutations inactivatrices du SCF ou de son récepteur sont permissives au développement de toutes les lignées hématopoïétiques mais s'accompagnent d'une diminution de 40 fois du nombre de cellules $CD44^+$ / $CD25^-$. Des cellules thymiques déficientes pour c-kit présentent une diminution de 50 % du nombre de divisions suggérant le rôle majeur du SCF dans la prolifération. Le SCF agit également sur la survie cellulaire. Des expériences de culture *in vitro* en présence de SCF ont permis de mettre en évidence son rôle anti-apoptotique (Andrew and Aspinall, 2001).

II. La recombinaison V(D)J

II.1. Mécanismes de la recombinaison V(D)J

II.1.1. Acteurs de la recombinaison V(D)J

II.1.1.1. Les Séquences Signal de Recombinaison (RSS)

Les séquences signal de recombinaison se situent de part et d'autre d'un segment V, (D) ou J d'un TCR. Elles se composent d'un nonamère et d'un heptamère séparés par un espaceur de 12 ou 23 paires de base, ce qui identifie les 12 RSS et les 23 RSS **(Figure 18)**. L'heptamère et le nonamère sont conservés et leurs séquences consensus sont respectivement CACAGTG et ACAAAAACC. Cependant, la plupart des heptamères et des nonamères ont une séquence dégénérée et les nucléotides soulignés ci-dessus sont conservés à plus de 95 % (Ramsden et al., 1994)

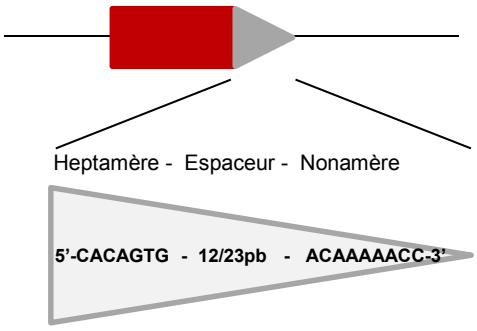


Figure 18 : Représentation schématique d'une RSS.
Le triangle rouge représente un segment TCR et le triangle gris une RSS (Recombination Signal Sequence). La partie basse du schéma indique les séquences consensus de l'heptamère et du nonamère.

Il est intéressant de noter que l'intégrité de l'heptamère et notamment du CAC en 5' est importante pour une bonne efficacité de la recombinaison ainsi que le AA en position 5 et 6 du nonamère. En effet, une approche de recombinaison *in vitro* avec des substrats de recombinaison présentant des mutations sur les nucléotides très conservés des RSS a mis en évidence le rôle essentiel de l'heptamère dans la formation des cassures de l'ADN. Le rôle des autres résidus moins conservés n'est pas clairement défini, mais les variations de ces

nucléotides sont fortement corrélées avec le degré d'efficacité de la RSS (Cowell et al., 2003). L'espaceur a une séquence beaucoup plus variable que l'heptamère et le nonamère. Cependant, une étude a démontré le rôle nécessaire de l'espaceur. En effet, un espaceur différant de 12 ou 23 pb diminue considérablement la fixation des protéines RAG ainsi que le clivage. Si sa longueur est modifiée pour un nombre de paires de bases (18 ou 29 pb), le clivage est inhibé mais partiellement rétabli avec un espaceur de 33pb (Cuomo et al., 1996; Ramsden et al., 1996). Le nonamère permet la fixation de RAG1 *via* son domaine NBD (Nonamere Binding Domain). L'heptamère, quant à lui, possède au moins deux rôles. Il améliore la fixation de RAG sur la RSS et spécifie le site de clivage. Les segments V et J possèdent une seule RSS (12 ou 23 RSS selon le TCR), alors que les segments D possèdent deux RSS : une 12 RSS et une 23 RSS.

La règle 12/23 et la restriction B12/23

Lors de la recombinaison V(D)J, la règle 12/23 s'applique, c'est-à-dire qu'une 12 RSS ne va agir qu'avec une 23 RSS (Sakano et al., 1980). Il a été montré qu'*in vivo* ou en présence d'extrait lymphoïde, le réarrangement entre une 12 RSS et une 23 RSS est 25 à 50 plus efficace qu'entre deux 12 RSS ou deux 23 RSS (Eastman et al., 1996; van Gent et al., 1996). Une recombinaison entre deux 12 RSS ou deux 23 RSS n'est jamais observée physiologiquement.

L'analyse des réarrangements du locus du TCRβ, dans lequel il a été mis en évidence que la 12 RSS des Dβ, et non la 12 RSS des Jβ, est capable d'effectuer un réarrangement avec une 23 RSS Vβ a permis de mettre en évidence un niveau de régulation supplémentaire : la restriction B12/23 (Beyond the 12/23 rule) (Bassing et al., 2000).

La restriction B12/23 est maintenue dans les systèmes *ex vivo* utilisant des cellules non lymphoïdes et des substrats de recombinaison extra-chromosomiques (Jung et al., 2003; Tillman et al., 2003). De même, cette restriction est maintenue dans les systèmes *in vitro* utilisant des substrats de recombinaison non chromatiniens et des protéines RAG purifiées. La restriction B12/23 est donc indépendante d'une structure chromatinienne particulière ; seuls les RSS imposent cette restriction et elle s'applique à tous les loci Ig et TCR (Jung et al., 2003). Des expériences *in vivo* et *ex vivo* de l'étude des cassures aux niveaux de différentes RSS ont permis d'établir que la restriction B12/23 est imposée au moment ou juste avant l'étape de clivage (Tillman et al., 2002; Tillman et al., 2003).

II.1.1.2. Les protéines RAG1/2

Le locus des gènes *RAG* (Recombination Activating Gene) se situe sur le bras court du chromosome 11. Il est peu commun puisque les gènes *RAG1* et *RAG2* sont séparés par environ une quinzaine de kb et orientés en sens inverse (**Figure 19**). Les gènes *RAG* ne possèdent pas d'intron et leurs séquences sont très similaires, entre 50 et 90 % d'homologie selon les espèces. Ces deux protéines sont des endo-nucléases qui ont pour fonction de créer des coupures double brin de l'ADN lors de la recombinaison V(D)J.

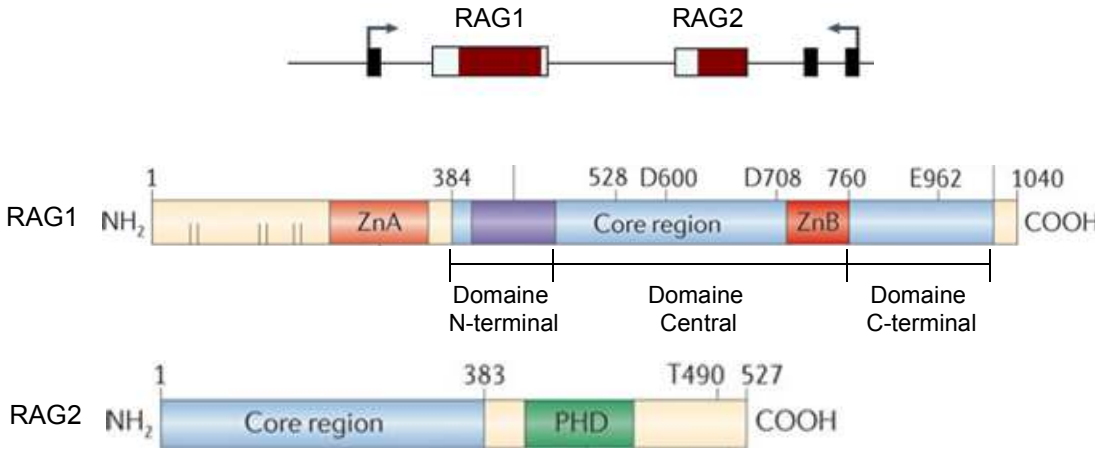


Figure 19 : Représentation schématique des protéines RAG1 et RAG2.
Le schéma du haut représente l'organisation des gènes RAG1 et RAG2 sur l'ADN avec les flèches représentant leurs promoteurs respectifs. La partie basse du schéma représente les protéines RAG1 et RAG2 avec leurs différentes parties « core » et non « core ». PHD : Plant HomeoDomain, Zn : zinc domain.
Inspiré de (Schatz and Ji, 2011).

Les protéines RAG1 et RAG2 sont spécifiques de la lignée lymphoïde et nécessaires à la recombinaison V(D)J. La recombinaison V(D)J nécessite la coopération des protéines RAG1 et RAG2 bien que des délétions de grandes zones de ces protéines n'affectent pas la recombinaison. En effet, la zone minimum nécessaire à la recombinaison V(D)J est le domaine « core ».Ainsi, des souris déficientes pour l'un ou l'autre des gènes *RAG* ne peuvent pas effectuer de recombinaison V(D)J et présentent une absence totale de cellules B et T matures. D'autres mutations provoquent une activité partielle des protéines ayant pour conséquence une immunodéficience appelée syndrome d'Omenn (Aleman et al., 2001; Sobacchi et al., 2006; Villa et al., 1998). Les patients atteints de ce syndrome présentent un nombre de cellules T en périphérie variable, aisément détectable, dû à une expansion

oligoclonale d'un faible nombre de précurseurs T. Ces souris ne présentent pas d'autres anomalies ce qui renforce l'idée que les protéines RAG ont des fonctions uniquement dans le système immun. Chez l'Homme, des mutations des gènes *RAG1* ou *RAG2* entraînent un syndrome sévère combiné d'immunodéficience (Schwarz et al., 1996; Villa et al., 1998; Villa et al., 2001). Des mutations dans le domaine PHD de *RAG2* ou une diminution de le méthylation de l'histone H3K4me3 entraîne une réduction de l'efficacité de la recombinaison V(D)J suggérant le rôle majeur de RAG2 dans la reconnaissance de l'histone H3K4me3 (Liu et al., 2007; Matthews et al., 2007).

La protéine RAG1 est le principal composant de la fixation à l'ADN et possède tous les principaux sites qui catalysent le clivage de l'ADN. RAG1 se divise en deux parties. La partie N-terminale (non « core ») contient des éléments responsables de l'interaction avec les protéines partenaires. Cette région contient également un domaine de dimérisation, ZDD (Zinc-binding Dimerization Domain). La deuxième zone de la protéine RAG1 est le « core » domaine qui peut se subdiviser en trois régions distinctes. Le domaine N-terminal qui contient le NBD permettant l'interaction avec le nonamère, le domaine central qui joue un rôle dans la coupure simple brin et médie l'interaction avec l'heptamère et le domaine C-terminal (CTD) qui permet la coupure double brin de l'ADN et médie l'interaction avec le segment adjacent à la RSS. La partie extrême du CTD collabore avec RAG2 pour moduler la fixation et le clivage RAG induit (Fugmann et al., 2000).
La protéine RAG2 est un cofacteur vital pour la fixation à l'ADN et le clivage de l'ADN. RAG2 peut être divisée en trois régions : la région N-terminale qui contenant six motifs Kelck-like qui médient l'interaction avec RAG1, une seconde région charnière acide et une région C-terminale qui contient un domaine PHD (Plant HomeoDomain) qui fixe l'histone H3K4me3. La région extrême de RAG2 contient un résidu thréonine (T490) très conservé qui permet la régulation de la dégradation de RAG2. Ce résidu est phosphorylé par Cdc2 (Cell Cycle kinase 2) lors de la dégradation de RAG2 (Lin and Desiderio, 1993) (**Figure 19**).

Contrairement aux protéines entières RAG_{FL} qui sont insolubles et/ou inactives, les « core-RAG » (cRAG) ont l'avantage d'être solubles. Ces dernières ont pu être purifiées et utilisées dans des expériences de recombinaison *in vitro* (McBlane et al., 1995).

Régulation de l'expression des protéines RAG

L'expression des protéines RAG est spécifique aux cellules lymphoïdes en développement, et, de plus, est restreinte à certains stades de leur différenciation (Shinkai et al., 1992). Les souris transgéniques qui expriment de manière constitutive les protéines RAG présentent une lymphopénie sévère et meurent prématurément (Barreto et al., 2001; Wayne et al., 1994). Ainsi, une régulation stricte de l'expression de ces protéines est nécessaire.

L'expression des protéines RAG évolue pendant la différenciation des cellules lymphoïdes. De plus, la cinétique d'expression des protéines RAG1 et RAG2 est très différente entre l'Homme et la Souris. En effet, chez la Souris deux vagues d'expression sont observées : une première vague d'expression de RAG1 aux stades précoces suivie d'une deuxième vague d'expression de RAG1 et RAG2 au stade DP (Wilson et al., 1994). Chez l'Homme, les expressions de RAG1 et RAG2 se superposent avec un niveau d'expression faible au stade DN et SP et un pic d'expression au moment des réarrangements complets du TCRβ et du TCRα (Dik et al., 2005b).

L'étude de la régulation de l'expression des protéines RAG met en évidence une régulation complexe effectuée par différents éléments *cis*-régulateurs (Schlissel, 2003). En plus des éléments promoteurs propres à chaque protéine RAG (**Figure 19**) d'autres éléments qui s'apparentent à des enhancers ont été définis. Deux études ont mis en évidence une région, localisée en 5' du gène *RAG2*, qui contient tous les éléments nécessaires à la régulation de l'expression des deux protéines (Monroe et al., 1999a). Une étude basée sur la stratégie de transgénèse avec les BAC, a mis en évidence un élément « anti-silencer » qui agit spécifiquement sur un « silencer » situé entre les deux gènes *RAG* (Yannoutsos et al., 2004).

Un autre enhancer, appelé D3, a également été caractérisé, il est situé à une dizaine de kb en 5' du gène RAG2, et semble être impliqué dans l'expression spécifique des protéines RAG aux stades pro-T et Pro-B (Wei et al., 2002).

L'expression des protéines RAG1 et RAG2 est finement régulée dans les thymocytes. En effet, il a été démontré que la demi-vie de la protéine RAG1 est de 15 minutes (Spanopoulou et al., 1995). La protéine RAG2, quant à elle, s'accumule préférentiellement en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Lin and Desiderio, 1995) suivi d'une diminution de 20 fois avant l'entrée en phase S.

II.1.2. ***Biochimie de la recombinaison V(D)J***

II.1.2.1. Généralités

La recombinaison V(D)J s'effectue en deux étapes. Une première étape RAG dépendante qui va permettre la formation d'une cassure double brin de l'ADN entre la RSS et le segment codant. La deuxième étape fait intervenir le complexe de réparation de l'ADN NHEJ (Non Homologous End Joining).

Lors du clivage de l'ADN RAG induit, quatre extrémités d'ADN sont ainsi générées. Lors de la réparation par la voie NHEJ, la fusion des deux RSS forme le joint signal (SJ) et la fusion des deux segments codants donne le joint codant (CJ). Deux mécanismes sont décrits lors du réarrangement V(D)J : le réarrangement par inversion et le réarrangement par délétion (**Figure 20**). Ce dernier, uniquement, induit la formation d'un SJ qui peut également être nommé épisome ou TREC (T-Cell Receptor End Coding) pour les loci des TCR. Ce morceau d'ADN ainsi généré est le reflet de l'activité thymique et peut être quantifié. Cependant, les TREC ne se répliquent pas et disparaissent au fur et à mesure des divisions cellulaires (Loeffler et al., 2002). Leur présence témoigne donc du caractère « néo-formé » du lymphocyte.

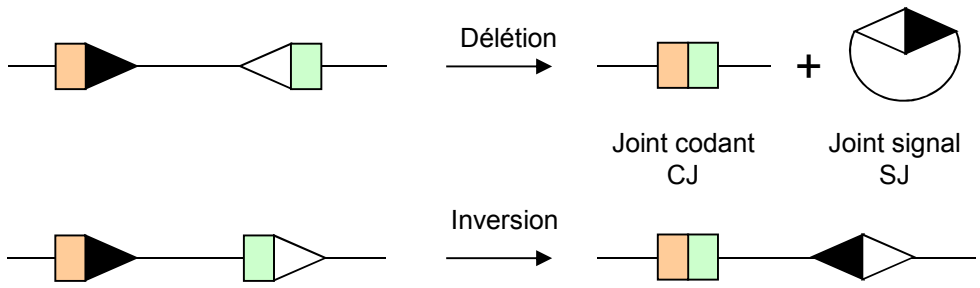


Figure 20 : Produits finaux de la recombinaison V(D)J en fonction de l'orientation des RSS.
Les carrés verts et orange représentant des segments, les triangles blancs et noirs les 12 et 23 RSS. CJ : Joint Codant, SJ : Joint Signal.

II.1.2.2. Les cassures de l'ADN RAG induites

La première phase de la recombinaison V(D)J est réalisée par les protéines RAG, la réaction débute par la reconnaissance des RSS par les protéines RAG et la formation d'un complexe

RAG/RSS stable. Le complexe synaptique se définit par la présence de deux segments géniques ramenés à proximité par l'association RAG/RSS.
La protéine RAG1, *via* son domaine NBD, va se fixer sur le nonamère d'une RSS. La protéine RAG2 ne se fixe pas directement sur l'ADN mais sur RAG1 pour stabiliser le complexe RAG/RSS. Plusieurs études ont mis en évidence le modèle de pré-association dans lequel RAG1 et RAG2 s'associeraient entre elles pour ensuite se fixer sur la RSS (Jones and Gellert, 2002). Il semble donc que les protéines RAG forment un complexe, reconnaissent le nonamère *via* RAG1 puis l'heptamère ce qui stabilise le complexe. Ce complexe est également stabilisé par les protéines HMGB1/2 (High Mobility Group Protein). En effet, il a été démontré que le complexe contient deux protéines RAG1, deux protéines RAG2 et une protéine HMGB1 ou HMGB2 ainsi qu'une 12 RSS et une 23 RSS (Grundy et al., 2009). Les protéines HMGB induisent probablement une déformation/courbure de l'ADN qui permet une meilleure fixation des protéines RAG sur la RSS. Cependant, les fonctions des protéines HMGB, qui ne se limitent pas à la recombinaison V(D)J, sont très nombreuses et aucune étude de KO n'a été menée.

Deux modèles sont proposés concernant la formation du complexe synaptique, le modèle d'association et le modèle par capture.
Le modèle d'association suggère que les protéines RAG se fixent sur une 12 RSS et une 23 RSS puis que les protéines RAG interagissent entre elles pour former le complexe synaptique. Dans le modèle par capture, qui semble favorisé par de nombreux travaux (Jones and Gellert, 2002), les protéines RAG se fixeraient sur une 12 ou 23 RSS puis incorporeraient la seconde RSS n'ayant pas fixé de protéines RAG (**Figure 21**). Dans ce dernier modèle, il a été décrit une meilleure formation du complexe synaptique et un meilleur clivage. Un système d'étude *in vitro* des coupures simple brin (CSB) introduites au niveau des RSS par les protéines RAG supporte aussi ce modèle par capture (Curry et al., 2005).

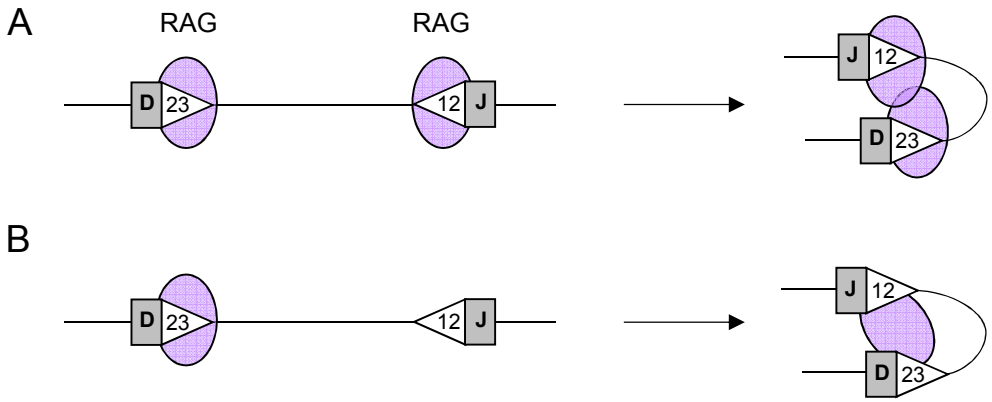


Figure 21 : Modèle d'association RAG/RSS.
A. Le modèle par association suggère une fixation des protéines RAG sur les deux RSS puis une interaction entre ces deux protéines dans le complexe synaptique.
B. Le modèle par association propose une fixation des protéines RAG sur une seule des deux RSS, puis le recrutement de la deuxième RSS dans le complexe synaptique.

Une fois le complexe RAG/RSS formé, les protéines RAG induisent dans un premier temps une coupure simple brin de l'ADN, entre la première base de l'heptamère et la dernière base de la séquence codante. La coupure simple brin de l'ADN est également appelée « nick ». Une extrémité 3'OH est libérée au niveau de la séquence codante et une extrémité 5'P sur l'heptamère. L'extrémité 3'OH est utilisée comme nucléophile pour attaquer la liaison phosphate du brin opposé dans une réaction de *trans*-estérification ce qui entraîne la cassure double brin de l'ADN (CDB). L'extrémité codante (CE) arbore ainsi une structure en épingle à cheveux et l'extrémité RSS (SE) une cassure franche (Fugmann et al., 2000; Gellert, 2002) (**Figure 22**).

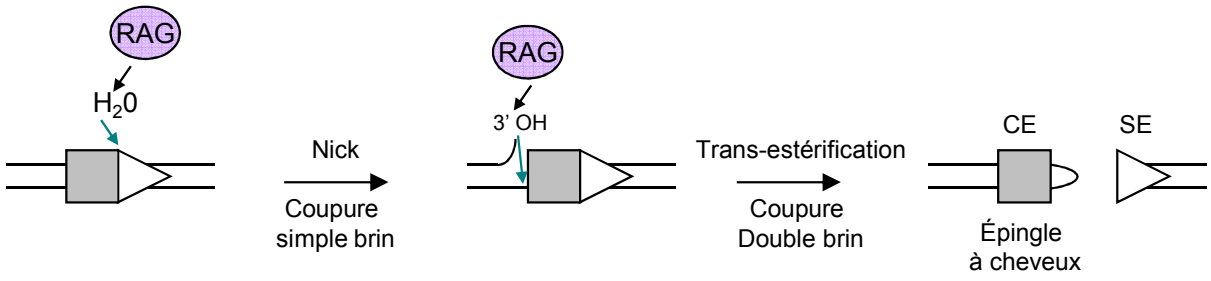


Figure 22 : Formation de la cassure double brin de l'ADN, réaction de *trans*-estérification.
La première étape consiste à générer une cassure simple brin, par les protéines RAG, à la bordure du segment puis l'extrémité 3'OH formée va attaquer le brin opposé pour créer une cassure double brin de l'ADN, par une réaction de *trans*-estérification. Les produits sont une CE avec une structure en épingle à cheveux et une SE avec une extrémité franche. CE : Coding End, SE : Signal End.

Ces deux étapes successives de clivage sont strictement dépendantes des ions métalliques divalents (Hiom and Gellert, 1997). En effet, en absence de cation divalent, les protéines RAG sont incapables de fixer les RSS. Le rôle de ces cations est d'activer une molécule d'eau pour permettre l'attaque nucléophile sur le groupement phosphate à l'étape de CSB. Ces cations jouent également un rôle important lors de la réaction de *trans*-estérification. C'est pourquoi, les expériences de recombinaison *in vitro* sont essentiellement effectuées avec du calcium (Ca^{2+}), du magnésium (Mg^{2+}) ou du manganèse (Mn^{2+}).

II.1.2.3. Mécanismes de réparation

La deuxième phase de la recombinaison V(D)J implique la réparation des coupures double brin de l'ADN RAG induites avec pour objectif final la formation d'un joint codant (CJ). Il existe deux voies de réparation des cassures double brin, la recombinaison homologue (HR) et la voie de réparation NHEJ. Les cassures double brin lors de recombinaison V(D)J sont réparées par la voie NHEJ. La voie NHEJ se compose de sept membres, Ku70, ku80, DNA-PK_{cs} (DNA-Dependent Protein Kinase), Artemis, DNA ligase-IV, XRCC4 (X-ray Repair Cross Complementing protein 4) et XLF-Cernunnos (XRCC4-Like Factor) (Lieber, 2008).
Juste après les CDB, les protéines RAG restent fixées sur l'ADN au niveau des SE dans un complexe CPC (Complexe Post Clivage). Ce complexe est transitoire et va ensuite évoluer en un complexe SEC (Signal End Complex) qui contient les SE et les protéines RAG. La formation de ce complexe est le point final de l'étape RAG dépendante.
Le complexe de réparation de l'ADN NHEJ intervient ensuite et va ouvrir les deux épingles à cheveux (**Figure 23**). Cette coupure est médiée par les protéines Ku/DNA-PK_{cs} et Artemis entre le nucléotide 4 et 5 en 3' du sommet de la structure en épingle à cheveux (Ma et al., 2002). La coupure est asymétrique et génère une extrémité simple brin plus longue qui va servir de matrice ; des nucléotides vont être ajoutés pour reconstituer une séquence double brin. Ces nucléotides se nomment nucléotides P pour Palindromique. À ce même moment, la délétion de nucléotides peut s'effectuer sur le simple brin ainsi formé *via* l'activité endonucléase d'Artemis. Le mécanisme de cette délétion est mal connu. La dégradation subséquente à l'addition de nucléotides P peut également être réalisée. Dans ce cas aucun nucléotide P ne sera observé au niveau du CJ. Ensuite, interviennent les autres enzymes du complexe NHEJ : XRCC4, Ligase-IV et XLF-Cernunnos ; ces protéines vont permettre la ligation des deux extrémités libres (Grawunder et al., 1997; Li et al., 1995). À cette étape,

intervient, une enzyme exprimée uniquement dans les lymphocytes en cours de réarrangements : la TDT (Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase). Celle-ci va ajouter des nucléotides au niveau de la jonction des deux segments codants, les nucléotides n (non-templated). L'ajout des nucléotides P et n permet la diversité des récepteurs antigéniques. Cependant, l'ajout et la perte de nucléotides se répercutent directement sur le cadre de lecture de la protéine. Ainsi, un seul joint codant sur trois est en phase de lecture et peut donner une protéine fonctionnelle.

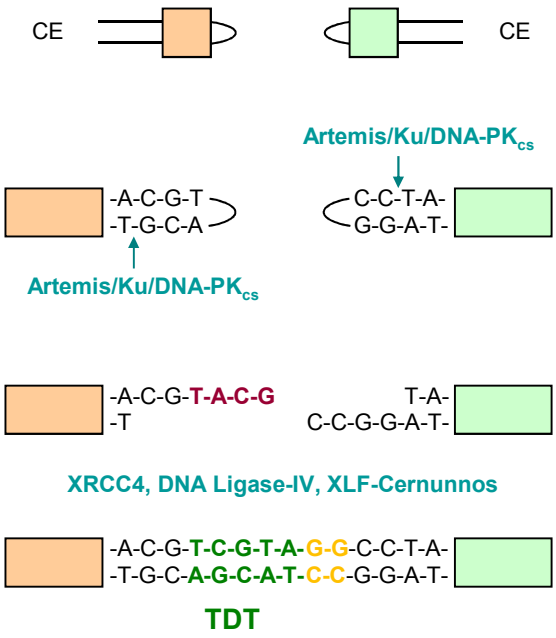


Figure 23 : Diversité jonctionnelle aux joints codants.
Les carrés verts et orange représentent des segments TCR. Les nucléotides en orange sont perdus lors du processus de réparation, les nucléotides verts et orange représentent les n et P nucléotides respectivement. CE : Coding End, TDT (Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase).

Un modèle murin présentant des mutations qui entraînent une perte de fonction de Ku, DNA-PK$_{cs}$, Artemis, XRCC4 ou de la DNA ligase IV présente un phénotype SCID dû à un défaut de formation du CJ ou de l'épingle à cheveux. (Pour revue (Dudley et al., 2005)). De plus, des délétions de deux composants de la voie NHEJ et de p53, dans un modèle murin, provoquent des tumeurs lymphoïdes agressives avec des translocations chromosomiques, marque d'une recombinaison V(D)J défectueuse (Dudley et al., 2005; Gao et al., 2000).

Les protéines du complexe NHEJ (Figure24).

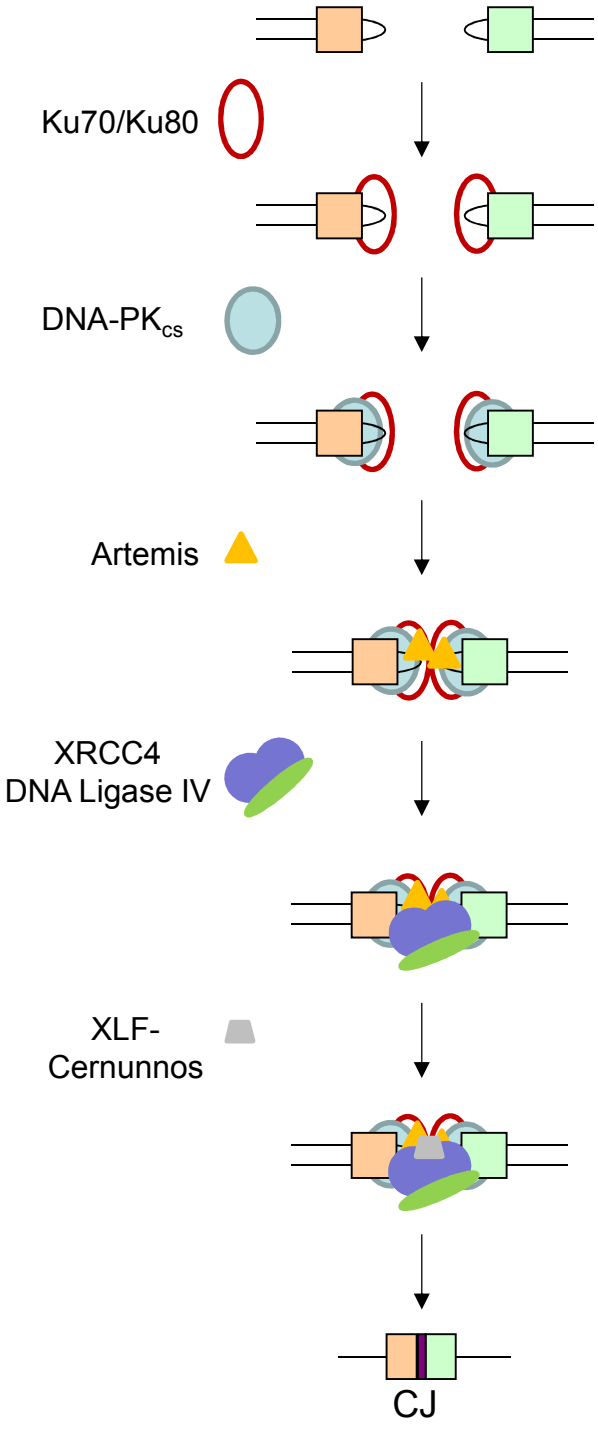


Figure 24 : Mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN pour le complexe NHEJ.
Les protéines de la voie NHEJ interviennent tour à tour dans le processus de réparation. Les carrés verts et orange représentent des segments TCR et le rectangle violet, la diversité jonctionnelle (nucléotides P et n) lors de la religation. CE : Coding End, CJ : Joint Codant.

Les protéines Ku

Le complexe Ku est un hétérodimère formé des protéines Ku70 et Ku80. Ce complexe se lie directement à l'ADN en formant un anneau au niveau des extrémités formées après la cassure double brin (Walker et al., 2001). La fixation sur l'ADN est strictement dépendante de l'hétérodimérisation car aucune de ces deux protéines n'est capable de se fixer à l'ADN séparément (Ochem et al., 1997; Ono et al., 1994). Cet anneau a pour objectif de maintenir les deux extrémités d'ADN proches et de les protéger des attaques des endo-nucléases ce qui induirait une perte du matériel génétique. Il a été suggéré que l'hétérodimère Ku s'associerait à la protéine RAG1 avant la cassure double brin de l'ADN induite par RAG (Raval et al., 2008). Ces protéines sont indispensables à la réparation de l'ADN. En effet, des cellules déficientes pour Ku80 présentent des défauts importants de réparation des CDB (Riballo et al., 2004). De plus, des modèles murins KO pour Ku70 ou Ku80 présentent tous les deux un phénotype SCID (Gu et al., 1997; Zhu et al., 1996). La fixation de l'hétérodimère Ku augmente de 100 fois l'affinité de DNA-PK_{cs} pour l'ADN (West et al., 1998).

La protéine DNA-PK_{cs}

La protéine DNA-PK_{cs}, fait partie des protéines de la famille des sérine/thréonine kinases. Elle se fixe aux protéines Ku, au niveau de l'anneau formé par ces dernières, ce qui enclenche l'activité kinase de la DNA-PK_{cs} qui s'autophosphoryle alors (Chan et al., 2002; Ding et al., 2003; Weterings et al., 2003). Le rôle majeur de l'autophosporylation a été démontré dans une étude de mutagenèse sur le site de phosphorylation ou sur le domaine kinase du gène *DNA-PKcs* (Kurimasa et al., 1999). La DNA-PK_{cs} permet une stabilisation du complexe Ku dans lequel les deux extrémités d'ADN sont maintenues.

Des mutations dans le gène de la *DNA-PK$_{cs}$* chez la souris, induisent une immunodéficience due à une absence de recombinaison V(D)J. De plus, ces mutations ont pour conséquences une sensibilité accrue aux rayons X et un défaut dans la réparation des cassures double brin de l'ADN (Bosma and Carroll, 1991). Les défauts observés sont quasiment identiques à ceux présents chez les patients SCID (Bogue et al., 1998; Gao et al., 1998a; Taccioli et al., 1998).

Artemis

Le gène *Artemis* a été découvert chez des patients SCID présentant des mutations de ce gène (Moshous et al., 2001). La protéine Artemis est la seule nucléase du complexe NHEJ. Elle fonctionne comme une exonucléase 5'-3'. Sa fonction consiste à ouvrir les structures en

épingles à cheveux (Ma et al., 2002; Pannicke et al., 2004; Poinsignon et al., 2004). L'autophosphorylation de DNA-PK_{cs} permettrait l'entrée d'Artemis dans le complexe de réparation. Son association avec DNA-Pk_{cs} permet l'activation de sa fonction endo-nucléasique ainsi que sa phosphorylation (Ma et al., 2005). Comme les protéines RAG, Artemis fonctionne en présence d'ions Mg^{2+}.

Des patients présentant une mutation inactivatrice du gène *Artemis* possèdent des défauts sévères de la recombinaison V(D)J (Moshous et al., 2000). Des mutants null d'Artemis ou de DNA-PK_{cs} présentent des défauts d'ouverture de l'épingle à cheveux. La conséquence est la même dans les modèles murin (Rooney et al., 2002).

DNA ligase IV et XRCC4

L'étape finale de la voie NHEJ est la ligation des extrémités d'ADN par le complexe DNA ligase IV/XRCC4. Ce complexe est recruté au niveau des cassures double brin de l'ADN par une interaction avec la DNA-PK_{cs} (Chen et al., 2000; Drouet et al., 2005). Ces deux facteurs sont très importants dans la voie NHEJ. En effet, l'efficacité de la réparation par NHEJ est très minimale en l'absence de ces deux protéines (Barnes et al., 1998; Frank et al., 1998; Gao et al., 1998b). De plus, XRCC4 est absolument requise car elle permet l'activation de l'activité ligase de la DNA ligase IV. Cette dernière a besoin de XRCC4 pour cibler correctement les CDB (Chen et al., 2000; Costantini et al., 2007; Drouet et al., 2005; Grawunder et al., 1997). La DNA ligase IV interagit avec XRCC4 *via* son domaine C-terminal (Grawunder et al., 1997; Sibanda et al., 2001). Ces deux protéines forment un trio : XRCC4 fonctionne en se dimérisant puis se lie avec la DNA ligase IV (Modesti et al., 2003).

Des modèles de lignées cellulaires défectueuses pour la DNA ligase IV ou pour XRCC4 sont viables mais présentent une sensibilité accrue aux radiations et une absence de formation de SE et CE (Gao et al., 1998b; Grawunder et al., 1998; Li et al., 1995; Taccioli et al., 1993). Les modèles murins avec l'un ou l'autre de ces gènes défectueux présentent une létalité embryonnaire avec des défauts au niveau du système nerveux (Barnes et al., 1998; Frank et al., 1998; Gao et al., 1998b). Enfin, les patients présentant un défaut de la DNA ligase IV développent des leucémies radiosensibles, des microencéphalies ou un phénotype SCID (O'Driscoll et al., 2001; Riballo et al., 1999).

XLF-Cernunnos

Ce gène a été cloné à partir de patients immunodéficients présentant une hypersensibilité aux infra-rouges (IR) (Buck et al., 2006). La protéine XLF-Cernunnos interagit avec les protéines XRCC4 et DNA ligase IV et semble être nécessaire pour la jonction correcte des CJ et SJ (Dai et al., 2003). Ce gène est extrêmement important dans la voie de réparation NHEJ mais n'intervient dans aucun autre mécanisme de réparation double brin de l'ADN (Gu et al., 2007; Tsai et al., 2007; Wu et al., 2007). Un modèle murin KO pour XLF a pour conséquence une absence totale de recombinaison V(D)J (Zha et al., 2007). Des patients présentant une absence de XLF sont très sensibles aux IR, sont déficients pour la recombinaison V(D)J et présentent une immunodéficience due à une profonde lymphopénie B et T. (Buck et al., 2006).

Les autres protéines

De nombreuses autres protéines interviennent lors de la réparation des CDB telles que MRE11, RAD50, NBS1, qui forment le complexe MRN ainsi que MDC1, 53BP1 et la kinase ATM. En présence d'ions zinc, MRN forme un pont entre deux bras de RAD50, suggérant un rôle pour ce complexe dans le maintien des deux extrémités d'ADN proches. La formation du complexe MRN requiert les facteurs MDC1, 53BP1 et le variant d'histones H2AX (Celeste et al., 2003; Lee et al., 2005; Ward et al., 2003; Xu and Stern, 2003). ATM est la kinase majeure d'H2AX, son rôle serait donc de créer un environnement chromatinien qui faciliterait l'accumulation du complexe MRN. Des mutations de ce gène peuvent être associées aux LAL-T (Voir paragraphes II.4.1 et III.1.3). Il n'est pas clairement défini comment ces protéines interviennent dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par la voie NHEJ.

II.2. ***Régulation de la recombinaison V(D)J***

Bien que la génération de la diversité des récepteurs antigéniques par la recombinaison V(D)J soit bénéfique, c'est un processus dangereux en raison de la génération de cassures double brin de l'ADN. Des défauts durant la recombinaison V(D)J sont à l'origine de translocations chromosomiques dans les pathologies lymphoïdes (Voir paragraphe II.4.1) (Bassing et al., 2002; Kuppers and Dalla-Favera, 2001). Ces erreurs reposent essentiellement sur la reconnaissance de RSS cryptiques ou de structures d'ADN inhabituelles telle que la structure

de l'ADN en Z (Raghavan et al., 2005). L'ADN en Z est une double hélice gauche dont le squelette présente une conformation en zigzag à la différence de l'ADN B qui tourne à droite. Ainsi, le développement normal du système immunitaire nécessite une régulation stricte de la recombinaison V(D)J qui est hautement contrôlée à plusieurs niveaux.

Le premier niveau de régulation est la spécificité tissulaire. En effet, l'expression des protéines RAG est restreinte aux cellules lymphoïdes B et T qui réarrangent les loci des Ig et TCRs respectivement (Shinkai et al., 1992). Le deuxième niveau de régulation est l'ordonnement des réarrangements des TCRs les uns par rapport aux autres, avec un ordre bien défini, TCR δ, γ, β et α ainsi qu'un ordonnement du réarrangement au sein d'un locus (Blom et al., 1998). Le TCRβ effectue en premier un réarrangement incomplet D-J avant l'utilisation du segment V pour le réarrangement complet VDJ. Le troisième niveau de régulation est l'exclusion allélique qui consiste à arrêter le processus de recombinaison lorsqu'un allèle a effectué un réarrangement productif (pour revue (Krangel, 2009)). Il est, cependant, important de noter que le locus du TCRα n'est pas soumis au processus d'exclusion allélique.

*II.2.1. **Accessibilité chromatinienne***

II.2.1.1. Généralités

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Il est constitué de 146 pb et s'enroule autour d'un octamère de protéines d'histones (H2A, H2B, H3, and H4) (Khorasanizadeh, 2004; Wolffe and Guschin, 2000). Les cellules eucaryotes possèdent trois formes de chromatine : la forme la plus compactée, l'hétérochromatine, une forme ouverte, l'euchromatine et une forme intermédiaire, l'hétérochromatine facultative.

Il existe plusieurs réactions chimiques qui permettent la décompaction de la chromatine. Il s'agit de modifications post-traductionnelles sur les histones (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000). La plus connue est l'acétylation des histones H3 et H4**.** Ainsi, les promoteurs acétylés sont accessibles et le gène peut être transcrit. L'acétylation crée une liaison covalente, mais c'est une réaction réversible. D'autres enzymes peuvent catalyser la réaction de désacétylation, qui permet aux nucléosomes de se refixer et de recompacter l'ADN. Ces enzymes sont des Histone Dé-ACétylases (HDAC). L'acétylation / désacétylation n'est pas le seul mode de régulation chromatinienne. De plus, l'ADN peut être méthylé au niveau d'îlots

CpG (Bird, 2002). En général, la méthylation des îlots CpG est synonyme de répression de l'expression génique.

Les nucléosomes sont très tassés et associés avec des DNA methyl-transférases (Dnmt), des Methyl CpG-binding Proteins (MeCP), des Histones De-ACetylases, des histones Methyl-transferases et des Heterochromatine Proteins (HP-1) dans la forme hétérochromatine. Dans la forme euchromatine, les nucléosomes sont plus libres et sont associés au complexe SWI/SNF. Ce complexe de remodelage de la chromatine, dépendant de l'ATP, permet le repositionnement des nucléosomes. L'acétylation des histones H3 et H4, et la méthylation des histones H3 sur les lysines en position 4 (K4), sont considérés comme étant des marqueurs d'une chromatine active. Au contraire, une hypoacétylation des histones H3 et H4, associée à la méthylation des histones H3 sur les résidus K9 ou K27 corrèlent avec un état inactif de la chromatine.(Litt et al., 2001).

II.2.1.2. Dans la recombinaison V(D)J

Initialement, le lien entre recombinaison V(D)J et accessibilité chromatinienne vient de la découverte d'un transcrit germinal, des TCR ou des immunoglobulines, dans des cellules qui n'ont pas encore effectué de réarrangements V(D)J. Cette transcription germinale est le reflet de l'ouverture chromatinienne et donc de la possibilité de réaliser des recombinaisons V(D)J (Van Ness et al., 1981; Yancopoulos et al., 1986). Par exemple, les segments Vβ non réarrangés sont transcrits dans les cellules Pré-T ($CD34^+$ / $CD1a^+$) mais pas dans les stades plus précoces ni dans les cellules B (Senoo and Shinkai, 1998). Ce lien entre transcription germinale et recombinaison V(D)J suggère que chaque étape de la recombinaison est contrôlée par des modifications de l'accessibilité chromatinienne. De plus, des modifications activatrices au niveau des histones telles que l'acétylation et l'hypométhylation suggèrent une connexion proche entre recombinaison V(D)J et structure chromatinienne. Les segments géniques prêts à être utilisés pour la recombinaison seraient dans une chromatine en position ouverte alors que les autres segments géniques seraient dans une chromatine en position fermée, alors inaccessibles aux protéines RAG (**Figure 25**).

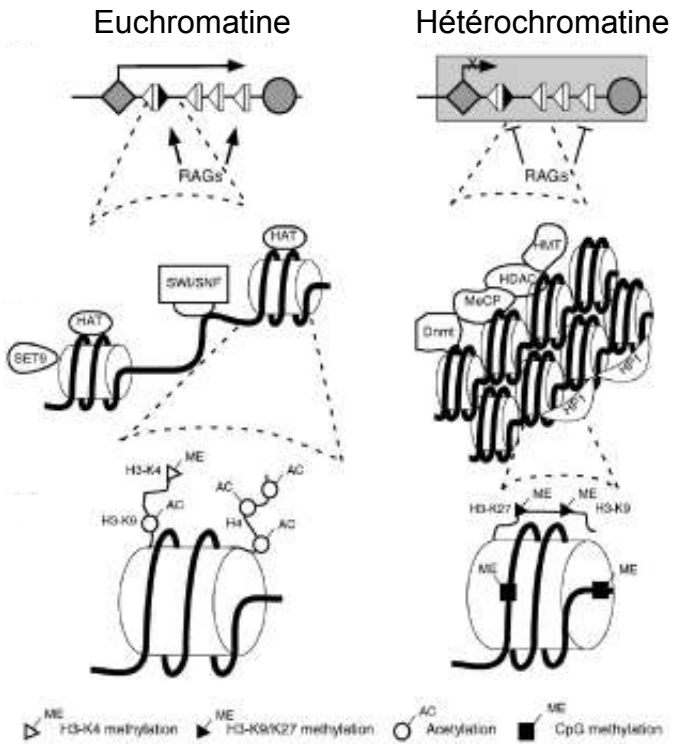


Figure 25 : Représentation schématique de la modification de la structure de la chromatine lors des réarrangements des TCRs.
Les deux types de chromatines sont représentés à plusieurs niveaux : loci d'un TCR (panel du haut), ADN (panel du milieu), nucléosome (panel du bas). Les promoteurs et les enhancers sont représentés par des triangles et ronds respectivement.
(Cobb et al., 2006).

Une expérience de recombinaison *in vitro* a mis en évidence le lien entre nucléosome et recombinaison V(D)J. En effet, dans ce modèle, la RSS est enroulée dans le nucléosome et dans ce cas ni la fixation de RAG ni le clivage de l'ADN ne sont observés (Golding et al., 1999; Kwon et al., 1998; Kwon et al., 2000; McBlane and Boyes, 2000). De plus, l'acétylation d'une RSS enroulée dans un nucléosome n'est pas suffisante pour induire la fixation de RAG et le clivage de l'ADN (Golding et al., 1999; Kwon et al., 2000). Cela suggère que les modifications chromatiniennes sont concomitantes et synergiques. Ces études supportent l'idée que le nucléosome en lui-même est un inhibiteur de clivage de l'ADN.

Dans le contexte de la recombinaison V(D)J, la grande majorité des segments géniques en cours de recombinaison est hypométhylée au niveau des îlots CpG alors que les segments géniques non utilisés pour la recombinaison sont hyperméthylés sur les îlots CpG (Bergman et al., 2003). De plus, une étude sur des substrats transgéniques a mis en évidence le lien entre l'hyperméthylation des îlots CpG et l'absence de recombinaison V(D)J (Demengeot et al., 1995; Engler et al., 1991; Hsieh et al., 1992).

Bien que les modifications de la chromatine représentent le processus majeur de régulation de la recombinaison V(D)J, le complexe RAG ainsi que les RSS peuvent influencer l'efficacité des réarrangements. En effet, la protéine RAG2, par son domaine C-terminal, lie les histones et favorise ainsi les réarrangements V-DJ et non les réarrangements D-J (West et al., 2005). La séquence des RSS, quant à elle, peut réprimer l'accessibilité en stimulant le recouvrement par la structure nucléosomale (Baumann et al., 2003). Ce résultat suggère que les RSS contrôlent le positionnement des nucléosomes et qu'elles seraient donc directement impliquées dans la régulation de la recombinaison V(D)J. Le rôle des facteurs de transcription sur ces RSS dans cette régulation sera discuté au paragraphe I.5.2.3.

II.2.2. ***Rôle des éléments cis-régulateurs***

Le lien entre transcription germinale et recombinaison V(D)J laisse suggérer que ces deux processus partagent des éléments de régulation communs. En accord avec cette idée, des promoteurs et des enhancers sont présents tout au long des loci des Igs et TCRs. Pour détailler cette partie, je prendrai, pour exemple, le rôle des enhancers et des promoteurs dans la recombinaison du TCRα/δ. Ces données s'appuient essentiellement sur des expériences effectuées chez la Souris.

Le locus du TCRα/δ contient deux enhancers, l'enhancer δ (Eδ) et l'enhancer α (Eα) ainsi qu'un promoteur TEA. L'Eα est situé en aval du segment Cα alors que l'Eδ est situé entre les Vα et les Jα (**Figure 5**).
Le rôle de ces enhancers est important lors de la transcription germinale et lors des réarrangements du TCRα/δ. En effet, la délétion de l'Eα résulte en une réduction sévère de la transcription germinale des segments Jα et des Vα proximaux et des réarrangements Vα-Jα (Hawwari and Krangel, 2005; Sleckman et al., 1997). Cependant, la transcription ainsi que les réarrangements impliquant les segments Vα distaux ne sont pas affectés, suggérant la présence d'autres éléments de régulation. Le KO de l'Eα n'altère pas les réarrangements du TCRδ mais induit une diminution de sa transcription germinale (Sleckman et al., 1997). À l'inverse, la délétion de l'Eδ, induit une diminution drastique des réarrangements du TCRδ mais pas du TCRα (Monroe et al., 1999b). Ces deux enhancers ne sont pas interchangeables, par exemple, le remplacement de Eα par l'Eδ ne restaure pas une recombinaison du

TCRδ (Bassing et al., 2003). En accord avec la cinétique de réarrangements des TCRs, l'Eδ est actif dans les cellules DN3 et inactif dans les cellules DP au moment où l'Eα devient fonctionnel (Krangel et al., 2004). L'activation de ces enhancers à un stade donné est donc très importante dans la régulation de la recombinaison V(D)J du locus concerné.

Le promoteur TEA est situé en amont du premier segment Jα (Jα61) (**Figure 5**). La délétion germinale du TEA induit une absence complète de la transcription germinale et des réarrangements spécifiquement au niveau des segments Jα en 5' (Villey et al., 1996). Des études ont mis en évidence au moins quatre promoteurs dans la région des segments Jα (Hawwari and Krangel, 2005). Cette étude de KO des enhancers et promoteurs suggère un modèle de « fermeture éclair », modèle dans lequel l'utilisation des segments V et J proximaux s'effectue en premier, suivie de l'utilisation des segments les plus distaux. L'Eα active premièrement les segments V situés en 3' du locus qui vont se réarranger préférentiellement avec les segments Jα situés en 5', en position ouverte grâce à l'élément TEA. Ce premier réarrangement supprime le TEA, ce qui va induire l'activation des autres promoteurs pour permettre l'utilisation des segments J les plus distaux.

II.2.3. ***Localisation nucléaire et architecture du locus***

Il est reconnu qu'une localisation périnucléaire est synonyme de l'inactivité génique (Kosak and Groudine, 2004). Il est maintenant bien établi que les loci des récepteurs à l'antigène migrent vers le centre du noyau lorsqu'ils vont entrer en phase de recombinaison. De plus, des études par FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) ont mis en évidence une étroite corrélation entre la recombinaison V(D)J et l'état de contraction du locus. En effet, la forme contractée du locus correspond à un état de recombinaison, le locus revient ensuite à un état décontracté après avoir effectué le réarrangement. À titre d'exemple, dans les cellules pro-T, le locus du TCRα/δ est en configuration contractée au niveau des segments Vδ, ce qui permet le rapprochement des segments Vδ avec le réarrangement DJδ précédemment effectué et le réarrangement Vδ-DJδ. Lors des premiers réarrangements du TCRα qui utilise préférentiellement les segments Vα situés en 3', les segments Vα en 3' sont contractés alors que ceux situés les plus en 5' sont en configuration décontractée. Ces segments passent, ensuite, en configuration contractée lors du processus d' « ongoing » de TCRα (Shih and Krangel, 2010).

Des facteurs non spécifiques de lignées interviennent également dans la contraction des loci, en se complexant avec des facteurs lignée-spécifique tels que YY1, CTCF et la cohésine (Hewitt et al., 2010).

II.2.4. ***Rôle des facteurs de transcription***

En plus de la régulation épigénétique qui contrôle la structure de la chromatine, un ensemble d'études montre que les RSS agissent directement comme régulateur génétique de la recombinaison V(D)J. La première contrainte imposée par les RSS est la règle 12/23 : une réaction de recombinaison efficace se produit seulement entre un segment génique flanqué d'une 12-RSS et un segment génique flanqué d'une 23-RSS (Voir paragraphe II.1.1.1). De plus, l'importance des facteurs de transcription dans la recombinaison V(D)J a été mise en évidence par différentes approches incluant les techniques classiques de biologie moléculaire, des souris KO pour les facteurs de transcription et des expériences de Knock-In (KI).

Les facteurs bHLH, E2A et HEB ont un rôle important dans la recombinaison V(D)J. En effet, une forme dominante négative de HEB inhibe les réarrangements V-DJβ (Barndt et al., 2000). EA2 joue un rôle dans le répertoire des réarrangements du TCRγ et du TCRδ. Ainsi, un modèle de souris adulte KO pour E2A présente une utilisation des segments Vγ3 et Vδ1 (segments utilisés dans la vie fœtale) et l'absence d'utilisation des segments de la vie adulte tels que Vγ2 et Vδ5 (Bain et al., 1999). De plus, la surexpression d'E2A, de HEB et de RAG1/2 dans une lignée non-lymphoïde (BOSC23) permet des réarrangements précoces du TCRδ et du TCRγ (Langerak et al., 2001).
Le rôle des facteurs de transcription a été également bien défini dans l'activation des enhancers et des promoteurs décrits précédemment. En effet, la fixation des facteurs SP1 et ATF/CREB au niveau du promoteur de Dβ1 induit les réarrangements Dβ-Jβ. Les régions fonctionnelles (« core ») de l'Eβ et de l'Eα sont précisément les séquences responsables de la fixation des facteurs de transcription spécifiques soit respectivement : GATA3, ATB/CREB, bHLH, ETS1, RUNX1 et ETS1, RUNX1, LEF-1. Enfin, l'enhancer delta (Eδ) fixe les facteurs c-Myb, CBF/PEBP2, GATA3, et collabore avec le promoteur en amont de Dδ2 qui lui-même fixe URF1, RUNX1 et c-Myb (Carabana et al., 2005). Ce promoteur en amont du segment Dδ2 est spécifique de la Souris.

De plus, le facteur de transcription PAX5 (Paired Box Protein 5) joue un rôle déterminant dans le recrutement des protéines RAG au niveau des segments V_H (Zhang et al., 2006). En effet, un modèle murin $Pax5^{-/-}$.effectue correctement les réarrangements D_H-J_H et les réarrangements V_H-DJ_H avec les segments V_H proximaux mais avec les segments les plus distaux.

Il est bien établi que le locus de TCRβ commence par un réarrangement Dβ-Jβ qui est suivi de l'utilisation d'un segment V pour effectuer un réarrangement VDJ complet. L'équipe de, Wang et *al.* a démontré le rôle majeur du facteur de transcription c-Fos dans la régulation de l'ordonnement du TCRβ murin. En effet, par des études d'interaction protéine-protéine et protéine-ADN, ils ont montré que le facteur de transcription c-Fos se fixe sur la 23 RSS de Dβ1/2 ce qui permet le recrutement des protéines RAG et ainsi le réarrangement D-Jβ. Il est important de noter que c-Fos ne peut pas se fixer directement sur la RSS, il a besoin des protéines RAG bien que celles-ci soient très faiblement exprimées à ce moment du développement T. Son KO chez la Souris induit un désordre total puisque des réarrangements V-Dβ ou V-Jβ sont observés (Wang et al., 2008). La restriction B12/23 et l'ordonnement des réarrangements du TCRβ s'expliquent donc par un mécanisme de « RAG deposition » dependant de c-Fos.

Tous ces exemples mettent bien en évidence le rôle essentiel des facteurs de transcription dans la régulation de la recombinaison V(D)J. De plus, l'autre locus TCR contenant des segments D et donc pour lequel se pose la question de l'ordonnement des réarrangements est le locus du TCRδ. Aucune donnée de la littérature ne répond à cette question chez l'homme.

II.3. ***Produits alternatifs de la recombinaison V(D)J***

Une recombinaison V(D)J correcte crée des joints codants (CJ) et des joints signaux (SJ) mais, dans certains cas des produits alternatifs peuvent être générés. Ces produits alternatifs de la recombinaison V(D)J sont des joints hybrides (HJ), des joints Open and Shut (OSJ) et des joints pseudo-hybrides (ψHJ).

II.3.1. ***Les joints hybrides***

La formation d'un joint hybride résulte de la fusion d'une SE et d'une CE (**Figure 26**). Cette recombinaison anormale est soumise au même phénomène que lors de la formation d'un CJ. En effet, la réparation peut être effectuée par le complexe NHEJ et la perte de nucléotides ainsi que l'ajout de nucléotides P et n sont observés à la jonction des HJ. Ces HJ peuvent également être formés en l'absence de complexe NHEJ, le mécanisme par lequel la fusion entre la SE et la CE s'effectue s'appelle « RAG-mediated joining ». Dans ce cas, le groupement 3'OH porté par la SE attaque la structure en épingle à cheveux au niveau de la CE, ce qui génère un groupement 3'OH au niveau de la CE qui va s'associer avec le groupement 5'P porté par la SE (Han et al., 1997). Il semblerait que ce processus de formation de HJ soit favorisé en présence d'un complexe NHEJ déficient (Raghavan et al., 2006; Swanson et al., 2004; Tsai and Schatz, 2003). La formation d'un joint hybride est identifiée de façon plus fréquente dans les substrats de recombinaison (Lewis et al., 1988) qu'aux loci des récepteurs à l'antigène (Alexandre et al., 1991; Morzycka-Wroblewska et al., 1988).

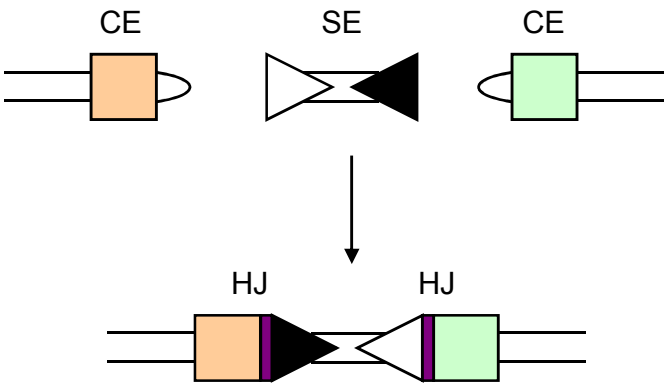


Figure 26 : Représentation schématique de la formation des joints hybrides.
Les carrés verts et orange représentent des segments TCRs, les triangles noirs et blancs les RSS et le rectangle violet la diversité jonctionnelle (P et n nucléotides) lors de la religation. CE : Coding Ends, SE : Signal Ends, HJ : Joint Hybride, TCR : T Cell Receptor.

II.3.2. ***Les joints Open and Shut***

Les Joints Open and Shut (OSJ) proviennent de la religation d'une SE et d'une CE. Lors de la religation, le complexe NHEJ intervient, la perte ainsi que l'ajout de nucléotides n et P sont observés. Le produit de cette religation est différent du produit initial de par la perte et l'ajout de ces nucléotides (**Figure 27**). Il est possible, dans certains cas, qu'il n'y ait ni ajout ni perte de nucléotides ce qui aboutit à un produit final identique au produit initial. Il n'est donc pas exclu que la fréquence des OSJ soit sous-estimée (Brandt and Roth, 2004).

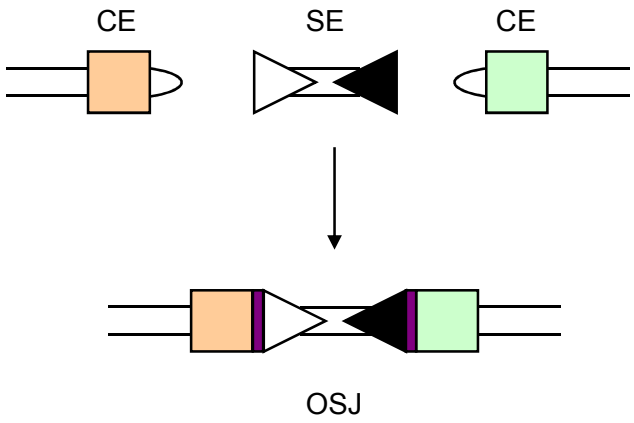


Figure 27 : Représentation schématique de la formation des joints Open and Shut.
Les carrés verts et orange représentent des segments TCRs, les triangles noirs et blancs, les RSS et le rectangle violet la diversité jonctionnelle (nucléotides P et n) lors de la religation. CE : Coding End, SE : Signal End, OSJ : joint open and shut.

II.3.3. ***Les joints pseudo-hybrides***

Les joints pseudo-hybrides ont été décrits par Lewis et *al.* (Lewis et al., 1984, 1985). Ce sont des SJ secondaires qui se sont formés à partir de SJ précédemment formés. Ceci suggère que le SJ reste actif et que les protéines RAG peuvent continuer à cibler les RSS qui le constituent tout en respectant la règle 12/23 (**Figure 28**).

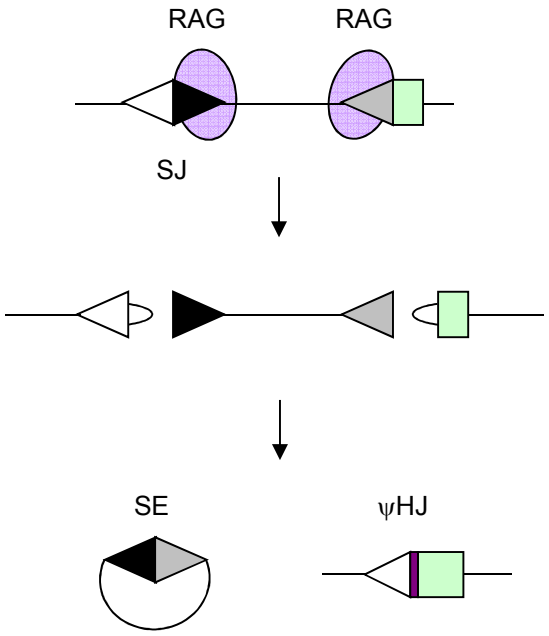


Figure 28 : Représentation schématique de la formation des joints pseudo-hybrides.
Les triangles représentent les RSS, le carré vert un segment TCR et le rectangle violet la diversité jonctionnelle (nucléotides P et n) lors de la religation. SJ : Joint Signal, SE : Signal End, ψHJ : Joint Pseudo-Hydride.

II.4. ***Recombinaison V(D)J illégitime***

Le processus de recombinaison V(D)J est hautement régulé. En effet, un mécanisme qui génère des cassures double brin de l'ADN est une source d'instabilité génomique. Néanmoins, lors de la réparation par le complexe NHEJ des cassures double brin de l'ADN des erreurs peuvent survenir. Des remaniements entre deux loci Ig et TCR peuvent s'effectuer ; ce phénomène se nomme recombinaison en *trans*. De plus, des translocations chromosomiques entre deux chromosomiques distincts ou des délétions interstitielles peuvent survenir (Cauwelier et al., 2006).

II.4.1. ***Recombinaison en trans***

Les *trans*-réarrangements peuvent s'effectuer entre deux chromosomes différents ou par un mécanisme d'inversion sur un même chromosome. Ces évènements de *trans*-réarrangements sont rares. Par exemple, des *trans*-réarrangements Vδ-Jγ, sur le chromosome 7, se produisent

à une fréquence de 1/200 000 dans les PBL (Peripheral Blood Lymphocyte) (Kobayashi et al., 1991). De même, les *trans*-réarrangements par inversion Vγ-Jβ peuvent être détectés à une fréquence de 1/30 000 et de 1/10 000 dans les PBL et dans les cellules T respectivement (Hecht et al., 1987). Les *trans*-réarrangements sont également identifiés dans les LAL-B pédiatriques. Le chromosome 14 porte les loci IgH et TCRα/δ. L'inversion du chromosome 14, lors du processus de recombinaison V(D)J au niveau de ces deux loci, a pour conséquence la ligation entre les segments V_H et les segments Jα (Baer et al., 1985). Les *trans*-réarrangements sont détectés à une fréquence plus élevée (50 à 100 fois plus) chez les patients atteints d'Ataxie Telangectasie (AT) (Kobayashi et al., 1991; Stern et al., 1989) ou de leucémies lymphoïdes (Lopes et al., 2004). Les patients atteints d'AT présentent une mutation du gène *ATM,* facteur intervenant lors de processus de réparation des cassures double brin de l'ADN. L'augmentation du nombre de *trans*-réarrangements est observée également chez les patients en cours de chimiothérapie pour le traitement de lymphomes, leucémies ou de tumeurs solides (Lopes et al., 2001). Des modèles murins montrent que le rapport *cis*/*trans*-réarrangements est de 500 à 1000 pour 1 ; ce ratio passe à 6 pour 1 dans des thymocytes irradiés de souris SCID (Lista et al., 1997). Comme lors du processus de recombinaison au sein d'un même locus, l'addition de n nucléotides est observée lors d'un *trans*-réarrangement (Hinz et al., 2000; Kobayashi et al., 1991). L'analyse des séquences des transcrits générés lors des *trans*-réarrangements indique que les réarrangements générés peuvent être dans le bon cadre de lecture et que la protéine chimérique ainsi générée peut être exprimée à la surface de la cellule (Davodeau et al., 1994). Le TCR chimérique va reconnaître un peptide du CMH et fonctionnera comme un récepteur à l'antigène issu d'un réarrangement en *cis*.

II.4.1. ***Délétions sous-microscopiques***

Une délétion sous-microscopique implique deux sites non V(D)J mais reconnus et clivés par la machinerie de recombinaison V(D)J. L'exemple le plus connu est la délétion, d'environ 100 Kb, entre *SIL* et *TAL1* qui met *TAL1* sous le contrôle du promoteur de *SIL*.
Les deux points de cassures au niveau de *SIL* et de *TAL1* possèdent des séquences cRSS dans lesquelles la séquence de l'héptamère est clairement identifiable alors que la séquence du nonamère n'est pas retrouvée (Aplan et al., 1990; Aplan et al., 1992; Bash et al., 1993).
Il a été prédit que les cRSS au niveau de *TAL1* et de *SIL* agiraient comme une 12 RSS et une 23 RSS respectivement. Ces cRSS auraient une efficacité de recombinaison 20 000 fois

inférieure à celle des 12 et 23 RSS consensus (Raghavan et al., 2001b). De plus, les délétions du locus *CDKN2A* surviennent par ce même mécanisme. Des tests *in vitr*o de substrats de recombinaison ont clairement identifié le rôle de la machinerie de recombinaison lors des délétions de *CDKN2A* et celles observées dans les cas SIL-TAL1 (Kitagawa et al., 2002; Murray et al., 2006; Raghavan et al., 2001b). En effet, une signature des CJ est présente à la jonction des délétions.

II.4.2. ***Les translocations impliquant le TCR***

Des translocations chromosomiques impliquant les IgH/TCR ont été identifiées avec une grande fréquence dans les hémopathies malignes (pour revue (Aplan, 2006; Kuppers and Dalla-Favera, 2001).

Les translocations entre un oncogène et un TCR ont pour conséquence la surexpression de l'oncogène. Le positionnement d'un élément *cis*-régulateur tels que les Enhancers du TCR à proximité de l'oncogène est généralement considéré comme étant directement à l'origine de sa surexpression. De plus, il existe des mécanismes alternatifs de dérégulation des oncogènes, par délétion des éléments de régulation négative (NRE), ce mécanisme a été décrit pour l'oncogène LMO2 (Dik et al., 2007). Cependant, les mécanismes précis entraînant la surexpression sont peu connus à ce jour.

Il est important de noter que les translocations impliquant les loci des TCR surviennent spontanément à de très faibles fréquences dans le thymus à l'état physiologique (Dik et al., 2007; Marculescu et al., 2003) et que ces évènements de translocations peuvent être sélectionnés au niveau cellulaire et ainsi contribuer à la leucemogenèse en conférant des avantages prolifératifs et/ou anti-apoptotiques.

Deux modèles sont proposés concernant l'initiation de la translocation. Le modèle « contact-first » et le modèle « breakage-first » (**Figure 29**). Le premier modèle se base sur l'apparition des cassures double brin de l'ADN au niveau de deux régions proches physiquement et c'est lors de la réparation que s'effectuera la translocation entre les deux chromosomes. Le modèle « contact-first » suggère que les cassures double brin de l'ADN peuvent survenir à plusieurs endroits dans le génome, qu'ensuite les chromosomes bougent et que la réparation va s'effectuer ainsi que la translocation (Meaburn et al., 2007). De plus, les gènes impliqués dans les translocations avec le TCR doivent être en configuration chromatinienne active.

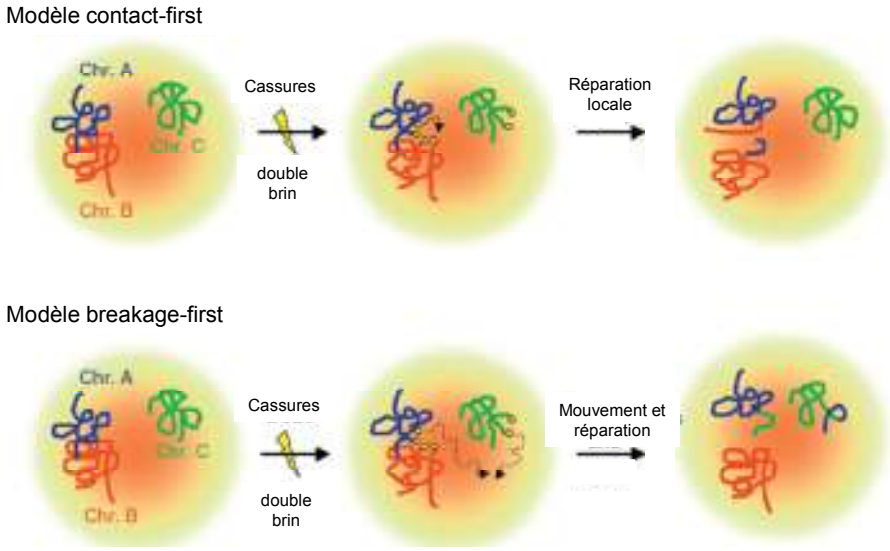


Figure 29 : Modèles de « First-contact» et de « Breakage-contact».
Inspiré de (Zhang et al., 2010).

II.4.2.1. Translocation de type I

Les translocations de type I surviennent suite à la capacité des protéines RAG à reconnaître, fixer et cliver l'ADN au niveau de RSS cryptiques (cRSS) qui divergent de la séquence consensus. Des études fonctionnelles *ex vivo* ont estimé que les RSS cryptiques sont au nombre de 10 millions dans le génome humain, répartis en moyenne tous les 1 à 2 kb, et qu'elles peuvent être ciblées par le processus de recombinaison V(D)J (Lewis et al., 1997). Cependant, ces RSS cryptiques sont 2.10^{-5} moins efficaces qu'une RSS consensus. Le pouvoir recombinogénique d'une RSS cryptique ne peut être défini uniquement sur la base de sa séquence. Des outils informatiques ont été développés afin de déterminer la fonctionnalité des cRSS (http://www.itb.cnr.it/rss/) (Cowell et al., 2003; Lewis et al., 1997). De plus, des tests fonctionnels *in vitro*, ont permis de démontrer que très peu de cRSS sont ciblées par la machinerie de recombinaison V(D)J (Marculescu et al., 2006; Vanura et al., 2009). Au vu du nombre de RSS cryptiques dans le génome, il n'est pas surprenant que certains se situent à côté d'oncogènes. Dans le cas d'une translocation de type I, ce processus fait intervenir deux partenaires : un segment RSS et un proto-oncogène. Dans le cas d'une translocation de type I, l'anomalie provient d'une erreur de ciblage des protéines RAG qui vont reconnaître une cRSS située à côté d'un proto-oncogène (**Figure 30**). Il semble que les translocations de type I sont des évènements rares dans les hémopathies lymphoïdes.

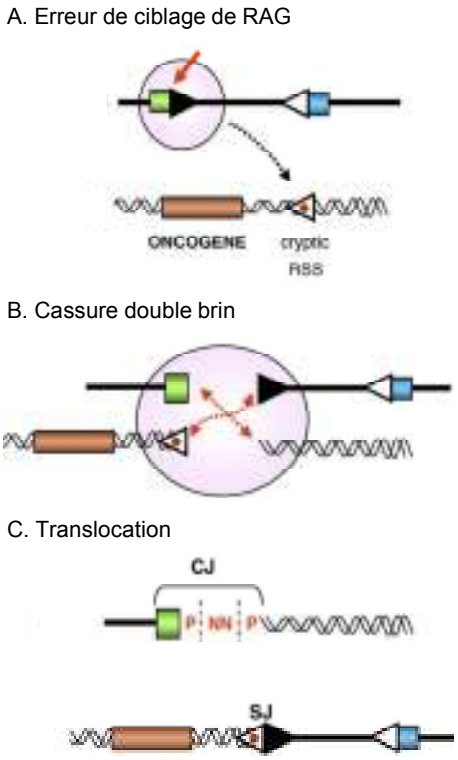


Figure 30 : Mécanisme de translocation de type I.
A. La cRSS représentée par un triangle blanc avec un point rouge est ciblée par RAG.
B. Translocation réciproque lors de la réparation des extrémités entre les segments TCR et l'oncogène.
C. Formation des Joints Signaux (SJ) et Joints Codants (CJ).
(Marculescu et al., 2006).

II.4.2.2. Translocation de type II

La translocation de type II se définit comme étant une erreur lors de la réparation des cassures double brin de l'ADN ; la ligation s'effectue entre un segment du TCR et le proto-oncogène (**Figure 31**). À la différence de la translocation de type I, trois partenaires interviennent : un proto-oncogène et deux segments du TCR. Cela suggère que la translocation intervient lors du processus de réarrangement physiologique sur les loci des TCRs et que ce réarrangement est perturbé par la présence d'un autre partenaire (BE, Broken-End) dans la synapse de recombinaison. Lors de la réparation par le complexe NHEJ, deux voies sont possibles. La voie classique dans laquelle les deux BE sont jointes aux deux CE pour générer un joint mixte CE/BE (MJ). Dans la voie alternative, une BE est jointe à une CE pour donner un MJ CE/BE sur un des dérivatifs chromosomiques, l'autre BE est jointe à une SE pour donner un MJ SE/BE sur l'autre dérivatif. Dans les deux cas, la surexpression de l'oncogène est observée.

Dans ce cas de translocation, l'ajout de nucléotides P et n est observé au niveau du joint mixte (TCR-oncogène) (Marculescu et al., 2006; Vanura et al., 2009). Le mécanisme de cassure de l'ADN sur l'oncogène n'est pas induit par RAG. La cassure s'effectue au niveau de sites fragiles par un mécanisme non connu dans la majorité des cas, à l'exception de certains cas où la cassure intervient au niveau de structures de l'ADN non B (Raghavan et al., 2004) ou au niveau de sites riches en CpG (Tsai et al., 2008).

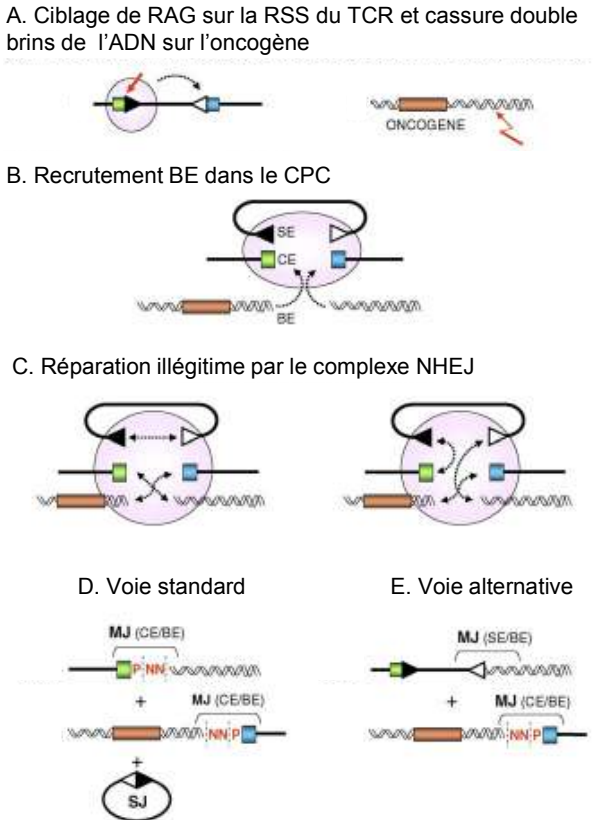


Figure 31 : Mécanisme de translocation de type II.
A. Ciblage et coupure double brin par RAG sur la RSS du TCR, cassure double brin (BE) au niveau d'un site fragile proche d'un oncogène.
B. Recrutement des BE au niveau du complexe post clivage du TCR.
C. Réparation illégitime par le complexe NHEJ conduisant à une translocation réciproque. La ligation s'effectue entre un segment du TCR et l'oncogène.
D. Voie classique dans laquelle les deux BE sont jointes aux deux CE.
E. Voie alternative, une BE est liguée à une CE, l'autre BE est jointe à une SE.
MJ : Joint Mixte, CE : Coding End, SE : Signal End, BE : Broken End, CPC : Complexe Post Clivage.
(Marculescu et al., 2006).

III. Les leucémies aiguës lymphoblastiques T

III.1. ***Généralités***

III.1.1. ***Définitions***

Les leucémies aigues (LA) forment un groupe hétérogène d'hémopathies malignes résultant de la transformation maligne d'un progéniteur hématopoïétique. Ces leucémies sont bloquées à un stade précis de maturation et prolifèrent de façon incontrôlée. Cela a pour conséquence une accumulation de cellules malignes (blastes) au détriment de l'hématopoïèse normale, avec un envahissement consécutif de la moelle osseuse, puis du sang et éventuellement d'autres organes (ganglions, médiastin, système nerveux central…). Le diagnostic des leucémies aiguës se base sur la caractérisation du clone leucémique. Selon l'expression par les blastes d'antigènes membranaires et/ou intra-cytoplasmiques spécifiques de la lignée lymphoïde T, B ou myéloïde, les leucémies sont classées respectivement en leucémie aiguë lymphoblastique T ou B (LAL-T/LAL-B) ou leucémie aiguë myéloïde (LAM). L'expression du CD3 cytoplasmique (cCD3) ou membranaire (mCD3) est nécessaire et suffisante pour affirmer l'appartenance à la lignée T des blastes.
Une (LAL-T) se définit par une infiltration blastique minimum de 25 % de la moelle osseuse. La moelle est le plus souvent infiltrée par plus de 90 % de blastes, une infiltration inférieure à 50 % ne s'observe que dans 4 % des cas de LAL-T (Bassan et al., 2004).

III.1.2. ***Epidémiologie et étiologie***

Les LAL sont peu communes chez l'adulte. Environ 10 000 nouveaux cas adultes sont diagnostiqués en Europe chaque année. Elles représentent à peu près 15 % de toutes les leucémies de l'adulte. Les LAL-T représentent 25 % des LAL de l'adulte avec un sexe ratio homme/femme de 4 : 1 (Bassan et al., 2004).
Chez l'enfant, les LAL sont les tumeurs malignes les plus fréquentes puisqu'elles représentent 30 % des cancers pédiatriques et 80 % des leucémies. En Europe, l'incidence annuelle des LAL varie de 2 à 4 pour 100 000. Les LAL-T représentent 15 % des LAL pédiatriques et

prédominent chez les pré-adolescents et les adolescents (Pui et al., 1993). L'incidence des LAL-T pédiatriques est également plus élevée chez le garçon avec un sexe ratio de 3 : 1.
Les événements pathogéniques précis conduisant au développement des LAL sont mal connus (Bassan et al., 2004). Seul un petit nombre de cas (<5 %) est associé à des facteurs génétiques, le plus souvent associé à des processus d'instabilité génomique, entraînant le développement de syndromes de prédisposition génétique tel que le syndrome de Down, la neurofibromatose, le syndrome de Shwachman, l'ataxie télangiectasie, le syndrome de Wiskott-Aldrich, le syndrome de Klinefelter ou l'histiocytose langerhansienne. L'exposition prénatale aux rayons X pourrait favoriser le développement de cette pathologie. Un niveau socio-économique défavorable augmenterait le risque de LAL entre 2 et 5 ans de façon inexpliquée. L'exposition à des champs magnétiques de très basse fréquence, aux radiations de Tchernobyl (exposition à une dose supérieure à 10 mSv) (Gluzman et al., 1999) et à certains composés chimiques tels que le benzène et l'oxyde d'éthylène sont également incriminés (pour revue (Buffler et al., 2005)).

III.1.3. ***Clinique et traitement***

Les symptômes cliniques sont dus dans un premier temps à l'infiltration de la moelle osseuse par la population tumorale avec notamment un syndrome anémique, hémorragique ou infectieux dans un contexte d'altération de l'état général. L'atteinte du système nerveux central (SNC) est détectée dans 5 à 10 % des cas entraînant des signes neurologiques. Un envahissement des ganglions lymphatiques, du foie et de la rate, mais surtout du médiastin (dans 60 % des cas) peut être identifié dans les LAL-T et causer des problèmes cardio-pulmonaires. Enfin, une hyperleucocytose élevée (supérieur à 100 G/l) peut conduire à un syndrome de leucostase et à des hémorragies cataclysmiques rapidement fatales (Bassan et al., 2004).
Ainsi, le caractère aigu de la leucémie est défini par le potentiel évolutif rapide (en quelques semaines) des symptômes et des signes biologiques de la maladie entraînant le caractère rapidement létal des troubles viscéraux engendrés, ceci en l'absence d'un traitement efficace.
Le pronostic est médiocre avec un taux de survie à 5 ans chez l'enfant de 80 % et seulement de 50 % chez l'adulte (Pui, 2009).
Les protocoles internationaux de chimiothérapie des LAL-T comportent schématiquement trois phases. La première est l'induction de la rémission complète, ayant pour but d'éliminer

plus de 99 % des cellules blastiques existantes et de pouvoir restaurer une hématopoïèse normale. La deuxième est la consolidation de la rémission ce qui passe par l'administration de plusieurs cures afin d'éradiquer les blastes résiduels. Enfin, la troisième phase est le traitement d'entretien d'une durée de 2-2,5 ans permettant de limiter les risques de rechute précoce. Suite à la première étape du traitement une rémission clinique complète est obtenue dans 96-99 % des cas pédiatriques, et dans 78-93 % des cas adultes (Pui and Evans, 2006). Lorsqu'il y a résistance au traitement ou détection de maladie résiduelle (MRD), le traitement est alors intensifié. Par ailleurs, une prophylaxie neuro-méningée est instaurée dès la diminution de la blastose sanguine. Enfin, en fonction des critères pronostiques, le patient peut bénéficier d'une chimiothérapie d'entretien prolongée, ou d'une allogreffe de CSH ou dans certains protocoles d'une intensification avec ou sans support de cellules souches autologues.

III.2. ***Classification immunophénotypique***

Cette classification se base sur la mise en évidence d'antigènes de différenciation spécifiques de la lignée lymphoïde T. Le Groupe Européen de caractérisation Immunologique des Leucémies (EGIL) propose une classification immunologique en fonction des stades de différenciation thymique (Table 1) (Bene et al., 1995).

	cCD3	CD7	CD2/CD5/CD8	CD1a+	sCD3+/CD1a-
T-I ou pro-T	+	+	-	-	-
T-II ou pré-T	+	+	+	-	-
T-III ou corticale	+	+	+	+	-
T-IV ou mature	+	+	+	-	+

Tableau 1 : Classification immunophénotypique EGIL des LAL-T.

Les LAL-T I ou II correspondant aux phénotypes les plus immatures avec l'expression d'antigènes de la lignée T précoces comme les CD2, CD5 ou CD7, sont des entités rares. En

revanche, la classe T-III est plus fréquente avec acquisition du CD1a et éventuellement du CD3 en surface, ainsi que la co-expression des marqueurs CD4 et CD8. Les LAL-T de phénotype mature (T-IV) où le CD1a a disparu alors que le CD3 est positif en surface sont un peu moins fréquentes. Dans ce dernier groupe, les lymphoblastes sont simple positif CD4 ou CD8 et expriment un récepteur T à l'antigène (TCR) qui peut être indifféremment αβ ou γδ. Cependant, la classification EGIL a peu de relevance thérapeutique et la définition du blocage de maturation est relativement peu précise.

III.3. ***Classification par le TCR***

Les stades d'arrêt de maturation des LAL-T reproduisent fidèlement les différentes étapes de maturation thymique humaine (Asnafi et al., 2003a). De ce fait, l'analyse des réarrangements des loci des TCRs, l'expression de la chaîne du TCRβ en intra-cytoplasmique (cTCRβ) et l'expression du TCRγδ ou αβ à la surface des blastes T a permis d'affiner de manière sensible le stade d'arrêt de maturation des blastes. Les LAL-T peuvent ainsi être subdivisées en trois grands groupes : les LAL-T immatures, pré-αβ et mâtures (**Figure 32**).

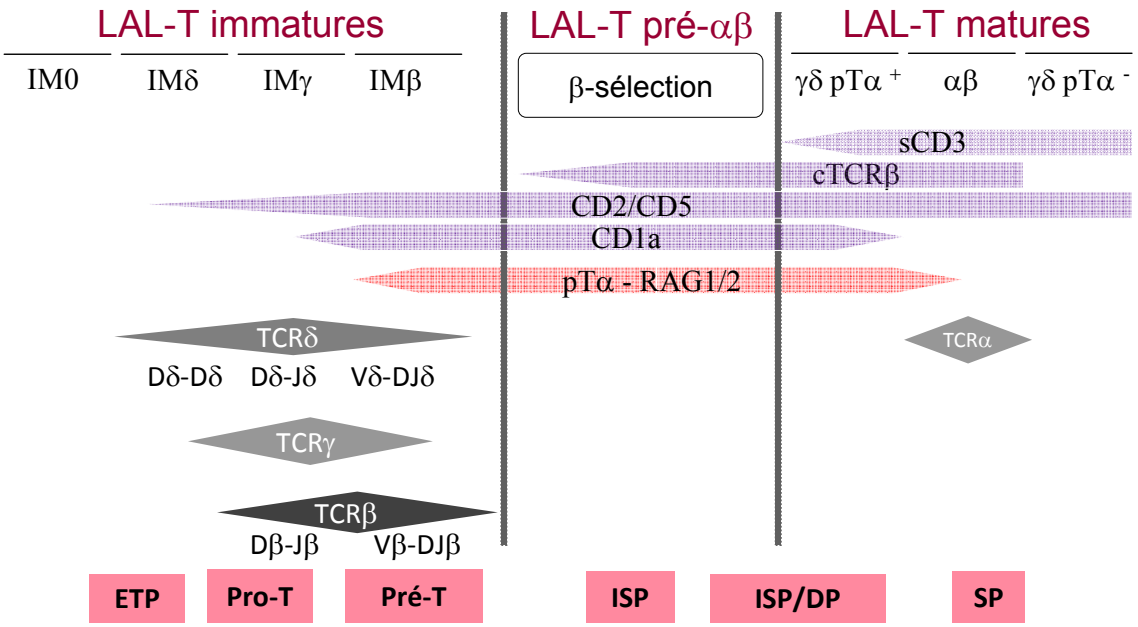


Figure 32 : Classification immuno-génétique des LAL-T.
IM : Immature, ISP : Immature Simple Positif, DP : Double Positif, SP : Simple Positif, Ptα : Pré T alpha, TCR : T Cell Receptor.

III.3.1. ***Les LAL-T immatures***

Les LAL-T immatures n'expriment pas le CD3 en surface (sCD3) ni la chaîne du TCRβ en intracytoplasmique et présentent les caractéristiques des précurseurs thymiques immatures non-T restreints. En effet, elles sont doubles négatives ($CD4^-$ / $CD8^-$), n'expriment pas le CD1a ni le CD5. Elles expriment le CD34, le CD7 et le cCD3 ainsi que des marqueurs myéloïdes tels que le CD13 et le CD33 ou des marqueurs NK tel que le CD56. Au niveau transcriptionnel, des niveaux très faibles de RAG1/2 et de pTα sont détectables. La configuration de leurs loci du TCR respecte parfaitement l'ordre physiologique des réarrangements successifs des TCRs. Il est ainsi possible de les classer en quatre catégories: les IM0 sans aucun réarrangement des TCRs, les IMδ; des réarrangements incomplets du TCRδ sont détectables, les IMγ; les TCRδ et TCRγ sont réarrangés avec la présence de réarrangement DJ incomplets du TCRβ et enfin les IMβ dans lesquelles les trois loci sont réarrangés. Cette dernière catégorie est la seule à exprimer fortement les transcrits pTα et RAG1/2 et correspond aux précurseurs les plus immatures de la lignée αβ (Asnafi et al., 2003a).

Les auteurs d'une étude récente ont étudié le transcriptome d'une grande cohorte de LAL-T et ont identifié 12% des cas avec un profil d'expression différent des autres LAL-T mais très similaire à celui des ETP physiologiques (Rothenberg et al., 2008). Récemment, un sous-groupe a été décrit dans les LAL-T immatures, les ETP-ALL (Early Thymic Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia). Ces LAL-T se définissent par la négativité du CD1a et du CD8, l'expression faible du CD5 (<75 %), et l'expression d'un ou plusieurs marqueurs myéloïdes tels que le CD13, CD33, CD117 ou HLA-DR ou de cellules souches tels que le CD34, CD11b ou CD65 (Coustan-Smith et al., 2009).

III.3.2. ***Les LAL-T pré αβ***

Ce sous-groupe de LAL-T correspond aux LAL-T n'exprimant pas le CD3 à la surface et exprimant la chaîne du TCRβ en intracytoplasmique. Ces LAL-T sont phénotypiquement $CD34^+$ / $CD1a^+$ / $CD4^+$ / $CD8^+$ / $CD2^+$ / $CD5^+$ et, transcriptionnellement, elles expriment fortement les transcrits RAG1/2 et pTα. Ces LAL-T ont effectué des réarrangements complets du TCRδ et du TCRβ et n'ont pas encore commencé à réarranger le locus du TCRα. La

catégorie des LAL-T pré-αβ présente donc les mêmes caractéristiques que les thymocytes en cours de β-sélection et correspond à l'expansion clonale de cellules exprimant un pré-TCR.

III.3.3. ***Les LAL-T matures***

Les LAL-T matures correspondent à des proliférations de lymphoblastes exprimant le complexe CD3/TCRγδ ou CD3/TCRαβ à leur surface. La moitié d'entre elles est de phénotype TCRγδ. Les LAL-T TCRγδ positives peuvent se différencier en deux sous-groupes. Environ 40 % des cas expriment le transcrit pTα. Ces formes pTα positives expriment également les transcrits RAG1/2 et possèdent des réarrangements complet de TCRβ ainsi que l'expression de la chaîne β en intracytoplasmique. Elles possèdent un phénotype double positif $CD4^+$ / $CD8^+$ de type cortical avec parfois l'expression des marqueurs CD34, CD13 et CD33. Ces caractéristiques les rapprochent fortement des LAL-T IMβ et pré-αβ. Le sous-groupe pTα négatif, n'exprime pas les transcrits RAG1/2, ni la TdT dans majorité des cas. Ces LAL-T ont réarrangé le TCRδ, le TCRγ et le TCRβ de façon incomplète.

Les LAL-T de l'adulte (> 20 ans) présentent un stade d'arrêt de maturation nettement plus immature que les LAL-T pédiatriques (<10 ans) ; en effet, pour ces dernières, la moitié des cas exprime un TCR de surface. Les LAL-T des adolescents et de l'adulte jeune (11-20 ans) présentent des stades d'arrêt de maturation intermédiaires permettant de visualiser une évolution progressive entre ces deux catégories immatures et matures (Asnafi et al., 2004). L'involution thymique est à l'origine de la l'incidence croissante des formes immatures en fonction de l'âge.

III.4. ***Les Anomalies oncogéniques***

Au cours de ces deux dernières décennies, des progrès significatifs ont été réalisés dans l'identification des anomalies génétiques des LAL-T et la compréhension de leurs conséquences fonctionnelles (Armstrong and Look, 2005; De Keersmaecker et al., 2005; Grabher et al., 2006; Graux et al., 2006). Il est maintenant admis que les LAL-T constituent

une pathologie dite «multihits» : de nombreuses altérations doivent être acquises par la cellule lymphoïde avant d'aboutir à la transformation maligne finale. Ainsi, de nombreuses lésions sont identifiées dans les blastes d'un même patient telles que des translocations, des mutations, des délétions et des amplifications peuvent s'accumuler de façon séquentielle.

Un grand nombre de gènes impliqués dans l'oncogenèse des LAL-T a initialement été mis en évidence à l'aide de l'étude du caryotype réalisé systématiquement au diagnostic de la maladie. En effet, des translocations chromosomiques visibles en cytogénétique conventionnelle entre les loci du TCR et des oncogènes sont fréquemment observées.

Ces translocations peuvent être de deux types. Les translocations non réciproques conduisent à de larges délétions ou duplication de morceaux de chromosomes. Les translocations réciproques consistent en une simple permutation entre deux bras de chromosomes non homologues et en l'absence de délétion de matériel génétique. Ces dernières sont très fréquemment observées dans les LAL-T. Les oncogènes impliqués dans une translocation avec un TCR sont nombreux tels que *TAL1*/2, *LYL1*, *LMO1/2*, c-*MYC*, *NOTCH1*, *LCK, TLX1, BHLHB1*, *MTCP1*, *CCND2*, le cluster des gènes *HOXA*, *BMI-1* et c-*MYB*. Cependant, des partenaires restent non identifiés (Cauwelier et al., 2006). Une étude par FISH, a permis de mieux identifier les oncogènes impliqués dans les translocations avec le TCR. Ces oncogènes sont impliqué dans une translocation avec le locus du TCRα/δ (14q11) et du TCRβ (7q35) à hauteur de 18% et 19%, respectivement (Cauwelier et al., 2006). De façon remarquable, des translocations impliquant le TCRγ ne sont jamais identifiées dans les LAL-T.

Une classification simplifiée des nombreuses altérations a été proposée en fonction du processus cellulaire qu'elles affectent tels que la différenciation, les étapes de contrôle au niveau du cycle cellulaire (ou c*heckpoints*), la prolifération ou la survie (De Keersmaecker et al., 2005; Van Vlierberghe et al., 2008a). Ainsi, on peut classer les oncogènes des LAL-T en deux types : A et B. Les oncogènes de type A sont présents dans les blastes de façon mutuellement exclusive, déterminent de façon dominante un groupe de patients par une signature d'expression génique et sont associés à une étape donnée du blocage de maturation. Les oncogènes de type B sont redondants entre eux et avec les oncogènes de type A. Ils agissent en synergie dans le processus de transformation. Les oncogènes du type B sont généralement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, l'auto-renouvellement et/ou l'engagement dans la lignée T (Van Vlierberghe et al., 2008a).

III.4.1. ***Oncogènes de type A***

Les anomalies génétiques touchant les oncogènes de type A induiraient le blocage de maturation à des stades spécifiques du développement des lymphocytes T (Van Vlierberghe et al., 2008a). Ces oncogènes définissent des sous-groupes cytogénétiques et moléculaires de LAL-T comprenant les anomalies génétiques ayant pour conséquence l'expression ectopique des gènes tels que *TAL1/2*, *LMO1/2*, *TLX1/3*, *MYB* et *HOXA* et les aberrations chromosomiques produisant des transcrits de fusion tels que CALM-AF10, MLL-ENL et SET-NUP214. Plusieurs études transcriptomiques ont permis d'établir des signatures spécifiques de sous-groupes de LAL-T (Ferrando et al., 2002b; Soulier et al., 2005a). Ces études ont montré un profil d'expression commun entre les LALT surexprimant l'un de ces gènes du groupe A. Ainsi à titre d'exemple, l'étude du transcriptome des LAL-T avec un transcrit CALM-AF10, le transcrit SET-NUP214, un réarrangement de *MLL* ou une inversion du chromosome 7 montre une signature transcriptionnelle commune caractérisée par la surexpression des gènes *HOXA*. Ces LAL-T forment ainsi le groupe HOXA (Soulier et al., 2005a). De même, l'altération de l'un des oncogènes *TLX1*, *TLX3* ou *MYB* est associée à un profil d'expression spécifique à chacun d'entre eux (Clappier et al., 2007; Ferrando et al., 2003; Soulier et al., 2005a). Les anomalies des protéines bHLH (TAL1/2, LYL1), HOX (TLX1/3) et c-MYB sont identifiées dans 65 % des LAL-T alors que les anomalies des protéines LIM (LMO1/2) et du cluster HOXA sont identifiées dans seulement 10 % et 12 %, respectivement des LAL-T

III.4.1.1. Sous-groupe TAL/LMO

TAL1 et *TAL2* sont des gènes appartenant à la famille bHLH de classe B. Ce sont des cofacteurs transcriptionnels qui se complexent avec E2A/HEB qui sont des bHLH de classe A (pour revue : (Jones, 2004)).

En conditions physiologiques, TAL1 est impliqué dans l'hématopoïèse de plusieurs lignées cellulaires mais n'est pas exprimé durant la maturation lymphocytaire T (Pulford et al., 1995). La surexpression de TAL1 chez près de 30-40 % des LAL-T est associée aux stades d'arrêts de maturation mature. Sa surexpression est induite de trois façons : soit par une translocation avec les loci du TCRβ et TCRα/δ, soit par une délétion interstitielle mettant TAL1 sous le contrôle du promoteur de SIL ou soit par une expression ectopique dû à un mécanisme non

encore expliqué à ce jour. L'anomalie chromosomique SIL-TAL1 est la plus fréquemment retrouvée dans les LAL-T de l'enfant (15 à 20 % en fonction des données de la littérature). Cette anomalie survient dans des LAL-T TCRαβ positives (et plus particulièrement celles qui ont délété sur les deux allèles les loci TCRδ) mais jamais dans des LAL-T TCRγδ (Macintyre et al., 1992). Par ailleurs, il est rapporté qu'une expression ectopique de TAL1 sans anomalie détectable du locus survient chez de nombreux patients (Bash et al., 1995; Chetty et al., 1995). Néanmoins, même s'il existe des données solides pour affirmer l'existence de surexpression ectopique de TAL1, la fréquence est sans doute surestimée par la présence de cellules résiduelles exprimant physiologiquement TAL1 (comme les érythroblastes) dans les prélèvements (Delabesse et al., 1998).

L'effet oncogénique de TAL1 a été démontré dans un modèle murin, dans lequel TAL1 est sous le contrôle du promoteur Lck ce qui permet une surexpression spécifique dans les thymocytes. Ce modèle développe une leucémie avec une longue latence, entre 7/8 mois et 1 an selon les études (Condorelli et al., 1996; Kelliher et al., 1996) suggérant la nécessité d'un évènement oncogénique secondaire. La latence est fortement réduite dans un modèle double transgénique avec un KO de p53.

Dans les LAL-T, TAL1 peut bloquer la différenciation par inhibition de pTα *via* l'inhibition de la fonction de HEB-E2A et également promouvoir la croissance par inhibition de p16 qui intervient dans le cycle cellulaire (Hansson et al., 2003; Herblot et al., 2000; Tremblay et al., 2003).

LMO1 et LMO2 sont exprimés dans les thymocytes DN1 et DN2 et exercent une fonction de contrôle de l'hématopoïèse et de l'angiogenèse.

Dans les LAL-T, *LMO1* et *LMO2* sont fréquemment impliqués dans des translocations chromosomiques avec les TCRα/δ ou TCRβ induisant de ce fait leur surexpression. Plus récemment, une délétion interstitielle (del (11)(p12.p13) a été identifiée. Cette délétion intra chromosomique a pour conséquence la perte d'un élément de régulation négatif et ainsi la surexpression de LMO2 (Van Vlierberghe et al., 2006). La surexpression de LMO2 par des translocations avec les TCRs dans les LAL-T prédomine au cluster mature (Ferrando et al., 2002b).

Les modèles murins transgéniques de LMO1 et LMO2 ont démontré leur rôle oncogénique. Ces souris développent des tumeurs T peu agressives de phénotypes variés avec des fréquences variables (de 10 à 100 %) ainsi qu'une longue latence (Fisch et al., 1992; Larson et al., 1995). De ce fait, la nécessité d'évènements secondaires a été suggérée pour aboutir au

développement de la LAL-T. Le modèle murin le plus fréquemment utilisé est le modèle double transgénique de coopération LMO2 ou LMO1 avec TAL1, ce qui permet une diminution importante de la latence (Chervinsky et al., 1999). Ces modèles reflètent ce qui est observé dans les LAL-T puisque l'accumulation d'une population thymique DN est observée.
L'étude récente de McCormack et *al.* montre l'implication directe de *Lmo2* dans le blocage de maturation chez des souris transgéniques pour ce gène (McCormack et al., 2010). En effet, l'expression constitutive de LMO2 induirait un auto-renouvellement permanent des thymocytes engagés dans la différenciation T et ce qui empêcherait la maturation thymique. La synergie des gènes *LMO*/*TAL* peut être expliquée par leur action prédominante d'inhibition du frein de prolifération cellulaire exercé par E2A car les souris déficientes pour E2A montrent le même phénotype que les souris transgéniques LMO/TAL (O'Neil et al., 2004).

III.4.1.2. Sous-groupe C-MYB

Dans la maturation thymique, C-MYB joue un rôle dans la phase proliférative consécutive à la sélection β (Pearson and Weston, 2000). D'une part, C-MYB joue un rôle dans la transition des cellules DN vers des stades ultérieurs de maturation. C-MYB peut être classé en oncogène de type A ou de type B selon son mécanisme de dérégulation. Dans la classe des oncogènes de type A, *C-MYB* est dérégulé dans les LAL-T suite à une translocation chromosomique avec le TCRβ. Cette translocation a été identifiée principalement chez l'enfant très jeune et pourrait constituer un sous-groupe de LAL-T basé sur le profil d'expression génique. Le stade d'arrêt de maturation n'a pas été clairement caractérisé (Clappier et al., 2007). Cette anomalie est identifiée dans environ 20 % des LAL-T de l'enfant, notamment du jeune enfant, et 5 % des LAL-T de l'adulte.

III.4.1.3. Les protéines à homéodomaine, HOXA, TLX1, TLX3

Les protéines à homéodomaine sont des facteurs de transcription ayant pour fonction la mise en place ordonnée, dans le temps et dans l'espace, au cours de l'embryogenèse, des différentes structures anatomiques (morphogenèse) (Krumlauf, 1994).
Cette super famille de protéines possède un domaine caractéristique de 60 acides aminé appelé homéodomaine, il fut initialement identifié chez la drosophile. Ce domaine

caractéristique de cette famille a pour propriétés à la fois de se lier à l'ADN et d'interagir avec les protéines partenaires. Une classification récente a établi deux groupes; les groupes HOXL et (Holland et al., 2007). Ces sous-classes se distinguent par leur position chromosomique. En effet, la sous-classe des HOXL se distribue en deux sous-groupes de gènes : les HOX paralogues et les para HOX paralogues, constitués chacun de quatre régions cluster. Les gènes HOX paralogues sont les mieux étudiés, ils comprennent les protéines HOX répartis en quatre clusters : HOXA, HOXB, HOXC et HOXD. La fonction de ces gènes a été bien étudiée au cours de l'embryogenèse dans la définition axiale antéro-postérieure des différents segments de l'embryon de des membres. Les gènes de la famille NKL ne sont pas répartis en cluster mais sont dispersés dans le génome. Leurs homéodomaines sont moins bien conservés avec une divergence d'environ 50% par rapport au gène *ANTP* ancestral identifié chez la drosophile. Ces membres de famille jouent un rôle clé au cours de l'organogenèse dans la différenciation du mésoderme et de l'ectoderme ainsi que dans l'orientation des lignées cellulaires (Duverger and Morasso, 2008).

Il est, assez bien, établi que les protéines à homéodomaine ne jouent pas seulement un rôle dans l'organogenèse, mais contribuent aussi à l'organisation et à la régulation de l'hématopoïèse (Lawrence et al., 1996; Magli et al., 1997; Taghon et al., 2003). En effet, l'engagement des CSH vers des lignées spécifiques et leur différenciation plus tardive sont régulés, entre autres, par l'existence de combinaisons variables de protéines HOX. À titre d'exemple, il a été montré que les gènes *HOXB4* et *HOXC* favoriseraient l'engagement des CSH vers la lignée lymphoïde T (Bijl et al., 1996; Lawrence et al., 1993).

Ces protéines peuvent avoir un rôle dans la différenciation cellulaire et certaines d'entre-elles sont impliquées dans des maladies humaines et des anomalies congénitales. En effet, de nombreux modèles murins d'inactivation ou de surexpression dans la moelle osseuse des gènes *HOX* ont montré l'atteinte d'une ou de plusieurs lignées hématopoïétiques. Une surexpression constitutive des homéogènes aboutit le plus souvent à l'apparition d'hémopathies de type leucémie. Ces résultats confirment le rôle joué par ces protéines dans l'hématopoïèse et dans les pathologies malignes (Argiropoulos and Humphries, 2007; Grier et al., 2005; Lawrence et al., 1996). Il n'est pas étonnant que la dérégulation de gènes impliqués dans le contrôle de la différenciation et de la prolifération puisse jouer un rôle dans la transformation maligne des cellules.

Sous-groupe HOXA

Durant la maturation T normale humaine, les protéines HOXA7, HOXA9, HOXA10 et HOXA11 sont exprimées aux stades les plus précoces du développement T et s'éteignent progressivement lors de la maturation en commençant par les gènes situés dans la région 3' du cluster (Taghon et al., 2003).
Dans les LAL-T, HOXA peut être dérégulé de plusieurs manières : soit par la présence des transcrits de fusion impliquant MLL, CALM-AF10 ou SET-NUP214, soit par une translocation avec les loci du TCR. La dérégulation du cluster HOXA, quelle que soit le mode de dérégulation est observée dans environ 12 % des LAL-T de l'adulte et de l'enfant.

La translocation t(10;11)(p13;q14) qui fusionne les gènes CALM et AF10 a identifié comme une anomalie chromosomique récurrente dans les LAL-T. L'incidence est autour de 8 %. CALM-AF10 est détecté dans les LAL-T immatures (IMδ ou IMγ) et moins souvent dans les LAL-T de la lignée γδ mais jamais dans les LAL-T TCRαβ positives. Ceci suggère fortement que le transcrit CALM-AF10 est un transcrit oncogénique restreint à la lignée γδ. Il a été montré que CALM-AF10 est nécessaire et suffisant à la transformation. Dans les cas de translocations CALM-AF10, l'expression des gènes *HOXA* est due au recrutement de l'histone H3 méthyltransférase hDOTL1 par AF10 empêchant l'export nucléaire de CALM-AF10 et induisant la surexpression du cluster HOXA (Okada et al., 2006).

Les fusions impliquant *MLL* sont très peu fréquentes dans les LAL-T pédiatriques (inférieur à 1 %) et sont associées à un arrêt de maturation à un stade immature ou TCRγδ (Ferrando et al., 2003). De la même façon que CALM-AF10, les transcrits de fusion MLL-AF10 et MLL-ENL interagissent avec hDOT1L ayant pour conséquence l'activation du cluster des gènes *HOXA* (Mueller et al., 2007).

Un nouveau type de délétion chromosomique cryptique touchant le chromosome 9 (del(9)(q34.11;q34.13)) a été mis en évidence dans les LAL-T (Van Vlierberghe et al., 2008b). Cette délétion a pour conséquence la fusion des gènes *SET* et *NUP214*. SET-NUP214 est un co-facteur de transcription qui fixe les régions promotrices des gènes *HOXA9* et *HOXA10*, et interagit avec CRM1 et hDOT1L (Van Vlierberghe et al., 2008b). Ainsi, la méthylation des histones H3 est accompagnée de l'acétylation des histones H3 au sein des

régions promotrices de tous les gènes *HOXA*. Ce mécanisme a été confirmé dans une lignée cellulaire appelée LOUCY qui porte l'anomalie SET-NUP214 et surexprime les gènes *HOXA*.

Un modèle murin de surexpression des gènes *HOXA9* ou *HOXA10* confère un avantage prolifératif et conduit à une leucémie avec une longue latence ce qui suggère la nécessité d'évènements oncogéniques secondaires (Argiropoulos and Humphries, 2007).

Sous-groupe TLX1

TLX1 (ou *HOX11*, *TCL3*), est un homéogène orphelin de classe II situé, chez l'Homme, sur le chromosome 10q24. Il est admis que TLX1 n'est pas exprimé en physiologie durant la lymphopoïèse T.

Sa surexpression dans les LAL-T, induite pas une translocation avec les loci des TCRs est identifiée dans environ 5 % des LAL-T pédiatriques et 30 % des LAL-T de l'adultes (Ferrando et al., 2004). La surexpression de TLX1 a été reportée dans des LAL-T en l'absence de translocation avec le TCR. Il a été proposé un mécanisme alternatif tel que la déméthylation du promoteur ou un mécanisme de *trans*-activation pour expliquer cette surexpression (Watt et al., 2000). Cette surexpression, quelle qu'en soit l'origine, a pour conséquence un blocage de maturation au stade cortical pré-αβ (Asnafi et al., 2004; Ferrando et al., 2002b; van Grotel et al., 2006).

Ce stade d'arrêt de maturation a été confirmé dans des études de modèles murins. En effet, l'expression rétrovirale de TLX1 dans des thymocytes induit un blocage de différenciation juste avant le stade DP (Owens et al., 2006). La surexpression ectopique du gène *TLX1* dans les souris transgéniques provoque des leucémies/lymphomes exclusivement de phénotype T. Cependant, la fréquence de ces tumeurs est très faible (inférieur à 5 à 10 %) et la latence très longue (supérieur à 9-12 mois), ce qui suggère que des évènements oncogéniques supplémentaires doivent être accumulés afin d'aboutir à une transformation leucémique (Hawley et al., 1994; Hawley et al., 1997). Une étude menée sur des cellules de foie fœtal murines ou des cellules progénitrices humaines $CD34^+$, infectées par un virus permettant l'expression de TLX1 puis cultivées en FTOC, a montré que ces cellules présentent un blocage de maturation avant le stade DP. La délétion du domaine H3 de TLX1, capitale pour la fonction de l'homéodomaine, lève le blocage de maturation, ce qui suggère le rôle de l'homéodomaine également dans le blocage de maturation.

Sous-groupe TLX3

TLX3 (appelé aussi *HOX11L2*) est un gène HOX orphelin de séquence très proche de *TLX1*, situé chez l'Homme au niveau du chromosome 5q34. TLX3 n'est pas exprimé dans les cellules hématopoïétiques physiologiques. En effet, son expression est restreinte aux cellules du système nerveux périphériques.

Sa surexpression est induite par une translocation, t(5;14)(q35;q32), le plus souvent cryptique dans environ 25 % des LAL-T pédiatriques et 15 % des LAL-T de l'adultes. Cette translocation juxtapose *TLX3* au promoteur de *BCL11B* ce qui aboutit à la surexpression de TLX3 (Bernard et al., 2001). D'autres translocations plus rares ont été décrites telles que les translocations avec le TCRδ (Hansen-Hagge et al., 2002) ou CDK6 (Su et al., 2004)..

Les LAL-T TLX3 positives partagent un profil d'expression transcriptomique très fortement similaire correspondant à un arrêt de maturation au stade cortical précoce $CD1a^+$, pré-αβ. Certains cas de LAL-T $TLX3^+$ sont de phénotype Tγδ mais ne sont jamais de phénotype mature Tαβ (Asnafi et al., 2004; Ferrando et al., 2002b; van Grotel et al., 2006).

Les modèles murins inactivés pour TLX3 présentent une mortalité un jour après la naissance par atteinte des centres respiratoires de la moelle épinière mais sans atteinte significative de l'hématopoïèse (Shirasawa et al., 2000). Aucune donnée publiée n'est à ce jour disponible quant à un éventuel rôle de TLX3 dans la lymphopoïèse T. En effet, à ce jour, il n'a été identifié ni de cibles géniques régulées par TLX3 ni de partenaires protéiques.

III.4.2. ***Oncogènes de type B***

De nombreuses anomalies génétiques sont identifiées dans les LAL-T et sont présentes de manière redondante entre-elles dans les différents sous-groupes de LAL-T. Elles s'ajoutent à l'expression des oncogènes de type A et constituent ainsi les anomalies de type B (**Tableau 2**) (Van Vlierberghe et al., 2008a). Ces anomalies incluent des dérégulations de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (mutations de type B1), dans l'auto-renouvellement (mutation de type B2), dans la voie de signalisation du TCR (mutation de type B3), dans la différenciation T (mutations de type B4) ou induisant l'activation des tyrosines kinases (mutations de type B5). Certains de ces gènes dérégulés peuvent être retrouvés dans plusieurs de ces groupes car ils agissent dans divers processus cellulaires. De nombreux nouveaux gènes appartenant au

groupe B sont identifiés. Compte tenu de leur grand nombre, ne seront décrit ici que les plus relevants et/ou fréquents.

	Rearrangement	Gene(s)	Function
Cell cycle defects (B1)	9p21 deletions/hypermethylation	*CDKN2A/2B*	Cell cycle inhibitor/Inhibitor HDM2
	t(7;12)(q34;p13)/t(12;14)(p13;q11)	*CCND2*	Cell cycle activator
NOTCH activation (B2)	t(7;9)(q34;q34)	*NOTCH1*	Self-renewal, differentiation
	Mutations	*NOTCH1*	T cell commitment
	Mutations	*FBXW7*	Proteasomal degradation
(pre)TCR signalling (B3)	t(1;7)(p34;q34)	*LCK*	Signal transduction
	Mutations	*RAS*	Signal transduction
	17q11.2 deletion	*NF1*	RAS inhibitor
	10q23.31 deletion	*PTEN*	Signal transduction
	Mutations	*PTEN*	Signal transduction
Additional deregulation T-cell differentiation (B4)	Duplication	*MYB*	Transcription factor
Activation other tyrosine kinases (B5)	Episomal 9q34 amplification	*NUP214-ABL1*	Signal transduction
	t(9;14)(q34;q32)	*EML1-ABL1*	Signal transduction
	t(9;12)(q34;p13)	*ETV6-ABL1*	Signal transduction
	t(9;22)(q34;q11)	*BCR-ABL1*	Signal transduction
	t(9;12)(p24;p13)	*ETV6-JAK2*	Signal transduction
	Mutations	*FLT3*	Tyrosine kinase receptor signalling

Tableau 2 : Classification des oncogènes de type B dans les LAL-T.

Anomalies du cycle cellulaire (Type B1)

Le cycle cellulaire est un processus hautement régulé au cours duquel différents points de contrôle permettent la coordination entre la croissance cellulaire, la division cellulaire et la différenciation (pour revue (Nurse, 2000)).

L'inactivation génomique homozygote ou hétérozygote des loci *CDKN2A* et *CDKN2B* est l'anomalie la plus fréquente des LAL-T avec une incidence d'environ 90 % (Cayuela et al., 1996). *CDKN2A* et *CDKN2B* code respectivement pour p16 et p15 agissant comme des inhibiteurs de la cycline D et de CDK4. De plus, la délétion de ces deux gènes a pour conséquence une entrée incontrôlée en cycle ainsi que la désactivation des points de contrôles et de l'apoptose. La délétion de *CDKN2A* et *CDKN2B* n'est pas restreinte aux LAL-T mais reflète un mécanisme plus général dans le processus oncogénique dans les tumeurs cancéreuses.

La surexpression de cyclines a également pour conséquence une entrée en cycle incontrôlée. Par exemple, la translocation entre le locus de la cycline D2 (*CCND2*) et le TCRβ a pour conséquence une expression ectopique de la Cycline D2 (Clappier et al., 2006).

Activation de la voie NOTCH1 (Type B2)

La dérégulation de la voie NOTCH1 a été découverte par la translocation t(7 ; 9)(q34 ; q34.3) impliquant le récepteur NOTCH1 et le TCRβ (Ellisen et al., 1991). Plus récemment, des mutations de *NOTCH1* ont été identifiées dans environ 50 à 60 % des LAL-T. Deux types de mutations majoritaires sont décrits, celles touchant le domaine d'hétérodimérisation (HD) et celles affectant le domaine PEST (**Figure 33**). Des mutations plus rares peuvent affecter le domaine juxta-membranaire ou le domaine de *trans*-activation (TAD) (Sulis et al., 2008). Les mutations de *NOTCH1* sont couplées avec les mutations du gène *FBXW7*. En effet, les mutations de *FBXW7* sont retrouvées dans environ 10 % des LAL-T. FBXW7 fait partie de la famille de E3 ligase et a, entre autres, pour cible NOTCH1. FBXW7 permet la poly-ubiquitination de NOTCH1 sur le phospho-degron ainsi que sa dégradation par le protéasome (O'Neil et al., 2007; Thompson et al., 2007). Au total, les mutations de *NOTCH1* et/ou de *FBXW7* portent la dérégulation de cette voie dans environ 70 % des LAL-T (Asnafi et al., 2009a).

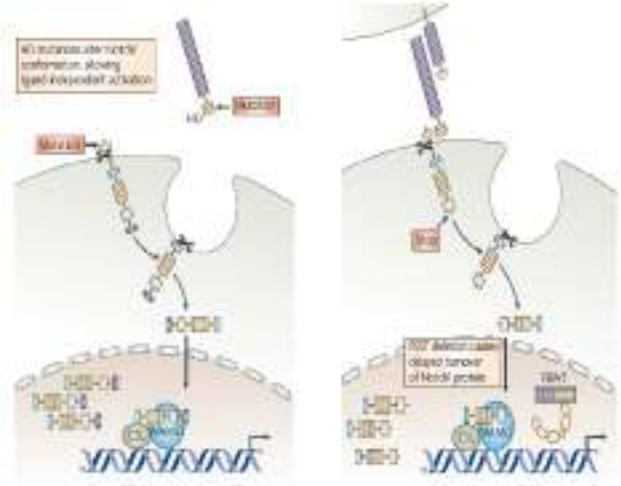


Figure 33 : Schématisation du récepteur humain NOTCH1 avec les principales mutations retrouvées dans les LAL-T.
A. Les mutations au niveau du domaine HD entraînent une activation ligand indépendante du récepteur qui sera coupé par les métalloprotéases.
B. Les mutations au niveau du domaine PEST stabilise le domaine intracellulaire de NOTCH1 et le rend résistant à la dégradation par FBXW7.
(Aifantis et al., 2008).

Les mutations sur le domaine HD sont des mutations ponctuelles ou des insertions/délétions qui ne décalent jamais le cadre de lecture. Ces mutations entraînent une activation constitutive en l'absence de ligand. Les mutations de *NOTCH1* sur le domaine PEST sont soit des codons stop, soit des insertions/délétions qui décalent le cadre de lecture pour aboutir à un codon stop. Ces mutations entraînent toujours la délétion du phospho-degron. Les mutations de *FBXW7* se situent au niveau de trois arginines, toutes trois impliquées dans la reconnaissance du phospho-degron. Les mutations de *NOTCH1* sur le domaine PEST et celles de *FBXW7* ne sont pas ligand-indépendantes mais permettent une augmentation de la demi vie de la protéine NOTCH1 par absence de dégradation par le protéasome. Il est important de noter que des mutations à effets similaires ne surviennent jamais ensemble ; il n'est jamais retrouvé de mutations de FBXW7 et du domaine PEST chez le même patient.

Anomalies dans la voie de signalisation du pré-TCR (Type B3)

Les multiples composants de la voie de signalisation du pré-TCR sont affectés par des mutations ou des réarrangements chromosomiques dans les LAL-T, ce qui suggère que la voie du pré-TCR joue un rôle important la leucemogenèse T.

Par exemple, la protéine LCK est fortement exprimée dans les cellules T et joue un rôle central dans les premières étapes de la signalisation du pré-TCR (Palacios and Weiss, 2004). Dans de rares cas de LAL-T, des translocations entre *LCK* et le TCRβ ont été décrites (Tycko et al., 1991). De même, la protéine tyrosine kinase RAS est impliquée dans la transmission de la signalisation du pré-TCR *via* ERK. Dans les LAL-T, des mutations activatrices de RAS ont été identifiées dans 4 à 10 % des cas (Kawamura et al., 1999; Yokota et al., 1998). *NF1*, le régulateur négatif de RAS, est également retrouvé délété dans de très rares cas de LAL-T (Balgobind et al., 2008). La phosphatase PTEN, est également un régulateur important de la signalisation du pré-TCR, qui est négativement régulée par NOTCH1. Des inactivations homozygotes de *PTEN* sont décrites dans 17 % des LAL-T (Palomero et al., 2007).

Dérégulation additionnelle de la différenciation T (Type B4)

L'oncogène *C-MYB* est également un oncogène de type B quand sa dérégulation est observée suite à une duplication. Cette anomalie est retrouvée dans environ 8 % des LAL-T (Clappier et al., 2007; Lahortiga et al., 2007). Pour des raisons mal comprises, les duplications de *C-MYB* ne correspondent pas une entité de LAL-T et se retrouvent associées à plusieurs

oncogènes de type A (Clappier et al., 2007; Lahortiga et al., 2007) tels que *TAL/LMO, TLX1, TLX3 et HOXA.*

Anomalies d'autres tyrosines kinases (Type B5)

Des anomalies de tyrosine kinase ont été décrites dans d'autres catégories d'oncogène de type B. Dans cette partie seront décrites les tyrosines kinases qui n'appartiennent à aucune autre catégorie.

La dérégulation d'*ABL1* est impliquée dans les cas de LAL-T que ce soit par des amplifications épisomales de type NUP214-ABL1, retrouvées dans 6 % des LAL-T (Graux et al., 2004) ou soit suite à une fusion avec ETV6, EML1 ou BCR ABL1 retrouvées beaucoup plus rarement (De Keersmaecker et al., 2005; Van Limbergen et al., 2001). Les produits de fusion avec ABL1 ont pour conséquence une phosphorylation constitutive d'ABL1 ce qui induit une activation aberrante de la tyrosine kinase ainsi qu'une prolifération excessive. JAK1 et JAK2 sont également deux tyrosines kinases impliquées dans les LAL-T. *JAK1* est dérégulé suite à des mutations à des fréquences variables selon les études (Asnafi et al., 2009b; Flex et al., 2008; Jeong et al., 2008) et *JAK2* suite à une fusion avec *ETV6* (Lacronique et al., 1997). De même, les anomalies de la tyrosine kinase FLT3 par des mutations dans le domaine de la boucle d'activation ou par des duplications en tandem dans le domaine juxta-membranaire sont retrouvées dans de rares cas de LAL-T (Paietta et al., 2004; Van Vlierberghe et al., 2005).

III.4.3. ***Dérégulation de RUNX1***

La dérégulation de *RUNX1* par des translocations chromosomiques et des mutations est fréquemment retrouvée dans les leucémies aigues. De nombreux partenaires de *RUNX1* sont décrits dans les translocations **(Figures 34)**. Les plus fréquentes sont les translocations t(8 ;21)(q22 ;q22) entre *RUNX1* et *ETO* et t(12 ;21)(p13 ;q22) entre *RUNX1* et *TEL* présentes respectivement dans 10 % des LAM (Acute Myeloid Leukemia) de l'adulte et 25 % des LAL de l'enfant.

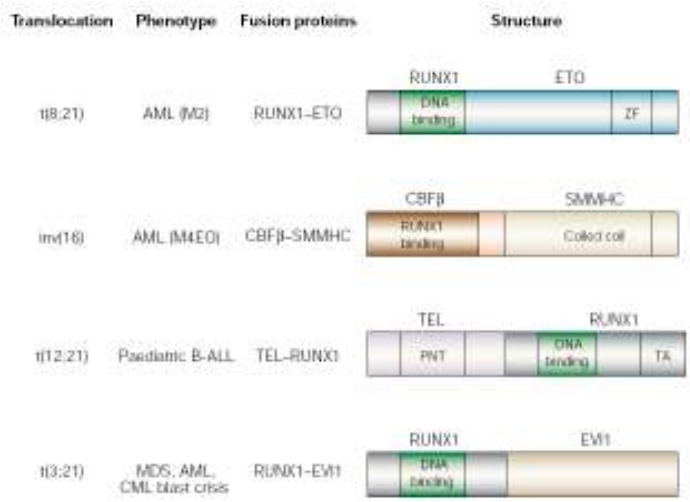


Figure 34 : Représentation schématique des translocations impliquant RUNX1.
(Speck and Gilliland, 2002)

Récemment des anomalies de *RUNX1* ont été décrites dans les LAL-T. Ces anomalies sont soit des mutations soit des délétions génomiques, elles sont essentiellement identifiées dans le sous-groupe des ETP-ALL (Zhang et al., 2012). En effet, cette étude identifie 12 cas (23%) ETP-ALL avec une altération de RUNX1 contre 2 (5%) cas dans le groupe non ETP.

Les LAM0 représentent l'entité avec la plus grande incidence de mutations de RUNX1, soit 27%. De plus, il semblerait que l'entité LAM0 ne soit pas homogène et que le statut mutationnel de RUNX1 forme deux sous-classes de LAM0. La sous classe présentant des mutations de RUNX1 présente une augmentation de l'expression des transcrits de gènes impliqués dans le développement lymphoïde B.

Les mutations de *RUNX1* touchent principalement le domaine N-terminal, au niveau du domaine runt ce qui peut perturber la fixation de son partenaire CBFβ. Ces mutations entraînent une perte de fonction.

Il semble qu'en elle-même l'inactivation du gène *RUNX1* seule ne suffise pas à la leucemogenèse mais qu'elle constitue une première étape après laquelle la survenue d'un autre événement conduit au déclenchement de la pathologie (Roumier et al., 2006).

Résultats

De l'ontogenèse…

Article 1

Rôle de RUNX1 dans les réarrangements précoces du TCRδ

Human TCRδ early rearrangements are ordered *via* a specific RSS-RUNX1-RAG1 interaction

Manuscrit en préparation

Le Noir S, Lhermitte L, Trinquand A, Villarèse P, Cieslak A, Reimann C, Verhoeyen E, Roggy A, Six E, André-Schmutz I, Nadel B, Macintyre EA, Payet-Bornet D#, Asnafi V#.
co-corresponding auteurs

Durant la maturation thymique, la cinétique de réarrangement des TCRs les uns par rapport aux autres est bien établie. Les loci des TCRβ et TCRδ sont les plus complexes car ils contiennent des segments D à la différence des loci des TCRα et TCRγ. Il se pose ainsi la question de la cinétique d'utilisation des segments V, D et J au sein de ces loci. Comme je l'ai décrit dans la partie introduction le facteur de transcription c-Fos a été décrit comme le facteur majeur de l'ordonnement des réarrangements du TCRβ. Cette étude a pour objectif d'analyser la régulation des réarrangements précoces du TCRδ chez l'homme et les facteurs de transcription impliqués.

La quantification des réarrangements Dδ2-Dδ3 et Dδ2-Jδ1 et les TREC associés dans les sous-populations thymiques humaines met en évidence la présence massive des réarrangements Dδ2-Dδ3 au stade $CD34^+$ / $CD1a^-$ et peu de Dδ2-Jδ1. Ces derniers sont fortement présents au stade $CD34^+$ / $CD1a^+$ alors que Dδ2-Dδ3 diminuent. Ces résultats ont été confirmés dans une expérience *ex vivo* de différenciation T sur OP9-DL1 de cellules $CD34^+$ de sang de cordon puisque les premiers réarrangements à s'effectuer sont les réarrangements Dδ2-Dδ3 à J7 de culture suivis par les réarrangements Dδ2-Jδ1 à J10 de culture. Enfin, une approche de recombinaison *in vitro* permettant d'analyser la formation des TREC a permis de confirmer ces données. L'ensemble de ces résultats suggère un ordonnement des réarrangements précoces du TCRδ avec un réarrangement Dδ2-Dδ3 suivi par l'utilisation du segment Jδ1. De plus, nous avons identifié, le stade phénotypique $CD34^+$ / $CD1a^-$ / $CD7^{int}$ comme étant le stade spécifique des réarrangements Dδ2-Dδ3. Comme attendu, le stade $CD34^+$ / $CD1a^-$ / $CD7^{+/dim}$ possède les caractéristiques phénotypiques ETP basée sur l'expression faible de CD5 et la présence de marqueurs cellule souche et myéloïdes.

Afin d'identifier les facteurs de transcription (FT) susceptibles de réguler cet ordonnement, une étude *in silico* a permis de mettre en évidence un site putatif de fixation pour le FT RUNX1/AML1 sur la 23 RSS de Dδ2. L'expression du transcrit et de la protéine RUNX1 est massive au stade $CD34^+$ / $CD1a^-$ confortant le possible de rôle de ce facteur de transcription dans la régulation de ce réarrangement. Nous avons confirmé ce rôle en montrant dans des $CD34^+$ thymiques la fixation du FT RUNX1 sur le Dδ2-23RSS. De plus, une analyse *in vitro* par GST pull down a permis de montrer l'interaction protéique entre et la protéine RAG1 et ce *via* son domaine C-terminal (non avec la protéine RAG2). Cette interaction a été confirmée par une approche PLA Proximity Ligation Assay) des $CD34^+$ thymiques et de sang de cordon à J7 de culture suggérant ainsi le rôle de RUNX1 dans ce réarrangement.
De façon remarquable, l'inactivation de RUNX1 dans des $CD34^+$ du sang de cordon a pour conséquence une absence de réarrangement Dδ2-Dδ3. Ce rôle majeur de RUNX1 dans la régulation de ce réarrangement est confirmé par une approche de recombinaison *in vitro* en utilisant un vecteur muté au niveau du site de fixation de RUNX1. En effet, cela a pour conséquence un désordre des réarrangements puisque aucun réarrangement Dδ2-Dδ3 n'est observé mais des réarrangements Dδ3-Jδ1 s'effectuent (sans avoir utilisé le segment Dδ2.

L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle majeur de RUNX1 dans l'ordonnement des réarrangements précoces du TCRδ chez l'homme, à la différence de la souris, *via* sa fixation sur la Dδ2-23RSS et l'interaction avec RAG1. De façon intéressante ce modèle met en évidence, après le TCRβ, un nouveau locus soumis à la restriction B12/23.

Human TCRδ early rearrangements are ordered *via* a specific RSS-RUNX1-RAG1 interaction

Sandrine Le Noir[1], Ludovic Lhermitte[1], Amélie Trinquand[1], Patrick Villarèse[1], Agata Cieslak[1], Christian Reimann[3], Els Verhoeyen[4], Anne. Roggy[1], Emmanuelle Six[3], Isabelle André-Schmutz[3], Bertrand Nadel[2], Elizabeth Macintyre[1], Dominique Payet-Bornet[2,5], Vahid Asnafi[1,5]

Affiliations:

[1]Université de médecine Paris Descartes Sorbonne Cité, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR8147, and Département of Hématologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker Enfants-Malades, Paris, France

[2]Centre d'Immunologie de Marseille-Lumen (CIML), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm U631), CNRS UMR6102, Université de la Méditerranée, Marseille, France

[3]Université Paris-Descartes, Faculté de Médecine René Descartes, IFR94 and INSERM, U768, Paris, F-75015, France

[4]Université de Lyon, F69000; Inserm, EVIR, U758, Human Virologie Département, F-69007; Ecole Normale Supérieure de Lyon, F-69007; Université Lyon 1, F-69007, Lyon, France

[5]Co-corresponding authors

Running title: RUNX1 mediates Human TCRδ rearrangements ordering

The authors declare no conflict of interest.

Correspondence and Reprints:

-Vahid Asnafi, Hôpital Necker Enfants-Malades, Laboratoire d'hématologie, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France,

E-mail: vahid.asnafi@nck.aphp.fr. Phone : (+33) 144 49 49 33; Fax : (+33) 144 38 17 45

- Dominique Payet-Bornet, CIML, case 906, Campus de Luminy, 13288 Marseille, France,

E-mail: payet@ciml.univ-mrs.fr. Phone : (+33) 491 26 91 43 ; Fax : (+33) 491 26 94 30

Introduction

Human T-lymphocyte ontogeny is a hierarchical thymic process in which the ordered somatic recombination of V, (D) and J gene segments at the TCRδ, TCRγ, TCRβ or TCRα loci determine the development into either γδ or αβ T-cell lineages (Dik et al., 2005b; Spits, 2002). TCRδ rearrangement is the first to occur, at the $CD34^{+}$, $CD1a^{-}$, CD4/8 double negative (DN) stage, followed by concurrent TCRγ and TCRβ rearrangements coinciding with CD1a expression (Dik et al., 2005b), and finally TCRα rearrangements, which occur at a later CD4/8 double positive (DP) stage, accompanied by TCRδ locus deletion due to Vα-Jα recombination (Verschuren et al., 1997). In both mice and human TCR, only the TCRδ and TCRβ loci contain D gene segments (Lefranc, 2001) (**Supplementary Fig. 1** online for corresponding TCRδ configurations). TCRβ rearrangement is strictly ordered with an initial Dβ to Jβ rearrangement followed by a Vβ to Dβ-Jβ rearrangement (Bassing et al., 2000), whereas the order of TCRδ Dδ-Dδ and Dδ-Jδ rearrangements is poorly characterised in humans.

All V, (D) and J gene segments are flanked with recombination signal sequence (RSS) which are composed of conserved heptamer and nonamer motifs separated by a non conserved spacer of either 12 or 23 base pairs. The V(D)J recombination process is initiated by the multimeric RAG1/RAG2 complex (RAG1/2) which binds to a 12RSS/23RSS pair (12/23 rule) and then introduces double-strand breaks (DSB) simultaneously at the two coding segment-RSS junctions (Eastman et al., 1996; van Gent et al., 1996). The subsequent repair of these DSB involves the Non Homologous End joint (NHEJ) complex as well as the TdT enzyme which increases antigen receptor diversity by adding n nucleotides at the coding segment junctions. The final products of V(D)J recombination are the coding joint (CJ) and the signal joint (SJ). Depending on RSS orientation, the latter is either retained on the chromosome or excised from the chromosome as a T-cell Receptor Excison Circle (TREC). Since TREC are episomal and non replicative DNA their quantity decreases during cell proliferation.

Regulation of V(D)J recombination is mediated by enhancer- and promoter-changes in chromatin structure which determine accessibility of the chromosomal RSS to RAG1/2 complexes (Hesslein and Schatz, 2001; Yancopoulos and Alt, 1985) .In DN thymocytes, TCRδ enhancer (Eδ) activation controls chromatin accessibility to support TCRδ rearrangement (Bassing et al., 2003); whereas in DP thymocytes, activation of the TCRα

enhancer (Eα) is indispensable for the initiation of TCRα rearrangement (Sleckman et al., 1997). Intrinsic RSS features can, however, be directly involved in the control of V(D)J recombination independent to chromatin accessibility (Krangel, 2003), as has been clearly demonstrated for TCRβ gene assembly. The basic 12/23 rule would allow direct Vβ-Jβ rearrangement, but this is prohibited by a beyond 12/23 rule restriction (B12/23 restriction) which imposes Dβ segment usage (Bassing et al., 2000). B12/23 restriction is independent of chromatin structure; it is based on RSS features and can be fully recapitulated with *in-vitro* systems using chromatin-free DNA (Jung et al., 2003; Tillman et al., 2003). Increasing data also suggest that intrinsic features of RSS, notably their ability to recruit specific transcription factors (TF), can also be directly involved in the order of V(D)J recombination (Wang et al., 2008). This was suggested for the mouse TCRβ locus by demonstrating that the B12/23 restriction is independent of chromatin structure and can be fully recapitulated with *in-vitro* systems using chromatin-free DNA (Jung et al., 2003; Tillman et al., 2003). More recently it was shown that c-Fos binds to the mouse and probably human *Dβ1-23RSS* and recruits the RAG1/2 proteins to induce Dβ to Jβ rearrangement (Wang et al., 2008). Importantly, c-Fos inactivation deregulates the order of TCRβ rearrangement and renders direct Vβ to Dβ recombination possible. c-Fos does not bind to murine TCRδ Dδ or Jδ (Wang et al., 2008) and it is generally considered that early rearrangements of this locus is not ordered and does not undergo B12/23 restriction, although the configuration of the Dδ and Jδ gene segments are compatible with such a restriction (**Supplementary Fig. 1** online).

We now show that human TCRδ gene assembly is ordered and controlled by a B12/23 restriction. Most importantly, we show that RUNX1 is directly involved in this ordered early rearrangement through recruitment to the *Dδ2-23RSS* and interaction with RAG1.

Results

Early Human Dδ2-Dδ3 and Dδ2-Jδ1 rearrangements are ordered during thymic maturation

To determine whether TCRδ rearrangements are ordered, we first quantified early TCRδ rearrangements (Dδ2-Dδ3 and Dδ2-Jδ1) in human thymic subpopulations (**Supplementary Fig. 2** online) and $CD34^+$ umbilical cord blood cells (UCB). Contrary to UCB CD34+ cells, Dδ2-Dδ3 rearrangements were readily detected in $CD34^+/CD1a^-$ thymocytes, whereas Dδ2-Jδ1 rearrangements were detected at a lower level (**Fig. 1a**). In $CD34^+/CD1a^+$ thymocytes, Dδ2-Jδ1 rearrangement reached maximum levels and Dδ2-Dδ3 rearrangement declined. These observations were confirmed by quantifying T-cell excision circles (**Fig. 1b**). We next cultured umbilical cord blood $CD34^+$ cells on OP9-DL1 and analyzed TCRδ rearrangement at different days of culture. Dδ2-Dδ3 rearrangements were first detected at day 7 followed by Dδ2-Jδ1 rearrangements 3 days later, at day 10 (**Fig. 1c**). To further confirm ordered TCRδ rearrangement, we amplified, sub-cloned and sequenced Dδ2-Jδ1 human thymic rearrangements. Dδ3 segments were detected in all Dδ2-Jδ1 sequenced rearrangements, suggesting that the assembly of Dδ2 and Jδ1 gene segments occurs in a two-step process starting systemically with the Dδ3 gene segment (**Fig. 1d** and **Supplementary Fig. 3** online). To test whether a B12/23 rule restriction prohibits direct Dδ2-Jδ1 rearrangement, *in-vitro* RAG1/2-mediated DNA coupled cleavage assays which recapitulate the first step of V(D)J recombination (i.e.: DSB formation) and thus result in the production of signal ends (SE) and coding ends (CE), were performed. Using a pD2D3J1 construction, we observed Dδ2-Dδ3 but not Dδ3-Jδ1 SE whereas Dδ3-Jδ1 could be detected with the pD3J1 construction (**Fig. 1e**). Importantly, no direct Dδ2-Jδ1 rearrangement, without a Dδ3 segment, was detected although the 12/23 RSS rule was respected (construction pD2J1) (**Fig. 1e**). Taken together, these results strongly suggested that early TCRδ rearrangements are ordered; with a Dδ2 to Dδ3 rearrangement followed by a Dδ2-Dδ3 to Jδ1 rearrangement and that these rearrangements are controlled by an unsuspected B12/23 restriction.

Dδ2-Dδ3 occurs at a specific $CD34^+$ $CD7^{+dim}$ $CD5^{+/-}$ early thymic precursor stage

We then sought to identify a specific early thymic stage specific to Dδ2-Dδ3 rearrangements. For this purpose we sorted human CD4/8 double negative/$CD34^+$ thymic

precursors based on the level of CD7 expression into $CD34^+/CD1a^-/CD7^{+dim}$ and $CD34^+/CD1a^-/CD7^{++}$ subpopulations (**Fig. 2a**). As expected the $CD34^+/CD1a^-/CD7^{+dim}$ subset demonstrated an early thymic precursor (ETP) phenotype, based on weak CD5 expression and stem cell/myeloid antigen expression (**Fig. 2b**). Interestingly ETP cells demonstrated only Dδ2-Dδ3 rearrangements whereas $CD34^+/CD1a^-/CD7^{++}$ thymocytes exhibit both Dδ2-Dδ3 and Dδ2-Jδ1 rearrangement (**Fig. 2c, d,** left). Multiplex fluorescent PCR analysis confirmed these data, demonstrating that Dδ2-Dδ3 rearrangements start before the Dδ2-Jδ1 in a specific ETP subset (**Fig. 2c, d,** right).

RUNX1 interacts with Dδ2-23RSS

As Dδ2 to Dδ3 occurs at a very immature stage of thymic maturation, harboring low levels of RAG transcripts (**Supplementary Fig. 4** online) we then hypothesized that early TCRδ gene assembly requires specific TF to allow efficient RAG1/2-loading on RSS, as described for c-Fos and Dβ1. To uncover putative transcription factor binding sites within human Dδ2, Dδ3 and Jδ1 RSS, an *in-silico* analysis, using the web-based tool ConSite (sandelin NAR04) was performed. This identified a full consensus DNA binding site for RUNX1 (5' TG(T/C)GGT 3') spanning the human *Dδ2-23RSS* heptamer and Dδ2 coding sequences (**Fig. 3a**). RUNX1 binding sites were not found in any other human Dδ and Jδ RSS/coding sequences. This DNA binding site is not conserved in the mouse Dδ1 segment (homologous to human Dδ2) (**Fig. 3b**). RUNX1 is highly expressed (at both transcript and protein levels) in human early thymic cells (**Fig. 3c, d**) and as such coincides with early TCRδ gene rearrangement. Chromatin-immunoprecipitation (ChIP) assays performed with $CD34^+$ thymocytes and anti-RUNX1 antibody show that immunoprecipitated DNA is significantly enriched with *Dδ2-23RSS* DNA, compared to Dδ3-12RSS DNA (**Fig. 3e,** left). As expected, in the control ChIP assay performed with $CD34^-/CD3^+$ (instead of $CD34^+$) thymocytes, precipitated DNA was not enriched for *Dδ2-23RSS* due to TCRα rearrangement and consequently TCRδ deletion. (**Fig. 3e,** right).

These data demonstrate that RUNX1 can bind human thymocyte *Dδ2-23RSS* at a stage when Dδ2 to Dδ3 rearrangement is taking place, but that regulation of murine Dδ2 to Dδ3 rearrangement appears to be different.

RUNX1 interacts with the RAG1 protein

To further explore the possibility that RUNX1 could facilitate RAG1 loading onto *Dδ2-23RSS*, GST pull-down assays were used to show that the core RAG1 protein interacts with RUNX1 *in-vitro, via* its C-terminal domain (**Fig. 4a**). Furthermore, co-immunoprecipation (IP) assays using the MOLT-4 T-ALL cell line, which co-expresses RUNX1 and RAG1, showed that IP performed with an anti-RUNX1 antibody results in the Co-IP of RAG1 (**Fig. 4b**). Finally, Proximity Ligation Assays (PLA) confirmed the RUNX1-RAG1 interaction in MOLT-4 and showed that the interaction was lost in MOLT-4 cells transduced with lentivirus expressing RUNX1 shRNA (**Fig. 4c**). Importantly, PLA showed that RUNX1 interacts with RAG1 in $CD34^+$ thymocytes (**Fig. 4d,** left) or UCB cells co-cultured on OP9-DL1 for 7 days (concurring with initiation of Dδ2-Dδ3 rearrangement, **Fig. 1c** and **Fig. 4d,** Middle) when compared to J0 UCB (**Fig. 4d,** right). Taken together, these data strongly suggest a RUNX1-RAG1 interaction during early thymopoeisis.

RUNX1 loss of function leads to absence of human Dδ2-Dδ3 rearrangements

To functionally test the role of RUNX1 in Dδ2-Dδ3 rearrangement, we generated a recombination substrate p3'$D2^{mut}$D3J1 harbouring a mutated RUNX1 binding site. This mutation corresponds to deletion of a cytosine located within the Dδ2 coding sequence and as such it leaves the *Dδ2-23RSS* intact. *In-vitro* coupled cleavage assays performed with p3'$D2^{mut}$D3J1 and p3'D2D3J1 and pD3J1 controls, showed that disruption of the RUNX1 binding site prevents Dδ2-Dδ3 SE formation (**Fig. 5a** lower, left) but makes possible the production of Dδ3-Jδ1 SE (**Fig. 5a,** lower, right). Prevention of RUNX1 binding therefore disrupts the cleavage order observed with the pD2D3J1 substrate.

To confirm the role of RUNX1 in Dδ2-Dδ3 rearrangement, RUNX1 was knocked-down (**Supplementary Fig. 5** online) in UCB $CD34^+$ cells which were then co-cultured on OP9-DL1 to promote T-cell differentiation. Cells were collected at day 8 and day 11 for quantification of Dδ2-Dδ3 rearrangement. At day 8, no rearrangement was detected under either condition, because of a lentiviral induced delay in T differentiation. At day 11, Dδ2-Dδ3 rearrangements were detected in control Sh-GFP conditions but not after RUNX1 knock-down (**Fig. 5b**). To verify cell viability, Annexin V/IP staining was performed on Sh-GFP control and Sh-RUNX1-GFP cells, confirming absence of significant apoptosis in both conditions (**Fig. 5c**). Taken together, these data confirm the role of RUNX1 in ordering early human TCRδ rearrangements.

Discussion

Amongst antigen receptor loci, only TCRβ, immunoglobulin heavy chain (IgH) and TCRδ contain D segments. The regulation of both TCRβ and IgH, which show allelic exclusion has long been recognized to be ordered (Jung et al., 2006; Khor and Sleckman, 2002). In contrast, the TCRδ locus was not considered to be ordered, based on the absence of allelic exclusion. However the vast majority of these studies focused on murine thymic maturation and little data were available for early human T-cell maturation. One study suggested that the earliest human TCRδ rearrangements could be ordered, based on the identification of predominant Dδ2-Dδ3 rearrangements within a very immature ($CD34^+/CD1a^-$) thymic subset (Dik et al., 2005b). We now extend this data and demonstrate that Dδ2-Dδ3 rearrangements indeed occur before Dδ2-Jδ1 rearrangements in a specific ETP subset of human thymocytes, highlighting differences in early murine and human thymopoiesis (Blom et al., 1998).

Given the importance of ordered recombination, extensive research has led to the identification of a critical role of RAG targeting or "RAG deposition", (Jackson and Krangel, 2006) to specific RSS by TF, the so-called B12/23 restriction. One example is c-Fos RAG deposition at Dβ segments for the TCRβ locus (Wang et al., 2008), but a similar role for c-Fos in murine TCRδ regulation was not identified. In line with this, it was postulated that such mechanism of B12/23 restriction or RAG deposition are absent from the TCRδ locus based on mouse T-cell maturation (Chien et al., 1987). We now demonstrate that the human TCRδ locus is subjected to B12/23 restriction *via* the *Dδ2-23RSS*. Most importantly, we identified the TF, RUNX1, which mediates this "RAG deposition" onto *Dδ2-23RSS* during human, but apparently not murine, thymopoiesis. Functional inactivation of RUNX1 leads to the absence of normal Dδ2-Dδ3 rearrangements *in-vivo* and violation of TCRδ ordering *in-vitro* confirming the B12/23 restricting role of *Dδ2-23RSS*. This identifies RUNX1 as a critical regulator of the earliest human TCRδ rearrangement by a protein-protein interaction involving RAG1.

RUNX1, RUNX2 and RUNX3 are the members of the RUNX family of TF; they share a conserved Runt domain, which mediates DNA-binding and heterodimerization with the CBFβ protein. RUNX1 is the predominantly expressed RUNX factor in the hematopoietic system, when it is essential for definitive hematopoeisis during embryogenesis. *Runx1* gene

inactivation in mice impedes the emergence of the first hematopoietic stem cells (HSC) from the aorto-gonadal-mesonephros region. In adult mice, inactivation of *Runx1* impairs lymphoid and megakaryocyte lineage maturation (Growney et al., 2005; Ichikawa et al., 2004) and leads to HSC exhaustion (although this is under debate (Cai et al., 2011; Jacob et al., 2010)).

Deletion of Runx1 at either DN or DP stages of T cell differentiation using *Lck-cre* or *CD4-cre* transgenic mice, respectively, showed that Runx1 is required for DN3 to DN4 and DP to SPCD4$^+$ transitions (Egawa et al., 2007; Taniuchi et al., 2002). Herein identify a further, earlier role for RUNX1 in human thymic development, acting as a RAG1 co-factor in initial TCRδ rearrangement. *RUNX1* binding sites are present in human and murine TCRα and TCRβ enhancers, which are essential for TCRα and TCRβ expression (Sleckman et al., 1997; Tripathi et al., 2002). Accordingly, deletion of Runx1 in DN thymocytes was accompanied by reduced expression of intracytoplasmic TCRβ chain (icTCRβ), but did not affect TCRγδ T-cell development (Egawa et al., 2007). However, in these experiments, the *Lck-cre* transgene inactivated Runx1 at the DN2 and DN3 stages after the onset of TCRδ rearrangement, thus preventing identification of a potential role for Runx1 in TCRδ locus regulation.

A role for *RUNX1* in "RAG1 deposition" on *Dδ2-23RSS* is likely to be particularly important at the early stages of T-cell development, when *RAG1* expression is low (**Supplementary Fig. 3** online). RAG1 interacts primarily with the nonamer, while RUNX1 binds to the CJ/heptamer junction; the RSS may therefore be able to accommodate both proteins, which could even cooperate in DNA binding, at least initially. Cooperative binding has been evidenced for RUNX1 and ETS1, with interaction increasing their affinity for their juxtaposed DNA binding sites, notably in TCR regulatory elements (Kim et al., 1999). The RUNX1 runt domain is flanked, on its carboxy terminal side, by a negative regulatory domain for DNA binding (NRDB) that impedes RUNX1 binding to DNA (Gu et al., 2000; Kanno et al., 1998). RUNX1 auto-inhibition is relieved by heterodimerization with CBFβ, which locks RUNX1 in a high affinity DNA-binding conformation (Gu et al., 2000; Kanno et al., 1998). A similar result is achieved when the negative regulatory domain of ETS1 interacts with the RUNX1 NRDB, whereby ETS1 and RUNX1 mutually inactivate their negative regulatory domains and increase their DNA binding abilities (Kim et al., 1999). Since the RAG1-RUNX1 interaction involves the RUNX1 NRDB (**Fig. 3**) RAG1 might contribute to locking RUNX1 in a high affinity DNA-binding conformation and to stabilization of a RAG1-RUNX1-*Dδ2-23RSS* ternary complex.

The probability that a coding joint/heptamer junction harbors a RUNX1 binding site, d($A_1C_2C_3A_4C_5A_6$), is not negligible since most of the RSS heptamers start with d($C_3A_4C_5A_6$) and all of them possess at least the d($C_3A_4C_5$) sequence, which is absolutely required for RAG cleavage. Despite this, we found only one RSS carrying a RUNX1 binding site amongst the human TCRδ Dδ and Jδ segments. A recent study described a novel role for RUNX1 in VH to DH-JH rearrangement, *via* Ebf1 (Seo et al., 2012), unlike the direct role for RUNX1 in early TCRδ rearrangement described here. An in-depth analysis of RUNX1-RSS sequences in Ig/TCR V, D and J segments will further clarify the, potentially variable, role(s) of RUNX1 in human and murine lymphoid development.

Our genome is scattered with RUNX1 binding sites and RUNX1 is involved in the regulation of various genes during hematopoietic differentiation (Wong et al., 2011). The drawback of RAG1-RUNX1 interaction is that RUNX1 might mis-target RAG1 and induce genomic instability by creating illegitimate DNA nicks or double strand breaks at nonantigen receptor loci. Chromosomal rearrangements involving TCR loci are frequent in T-ALL and are not purely RAG mediated. We have recently shown that the vast majority of TCRδ translocations occur during TCRδ Dδ2-Dδ3, potentially suggesting a role for RUNX1 in their pathogenesis. RUNX1 gene is one of the most frequently mutated gene in human leukemia; RUNX1 loss-of-function or dominant negative fusion proteins result in leukemia-prone cells which become fully leukemic upon acquisition of additional hits (Speck and Gilliland, 2002). More specifically, RUNX1 loss-of-function mutations occur in approximately 25% of AML M0. Based on the data presented here, it is tempting to speculate that the maturation arrest in these rare AML may be, at least in part, related to a failure to initiate TCRδ rearrangement.

In conclusion, a RUNX1/RAG1 interaction is likely to impact both normal and malignant T lymphoid development due to their role in regulating TCRδ rearrangement.

Acknowledgements

We thank Institute for Research at Necker-Enfants Malades (IRNEM) Cell Imaging platform. SLN was supported by grants from the "ARC Association de Recherche contre le Cancer", and the "Fondation pour la recherche médicale (FRM)". This work was supported in EAM team by grants from the "Fondation de France/Comité Leucémie". Work in the BN laboratory is supported by institutional grants from Inserm and CNRS, and grants from INCa and the "Fondation de France".

Author contributions

S.L.N., D.P.B. performed cellular and molecular biology experiments, analyzed data and wrote the manuscript; LL, AT and CR performed cytometry analysis. PV and AG performed fluorescent PCR; E.V. provided lentiviral ShRNAs; E.A.M and V.A. wrote the manuscript; D.P.B. and V.A. oversaw conceptual development of the project.

Legend to figures

Figure 1 Early TCRδ rearrangements are ordered

(**a**) Quantification of Dδ2-Dδ3 and Dδ2-Jδ1 rearrangements by RQ-PCR from $CD34^+$ umbilical cord blood (UCB), double negative (DN), immature single positive (ISP) and double positive (DP) thymocytes. Results (Mean and SEM) are normalized to the Albumin gene throughout. (**b**) Quantification of Dδ2-Dδ3 and Dδ3-Jδ1 TREC by RQ-PCR. (**c**) Quantification of Dδ2-Dδ3 and Dδ2-Jδ1 rearrangements at different days of $CD34^+$ UCB culture on OP9-DL1. (**d**) Sequence of Dδ2-Jδ1 thymic rearrangements. Dδ2, Dδ3 and Jδ1 segments are respectively in bold black, italic bold black and bold grey. Grey letters and points represent n nucleotides and nucleotides deleted during recombination. (**e**) Top panels represent plasmid constructions used for *in-vitro* recombination assays, with 23RSS in white triangles and 12RSS in black triangles. Black and grey lines represent radiolabelled probes. The bottom panel shows autoradiographs of *in-vitro* recombination assays with Dδ2Dδ3 or Dδ3Jδ1 probes. Bands represent episomes generated after incubation with RAG1/2 proteins.

Figure 2 Dδ2-Dδ3 rearrangements occurs in $CD34^+/CD1a^-/CD7^{+dim}$ stage

(**a**) FACS plots showing the gating strategy used for sorting populations (dots and SD curves). Black and dashed boxes represent $CD34^+/CD1a^-/CD7^{+dim}$ and $CD34^+/CD1a^-/CD7^{++}$ sub-populations, respectively. (**b**) FACS plots representing phenotypic markers differentially expressed between $CD34^+/CD1a^-/CD7^{+dim}$ (blue) and $CD34^+/CD1a^-/CD7^{++}$ (orange) populations. (**c**) Quantification by RQ-PCR normalized to albumin (Mean and SEM) and fluorescent PCR Genescan analysis (FI: Fluorescence Intensity) of Dδ2-Dδ3 rearrangements. (**d**) As in (**c**) for Dδ2-Jδ1 rearrangements.

Figure 3 Binding of RUNX1 to the Dδ2-23RSS

(**a**) Sequences of RSS (12 and 23) and segments (bold) for Dδ2, Dδ3 and Jδ1. The RUNX1 putative binding site in *Dδ2-23RSS* is double underlined. (**b**) Genomic alignment of the human Dδ2 segment and RSS with its murine Dδ1 homologue. Gene segments are depicted in bold. RUNX1 binding site is indicated with braces. Nucleotide different from the RUNX1 consensus sequence is underlined in mouse sequence. (**c**) RQ-PCR for RUNX1 expression in Human thymic subpopulations. Results (mean and SEM) are represented relative to the ABL1 housekeeping gene (**d**) Western blot of RUNX1 expression in Human thymic subpopulations. (**e**) Chromatin ImmunoPrecipitation assays in $CD34^+/CD3^-$ and $CD34^-/CD3^+$ thymocytes for

RUNX1 and control IgG. *Dδ2-23RSS*, *Dδ3-12RSS* and *Eα* were amplified by RQ-PCR and normalized to actin as negative control. Errors bars represented SEM.

Figure 4 RUNX1-RAG1 interaction

(**a**) GST and GST-RAG1 pull-down of ^{35}S-labeled *in-vitro*-translated RUNX1 and truncated versions, depicted on the right. Grey boxes represent the RUNX1 runt domain. The 'Input' lanes correspond to 10% of the ^{35}S-labeled protein used for the pull-down experiment. (**b**) Cell lysates from the MOLT-4 cell line were immunoprecipitated (IP) using anti-RUNX1 antibody, followed by immunoblotting using an anti-RAG1 antibody. The 'Input' lanes correspond to 10% of cell extracts used in the Co-IP. 'No Ab': control IP experiment performed without antibody. FT: flow-through; LW: last wash. (**c**) Duolink Proximity Ligation Assays (PLA) on MOLT-4 cell line before and after inactivation of RUNX1. (**d**) PLA on CD34$^+$ thymocytes and CD34$^+$ cord blood after sort (D0) and after 7 days of culture (D7). Small pictures represented confocal microscopy analysis of cells labeled with anti-RAG1 mAb (Alexa 555, purple) and anti-RUNX1 (Alexa 647, red).

Figure 5 RUNX1 inactivation leads to the TCRδ B12/23 restriction abrogation

(**a**) Top panel, representation of mutant constructions with 23RSS in white triangles and 12RSS in black triangles used for recombination *in-vitro* assays. Black and grey lines represent radiolabelled probes. The asterisk represent RUNX1 binding site. Bottom panel, autoradiographs of recombination *in-vitro* assays with D2D3 or D3J1 probes. Bands observed on the autoradiographs represent episomal signal joints generated after incubation with RAG1/2 proteins. (**b**) Quantification of Dδ2-Dδ3 and Dδ2-Jδ1 rearrangements in CD34$^+$ cord blood after lentiviral infection with control Sh-GFP and Sh-RUNX1-GFP at day 8 and day 11 culture on OP9-DL1. Results (Mean and SEM) are normalized to the Albumin gene. (**c**) Flow cytometric analysis of CD34$^+$ cord blood cells following transduction with lentiviruses encoding the GFP protein or RUNX1-specific shRNAs at day 11. GFP+-transduced cells were gated for analysis of AnnexinV/PI staining.

Material and Method

Purification of thymocytes fraction

Thymi were obtained as surgical tissue discards from children, with informed consent from the parents. Thymocytes were pre-purified by magnetic-activated cell-sorted beads before sorting (ARIA III). Purity after sort was over 95%.

Plasmids

The plasmids pD3J1, pD2D3J1, pD2J1 were generated by PCR from placental DNA and cloned into PGEMT-easy vector. Plasmid PGEX4T1-coreRAG1 was generated by PCR from Jurkat and cloned into PGEX4T1.The plasmid substrate pD2^{mut}D3J1 was derived from pD2D3J1 using site-directed mutagenesis (Stratagene).

Antibodies used

For ChIP, immunoprecipitation and WB: anti-RUNX1 (Abcam, ab23980) and RAG1 (Cell signalling D36D3). For Immunofluorescence, RAG1 (Cell signalling D36D3) and RUNX1 (Abcam, ab110035). For flow cytometry : CD1a-FITC (NA1/34), CD13-FITC (WM47) from Dako, CD3-Alexa700 (UCHT1) , CD4-V450 (RPA-T4), CD5-PerCP-Cy5.5 (L17F12), CD7-PE (M-T701), CD8-APC (RPA-T8), CD34-PerCP-Cy5.5 (8G12), CD45-V500 (H130), HLA-DR-FITC (L243), CD34-APC (8G12) from BD biosciences, CD117-PECy7 (104D2D1, Beckman Coulter) and CD123-APC (AC145, Miltenyi).

TCR rearrangement and TREC quantification

TCRδ quantification (Dδ2-Dδ3 and Dδ2-Jδ1) was performed as described (Dik et al., 2005b). TREC quantification was performed using an RQ-PCR mixture of 25 µl containing SYBR green (Applied Biosystems), 800 nM of each primer, 0.4 µg of bovine serum albumin, and 100 ng of genomic DNA. Normalization was performed with the Albumin gene for both targets.

RAG1/2-mediated DNA cleavage in vitro assays

RAG1/2-mediated coupled cleavage was performed as described (Franchini et al., 2009). Briefly 1µg of plasmid was incubated with RAG1/2 for 2 h at 30°C in cleavage reaction buffer (50 mM Hepes-KOH pH 7.5, 73 mM KCl, 2 mM NaCl, 10 mM, MgCl2, 1 mM DTT) supplemented with 1.5 mM rATP and 6 mg of a nuclear extract prepared from mouse WT

thymocytes. Negative controls were carried out using similar conditions without addition of the RAG1/2 extract. After extraction and precipitation, the DNA samples were analyzed by Southern blot using a Hybond N transfer membrane (Amersham). Membranes were hybridized with TCRδ-specific, radio-labeled probes D2D3 (5'-TTG-CTG-GAG-CTT-GAC-3') or D3J1 (5'- GGG-TAA-GCA-ACA-AGT-GCC-3').

Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation assays were done, with modifications, according to the manufacturer's instructions (Agilent). KS cells were cross-linked for 20min with 1% formaldehyde, sonicated using an Ultrasonicssonicator (Vibra-cell VCX130, SONICS) in order to obtain an average length for DNA fragments of approximately 600 bp and immunoprecipated with anti-RUNX1. ChIP DNA was purified by phenol/chloroform extraction and QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen). Samples were analyzed by RQ-PCR with the following primers Dδ2-23RSS-F : 5'-AGC-GGG-TGG-TGA-TGG-CAA-AGT-3', Dδ2-23RSS-probe: 5'-(6FAM) AGA-AGA-GGG-TTT-TTA-TAC-TGA-TG(MGB)-3', Dδ2-23RSS-R : 5'-AGA-CAT-ACA-TAG-CGG-GTC-AC-3'.

Immunofluorescence

Cells were fixed on slides using polylysine and Duolink performed following the manufacter's instructions. Briefly, cells were fixed with formaldehyde 2% during 15 minutes, permeabilized with triton 1% for 10 minutes and incubated with RUNX1 (1/1000) and RAG1 (1/25) antibodies for one hour.

Cell line and T-cell differenciation

The MOLT-4 cell line was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 50 µg/ml streptomycin, 50 IU penicillin, and 20% FCS at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO2. T cell differenciation was performed as described (Six et al.). Briefly, CD34+ cord blood cells were sorted and cultured on confluent OP9-DL1 in home made α-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 20% FBS (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Illkrich, France) and cytokines (rhFLT3-L: 5ng/ml, rhSCF:10ng/ml, rhIL7:2ng/ml, miltenyi). DNA was extracted at different days of culture.

GST-pull down

GST fusion proteins were expressed in *E. coli* (strain BL21) and were purified using glutathione-sepharose beads. [^{35}S]-Met-labeled proteins were obtained using the TNT T7 quick-coupled transcription/translation system (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Radiolabelled proteins were incubated with GST fusion proteins in binding buffer [150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8, 0), 0,1% Triton X-100, 1X of inhibitory proteases cocktail (complete EDTA free, Roche), 1 mg/ml BSA and DNaseI (37,5 U/µl)], for 1 hour at 4°C. The beads were washed 5 times, resuspended in Laemmli buffer, and were separated by SDS-PAGE. After transfert, membranes exposed to a phosphorImager screen (Fugi) and were stained with Coomassie Blue.

Immunoprecipitation

Protein extracts from 2.10^8 MOLT-4 cells were prepared with RIPA buffer: 50mM Tris-HCl pH 7.6, 1% NP 40, 150mM NaCl, 0.1% SDS20, 1X of inhibitory protease cocktail (complete EDTA free, Roche) and were incubated for 2 hr at 4°C with 10 µg of anti-RUNX1 covalently linked on protein G agarose beads (Upstate, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). After 4 washes in 100mM NaCl, 15mM Tris-HCl pH 7.8, the bound proteins were eluted and detected by Western blot analysis using anti-RAG1.

Lentiviral infection

Mission ShRNA-RUNX1 (TRCN0000013660) was purchased from Sigma. MISSION shRNA-pLKO.1-puro-GFP control transduction particles were used as a negative control. CD34$^+$ cord blood cells were infected, after 5 days culture in OP9-DL1, in cellgro medium (CellGenix) supplemented with FLT3-L (100ng/mL) and SCF (100ng/mL) cytokines. 48h after, GFP$^+$ cells were sorted and cultured on OP9-DL1 with cytokines.

References

1. Spits, H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* **2**, 760-72 (2002).
2. Dik, W. A. et al. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med* **201**, 1715-23 (2005).
3. Verschuren, M. C. et al. Preferential rearrangements of the T cell receptor-delta-deleting elements in human T cells. *J Immunol* **158**, 1208-16 (1997).
4. Lefranc, M. P. Nomenclature of the human T cell receptor genes. *Curr Protoc Immunol* **Appendix 1**, Appendix 1O (2001).
5. Bassing, C. H. et al. Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. *Nature* **405**, 583-6 (2000).
6. Eastman, Q. M., Leu, T. M. & Schatz, D. G. Initiation of V(D)J recombination in vitro obeying the 12/23 rule. *Nature* **380**, 85-8 (1996).
7. van Gent, D. C., Ramsden, D. A. & Gellert, M. The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell* **85**, 107-13 (1996).
8. Hesslein, D. G. & Schatz, D. G. Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv Immunol* **78**, 169-232 (2001).
9. Yancopoulos, G. D. & Alt, F. W. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* **40**, 271-81 (1985).
10. Bassing, C. H. et al. T cell receptor (TCR) alpha/delta locus enhancer identity and position are critical for the assembly of TCR delta and alpha variable region genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2598-603 (2003).
11. Sleckman, B. P., Bardon, C. G., Ferrini, R., Davidson, L. & Alt, F. W. Function of the TCR alpha enhancer in alphabeta and gammadelta T cells. *Immunity* **7**, 505-15 (1997).
12. Krangel, M. S. Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat Immunol* **4**, 624-30 (2003).
13. Jung, D. et al. Extrachromosomal recombination substrates recapitulate beyond 12/23 restricted VDJ recombination in nonlymphoid cells. *Immunity* **18**, 65-74 (2003).
14. Tillman, R. E. et al. Cutting edge: targeting of V beta to D beta rearrangement by RSSs can be mediated by the V(D)J recombinase in the absence of additional lymphoid-specific factors. *J Immunol* **170**, 5-9 (2003).
15. Wang, X. et al. Regulation of Tcrb recombination ordering by c-Fos-dependent RAG deposition. *Nat Immunol* **9**, 794-801 (2008).
16. Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. & Alt, F. W. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* **24**, 541-70 (2006).
17. Khor, B. & Sleckman, B. P. Allelic exclusion at the TCRbeta locus. *Curr Opin Immunol* **14**, 230-4 (2002).
18. Blom, B., Res, P. C. & Spits, H. T cell precursors in man and mice. *Crit Rev Immunol* **18**, 371-88 (1998).
19. Jackson, A. M. & Krangel, M. S. Turning T-cell receptor beta recombination on and off: more questions than answers. *Immunol Rev* **209**, 129-41 (2006).
20. Chien, Y. H. et al. T-cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* **330**, 722-7 (1987).
21. Growney, J. D. et al. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* **106**, 494-504 (2005).

22. Ichikawa, M. et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* **10**, 299-304 (2004).
23. Cai, X. et al. Runx1 loss minimally impacts long-term hematopoietic stem cells. *PLoS One* **6**, e28430 (2011).
24. Jacob, B. et al. Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis. *Blood* **115**, 1610-20 (2010).
25. Egawa, T., Tillman, R. E., Naoe, Y., Taniuchi, I. & Littman, D. R. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J Exp Med* **204**, 1945-57 (2007).
26. Taniuchi, I. et al. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* **111**, 621-33 (2002).
27. Tripathi, R., Jackson, A. & Krangel, M. S. A change in the structure of Vbeta chromatin associated with TCR beta allelic exclusion. *J Immunol* **168**, 2316-24 (2002).
28. Kim, W. Y. et al. Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *Embo J* **18**, 1609-20 (1999).
29. Gu, T. L., Goetz, T. L., Graves, B. J. & Speck, N. A. Auto-inhibition and partner proteins, core-binding factor beta (CBFbeta) and Ets-1, modulate DNA binding by CBFalpha2 (AML1). *Mol Cell Biol* **20**, 91-103 (2000).
30. Kanno, Y., Kanno, T., Sakakura, C., Bae, S. C. & Ito, Y. Cytoplasmic sequestration of the polyomavirus enhancer binding protein 2 (PEBP2)/core binding factor alpha (CBFalpha) subunit by the leukemia-related PEBP2/CBFbeta-SMMHC fusion protein inhibits PEBP2/CBF-mediated transactivation. *Mol Cell Biol* **18**, 4252-61 (1998).
31. Seo, W., Ikawa, T., Kawamoto, H. & Taniuchi, I. Runx1-Cbfbeta facilitates early B lymphocyte development by regulating expression of Ebf1. *J Exp Med* **209**, 1255-62 (2012).
32. Wong, W. F., Kohu, K., Chiba, T., Sato, T. & Satake, M. Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx. *Immunology* **132**, 157-64 (2011).
33. Speck, N. A. & Gilliland, D. G. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* **2**, 502-13 (2002).
34. Franchini, D. M., Benoukraf, T., Jaeger, S., Ferrier, P. & Payet-Bornet, D. Initiation of V(D)J recombination by Dbeta-associated recombination signal sequences: a critical control point in TCRbeta gene assembly. *PLoS One* **4**, e4575 (2009).
35. Six, E. M. et al. Cytokines and culture medium have a major impact on human in vitro T-cell differentiation. *Blood Cells Mol Dis* **47**, 72-8.

Figure 1

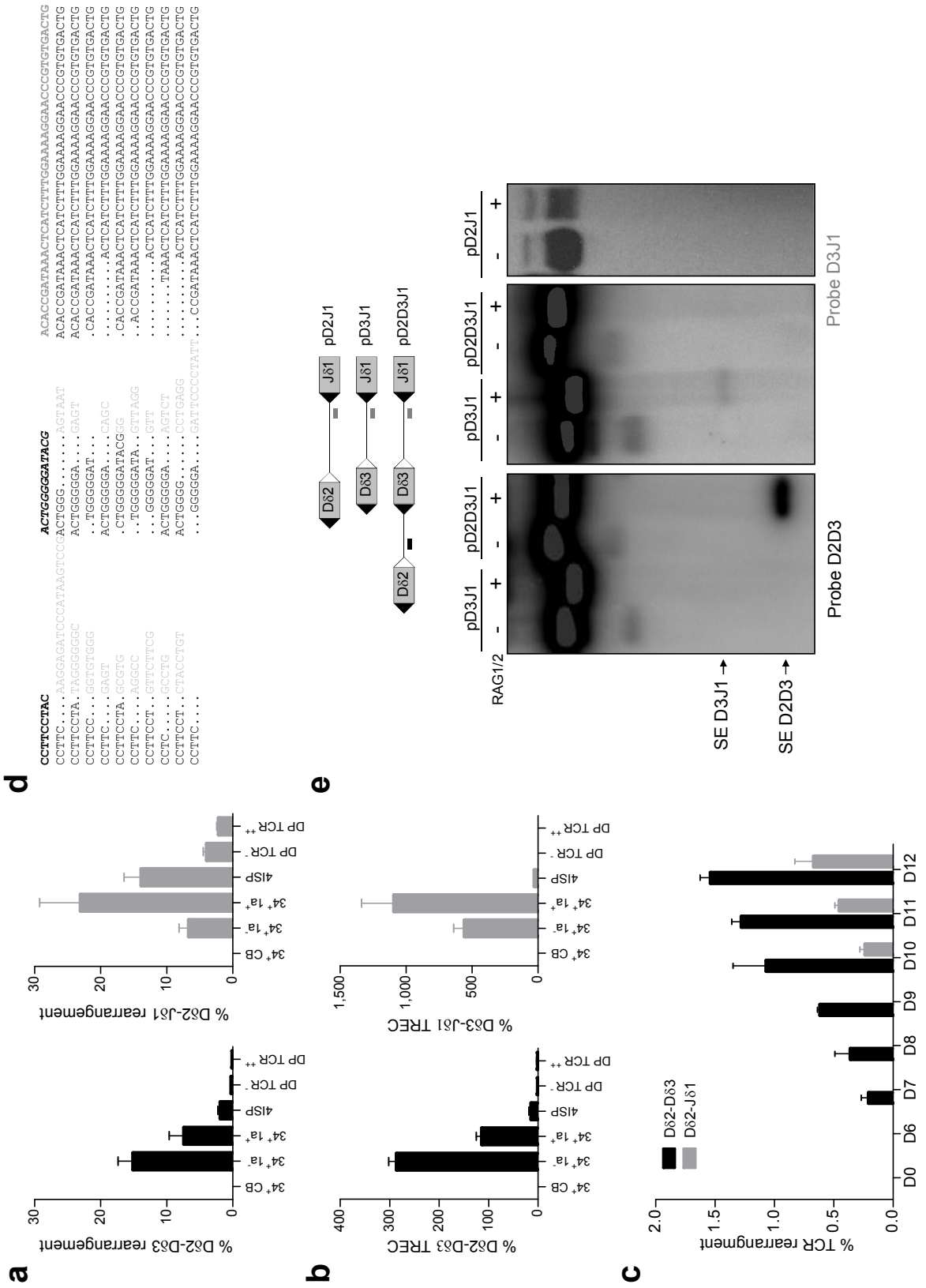

a
% Dδ2-Dδ3 rearrangement
b
% Dδ2-Dδ3 TREC
% Dδ3-Jδ1 TREC
c
% TCR rearrangment
Dδ2-Dδ3
Dδ2-Jδ1
D0 D6 D7 D8 D9 D10 D11 D12
d
e
pD2J1
pD3J1
pD2D3J1
Dδ2
Dδ3
Jδ1
RAG1/2
Probe D2D3
Probe D3J1
SE D3J1
SE D2D3
34+ CB
34+ 1a-
34+ 1a+
4ISP
DP TCR-
DP TCR++

Figure 2

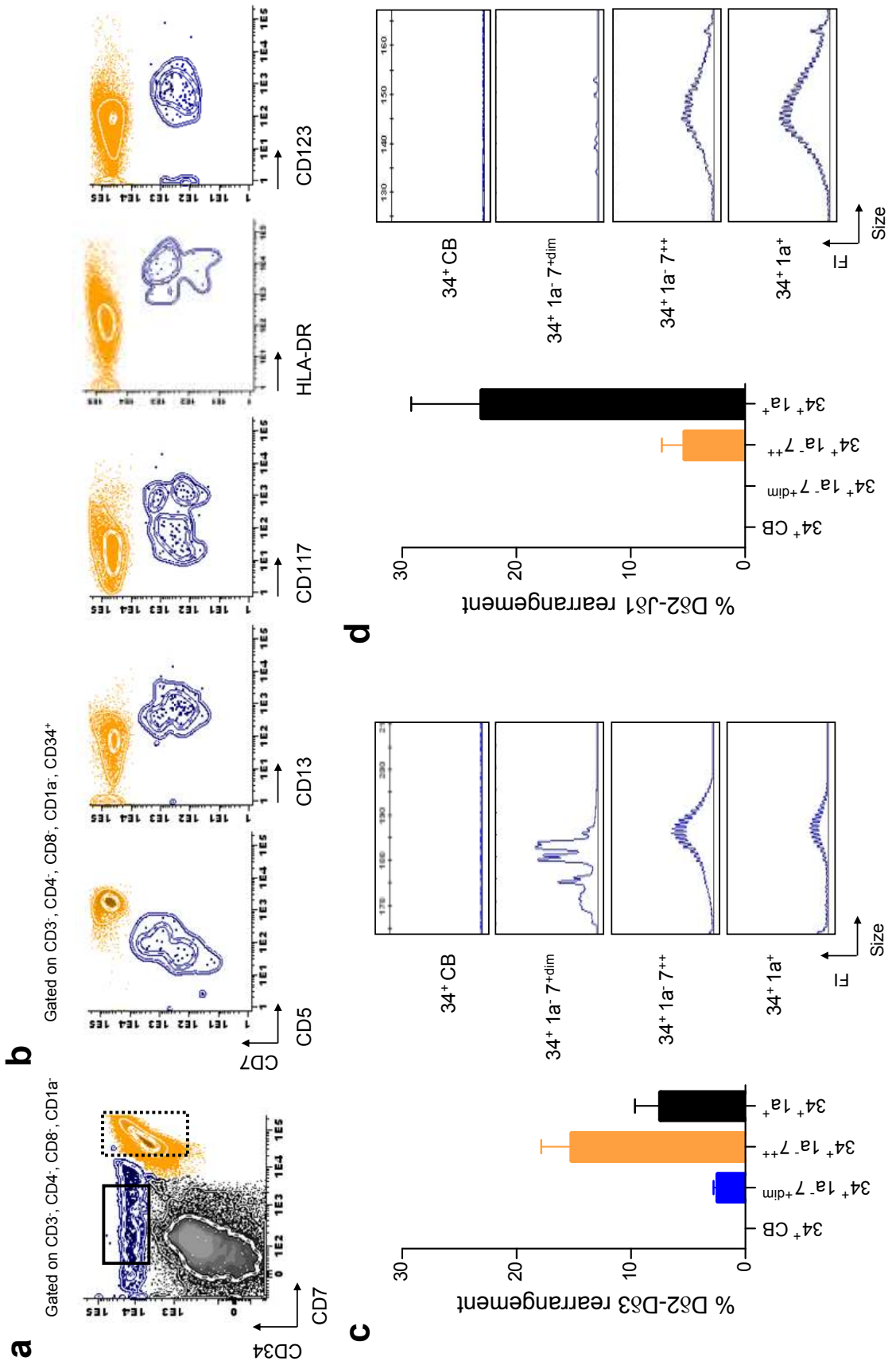

a
Gated on CD3-, CD4-, CD8-, CD1a-
CD34
CD7
b
Gated on CD3-, CD4-, CD8-, CD1a-, CD34+
CD7
CD5
CD13
CD117
HLA-DR
CD123
c
% Dδ2-Dδ3 rearrangement
34+ CB
34+ 1a- 7+dim
34+ 1a- 7++
34+ 1a+
34+ 1a+
34+ 1a- 7++
34+ 1a- 7+dim
34+ CB
FI
Size
d
% Dδ2-Jδ1 rearrangement
34+ CB
34+ 1a- 7+dim
34+ 1a- 7++
34+ 1a+
34+ 1a+
34+ 1a- 7++
34+ 1a- 7+dim
34+ CB
FI
Size

Figure 3

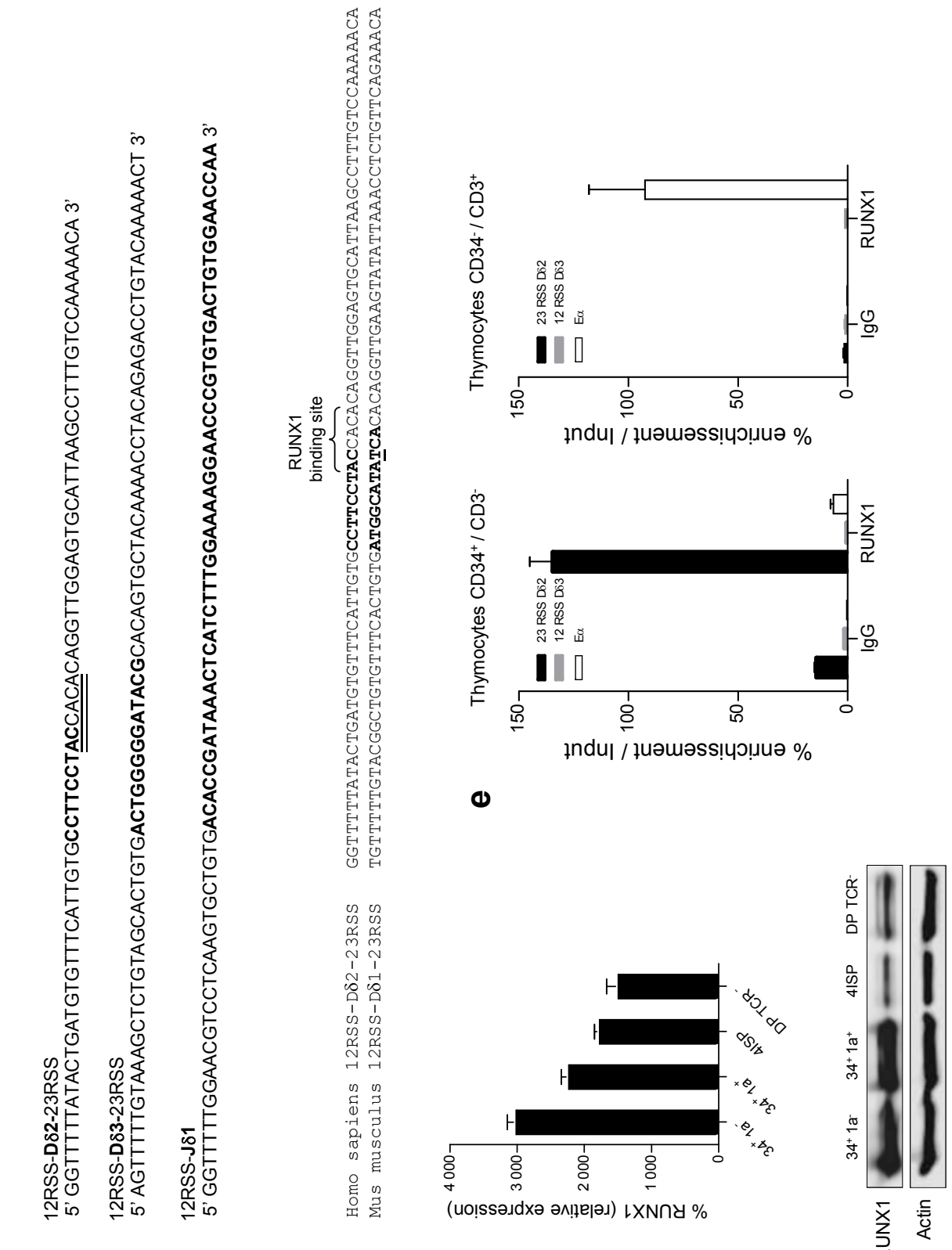

a
12RSS-D82-23RSS
5' GGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACA 3'
12RSS-D83-23RSS
5' AGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTGTACAAAAACT 3'
12RSS-J81
5' GGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTGTGGAACCAA 3'
b
RUNX1
binding site
Homo sapiens 12RSS-Dδ2-23RSS GGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACA
Mus musculus 12RSS-Dδ1-23RSS TGTTTTTGTACGGCTGTGTTTCACTGTGATGGCATATCACACAGGTTGAAGTATATTAAACCTCTGTTCAGAAACA
c
% RUNX1 (relative expression)
4 000
3 000
2 000
1 000
0
34- 1a-
34+ 1a+
4ISP
DP TCR-
d
34+ 1a-
34+ 1a+
4ISP
DP TCR-
RUNX1
Actin
e
Thymocytes CD34+ / CD3-
% enrichissement / Input
150
100
50
0
23 RSS Dδ2
12 RSS Dδ3
Eα
IgG
RUNX1
Thymocytes CD34- / CD3+
% enrichissement / Input
150
100
50
0
23 RSS Dδ2
12 RSS Dδ3
Eα
IgG
RUNX1

Figure 4

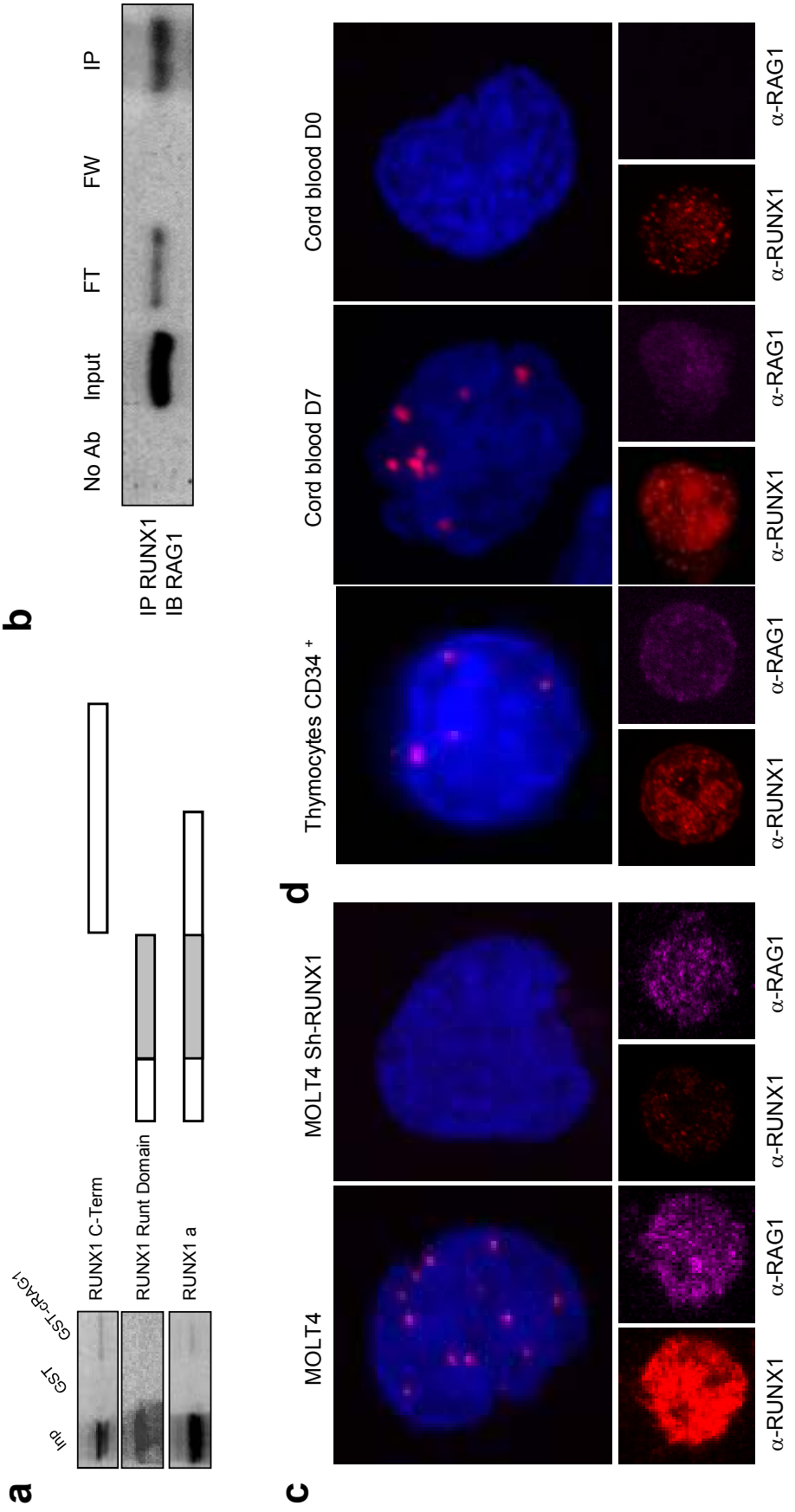
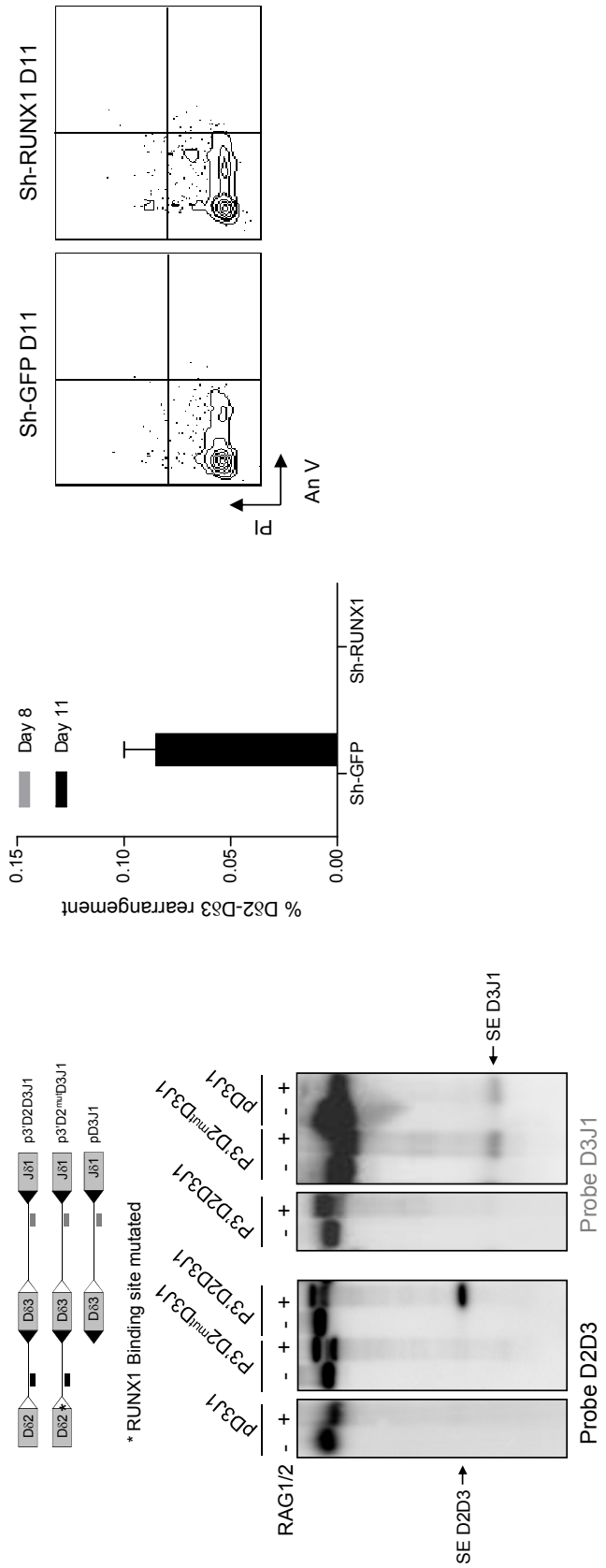
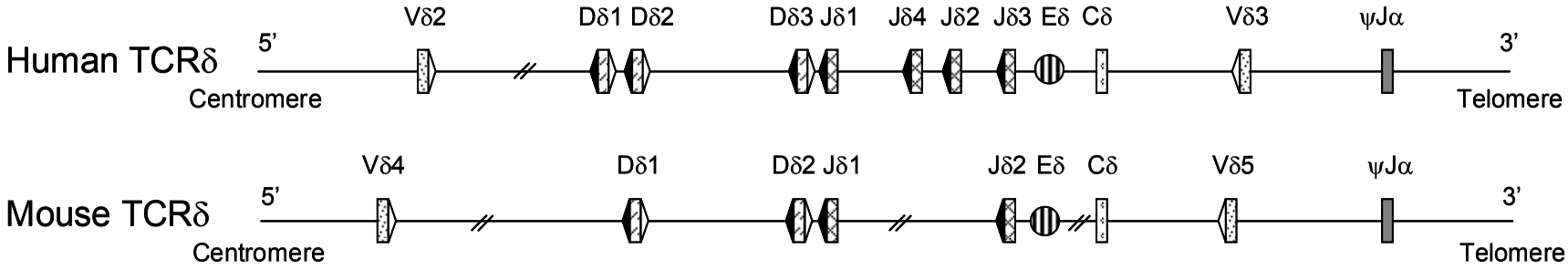

a
Inp
GST
GST-cRAG1
RUNX1 C-Term
RUNX1 Runt Domain
RUNX1 a
b
No Ab
Input
FT
FW
IP
IP RUNX1
IB RAG1
c
MOLT4
MOLT4 Sh-RUNX1
α-RUNX1
α-RAG1
d
Thymocytes CD34 +
Cord blood D7
Cord blood D0
α-RUNX1
α-RAG1

Figure 5

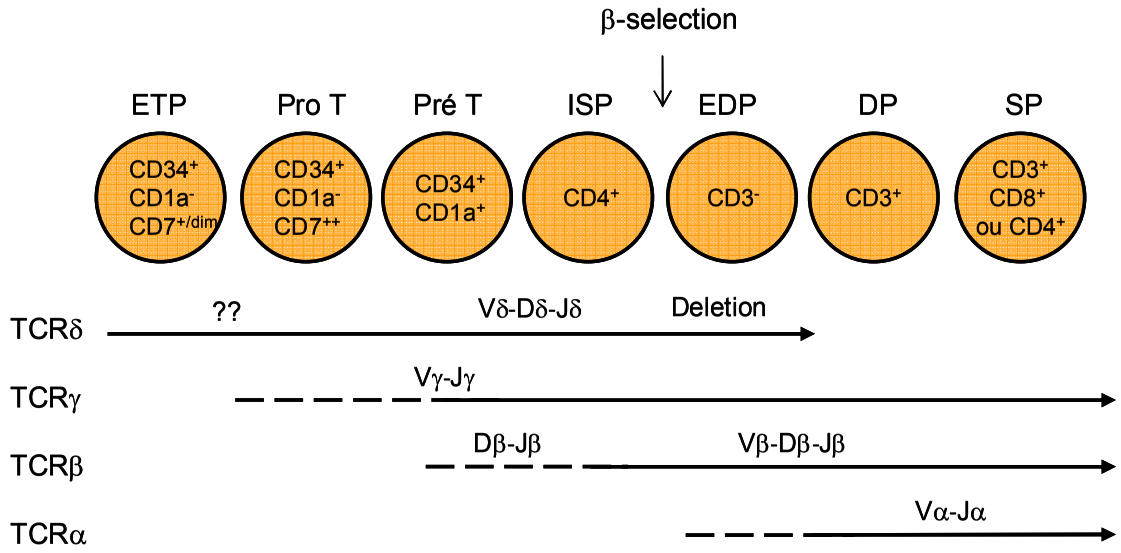

Sh-RUNX1 D11
Sh-GFP D11
PI
An V
Day 8
Day 11
Sh-GFP
Sh-RUNX1
% Dδ2-Dδ3 rearrangement
0.15
0.10
0.05
0.00
Jδ1
Dδ3
Dδ2
p3'D2D3J1
p3'D2mutD3J1
pD3J1
* RUNX1 Binding site mutated
RAG1/2
SE D2D3
SE D3J1
Probe D2D3
Probe D3J1

Supplementary Figure 1 : TCRδ configuration in humans and mice and the order of human thymic TCR rearrangements.

(**a**) Schematic representation of human and mouse TCRδ loci. 23RSS and 12RSS are represented respectively in white and black triangles (**b**) Thymic maturation stages and their TCR rearrangements in humans.

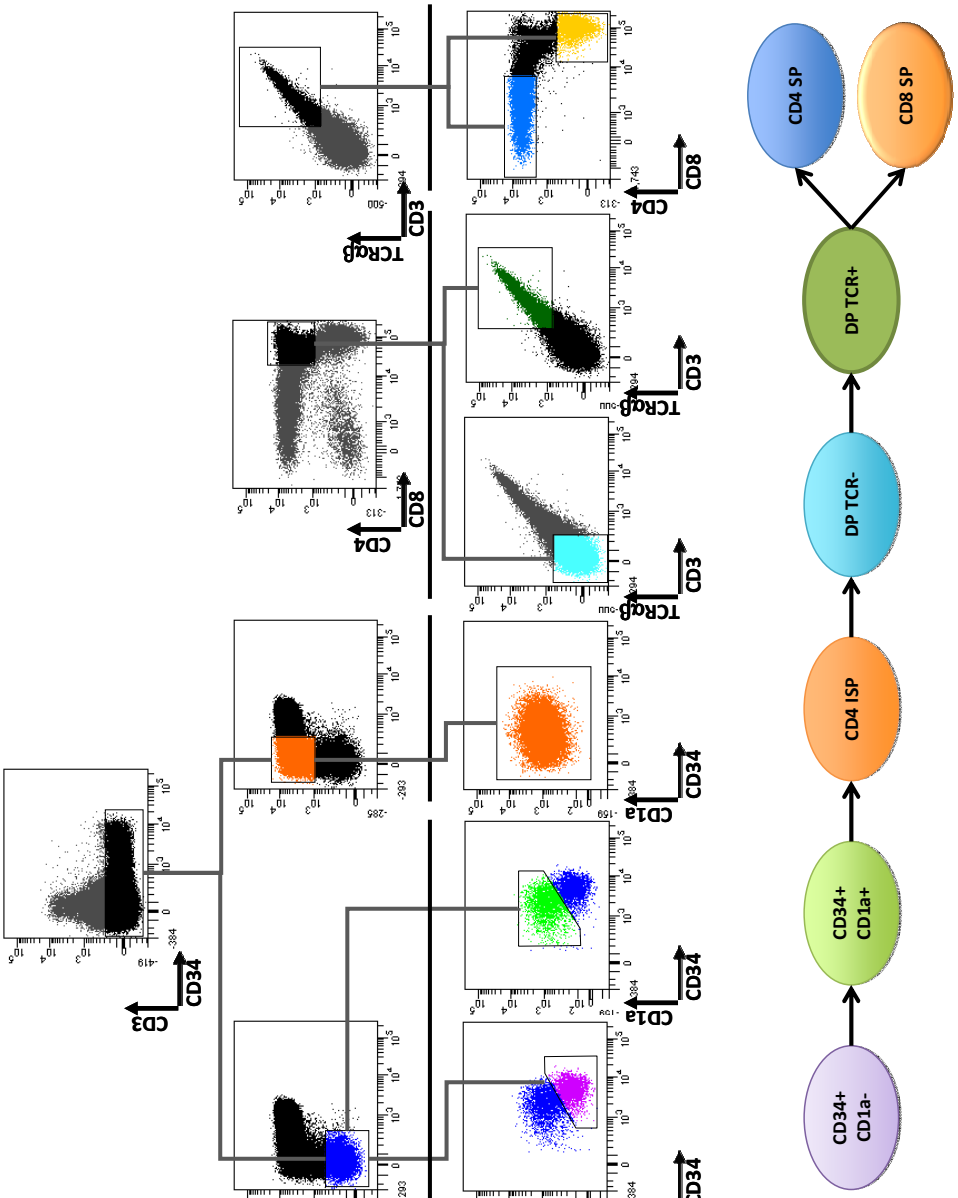


(**b**)



Supplementary Figure 2 : Major human T cell differenciation stages and gating strategy for cell-sorting

Plots show the gates used for sorting thymic sub-population. Purity after sort was checked to be over 95%. ISP :Immature Simple Positive, DP :Double positive, SP : Simple Positive.



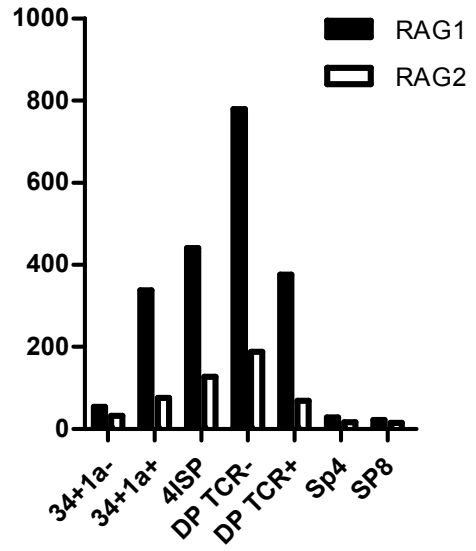
Supplementary Figure 3 : sequences of Dδ2-Jδ1 thymic rearrangement

n nucleotides are in grey and points represented deleted nucleotides during recombination.

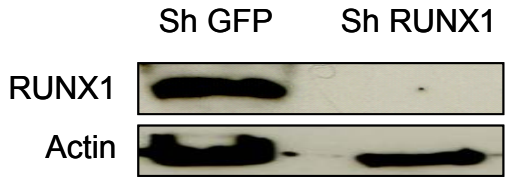
	CCTTCCTAC	**ACTGGGGGATACG**	**ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG**
1	CCTTCCTAC	..TGGGGG.....GCCCGG	..ACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
2	CCTTCC...ACGTCCTC	....GGGGA....CG	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
3	CCTTCCTACTAC	.TGGGG.......AAAT	..ACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
4	CCTTC....GAGGGGGTATTT	ACTGGG.......GCTA	......ATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
5	CCTCC....AC	....GGGGATAC.T	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
6	CCTT.....AACCCCCC	. CTGGGGGA....C	.CACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
7	.........TGAGGGCCCTGGGCCTATT	..TGGGGGA....CGGGATT	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
8	CCTTCCTACCGGATC	....GGGGAT...TAGGAATCGGGT	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
9	CCTTCC...ACCGCAGGGT	ACTGGGGA.....AACG	......ATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
10	CCTTCTA..GAA	ACTGGGGGATACGC	................CTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
11	CCTTCC...CCTA	.....GGGATA..ACACTCC	........AAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
12	CCTTCCTACTATGGGTACTTT	..TGGGGGAT...TTTTTGTTACGGT	.......TAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
13	CCT......AAGAGGGGTG	.CTGGGGGA....	...CCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
14	CCTTCCTACC	....GGGGATACGTCCG	.....GATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
15	CCTTCCT..CACAA	ACTGGGGA.....ACGC	.....GATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
16	CCTTC....ACTTGA	...GGGGGAT...GGGAGTTACG	...CCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
17	CCTTCC...CCCTGT	ACTGGGGGA....	.....GATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
18	CCTTCCT..TATT	ACTGGGGGATACGGTCCCCCCCCCT	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
19	CCTTCCT..GGC	.......GATA..GT	.....GATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
20	CCTTCC...A	ACTGGG.......ACCCCC	...CCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
21	CCTTCCT..CTGTGACGA	..TGGGGG.....GCCC	.CACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
22	CCTTCC...CGG	...GGGGGA....CGCCCCATT	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
23	CCTTCCTA.GGGGACTAAA	....GGGG.....CCCCGCCGATC	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
24	CCTTCCTACTCC	.CTGGGGGATA..TCC	...CCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
25	CCTTCCTA.TCT	..TGGGGGATACGGA	...........CTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
26	CCTTC....TTAAGA	..TGGGGGAT...TTTTTCTCATCTATTGTT	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
27	CCTTCCTACACCTCCCTGT	.CTGGGGGATACGTAGT	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
28	CCTTC....GCTCGTCTAAA	ACTGGGGGATACGGCAGGG	..ACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
29	CCTTCC...C	ACTGGGGGGATA..TA	......ATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
30	CCTTCC...CCTACCT	.CTGGGGGGATACGCCCGT	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
31	CCTTCCTA.GGGG	.CTGGGGGGAT...GGGG	ACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
32	CCTTCCTACGAGAT	..TGGGGGGA....AAGTACAC	...CCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
33	CCTTCC...CGAATCCGTA	ACTGGGGGATA..AGGATGAGGG	.CACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG

39	CCTTCCTACTCA	....GGGGATACGT	......ATAAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
40	CCTTCCT..CCTACCTGT	ACTGGGGGGATAC.CG	......ATAAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
41	CCT.....CTGATC	..TGGGGGA.....CGGGGGGAT	..ACCGATAAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
42	CCTTCC....ATGGCCCGTGCG	..TGGGGGATACGATCTTTGCC	..........AAAGGAACCCGTGTGACTG
43	CCTTCC....CCCCTT	.CTGGGGGGAT....GGTGAG	ACACCGATAAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
44	CCTTCCTACGTCT	.CTGGGGGGAT....C	.........TAAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
45	CCTTC.....AAA	ACTGGGGGGATAC..ATAATGGACGTGGGT	.........AAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
46	CCTTCC....GATAGTAGGGGGGTGGAAAATATCAG	.CTGGG.........TACAC	...CCGATAAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
47	CCTTCCTACC	.TGGGGGGAT....TTGGA	.........AAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
48	CCTTCCTA.AAGTTCCTC	....GGGA.....CACCAGACAAA	..........TCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
49	CCTTCCTACCTTTCCTC	.....GGGA.....	.....AAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
50	CCTTCCT..TCC	.CTGGGGGGA.....	....CGATAAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
51	CCTTCCTACGT	ACTGGGGGGA.....AC	...CCGATAAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG
52	CCTTCCTA.AGTATTTGCGC	.....GGGA.....CGTA	....CGATAAACTCATCTCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTG

Supplementary Figure 4 : RAG transcript expression in human thymic sub-population.
ISP, immature single positive; DP, double positive; SP, single positive.



Supplementary Figure 5 : Western blots for expression of RUNX1 (up) and the actin control (bottom) in MOLT-4 cells transduced with specific or nonspecific (control) shRNA.



A l'oncogenèse des LAL-T

Article 2

Etude des translocations TCR-oncogènes et le mécanisme de dérégulation associé

Extensive molecular mapping of TCRα/δ and TCRβ involved in chromosomal translocations reveals distinct mechanims of oncogenes activation in T-ALL.

Blood
Prepublished online September 4, 2012
Doi: 10.1182/blood-2012-04-425488

Le Noir S, Ben Abdelali R, Lelorch M, Bergeron J, Sungalee S, Payet-Bornet D, Villarèse P, Petit A, Callens C, Lhermitte L, Baranger L, Radford-weiss I, Grégoire MJ, Dombret H, Ifrah N, Spicuglia S, Romana S, Soulier J, Nadel B, Macintyre EA, Asnafi V

Les anomalies cytogénétiques récurrentes les plus fréquentes des LAL-T correspondent à des translocations chromosomiques impliquant les loci soit du TCRα/δ sur le chromosome 14, soit du TCRβ sur le chromosome 7. Ces translocations entraînent classiquement la dérégulation quantitative de l'oncogène. L'activation de l'oncogène est classiquement imputée à l'apport, en *cis*, d'éléments de régulation positive de type enhancers portés par le TCR.

Cet article décrit une étude extensive sur 280 LAL-T pour lesquelles une approche combinée de FISH et LM-PCR a permis d'identifier la présence et la nature des translocations chromosomiques impliquant les locis des TCRs.

Nous confirmons la fréquence des translocations, précédemment décrites par Cauwelier et al, soit respectivement 14%.et 19% de translocation avec le TCRβ et le TCRδ (Cauwelier et al., 2006). Comme déjà rapporté environ la moitié des translocations TCR ne sont pas identifiées par la cytogénétique conventionnelle. De plus, bien que quatre nouveaux oncogènes aient été identifiés, il semble que la grande majorité des oncogènes impliqués dans les translocations TCR soit désormais identifiée. Les nouveaux oncogènes partenaires identifiés sont *LEF1, IL2RB*, *GNAQ* et *NKX2-4*.

L'étude des points de cassures sur l'oncogène partenaire a permis de mettre en évidence que la grande majorité des points de cassures n'est pas médiée par les protéines RAG. En effet, ces translocations présentent deux segments TCR et un oncogène. Cette configuration est caractéristique d'une translocation de type II, c'est-à-dire non médié par la machinerie de recombinaison. De plus, l'étude *in vitro* du pouvoir recombinogénique du pseudo RSS situé au niveau des points de cassure sur *TLX1* a confirmé l'absence d'intervention de la machinerie RAG.

Deux mécanismes distincts de surexpression ont pu être identifiés selon le TCR impliqué dans la translocation. En effet, dans 100% des cas de translocations TCRβ-oncogènes, l'oncogène et l'Eβ sont sur le même dérivatif chromosomique, suggérant une surexpression de l'oncogène induite directement en *trans* par l'Eβ. En revanche, les configurations de translocation sont hétérogènes avec le TCRα/δ et semble indiquer un mécanisme de dérégulation enhancer-indépendant (cf Article 2). Une approche préliminaire met en évidence la présence d'un transcrit de fusion TCRδ-TLX1 ce qui suggère la présence d'un élément de régulation positif en amont du segment Dδ2.

Le mapping des points de cassure sur le TCR indique aussi que les translocations surviennent à un stade immature du développement thymique puisque les segments impliqués dans ces translocations sont ceux utilisés lors des réarrangements incomplets et précoces des loci des TCRδ et TCRβ. Cependant, le stade d'arrêt de maturation des LAL-T présentant ces translocations est souvent de type cortical (IMβ, Pré-αβ) c'est-à-dire un stade plus tardif que le moment de survenue de la translocation. Cela suggère que la survenue des translocations TCR-oncogènes est découplée du stade d'activation de l'oncogène.

Extensive molecular mapping of TCRα/δ and TCRβ involved chromosomal translocations reveals distinct mechanisms of oncogenes activation in T-ALL

Sandrine Le Noir[1], Raouf Ben Abdelali[1], Marc Lelorch[2], Julie Bergeron[1], Stephanie Sungalee[3], Dominique Payet-Bornet[3], Patrick Villarèse[1], Arnaud Petit[4], Céline Callens[1], Ludovic Lhermitte[1], Laurence Baranger[5], Isabelle Radford-weiss[2], Marie-Josée Grégoire[6], Hervé Dombret[7], Norbert Ifrah[8], Salvador Spicuglia[9], Serge Romana[2], Jean Soulier[10], Bertrand Nadel[3], Elizabeth Macintyre[1], Vahid Asnafi[1]

[1]Université Paris 5 Descartes, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR8147, and Department of Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker-Enfants-Malades, Paris, France
[2]Université Paris 5-Descartes, Department of Cytogenetics, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants-Malades, Paris, 75015, France
[3]Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm U631), CNRS UMR6102, Université de la Méditerranée, Marseille, France
[4]Department of Hematology, AP-HP Hôpital Armand Trousseau, Paris, 75012, France
[5]Department of Hematology, Centre Hospitalier, Angers, 49933, France
[6]Laboratoire de Génétique, CHU de Nancy-Brabois, Vandoeuvre-Les-Nancy, France
[7]Department of Hematology, AP-HP Hôpital St-Louis, Paris, 75010, France
[8]Department of Hematology, Inserm U892 Centre Hospitalier, Angers, 49933, France
[9]Technological Advances for Genomics and Clinics (TAGC). Inserm U1090. Marseille, France
[10]Inserm U728, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Université Paris VII Denis Diderot, Faculté de Médecine, Paris

Financial support:
This work in the Necker hematology department was supported by grants from the "Association de recherche sur le Cancer ARC" and the "Fondation de France". SLN was supported by a Grant from "ARC" and "Fondation pour la Recherche Medicale FRM". JB was supported by the National Cancer Institute of Canada (NCIC) through an award from the Terry Fox Foundation (TFF).

.*Correspondence and Reprints:*
-Vahid Asnafi, Hôpital Necker Enfants Malades, Laboratoire d'hématologie, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France,
E-mail: vahid.asnafi@nck.aphp.fr. Phone : (+33) 144 49 49 33; Fax : (+33) 144 38 17 45

Abstract

Chromosomal translocations involving the T Cell Receptor (TCR) loci represent one of the most recurrent oncogenic hallmarks of T-cell acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL) and are generally believed to result from illegitimate V(D)J recombination events. However, molecular characterization and evaluation of the extent of recombinase involvement at the TCR-oncogene junction has not been fully evaluated. Screening for TCRβ and TCRα/δ translocations by FISH and LM-PCR in 280 T-ALLs allowed identification of four unreported TCR translocated oncogene partner (*GNAG, LEF1, NKX2-4* and *IL2RB*). Molecular mapping of genomic junctions from TCR translocations showed that the majority of oncogenic partner breakpoints are not recombinase mediated and that the regulatory elements predominantly used to drive oncogene expression differ markedly in TCRβ (exclusively enhancer driven) and TCRα/δ translocations, when use of an enhancer-independent cryptic internal promoter is frequent. Our data also imply that oncogene activation takes place at a very immature stage of thymic development, when Dδ2-Dδ3/Dδ3-Jδ1 and Dβ-Jβ rearrangements occur, whereas the bulk leukemic maturation arrest occurs at a much later (cortical) stage. These observations have implications for T-ALL therapy, since the "pre-leukemic" early thymic clonogenic population needs to be eradicated and its disappearance monitored.

Introduction

T-cell Acute Lymphoblastic Leukemias (T-ALL) are malignant proliferations of T-cell precursors arrested at various stages of development (Asnafi et al., 2003a; Ferrando et al., 2002b). Understanding of T-ALL oncogenesis has advanced rapidly over the last decade and numerous combinations of multigenic aberrations and oncogenic synergy have been identified (Aifantis et al., 2008). Amongst these, chromosomal translocations involving the T Cell Receptor (*TCR*) loci represent the recurrent oncogenic hallmark of T-ALL (Cauwelier et al., 2006). *TCR* translocations predominantly involve the *TCR*α/δ locus at chromosome 14q11 or *TCR*β at chr. 7q34, but rearrangement of *TCR*γ at chr. 7p15 is virtually unrecognized (Cauwelier et al., 2006).

Such translocations are generally believed to result from illegitimate V(D)J recombination events, and to lead to ectopic activation of oncogenes, due to their the potent positive regulatory elements of the *TCR* locus or loss of Negative Regulatory Element (NRE) (Arai et al., 1997; Brake et al., 1998). Specific mechanistic differences in V(D)J-mediated translocation mechanisms have been shown to guide break location and clustering in T-ALL (Vanura et al., 2009). Two main types of oncogenic translocations involving the *TCR*β and *TCR*α/δ have been described (Marculescu et al., 2006). In so-called "type 1" translocations (Supplementary Figure S1), a cryptic but functional Recombination Signal Sequence (cRSS) is present near the oncogene, and is mistakenly targeted by the RAG recombinase as a partner for a recombining *TCR* gene segment. Translocations of this type consequently cluster (within tens of bp) at this cryptic site. In type 2 translocations, only the *Ig/TCR* locus breaks are generated by RAG targeting, and the translocation results from repair mistakes between *TCR* rearranging intermediates and DNA breaks in the vicinity of the oncogene. One distinctive feature of the two mechanisms is that the former involves DNA transactions between 2 breaks (4 DNA ends) both of which are thought to be recombinase-mediated, while the latter involves DNA transactions between 3 breaks (6 DNA ends) with only the *TCR* breaks being due to recombinase activity. In T-ALL, the basis for DNA breakage at the other breakpoint is largely unknown, is probably heterogeneous, and is not necessarily specific to lymphoid malignancies. It is generally considered that both the TCR locus and the partner oncogene need to be in an accessible chromatin configuration in order to undergo translocation. Since *TCR* rearrangements occur sequentially in a highly coordinated fashion during both normal

and leukemic T lymphoid development, molecular characterisation of *TCR* translocations can throw light on the timing of the oncogenic event.

In humans, the earliest T cell precursor was defined as CD34+/CD7+/CD45RA+/sCD3-/CD2-/CD5-/CD1a- (Spits, 2002). Progressive lineage restriction and acquisition of T-cell potential following migration from the bone marrow to the thymus is likely to involve successive differentiation into CD5+, CD1a- T/NK precursors, followed by definitive T-cell commitment of CD34+, sCD3- CD4/8 double negative (DN) thymocytes at the CD5+, CD1a+ developmental stage (Spits et al., 1998). This is followed by appearance of intermediate single positivity (ISP) for CD4, immediately prior to the transition to the CD4/8 double positive (DP) cell stage. *TCRδ* rearrangement initiates within the thymus, at the CD5+, CD1a- T/NK stage; and *TCRγ* and *TCRβ* rearrangements initiate at the CD1a+ stage, prior to the start of cTCRβ expression and β selection during the CD34+1a+ -> ISP transition (Spits et al., 1998). *TCRδ* rearrangement first involves V-D or D-D junctions, which may then proceed to D-J or VD-J complete junctions, possibly (or unless) followed by *TCRδ* locus deletion due to V-Jα recombination in αβ–T lineage committed precursors (Dik et al., 2005a). T-ALLs reproduce the normal stages of thymic cell development notably with respect to the succession of *TCR* rearrangements (Asnafi et al., 2003b).

Several significant T-ALL oncogenes, including *TLX1* (10q24), *HOXA* (7p15), *LMO2* (11p13), *LMO1* (11p15), *TAL1* (1p32) or *NOTCH1* (9q34) were identified from TCR chromosomal translocation analysis (Armstrong and Look, 2005; Graux et al., 2006). A recent, but unique, FISH study demonstrated that TCR-oncogene translocations detected karyotypically are largely underestimated, notably those involving TCRβ, which were detected in 19% of 126 T-ALLs (Cauwelier et al., 2006). The *TCR* partner oncogene was not identified in several cases. Similarly, molecular characterization and evaluation of the extent of recombinase involvement at the TCR-oncogene junction has not been fully evaluated in T-ALL. We have recently shown that some oncogenes can influence the type of TCRδ rearrangements which have leukaemogenic potential, since TLX1 over-expression inhibits the TCRα enhanceosome and therefore leads to auto-extinction of *TCR-TLX1* translocated cells in which the TCRα enhancer is on the same chromosome as *TLX1* (Dadi et al., 2012).

In this study, we searched for *TCRβ* and *TCRα/δ* translocations by FISH and LM-PCR in 280 T-ALL and characterized their molecular junctions. We confirm the high incidence of *TCRβ* translocations in both adult and pediatric T-ALLs and have identified four unreported TCR oncogene partners. We also show that the majority of oncogene partner breakpoints are

not recombinase mediated and that the regulatory elements predominantly used to drive oncogene expression differ in *TCRβ* (exclusively enhancer driven) and *TCRα/δ* translocations, when use of an enhancer-independent cryptic internal promoter is frequent.

Patients and methods

T-ALL samples

Diagnostic samples from a consecutive series of T-ALLs from 280 patients, 128 pediatric and 152 adults (16 years or over), were screened for TCRβ and TCRα/δ rearrangement by FISH and/or LM-PCR. Sample collection and analyses were obtained with informed consent. Diagnosis of T-ALL was based on the World Health Organization 2008 criteria, defined by expression of cytoplasmic and/or surface CD3, and negativity of CD19 and MPO, as reported (Asnafi et al., 2003a). The only criterion for inclusion in the study was the availability of appropriate material for cytogenetic/molecular analysis. Immunophenotyping, molecular marker identification of *STIL-TAL1* (also known as *SIL-TAL1*) and *PICALM-MLLT10* (also known as *CALM-AF10*) fusion transcripts, oncogene quantification (TLX1, TLX3, LMO1, LMO2, TAL1, HOXA9) and TCR immuno-genotyping were performed as described (Asnafi et al., 2003a; Asnafi et al., 2004).

Cytogenetic and FISH analysis

Cytogenetic analysis with R-banding was performed at various institutions on metaphases from bone marrow (BM) aspirates taken at diagnosis, using standard procedures. Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2005).

Screening by FISH for *TCRβ* and *TCRδ* rearrangements was performed at Necker Hospital. We designed a dual color probe using RP11-114L10 and RP11-1084E14 BAC clones for TCRβ and CTD-2552B11 and RP11-1083M21 for TCRα/δ. For the *GNAQ* translocation, we used 3 probes spanning the *GNAQ*, *TLX1* and TCRα/δ loci: BAC clones RP11-959B21, RP11-98I1, RP11-951C10, RP11-624L13 labelled with Streptavidine Cyanine 5 for the *GNAQ* locus; RP11-31L23, RP11-119018, RP11-324L3, RP11-179B2, RP11-1031N22 labelled with Rhodamine-dUTP for *TLX1*; RP11-137H15 and CTD-2552B11 labelled with FITC-dUTP (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) for *TCRα/δ*. For the *TCRα/δ-NKX2.4* translocation, *TCRα/δ* probes were coupled with CTD-2338F9 and CTD-322103. For the *TCRβ-LEF1* and *TCRβ-IL2RB* translocations, *TCRβ* probes were associated respectively with RP11-32K24, RP11-45D5, RP11-1123B16 and RP11-349I23 and with RP11-191N10 and RP11-643I13. For, the remaining loci we used, RP11-1065L8 and RP11-782G4 (*LMO1*),

RP11-1008P23 and RP11-1018M13 (*LMO2*), RP11-159M21 and RP11-1112E24 (*TAL1*), and RP11-1136C8 and 1132K14 (*HOXA*).

Ligation Mediated PCR (LM-PCR) and sequencing

LM-PCR assays were performed as described (Bergeron et al., 2007; Przybylski et al., 2005). Briefly, 330ng of genomic DNA was digested using a combination of six blunt end restriction enzymes (*Dra*I, *Pvu*II, *Stu*I, *Sma*I, *Ssp*I and *EcoR*V). For the TCRβ-based LM-PCR rounds, ligation of 50pmol of an adaptor to both ends of the restriction fragments was followed by two rounds of PCR using nested adaptor-specific (AP1 and AP2) oligonucleotide primers, as well as Dβ1, Dβ2, Jβ1.6 and Jβ2.7 oligonucleotide primers. The LM-PCR products were sequenced in both directions, using the specific primer and the nested adaptor specific primer (AP2). The sequences were blasted to the NCBI nucleotide database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) and Ensembl genome browser (http://www.ensembl.org/Multi/blastview). Junctions identified by LM-PCR were validated with a specific primer set flanking the identified breakpoint.

Quantitative RQ-PCR

We used a TaqMan assay to quantify HOXA9, LMO2, and TAL1 transcripts with the following primers: HOXA9F: 5'GAAAACAATGCTGAGAATGAGAGC3', HOXA9 Probe: Fam-ACAAGCCCCCCATCGATCCCA-Tamra, HOXA9R: 5'CGCGCATGAAGCCAGTT3', TAL1F : 5'ACAATCGAGTGAAGAGGAGACCTTC, TAL1 Probe: Fam-CTATGAGATGGAGATGGAGATTACTGATTG-Tamra, TAL1R: 5'ACGCCGCACAACTTTGGT 3', LMO2F : 5'GCCATCGAAAGGAAGAGCCT3' , LMO2 probe: Fam-CCTGCTGACATGCGGCGGCT-Tamra, LMO2R: 5'AAGTAGCGGTCCCCGATGTT3' 40 cycles were run on ABI 7500HT (Applied Biosystem) as described (Bergeron et al., 2007). NKX2-4 was quantified with kit hs01380224-g1 (applied biosystem).

Extra-Chromosomal Recombination Assay

Briefly, since previously described(Marculescu et al., 2002), a recombination plasmid (**Supplementary Figure S7A**) in which the two sequences to be tested for V(D)J recombination are separated by a termination signal was constructed. The ≈0,8kb sequence located immediately 5' of *TLX1* and containing the breakpoint 'hot spot' (5' *TLX1* sequence)

and the germline recombining Dδ3 segment flanked by its 2 consensus RSS were inserted upstream to the chloramphenicol acetyltransferase gene (CAT). Two 5' *TLX1* sequences were tested: the SR16 sequence covers nucleotides -794 to +15 relative to the position of the 1st ATG of *TLX1*'s first exon while the SR17 construct is shorter and covers position -794 to -227. The recombination plasmid and expression plasmids for RAG1, RAG2 and TdT were co-transfected into eukaryotic NIH3T3 fibroblasts, according to the manufacturer instructions (FuGENE HD® Tranfection Reagent, Roche Applied Science, Indianapolis). After Dpn1 digestion and purification, the plasmids were transfected in Top10 E.Coli bacteria (Invitrogen, Carlsbad, CA) and plated on ampicillin (100µg/mL)/chloramphenicol (25µg/mL). After 16-18 hours of incubation, the ampicillin/chloramphenicol-selected colonies were probed by direct PCR (Taq invitrogen) with core plasmid primers (p5b or P6b and Vect3c) flanking the inserted recombination construction. The PCR products were then sequenced and analysed individually.

Results

TCRβ translocation screening and oncogene partner identification in adult and pediatric T-ALLs

TCRβ locus translocations were identified by FISH in 40/280 (14%) T-ALLs. The *TCRβ* translocation frequency was comparable in adult (24/152; 16%) and pediatric (16/128, 12.5%) cases. Only 12/28 *TCRβ* translocated T-ALLs with an available karyotype harbored a 7q34 abnormality, confirming the low rate of classical karyotypic informativity for this category of translocation (Table 1).

LM-PCR and/or dual color FISH identified the oncogene partners from 37 of the 40 *TCRβ* split T-ALLs (Table1). No partner could be identified in only 3 cases. As expected, a high frequency of homeodomain (HD) oncogene deregulation was observed (25/40; 63%), including 13 *TCRβ-HOXA* and 12 *TCRβ-TLX1* translocations. Of the 13 *TCRβ-HOXA* cases, 11 had material available for HOXA transcript quantification; all demonstrated HOXA9 overexpression (median HOXA9/ABL: 277%, range 54%-3562%). Similarly, all 12 cases with *TCRβ-TLX1* translocations demonstrated high level TLX1 overexpression (data not shown). Contrary to TLX1 positive T-ALLs, which demonstrate a virtually uniform early cortical, stage of αβ-lineage maturation arrest (Asnafi et al., 2004; Ferrando et al., 2002a), *TCRβ-HOXA* translocations showed a predominantly mature TCR expressing γδ-lineage phenotype (8/13 TCRγδ+), especially in adult T-ALLs. Two TCRγδ expressing T-ALLs demonstrated HOXA activation both by *TCRβ-HOXA* translocation and PICALM-MLLT10 fusion transcript (Table 1). Amongst previously reported *TCRβ* oncogene partners, two *LMO1*, three *LMO2*, three *MYB* and one *TAL1* TCRβ translocated cases were identified, confirming the low frequency of these translocations in T-ALL.

Two new *TCRβ* partners were identified by LM-PCR: *LEF1* (Lymphoid Enhancer Factor 1) on chromosome 4q25 and *ILR2B* (Interleukin-2 Receptor Beta chain) on chromosome 22q13. The *TCRβ-LEF1* translocated case was a cortical CD1a+/pre-αβ adult T-ALL (T-ALL439, Table 1, this case also demonstrated a novel *TCRα/δ-NKX2-4* translocation, see below). LM-PCR analysis identified the breakpoints within intron 3 of *LEF1* (Figure 1A). Interestingly this *TCRβ-LEF1* translocation leads to the LEF1 transcript inactivation as RT-PCR analysis of the full length LEF1 transcript (Exons 1-11) demonstrated that the wild-type full length *LEF1* transcript was not detectable (Figure S2A) and SNP-6 CGH-array analysis of this case

confirmed that the un-translocated *LEF1* allele harboured partial intragenic deletion (Figure S2B). These data are in line with the reported tumor suppressor function of LEF1 in T-cell oncogenesis (Gutierrez et al.). The *TCRβ-IL2RB* translocated T-ALL was a cortical CD1a+/pre-αβ pediatric T-ALL with a normal karyotype (N°17, Table 1). Molecular breakpoint mapping revealed that the translocation put the *ILR2B* gene under the control of the TCRβ Enhancer (Eβ) (Figure1B).

TCRα/δ translocation screening and oncogene partner identification in adult and pediatric T-ALLs

Of 280 T-ALLs, 38 (13%) demonstrated a *TCRα/δ* translocation by cytogenetic and FISH analysis. These were more frequent in adults (29/152, 19%) compared to pediatric (9/128, 7%) cases (p=0.002). As for the *TCRβ* translocated cases, only 15/30 *TCRα/δ* translocated T-ALLs with available karyotypic data harbored a 14q11 abnormalities (Table 2).

LM-PCR and/or dual color FISH allowed identification of 36 oncogene partners from these 38 split-*TCRα/δ* T-ALLs (Table 2), with only two cases remaining unidentified. *TLX1* represented the most frequent TCRα/δ partner (as expected, mainly in adults, 19/29, compared to 2/9 in children) but there were also 7 *LMO2*, 5 *TAL1* and 1 *MYC*, with no apparent age influence. Compared to the relatively frequency of *TCRβ-HOXA,* there was a striking absence of *TCRα/δ-HOXA* rearrangements. One *trans*-rearrangement between the TCRδ and IgH loci was observed in a TLX3 expressing T-ALL (Table 2).

Two new partners were identified by LM-PCR: *NKX2-4* (NK2 Homeobox 4) on chromosome 20p11 and *GNAQ* (Guanine Nucleoside Binding Protein) on chromosome 9q21. Molecular junctional characterisation of the *TCRa/δ-NKX2-4* (N° 439) demonstrated that the translocation put the *NKX2-4* gene under the control of the TCRα/ Enhancer (Eα) (Figure1C). RQ-PCR analysis of NKX2-4 transcript expression confirmed NKX2-4 overexpression in this sample, as compared to other T-ALL, PBL and thymic samples (Supplementary Figure S3). The *TCRα/δ-GNAQ-TLX1* case (T-ALL244, Table 2 and Figure 1D), demonstrated a karyotypic t(9;10;14)(q22;q23;q11). On the basis of LM-PCR results and the overexpression of *TLX1*, we performed three-color FISH analysis using a combination of TLX1 (red), GNAQ (yellow) and TCR*α/δ* (green) probes. We demonstrated a fusion of *GNAQ* and *TCRα/δ*, *GNAQ* and *TLX1*, on the der(9) and der(10), respectively. However FISH analysis on the der(14) revealed a complex rearrangement and a fusion on 14q, of, sequentially, *TLX1*,

GNAQ, and *TCRα/δ* (telomere to centromere). By LM-PCR it was possible to identify the *GNAQ-TCRα/δ* junction (Figure 1D) but not the *TLX1* junction(s).
Another case (T-ALL500) showed a translocation with three partners including *TLX1*, *TCR*δ and *TCRβ,* confirmed by three-color FISH analysis (Supplementary Figure S4).

TCR translocations occur more frequently in early cortical, IMβ/Pre-αβ, T-ALLs and show patterns of oncogenic synergy

TCR translocations, especially those involving *TCRα/δ*, occurred more frequently within T-ALLs of early-cortical, IMβ/pre-αβ, phenotype (Tables 1 and 2). These translocations are, however, observed at all stages of maturation arrest, including mature TCRγδ and TCRαβ expressing T-ALLs, but are relatively rare in immature cases (Table 3). Among the recognized oncogenic groups in T-ALL, patterns of "cooperative" oncogenes can be identified. PICALM-MLLTF10+ T-ALLs lead to over-expression of HOXA but also co-exist with *TCRβ-HOXA* (this study) or *TCRα/δ-HOXA* (Bergeron et al., 2006), as if the *PICALM-MLLT10* (also known as *CALM-AF10)* induced HOXA expression leaved the locus accessible to DNA damage and subsequent translocation. Similarly in cases with *STIL-TAL1* (also known as *SIL-TAL1*), TCR translocations mainly involve oncoproteins known for their collaboration with *TAL1* (*LMO1, LMO2*). Approximately 60% of translocation partner oncogenes belong to the super family of homeotic proteins, but there are striking differences in TCR involvement, whereby *HOXA* is mostly translocated to *TCR*β, *TLX1* to both, and *TLX3* to neither, despite the fact that *TLX3* is frequently deregulated by promoter substitution in, particularly pediatric, T-ALL. No significant relation was observed with *NOTCH1/FBXW7* somatic mutations and TCRα/δ or TCRβ translocations, although TCR translocations altogether tended to be more frequent in *NOTCH1/FBXW7* mutated cases (p=0.04), probably since these cases are preferentially arrested at a cortical IMβ/pre-αβ stage (Table 3).

TCR-oncogene translocations precede the predominant stage of leukemic maturation arrest

LM-PCR analysis identified 19 and 24 molecular junctions from *TCRβ* (Figure 2 and Supplementary Figure S5) and *TCRα/δ* (Figure 3 and Supplementary Figure S6) translocated cases, respectively. All 11 *TCRβ*-oncogene T-ALLs in which both derivative junctions were identified occurred during a Dβ to Jβ rearrangement (Figure 2 and S5), of which 12 were Dβ1 and 4 were Dβ2. In Case N°536, a Vβ-Dβ rearrangement occurred after translocation.

Similarly, the *TCRα/δ* translocated cases predominantly (12/15) demonstrated junctions involving Dδ2 or Dδ3 to Jδ1 errors (Figure 3 and S6). Only one case (N°268) underwent translocation with TCRα. As such, *TCRα/δ* and *TCRβ*-oncogene translocations must occur during early thymic-cell differentiation in the vast majority of both adult and pediatric cases (Dik et al., 2005b). These data also imply that oncogene activation takes place at an immature DN/CD1a$^-$/CD34$^+$ stage of thymic development, when Dδ2-Dδ3/Dδ3-Jδ1 and Dβ-Jβ rearrangements occur, whereas the bulk leukemic maturation arrest occurs at a later (cortical) stage. This strongly suggests that most TCR-oncogene translocations correspond to early "driver" events in T-ALL oncogenesis.

TCR partner oncogene breakpoints are not frequently recombinase mediated

Since all TCRβ junctions identified involved DNA transactions between 3 breaks (6 DNA ends, type 2), the breaks in the oncogene partner are unlikely to be recombination signal sequence (RSS) mediated. This was also the case for the majority of *TCRα/δ*-oncogene junctions. None of the 26 fully (both derivatives) characterised TCRα/δ translocated cases were standard type 1 translocations (*trans*-V(D)J recombination between one TCR RSS and one cRSS). While a heptamer-like sequence located near this hotspot breakpoint region has already been proposed (Raghavan et al., 2001a), all *TCRδ-TLX1* junctions identified showed the presence of three breaks (Dδ, Jδ1 and *TLX1*), suggesting a type 2 translocation. In order to further test these reported heptamer-like sequences, the whole 700bp region 5' to *TLX1* was tested by a functional extra-chromosomal recombination assay (supplementary Figure S7A). In line with previous reports (Raghavan et al., 2001a), this confirmed the absence of functional cryptic RSS which could drive *TLX1* break location by this *in vitro* assay (supplementary Figure S7B). We also used the recently developed RIC (RSS Information Content) score analysis, an *in-silico* tool allowing evaluation of the recombinogenic potential of cRSS candidates (http://www.itb.cnr.it/rss). The RIC scores obtained for the recombination sites involved at all 39 breakpoints shows that the large majority of translocations reported here (37/39) do not pass the RIC criteria, confirming the absence of functional cRSS and the status of type 2 translocations. In only two cases: T-ALL43 (RIC: -32.86) and T-ALL86 (RIC: -54.19), a borderline "pass" RIC score identified potential 12-RSS and 23-RSS candidates, respectively (supplementary Figure S7C). However, none of the two cases would represent a standard *trans*-V(D)J transaction following cRSS mistargeting. Case T-ALL43

indeed shows a *TLX1* cRSS/Jβ breakpoint with a long N insertion (Supplementary Figure S5), which might be compatible with a type 1 translocation followed by rare ongoing recombination of the SJ (leading to a pseudo-HJ (Marculescu et al., 2003)). Unfortunately, neither LM-PCR assays nor direct PCR attempts to identify the expected reciprocal *TLX/D*β coding joint on Der7 gave rise to amplification products, preventing definitive resolution of this case. Case T-ALL86 is even more complex, and compatible with a rare variant involving the collusion between a type 1 synapse (Dδ2-12/TAL1) and a Dδ2-Dδ3 rearrangement (Tycko and Sklar, 1990).

In order to explore whether CpG dinucleotides are involved in the type 2 translocations identified here (as described in the *BCL2* MBR, *BCL1* MTC and the *TCF3* clusters to be hotspots for translocation breakpoints in B lymphoid lymphomas and leukemias (Tsai et al., 2008)), we searched for CpG dinucleotides and *TLX1* breakpoint colocalisation, but found that they were not superimposed (Figure supplementary S8) suggesting that distinct, as yet unrecognised, mechanisms are responsible for these breaks. Finally, as most of the oncogenic regions did not have cryptic heptamers and TCR-oncogene chromosomal translocations involved DNA transactions between 3 breaks in a large majority of cases, our data suggest that strand donation within type 2 translocations represent the most frequent illegitimate translocation events in T-ALL. However, we cannot formally exclude that some of the cRSS might have taken part in complex non-conventional type 1 translocations and further studies will be necessary to fully explore the interesting possibility of complex two-step recombination and/or three-ways synapses.

TCRβ and TCRα/δ translocated oncogenes are driven by distinct transcriptional regulators

In TCRβ translocations, the regulatory element which drives oncogene expression is likely to be exclusively Eβ, since the oncogene and the Eβ enhancer were located on the same derivative chromosome in all cases (Figure 2). In contrast, TCRα/δ translocations demonstrated heterogeneity with respect to the relative position of oncogenes and TCR positive regulatory elements on the derivative chromosomes. A minority (n=4) were compatible with Eα/δ driven oncogenesis, all of which involved *MYC*, *LMO2* or *TAL1* (Figure 3). In all remaining cases (20/24) the oncogene and Eα/δ were not on the same derivative chromosome, demonstrating that oncogene overexpression must be due to distinct regulatory elements within the TCRδ locus.

Virtually all of the *TCRα/δ-TLX1* breakpoints were within the *TLX1* Exon 1 (5' to the ATG start site and 3' to the promoter), leading to separation of the *TLX1* promoter from the coding region. In order to determine the origin of TCR driven TLX1 transcripts, we performed clono-specific RT-PCR across the breakpoints of both *TCRα/δ-TLX1* and *TCRβ-TLX1* translocations. "Fusion transcripts" (resulting from transcription within the TCRα/δ locus) were detected in all the *TCRα/δ-TLX1* samples (Figure 4A), but not in the *TCRβ-TLX1* samples (not shown and as previously described (Dadi et al., 2012). suggesting the presence of positive regulatory element(s) upstream to the *TCRδ* locus which drives TLX1 over-expression. By contrast, in cases with *TCRα/δ-LMO2* or *TCRα/δ-TAL1* translocations with the same configuration, no fusion transcripts from the TCRδ locus could be identified (Figure 4B). These data demonstrate that the mechanisms driving oncogene deregulation other than by downstream enhancer juxtapositioning are different in TLX1+ and TLX1- T-ALL.

The levels of LMO2, TAL1 and TLX1 expression did not differ depending on whether expression was driven by Eβ, Eα or upstream TCRδ regulatory elements (or cryptic promoters), demonstrating that sufficient levels of transcriptional deregulation are likely to be required for oncogenic clonal selection (Figure 4C). In line with this observation, breakpoints were scatted, often at a significant distance from the oncogene, in Enhancer-driven (Eβ or Eα) TCR-oncogene cases. In contrast, they clustered close to the oncogene when the oncogene and Eα/δ were located on different derivative chromosomes, in keeping with promoter dependant *cis*-acting positive regulatory elements (Figures 2 and 3).

Overall, these data demonstrate that Enhancer- independent oncogene deregulation and clonal selection occurs frequently in *TCRα/δ*, but not in *TCRβ* translocations in T-ALL.

Discussion

Deciphering molecular mechanisms of chromosomal alterations in cancer cells has improved understanding of both selection of mechanistic pathways and oncogenic functions. Among the various alterations reported to date, TCR chromosome translocations represent the recurrent oncogenic hallmarks of T-ALL, when they are much more frequent than Immunoglobulin (Ig) in B lineage ALL. In the present large series of T-ALL analysed by FISH and/or LM-PCR for *TCR*-oncogene translocation, *TCRβ*-oncogene and *TCRα/δ*-oncogene translocation were found in 14% and 19% of T-ALL, respectively. A significant number of both *TCRβ* and *TCRα/δ* translocations were unsuspected from cytogenetic analysis, stressing the need for FISH/LM-PCR screening if these cases require comprehensive detection. These data are consistent with Cauwelier et *al*, although they reported a slightly higher rate (19%) of *TCRβ*-oncogene translocation (Cauwelier et al., 2006). Four new TCR partners were identified in the present series of T-ALLs: *IL2RB* and *LEF1* with TCRβ and *NKX2-4* and *GNAQ* with TCRα/δ. The *LEF1* chromosomal translocation was associated with an intragenic deletion of the un-translocated *LEF1* locus. This suggests an intriguing form of oncogenic inactivation by a TCR translocation, since as the breakpoint within the *LEF1* gene splits the β-catenin domain, confirming the probable tumour suppressor role of LEF1 reported by Gutierrez *et al* (Gutierrez et al.). A translocation involving *IL2RB* has been described with an unknown partner on chromosome 1 (Berger and Bernard, 2007). IL2RB is constitutively expressed in mature T-cells and is induced by TCR activation, leading to proliferation and T-cell survival (Taniguchi and Minami, 1993). An oncogenic role for IL2RB deregulation is not evident, since it does not have catalytic properties. Further investigation will be necessary to clarify this uncommon abnormality. A *TCRα/δ-NKX2-4* translocation could be suspected from a t(14;20)(q11;p12) karyotype reported by Cauwelier et al (Cauwelier et al., 2006). *NKX2-4* is one of the NKL family of homeodomain proteins which also contains *TLX1* and *TLX3* (Holland et al., 2007). Recently, deregulation of other NKL oncogenes; *NKX2.1*, *NKX2.2* and *NKX2.5* were reported in T-ALL(Homminga et al., ; Nagel et al., 2003). Both *NKX2.1* and *NKX2.2* are known to be deregulated by recurrent IgH/TCR translocations. Such translocations are, however, likely to be rare, since none were identified in the present large series. Interestingly, T-ALL with *NKX2.1* overexpression corresponds to a distinctive transcriptional cluster characterized by a proliferative profile. Unfortunately, gene expression profiling was unavailable for the *NKX2-4* translocated case reported here. Another NKL

member, *NKX2-5*, can be deregulated by juxtapositioning to BCL11B in pediatric T-ALL cell lines (Nagel et al., 2003). Overall these observations suggest that a variety of NKL (at least TLX and NKX) proteins can be involved in T-ALL oncogenic networks.

Despite these 4 cases, few novel oncogenes have been identified in the present study, suggesting that the large majority of TCR driven oncogenes in T-ALL have already been identified.

Mistakes of V(D)J recombination have been considered one of the major mechanisms leading to lymphoid malignancy-associated translocations. Concerning type 2 translocations, the V(D)J synaptic complex is formed between the 2 normal *TCR/IG* partners. In this case, the end-transaction corresponds to a mistake in the repair phase of the V(D)J recombination, illegitimately joining coding-end intermediates (D and J) with broken ends (tumor breakpoints), and joining the signal-end intermediates into a normal Signal-Joint (SJ) (unseen in tumor cells, because excised on a non-replicative episome diluted-out during successive cell divisions) (Brandt and Roth, 2004; Marculescu et al., 2006). Because the RAGs can perform a single-strand nick at an isolated RSS (or cRSS), but requires a synaptic complex to convert the nick into a double-strand break (DSB) (Roth, 2003), the possibility that a broken end (or any third RSS partner) would have been converted from a nick into a double strand break before engaging into repair with synapsed partners is slim. No tripartite V(D)J reaction involving 2 *IG/TCR* partner and an additional RSS has been demonstrated so far.

A confusing situation may however arise when the type 1 signal joint, generated on one of the derivative chromosomes, keeps on rearranging with *IG/TCR* partners in *cis*. This may indeed create a pseudo-hybrid joint (ΨHJ) between a *TCR/IG* coding-end and the cRSS, but in which both rearranging partners (the coding-end and the cRSS) undergo processing (deletion, P, and N regions) (Vanura et al., 2007). Although this two-step mechanism has to date rarely been reported (Marculescu et al., 2003) we cannot exclude that it might be involved in some of the translocations reported here. Translocations of type 2 are generally more scattered, but nevertheless can cluster in “fragile sites” (within hundreds of bp) near to the deregulated oncogene. A recent study tested cryptic RSS in several oncogenes and showed that only few pseudo-RSS support V(D)J recombination in *in vitro* models, suggesting that V(D)J targeting mistakes are only responsible for a modest fraction of genomic alterations (Vanura et al., 2009). Our data are in keeping with these functional studies, since molecular analysis of TCR-oncogene junctions showed a large majority of type 2 TCR-oncogene translocations, in which the TCR partner chromosome breakpoints are not RAG mediated. CpG dinucleotides in the *BCL2* MBR, *BCL1* MTC and *TCF3* breakpoint clusters have been reported to be hotspots for

translocations breakpoints (Tsai et al., 2008) but we found no superimposition of CpG dinucleotides and *TLX1* breakpoints, which are highly clustered (Figure supplementary S8). This suggests that type 2 V(D)J translocations in T-ALL involve distinct non-RAG DSB mechanisms to those identified in B lymphoid malignancies, which remain to be identified.

The vast majority of *TCR* translocations occurred during Dβ-Jβ or Dδ-Dδ rearrangements, known to be very early events in T-cell differentiation which occur within the thymus, in DN CD1a- cells, prior to TCRβ selection. The final maturation arrest of the bulk leukemic population was much later in most cases, demonstrating uncoupled oncogene activation and maturation arrest. Most TCR translocated T-ALLs were indeed arrested during or after TCRβ selection, with a significant proportion expressing a TCRαβ or TCRγδ. We demonstrated that a significant proportion of these TCR+ T-ALLs, especially those expressing a TCRγδ, retain stigmata of TCRβ selection, such as a DP, CD1a+ phenotype and ongoing RAG1 and pre-T-α expression (Asnafi et al., 2003b). These data are compatible with an oncogenic role for the pro-proliferative TCRβ selection signal, whereby the TCR translocation occurs in an early DN thymocyte, but leads to a maturation arrest around TCRβ selection, as recently described for *TCRα/δ–TLX1* translocations (Dadi et al., 2012). In keeping with this, most TCR translocations are associated with specific stages of maturation arrest, the so-called type A oncogenes (Van Vlierberghe et al., 2008a). The scenario where oncogene activation is uncoupled from oncogene activity entails that the cell carrying the translocation has no selective advantage until reaching the appropriate later stage, when maturation is arrested. This cell and its progeny will meanwhile accumulate imprints of poly/oligo-clonality, such as *TCR* rearrangements and additional oncogenic mutations. Monoclonality would arise through competitive advantage of the additional mutations/translocations (it is currently considered that T-ALLs usually have >10 mutations/T-ALL) subsequently occurring in one or another sub-clone. Although this is only beginning to be recognised in T-ALL, this concept has clearly been demonstrated in other lymphoid neoplasias. The best described example is t(14;18)-mediated translocation in follicular lymphoma (FL), leading to ectopic BCL2 expression. While the translocation occurs as a type 2 translocation during DH to JH recombination in the bone marrow, BCL2 does not prevent further B-cell differentiation, nor provide selective advantage, until reaching the germinal centre, the quasi-exclusive localisation where BCL2 is physiologically down-regulated (Kuppers, 2005; Roulland et al.). As a consequence, FL manifests as a mature B-cell lymphoma originating from the germinal-centre. One demonstrative evidence that this

uncoupling also occurs in T-ALL oncogenesis is the *Notch1* mouse model, in which the retrovirus-mediated overexpression of intra-cellular notch (ICN1) in Lin- bone marrow cells generates TCRαβ+ CD4+CD8+ T-ALLs with a monoclonal TCRβ chain but diverse TCRα chains (Li et al., 2008). These observations have speculative implications for T-ALL therapy, since the "pre-leukemic" early thymic clonogenic population needs to be eradicated and its disappearance monitored.

A two-step model of translocation has been proposed based on a *TCRβ-TAL2* translocation model: first, a cRSS located 3' to *TAL2* reacts with Dβ1 in the thymus of a healthy individual and then a Dβ1-Jβ2.7 rearrangement occur which leads to TAL2 overexpression (Marculescu et al., 2003). This mechanism is not compatible with the majority of *TCRβ* translocations described here, since Dβ1 and Jβ segments are not on the same derivative.

While all breaks from *TCRβ*-oncogene translocations mapped 3' to the oncogene, the vast majority of breaks from *TCRα/δ*-oncogenes translocations mapped 5' to the oncogene. Consequently, although oncogene activation in *TCRβ* translocated cases was consistent with classical TCRβ Enhancer β-mediated activation, the TCRα/δ translocations uncoupled the oncogene and Eα onto two distinct derivative chromosomes, implying a distinct deregulation mechanism (involving potential non-enhancer regulatory elements in the *TCRδ* promoter region). We have demonstrated that TLX1 leads to inhibition of the TCRα enhancer, *via* an ETS1 interaction (Dadi et al., 2012), leading to counter-selection of translocations which juxtapose *TLX1* and the TCRα enhancer in *cis*. It is therefore possible that the different types of translocations observed for other T-ALL oncogenes are also impacted by the consequences of oncogene expression on juxtaposed TCR regulatory elements.

Remarkably, despite the obvious contrast in the mechanisms of oncogenes activation (see TLX1 or LMO2 in Figure 4C), no significant differences could be observed in oncogene over-expression levels from *TCRβ* and *TCRα/δ* translocation configurations, suggesting oncogenic selection of cases with sufficient/optimal expression levels. This suggests distinct molecular mechanisms of oncogene activation with respect to the *TCR* locus orientation involved in the translocation rather than the oncogene itself and justifies further investigation in the molecular mechanisms of early oncogenic deregulation.

In conclusion, the majority of *TCR* structural translocations in T-ALL have now probably been identified, but the mechanisms leading to chromosomal break and mis-repair on the partner chromosome are unidentified. These translocations occur at an earlier stage

than bulk maturation arrest and the localization of *TCRβ* and *TCRα/δ* breakpoints differ, probably at least in part due to an impact of the deregulated oncogene on the function of the juxtaposed TCR regulatory elements.

Acknowledgements:
We thank all participants in the LALA-94, the GRAALL-2003/05 and the FRALLE-93/2000, study groups for collecting and providing data and samples. We specially thank Mrs Veronique Lheritier.

Statement of authorship:
SLN, BN, EAM and VA, wrote the manuscript. SLN, JB, SS, RB, ML, CC, LL, PV, DPB, SSp and BN performed experiment and/or analysed data. AP, LB, MJG, NI, TL, SR, IRW, JS contributed to sample collection and/or provide patients data. VA oversaw conceptual development of the project

The authors declare no competing financial interest.

References

1. Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, Comba B, Le Tutour P, Estienne MH, Davi F, Landman-Parker J, Quartier P, Buzyn A, Delabesse E, Valensi F, Macintyre E. Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. Blood. 2003;101:2693-2703

2. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR, Look AT. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell. 2002;1:75-87

3. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. Nat Rev Immunol. 2008;8:380-390

4. Cauwelier B, Dastugue N, Cools J, Poppe B, Herens C, De Paepe A, Hagemeijer A, Speleman F. Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRbeta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes. Leukemia. 2006;20:1238-1244

5. Arai Y, Hatano M, Tokuhisa T. A negative regulatory region of the murine Hox11 gene. Gene. 1997;193:73-79

6. Brake RL, Kees UR, Watt PM. Multiple negative elements contribute to repression of the HOX11 proto-oncogene. Oncogene. 1998;17:1787-1795.

7. Vanura K, Vrsalovic MM, Le T, Marculescu R, Kusec R, Jager U, Nadel B. V(D)J targeting mistakes occur at low frequency in acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 2009;48:725-736

8. Marculescu R, Vanura K, Montpellier B, Roulland S, Le T, Navarro JM, Jager U, McBlane F, Nadel B. Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. DNA Repair (Amst). 2006;5:1246-1258

9. Spits H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. Nat Rev Immunol. 2002;2:760-772

10. Spits H, Blom B, Jaleco AC, Weijer K, Verschuren MC, van Dongen JJ, Heemskerk MH, Res PC. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. Immunol Rev. 1998;165:75-86.

11. Dik WA, Brahim W, Braun C, Asnafi V, Dastugue N, Bernard OA, van Dongen JJ, Langerak AW, Macintyre EA, Delabesse E. CALM-AF10+ T-ALL expression profiles are characterized by overexpression of HOXA and BMI1 oncogenes. Leukemia. 2005;19:1948-1957.

12. Asnafi V, Radford-Weiss I, Dastugue N, Bayle C, Leboeuf D, Charrin C, Garand R, Lafage-Pochitaloff M, Delabesse E, Buzyn A, Troussard X, Macintyre E. CALM-AF10 is a common fusion transcript in T-ALL and is specific to the TCRgammadelta lineage. Blood. 2003;102:1000-1006

13. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 2005;23:6306-6315

14. Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. Leukemia. 2006;20:1496-1510

15. Dadi S, Le Noir S, Payet-Bornet D, Lhermitte L, Zacarias-Cabeza J, Bergeron J, Villarese P, Vachez E, Dik WA, Millien C, Radford I, Verhoeyen E, Cosset FL, Petit A, Ifrah N, Dombret H, Hermine O, Spicuglia S, Langerak AW, Macintyre EA, Nadel B, Ferrier P, Asnafi V. TLX Homeodomain Oncogenes Mediate T Cell Maturation Arrest in T-ALL via Interaction with ETS1 and Suppression of TCRalpha Gene Expression. Cancer Cell. 2012;21:563-576

16. Asnafi V, Beldjord K, Libura M, Villarese P, Millien C, Ballerini P, Kuhlein E, Lafage-Pochitaloff M, Delabesse E, Bernard O, Macintyre E. Age-related phenotypic and oncogenic differences in T-cell acute lymphoblastic leukemias may reflect thymic atrophy. Blood. 2004;104:4173-4180

17. Bergeron J, Clappier E, Radford I, Buzyn A, Millien C, Soler G, Ballerini P, Thomas X, Soulier J, Dombret H, Macintyre EA, Asnafi V. Prognostic and oncogenic relevance of TLX1/HOX11 expression level in T-ALLs. Blood. 2007;110:2324-2330

18. Przybylski GK, Dik WA, Wanzeck J, Grabarczyk P, Majunke S, Martin-Subero JI, Siebert R, Dolken G, Ludwig WD, Verhaaf B, van Dongen JJ, Schmidt CA, Langerak AW. Disruption of the BCL11B gene through inv(14)(q11.2q32.31) results in the expression of BCL11B-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type BCL11B transcripts in T-ALL. Leukemia. 2005;19:201-208

19. Marculescu R, Le T, Simon P, Jaeger U, Nadel B. V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: a functional assessment of genomic instability by cryptic sites. J Exp Med. 2002;195:85-98

20. Ferrando A, Neuberg D, Dodge RK, Paietta E, Larson RA, Wiernik PH, Rowe JM, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Look AT. Adult T-Cell ALL Patients Whose Lymphoblasts Express the HOX11 Oncogene Have an Excellent Prognosis When Treated with Chemotherapy and Are Not Candidates for Allogeneic Bone Marrow Transplantaton in First Remission. Blood. 2002;100:154a

21. Gutierrez A, Sanda T, Ma W, Zhang J, Grebliunaite R, Dahlberg S, Neuberg D, Protopopov A, Winter SS, Larson RS, Borowitz MJ, Silverman LB, Chin L, Hunger SP, Jamieson C, Sallan SE, Look AT. Inactivation of LEF1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood;115:2845-2851

22. Bergeron J, Clappier E, Cauwelier B, Dastugue N, Millien C, Delabesse E, Beldjord K, Speleman F, Soulier J, Macintyre E, Asnafi V. HOXA cluster deregulation in T-ALL associated with both a TCRD-HOXA and a CALM-AF10 chromosomal translocation. Leukemia. 2006;20:1184-1187

23. Dik WA, Pike-Overzet K, Weerkamp F, de Ridder D, de Haas EF, Baert MR, van der Spek P, Koster EE, Reinders MJ, van Dongen JJ, Langerak AW, Staal FJ. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. J Exp Med. 2005;201:1715-1723

24. Raghavan SC, Kirsch IR, Lieber MR. Analysis of the V(D)J recombination efficiency at lymphoid chromosomal translocation breakpoints. J Biol Chem. 2001;276:29126-29133

25. Marculescu R, Vanura K, Le T, Simon P, Jager U, Nadel B. Distinct t(7;9)(q34;q32) breakpoints in healthy individuals and individuals with T-ALL. Nat Genet. 2003;33:342-344

26. Tycko B, Sklar J. Chromosomal translocations in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinase model. Cancer Cells. 1990;2:1-8

27. Tsai AG, Lu H, Raghavan SC, Muschen M, Hsieh CL, Lieber MR. Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. Cell. 2008;135:1130-1142

28. Berger R, Bernard OA. Interleukin-2 receptor beta chain locus rearrangement in a T-cell acute lymphoblastic leukemia. Pathol Biol (Paris). 2007;55:56-58

29. Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. Cell. 1993;73:5-8

30. Holland PW, Booth HA, Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. BMC Biol. 2007;5:47

31. Homminga I, Pieters R, Langerak AW, de Rooi JJ, Stubbs A, Verstegen M, Vuerhard M, Buijs-Gladdines J, Kooi C, Klous P, van Vlierberghe P, Ferrando AA, Cayuela JM, Verhaaf B, Beverloo HB, Horstmann M, de Haas V, Wiekmeijer AS, Pike-Overzet K, Staal FJ, de Laat W, Soulier J, Sigaux F, Meijerink JP. Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell;19:484-497

32. Nagel S, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RA. The cardiac homeobox gene NKX2-5 is deregulated by juxtaposition with BCL11B in pediatric T-ALL cell lines via a novel t(5;14)(q35.1;q32.2). Cancer Res. 2003;63:5329-5334

33. Brandt VL, Roth DB. V(D)J recombination: how to tame a transposase. Immunol Rev. 2004;200:249-260

34. Roth DB. Restraining the V(D)J recombinase. Nat Rev Immunol. 2003;3:656-666

35. Vanura K, Montpellier B, Le T, Spicuglia S, Navarro JM, Cabaud O, Roulland S, Vachez E, Prinz I, Ferrier P, Marculescu R, Jager U, Nadel B. In vivo reinsertion of excised episomes by the V(D)J recombinase: a potential threat to genomic stability. PLoS Biol. 2007;5:e43

36. Van Vlierberghe P, Pieters R, Beverloo HB, Meijerink JP. Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 2008;143:153-168

37. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. Nat Rev Cancer. 2005;5:251-262

38. Roulland S, Faroudi M, Mamessier E, Sungalee S, Salles G, Nadel B. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. Adv Immunol;111:1-46

39. Li X, Gounari F, Protopopov A, Khazaie K, von Boehmer H. Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. J Exp Med. 2008;205:2851-2861

40. Soulier J, Clappier E, Cayuela JM, Regnault A, Garcia-Peydro M, Dombret H, Baruchel A, Toribio ML, Sigaux F. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). Blood. 2005;106:274-286

41. Clappier E, Cuccuini W, Kalota A, Crinquette A, Cayuela JM, Dik WA, Langerak AW, Montpellier B, Nadel B, Walrafen P, Delattre O, Aurias A, Leblanc T, Dombret H, Gewirtz AM, Baruchel A, Sigaux F, Soulier J. The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. Blood. 2007;110:1251-1261

Pediatric T-ALL (n=16)					
T-ALL UPN	**Age**	**Phenotype**	**Oncogenetic**	**TCRβ partner**	**Karyotype**
282	15	IMB	negative	HOXA	46,XY[23]
246	11	IMB	negative	HOXA	ND
8	7	PRE-AB	negative	HOXA	46,XX[50]
284[b]	10	TCR GD+	negative	HOXA	46,XY,t(10;13)(q?;q?)[3]/46,XY[2]
290[c]	2	IMB	negative	MYB	46,XY,t(6;7)(q?23;q?)[19]/46,XY[3]
247[c]	2	IMG	negative	MYB	46,XX,t(6;7)(q?22;q35),t(8;14)(q22;q11),del(11)(q22)[14]/46,XX[1]
280[a]	14	IMB	TLX1	TLX1	46,XX,t(9;9)(q10;q10)[12]
336[a]	12	IMB	TLX1	TLX1	47,XX,del(9)(p12),+del(9)(p12)[9]/46,XX[5]
316[a]	11	PRE-AB	TLX1	TLX1	46-48,XY,inv(1)(p2?p3?),-4,-9,-9,-11,del(11)(q2?),del(12)(p?),-18,+5-7mar [cp17]/46,XY[3]
17	3	PRE-AB	STIL-TAL1	IL2RB	46,XY[25]
374	12	TCR AB+	negative	LMO2	46,XX[20]
75	10	TCR AB+	negative	LMO2	46 XY,del(6)(q15q23)[1]/46,XY[38]
270	13	PRE-AB	negative	TAL1	47,XY,t(1;7)(p22;q32),-6,+8,del(9)(q13q21),add(17)(p?13),r(?6)[8]/46,XY[14]
346[a]	5	IMB	TLX1	TCRβ	ND
328[c]	1	PRE-AB	negative	MYB	46,XY,t(6;7)(q23;q35)[16]/46,XY[6]
308	10	IM0	negative	unknown	47,XY,+19[6]/46,XY[5]
Adult T-ALL (n=24)					
T-ALL UPN	**Age**	**Phenotype**	**Oncogenetic**	**TCRβ partner**	**Karyotype**
174	21	IM0	negative	HOXA	46,XY,del(6)(p12p22),inv(14)(q22q31),add(20)(q11)[7]/46,XY,idem,add(8)(q24)[10]/46,XY[5]
366	28	PRE-AB	negative	HOXA	46,XY[20]
368	64	TCR AB+	negative	HOXA	ND
183	24	TCR GD+	negative	HOXA	46,XY[20]
181	29	TCR GD+	negative	HOXA	47,XY,+11[7]/47,XY,+21[4]/46,XY[1]
536	44	TCR GD+	negative	HOXA	46,XY[20]
347	16	TCR GD+	negative	HOXA	46,XY[26]
232	45	TCR GD+	PICALM-MLLT10	HOXA	ND
264	38	TCR GD+	PICALM-MLLT10	HOXA	46,XX,del(7)(p?),add(5)(q?)[9]
43[a]	36	IMG	TLX1	TLX1	46,XY[20]
546[a]	28	IMB	TLX1	TLX1	46,XY,add(4)(p?12),del(6)(q12),t(7;10)(q34;q24)[7]/46,XY[9]
474[a]	32	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY,t(7;10)(q34;q24)[30]
57[a]	35	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XX[20]
84[a]	17	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY,t(7;10)(q35;q24)[9]/46,XY,?t(5;18)(p11;p11)[3]/46,XY[3]
547[a]	20	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY,t(7;10)(q34;q24)[15]/46,idem,del(6)(q2?1q2?6)[2]/46,XY[3]
500[a]	26	PRE-AB	TLX1	TCRδ and TLX1	46,XY[20]
28[a]	47	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XX [50]
379[a]	58	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XX,t(7;10)(q35;q24)[13]
234[a]	16	IMB	negative	LMO1	46,XY,dup(2)(q11q37),?del(6)(p22)[15]
380	38	PRE-AB	STIL-TAL1	LMO1	46.XX,add(9)(p?)[18]/46,XX[5]
178	26	PRE-AB	negative	LMO2	46,XY,t(7;11)(q35;p13)[16]/46,XY[1]
439	25	PRE-AB	negative	LEF-1	46,XY,t(4;7)(q2?5;q35),t(14;20)(q11;p1?2)[19]
497	19	PRE-AB	negative	unknown	46,XY,t(7;9)(q34;q31),add(9)(q34)[18]
233	22	IMB	TLX3	unknown	48,XY,del(6)(q13q22),r(7),+8,+12[16]

Table 1: Biological characteristics of T-ALL with TCRβ-oncogene translocation.

Pediatric T-ALL (n=9)					
T-ALL UPN	**Age**	**Phenotype**	**Oncogenetic**	**TCRδ partner**	**Karyotype**
103[a]	12	IMB	TLX1	TLX1	46,XY[20]
346[a]	5	IMB	TLX1	TLX1	ND
377	15	PRE-AB	negative	LMO2	47,XY,del(9)(p?),t(11;14)(p13.q11),+17[22]
169	13	PRE-AB	negative	LMO2	46,XY[20]
299	12	PRE-AB	negative	LMO2	46,XX[24]
86	14	PRE-AB	negative	TAL1	46,XY,inv(2)(p25q21)[22]
327	15	TCR AB+	negative	TAL1	ND
268	13	TCR AB+	negative	MYC	46,XY,t(8;14)(q24;q11)[18]/46,XY,i(17)(p10)[5}/46,XY[5]
391	7	IMB	TLX3	IGLV5-45	47,XX,+8,del(9)(p21p24)[24]
Adult T-ALL (n=29)					
T-ALL UPN	**Age**	**Phenotype**	**Oncogenetic**	**TCRδ partner**	**Karyotype**
135[a]	24	IMB	TLX1	TLX1	48,XY,del(3)(q27),add(4)(q34),+5,+21[9]/48,idem,-17,+mar[2]/46,XY[19]
516[a]	38	IMB	TLX1	TLX1	46,XX [30]
506[a]	35	PRE-AB	TLX1	TLX1	47,XY,del(6)(q16q24),del(8)(p11),t(10;14)(q24;q11),+mar[6]/46,XY[10]
480[a]	41	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY,del(6)(q13q23),add(9)(p11),t(10;14)(q24,q11)[8]/46,XY[4]
199[a]	31	PRE-AB	TLX1	TLX1	ND
281[a]	18	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY[20]
496[a]	27	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY[20]
12[a]	34	PRE-AB	TLX1	TLX1	ND
242[a]	42	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY,del(6)(q21q25),t(10;14)(q24;q11)[4]/46,XY[16]
362[a]	45	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY,t(10;14)(q24;q11)[14]/46,XY[4]
9[a]	48	PRE-AB	TLX1	TLX1	ND
494[a]	53	PRE-AB	TLX1	TLX1	50,idem,+8,t(10;14)(q24;q11),+18,+19,+20[19]
73[a]	20	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY,del(7)(q?),-9,-10,del(12)(p11),-14,-14,+4mar[12]/46,XY[8]
381[a]	43	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY[20]
164[a]	35	PRE-AB	TLX1	TLX1	46,XY,t(9;20)(p21;q12),t(10;14)(q24;q11),del(12)(p12)[13]/46,XY[12]
528[a]	53	TCR GD+	TLX1	TLX1	ND
499[a]	21	ND	TLX1	TLX1	46,XY[20]
500	26	PRE-AB	TLX1	TLX1 and TCRβ	46,XY[20]
244	22	PRE-AB	TLX1	GNAQ-TLX1	46,XX,t(5;17)(q31;p13),t(9;10;14)(p?;q22;?q23;q11)[20]
260	56	TCR AB+	negative	LMO2	ND
437	17	IMG	negative	LMO2	46,XY,t(11;14)(p13;q11)[6]/46,XY[12]
481	23	PRE-AB	negative	LMO2	46,XY[25]
23	16	PRE-AB	STIL-TAL1	LMO2	45,XY,-7,del(9)(p21),t(11;14)(p13;q11);[19]
439	25	PRE-AB	negative	NKX2-4	46,XY,t(4;7)(q2?5;q35),t(14;20)(q11;p1?2)[19]
145	20	PRE-AB	negative	TAL1	ND
486	24	PRE-AB	negative	TAL1	46,XY,t(1;14)(p32;q11),del(9)(p?)[18]
92	33	TCR AB+	negative	TAL1	45,XY,der(1)t(1;9;14)(p32;p?;q?),der(9)t(1;9;14),-14[3]/47,XY,idem,+2mar[17]/46,XY[4]
45	22	IMB	STIL-TAL1	unknown	46,XY,t(5;20)(q32;p13)[3]/46,XY[17]
388	53	PRE-AB	negative	unknown	45,XY,-8,der(8)t(8;?)(q24;?),t(9;14)(p21;q13)[18]

Table 2: Biological characteristics of T-ALL with TCRδ-oncogene translocation.

	Total	T-ALL TCRβ translocated n (%)	T-ALL TCRδ translocated n (%)	T-ALL TCRβ/δ non translocated n (%)
T-ALL cases	280	40 (14%)	38 (13%)	205 (73%)
Median age, y	18	19,5	24	17
TCR subset analysis				
Immature	58	4 (7%)	1 (2%)	53 (91%)
Imβ/Pre-αβ	143	26 (18%)	31 (22%)	89 (60%)
TCR γδ	40	7 (18%)	1 (2%)	32 (80%)
TCR αβ	35	3 (9%)	4 (11%)	28 (80%)
ND	4	0	1	3
Genotype subset analysis				
PICALM-MLLT10	18	2[a] (11%)	0	16 (89%)
STIL-TAL1	30	2[b] (7%)	2[c] (7%)	26 (86%)
TLX1	39	11[d] (28%)	21[d] (54%)	7 (18%)
TLX3	47	1 (2%)	1[e] (2%)	45 (96%)
none of above	146	22 (15%)	14 (9%)	111 (76%)
NOTCH1 FBXW7 mutation				
NOTCH1and/or FBXW7 Mutated	150	25 (71%)	24 (83%)	101(63%)
NOTCH1and FBXW7 Unmutated	73	10 (14%)	5 (7%)	61 (84%)
ND	57	5	9	43

Table 3: Immunophenotypic genotypic characteristics and NOTCH1/FBXW7 status of adult T-ALL as a function of TCR translocation

Legend to Tables:

Table 1: Biological characteristics of T-ALL with TCRβ-oncogene translocation.
Applying a TCR-based classification (Asnafi et al., 2003a) : immature (IM) cases (surface and cytoplasmic TCRβ negative) comprised IM0, IMδ, and IMγ subtypes (harboring, respectively, a germline configuration of all three TCRβ, δ, and γ loci, only a TCRδ rearrangement, or in addition TCRγ-rearranged locus, accompanied or not by an incompletely rearranged DJβ locus); IMβ/pre-αβ cases included IMβ and pre-αβ subtypes (displaying VβDJβ rearrangement and, respectively, either a cTCRβ- or sTCR-/cTCRβ+ phenotype); TCRαβ and TCRγδ cases harboured a cell surface TCRαβ or TCRγδ . *PICALM-MLLT10* and *STIL-TAL1* fusion transcripts were detected using RT-PCR as described (Asnafi et al., 2003a). *TLX1* and *TLX3* were detected using RQ-PCR as described (Asnafi et al., 2004). Negative corresponds to cases with neither *PICALM-MLLT10* and *STIL-TAL1* fusion transcripts nor *TLX1/TLX3* overexpression.
[a]: also reported in (Dadi et al., 2012). [b]: also reported in (Soulier et al., 2005b). [c] also reported in (Clappier et al., 2007). ND: not down. Unknown corresponds to LM-PCR failures

Table 2: Biological characteristics of T-ALL with TCRα/δ-oncogene translocation
[a]: also reported (Dadi et al., 2012). ND: not down. Unknown corresponds to LM-PCR failures

Table 3: Immunophenotypic, genotypic characteristics and NOTCH1/FBXW7 status of adult T-ALL as a function of TCR translocation. [a] Both TCRβ-HOXA, [b] LMO1 and IL2RB, [c]LMO2 and Failed, [d] all TCR-TLX1, [e] *trans*-rearrangement Ig-TCRδ

Figure 1

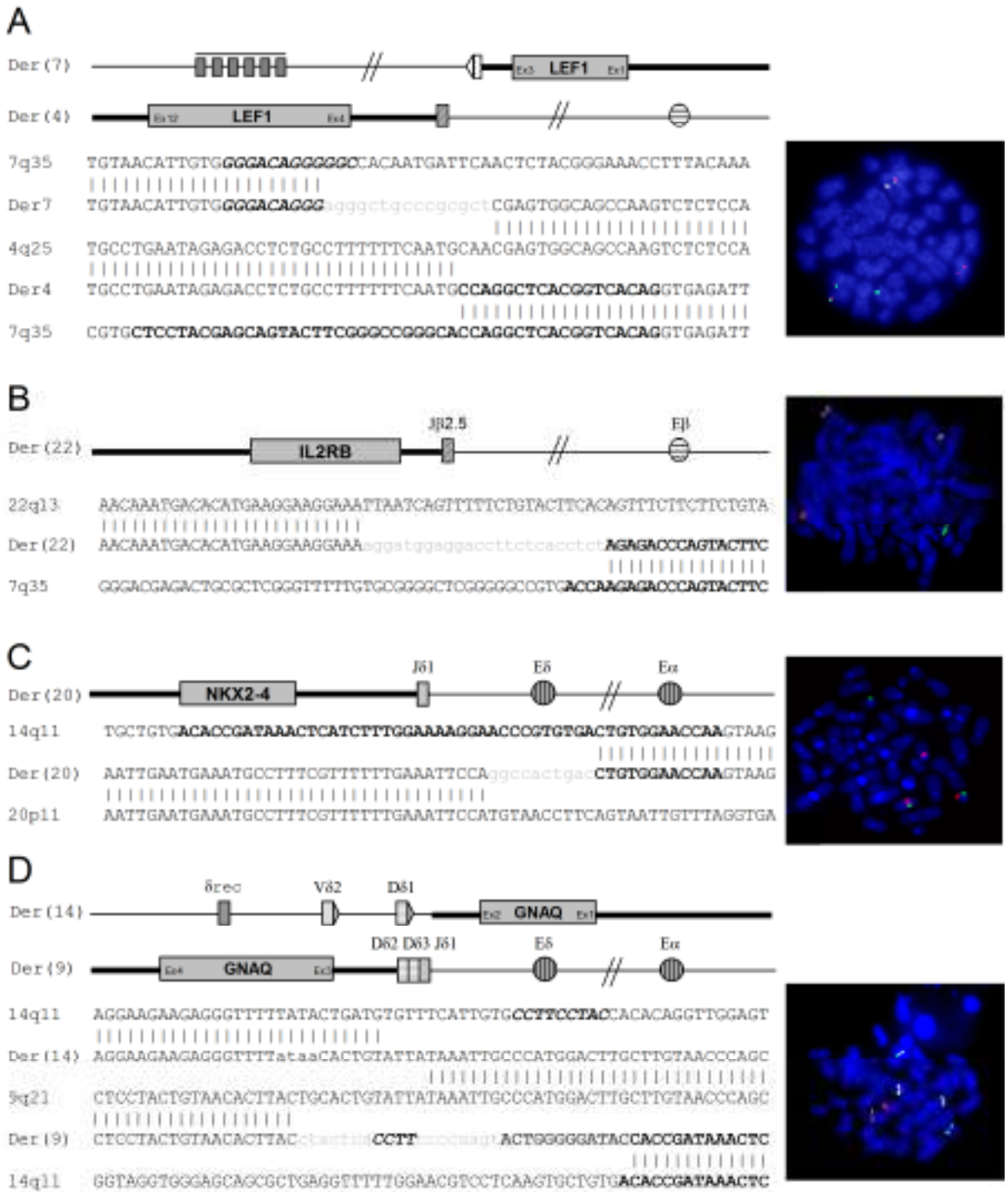

A
Der(7)
LEF1
Der(4)
LEF1
7q35 TGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTACAAA
Der7 TGTAACATTGTGGGGACAGGG
4q25 TGCCTGAATAGAGACCTCTGCCTTTTTTCAATGCAACGAGTGGCAGCCAAGTCTCTCCA
Der4 TGCCTGAATAGAGACCTCTGCCTTTTTTCAATGCCAGGCTCACGGTCACAGGTGAGATT
7q35 CGTGCTCCTACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGGTGAGATT
B
Der(22)
IL2RB
Jβ2.5
Eβ
22q13 AACAAATGACACATGAAGGAAGGAAATTAATCAGTTTTTCTGTACTTCACAGTTTCTTCTTCTGTA
Der(22) AACAAATGACACATGAAGGAAGGAAA
AGAGACCCAGTACTTC
7q35 GGGACGAGACTGCGCTCGGGTTTTTGTGCGGGGCTCGGGGGCCGTGACCAAGAGACCCAGTACTTC
C
Der(20)
NKX2-4
Jδ1
Eδ
Eα
14q11 TGCTGTGACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCGTGTGACTGTGGAACCAAGTAAG
Der(20) AATTGAATGAAATGCCTTTCGTTTTTTGAAATTCCA
CTGTGGAACCAAGTAAG
20p11 AATTGAATGAAATGCCTTTCGTTTTTTGAAATTCCATGTAACCTTCAGTAATTGTTTAGGTGA
D
Der(14)
δrec
Vδ2
Dδ1
GNAQ
Der(9)
GNAQ
D62 D63 Jδ1
Eδ
Eα
14q11 AGGAAGAAGAGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGT
Der(14) AGGAAGAAGAGGGTTTTataaCACTGTATTATAAATTGCCCATGGACTTGCTTGTAACCCAGC
9q21 CTCCTACTGTAACACTTACTGCACTGTATTATAAATTGCCCATGGACTTGCTTGTAACCCAGC
Der(9) CTCCTACTGTAACACTTAC CCTT ACTGGGGGATACCACCGATAAACTC
14q11 GGTAGGTGGGAGCAGCGCTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTC

Figure 2

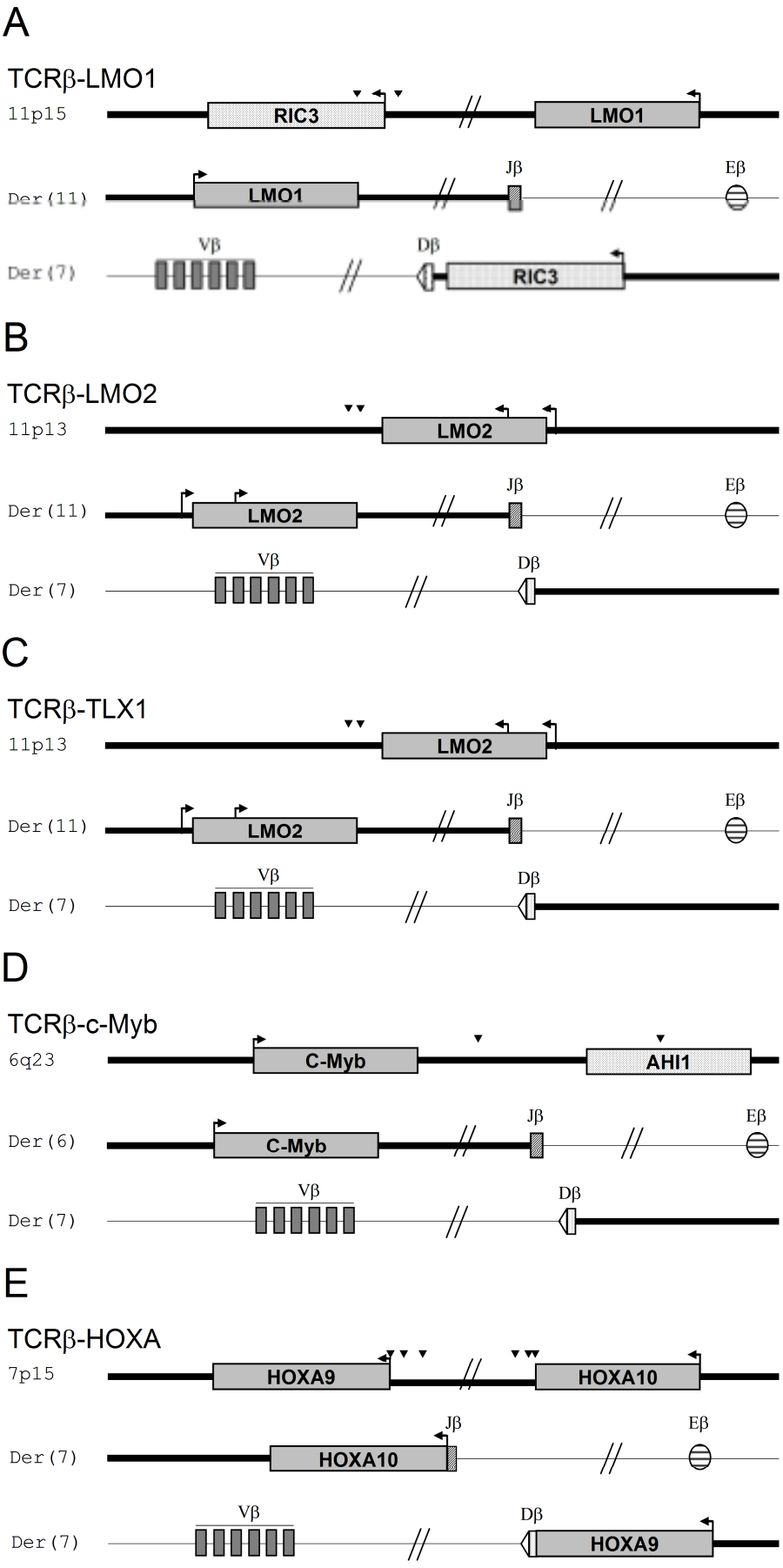

A
TCRβ-LMO1
11p15
RIC3
LMO1
Der(11)
LMO1
Jβ
Eβ
Der(7)
Vβ
Dβ
RIC3
B
TCRβ-LMO2
11p13
LMO2
Der(11)
LMO2
Jβ
Eβ
Der(7)
Vβ
Dβ
C
TCRβ-TLX1
11p13
LMO2
Der(11)
LMO2
Jβ
Eβ
Der(7)
Vβ
Dβ
D
TCRβ-c-Myb
6q23
C-Myb
AHI1
Der(6)
C-Myb
Jβ
Eβ
Der(7)
Vβ
Dβ
E
TCRβ-HOXA
7p15
HOXA9
HOXA10
Der(7)
HOXA10
Jβ
Eβ
Der(7)
Vβ
Dβ
HOXA9

Figure 3

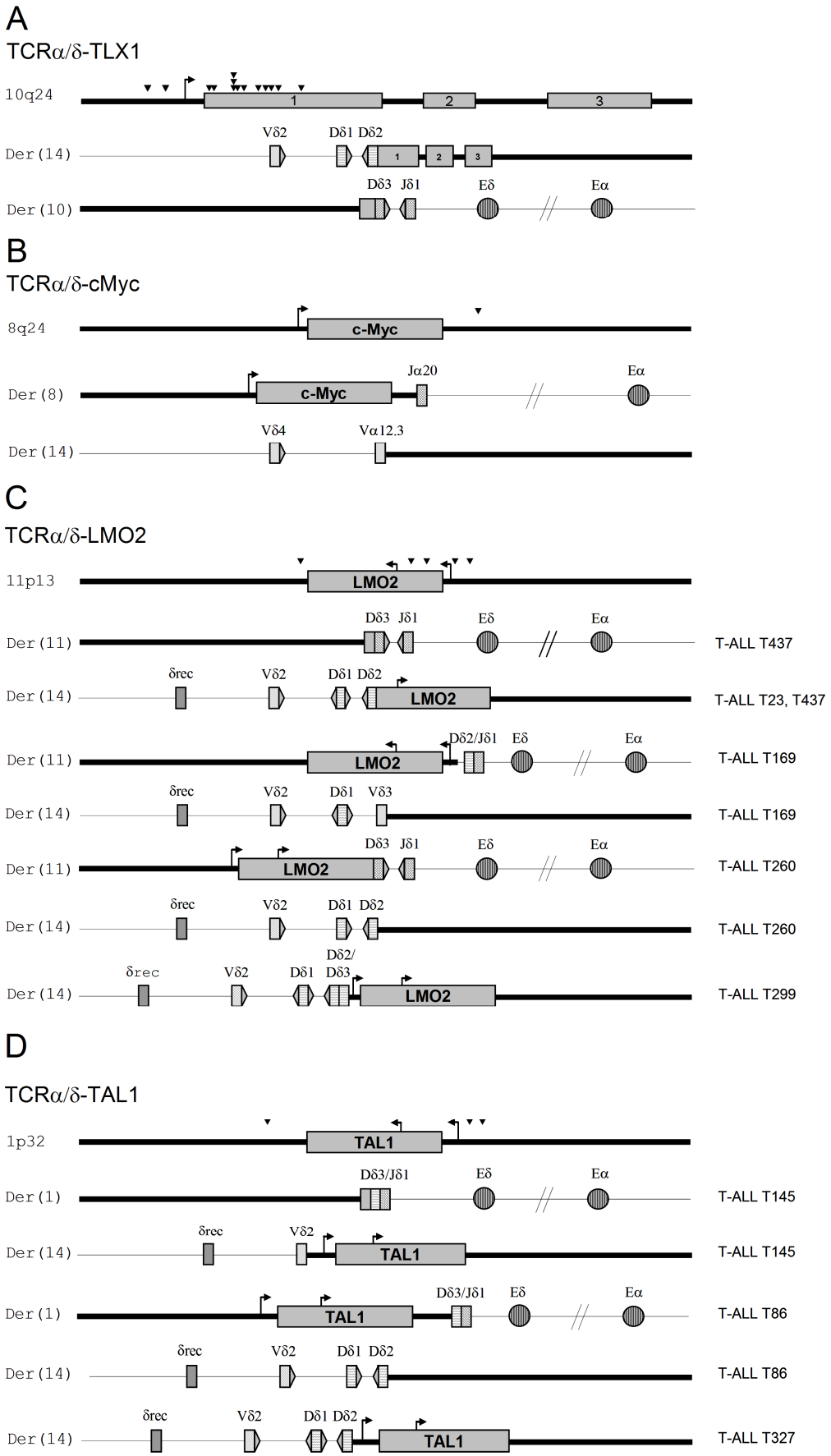
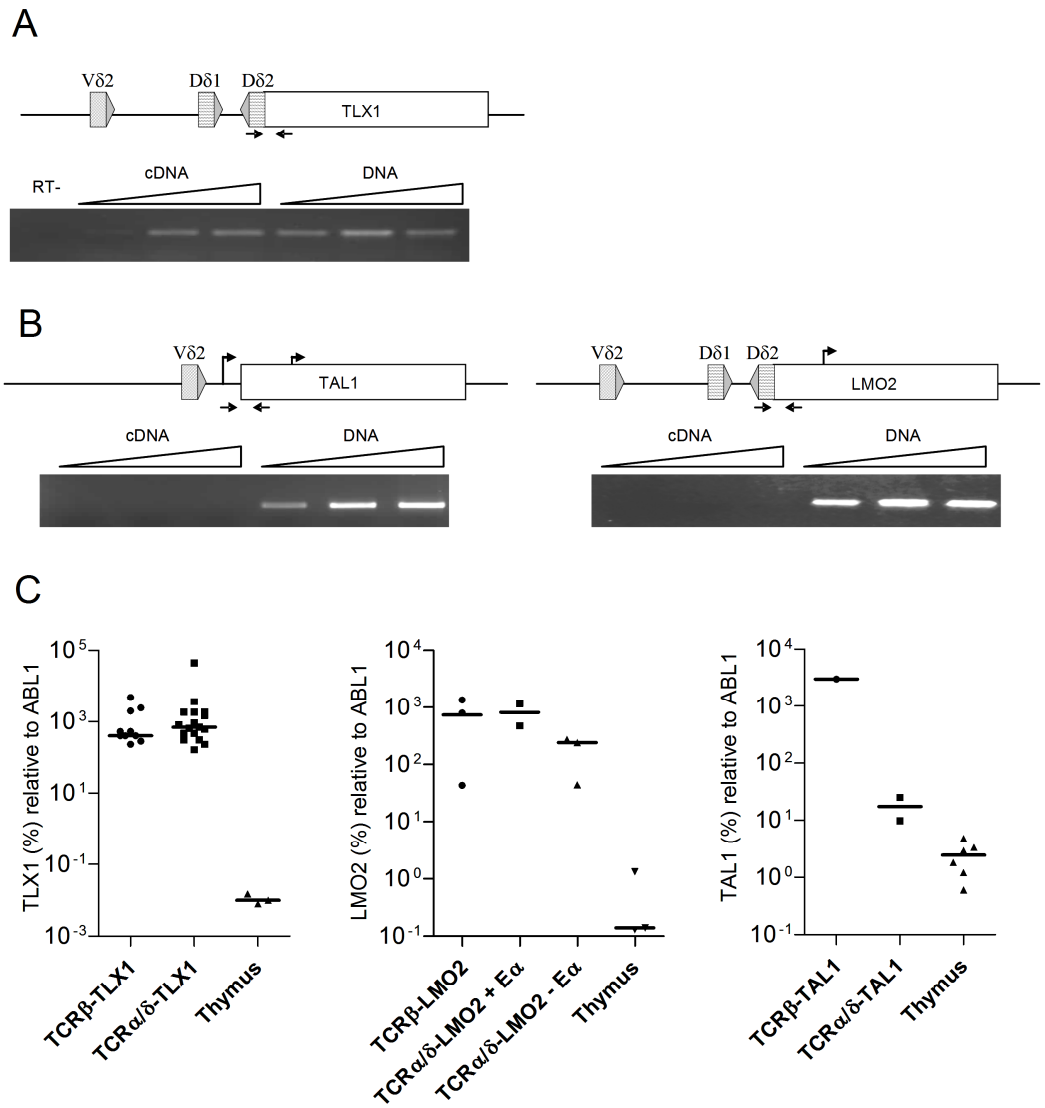

A
TCRα/δ-TLX1
10q24
1
2
3
Vδ2
Dδ1 Dδ2
Der(14)
Dδ3 Jδ1
Eδ
Eα
Der(10)
B
TCRα/δ-cMyc
8q24
c-Myc
Jα20
Der(8)
Vδ4
Vα12.3
Der(14)
C
TCRα/δ-LMO2
11p13
LMO2
Der(11)
T-ALL T437
δrec
T-ALL T23, T437
Dδ2/Jδ1
T-ALL T169
Dδ1 Vδ3
T-ALL T260
Dδ2/
Dδ3
T-ALL T299
D
TCRα/δ-TAL1
1p32
TAL1
Dδ3/Jδ1
T-ALL T145
T-ALL T86
T-ALL T327

Figure 4


A
Vδ2
Dδ1
Dδ2
TLX1
RT-
cDNA
DNA
B
Vδ2
TAL1
cDNA
DNA
Vδ2
Dδ1
Dδ2
LMO2
cDNA
DNA
C
TLX1 (%) relative to ABL1
TCRβ-TLX1
TCRα/δ-TLX1
Thymus
LMO2 (%) relative to ABL1
TCRβ-LMO2
TCRα/δ-LMO2 + Eα
TCRα/δ-LMO2 - Eα
Thymus
TAL1 (%) relative to ABL1
TCRβ-TAL1
TCRα/δ-TAL1
Thymus

Legend to Figures

Figure 1: Novel TCR-oncogene translocations, with FISH profiles on right

A-B. New TCRβ oncogene partner. Bold and thin bars depict the 4q25 or 22q13 and 7q34 chromosomal regions, respectively. Untemplated nucleotides (n diversity) are indicated in lowercase. Nucleotide sequences for the Dβ1, and Jβ gene segments are depicted in italic bold, and bold, respectively. Rights panels show a typical FISH metaphase analysis with a normal allele (split spots) and a translocated allele (fused spots) with TCRβ (green) and oncogenes (red) probes

C. New TCRα/δ oncogene partner. Bold and thin bars depict the 20p11 or 9q21 and 14q11 chromosomal regions, respectively. Untemplated nucleotides (n diversity) are indicated in lowercase. Nucleotide sequences for the Dδ2, Dδ3 and Jδ1 gene segments are depicted in bold italic, dark grey and bold respectively. Right panel show a typical FISH analysis on metaphase with a normal allele (split spots) and a translocated allele (fused spots) with TCRα/δ (green) and oncogenes (red) probes

D. as in C with three-color FISH analysis using a combination of TLX1 (green), GNAQ (yellow) and TCRα/δ (red) probes

Figure 2: Schematic representation of TCRβ-oncogene translocations

A-E. Schematic representation of TCRβ-oncogene translocations: *TCRβ-LMO1* (A), *TCRβ-LMO2* (B), *TCRβ-TLX1* (C), *TCRβ-MYB* (D) and *TCRβ-HOXA* (E). Both translocation derivatives are represented. Arrowheads indicate the relative position of breakpoints within the oncogene. Bold and thin bars depict the oncogene locus and the chromosome 7q35 TCRβ locus, respectively.

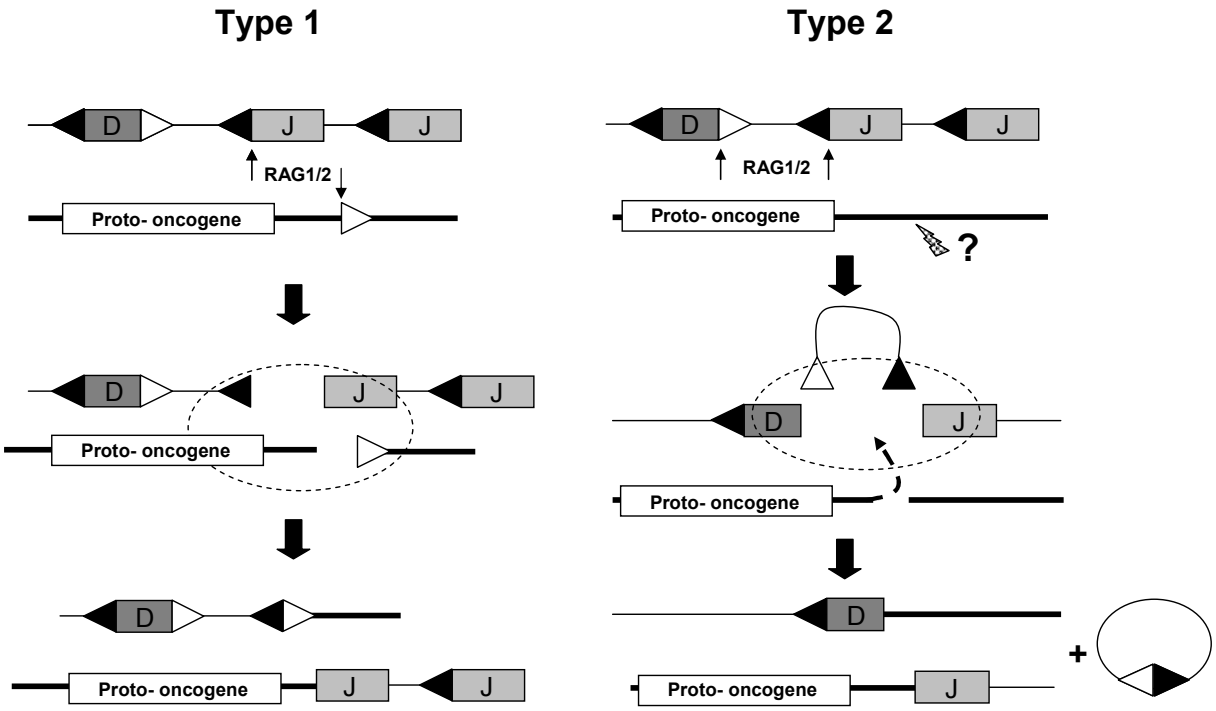
Figure 3: Schematic representation of TCRα/δ-oncogene translocations

A-D. Schematic representation of TCRα/δ-oncogene translocations: *TCRα/δ-TLX1* (A), *TCRα/δ-MYC* (B), *TCRα/δ-LMO2* (C), *TCRα/δ-TAL1* (D). Both translocation derivatives are representated, with corresponding T-ALL UPN (Unic Patient Number) numbers. Arrowheads indicate the relative positions of breakpoints within the oncogene. Bold and thin bars depict the oncogene locus and chromosome 14q11 TCRα/δ, respectively.

Figure 4: Analyse of TCR-oncogene translocation

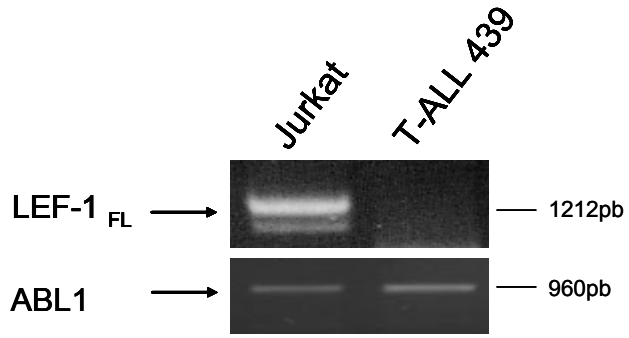
A. Fusion transcripts from *TCRδ-TLX1* (T-ALL9) were investigated by PCR and RT-PCR with a range of cDNA and DNA quantities. B. *TCRδ-LMO2* (T-ALL145) and *TCRδ-TAL1* (T-ALL437) translocations were investigated by PCR and RT-PCR with a range of cDNA and DNA quantities (positions of oligonucleotide primers are indicated by arrows on upper diagrams). The absence of genomic DNA contamination in the cDNA fraction was validated by RQ-PCR using Albumin DNA-specific oligonucleotide primers (Not shown) and a RT-negative control was performed for T-ALL9. **C.** *TLX1*, *LMO2* and *TAL1* quantification by RQ-PCR.

Supplementary Figure S1

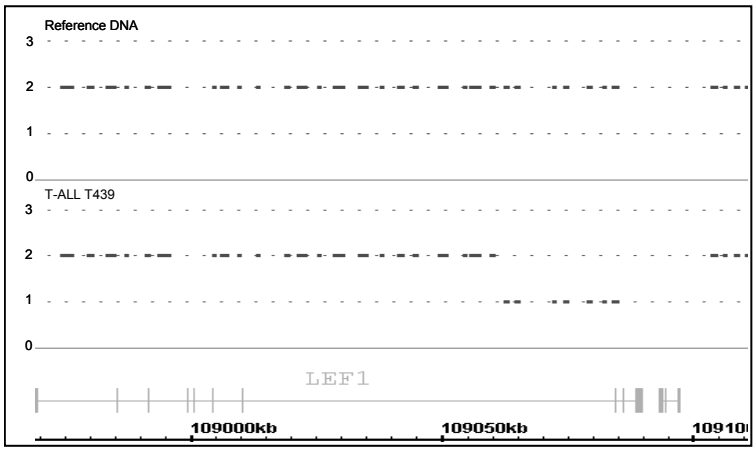


Supplementary Figure S2

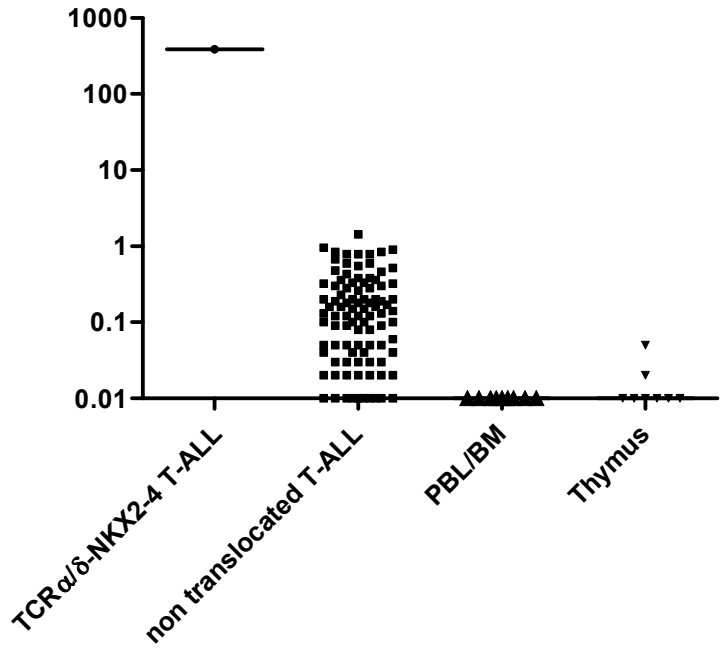
A.



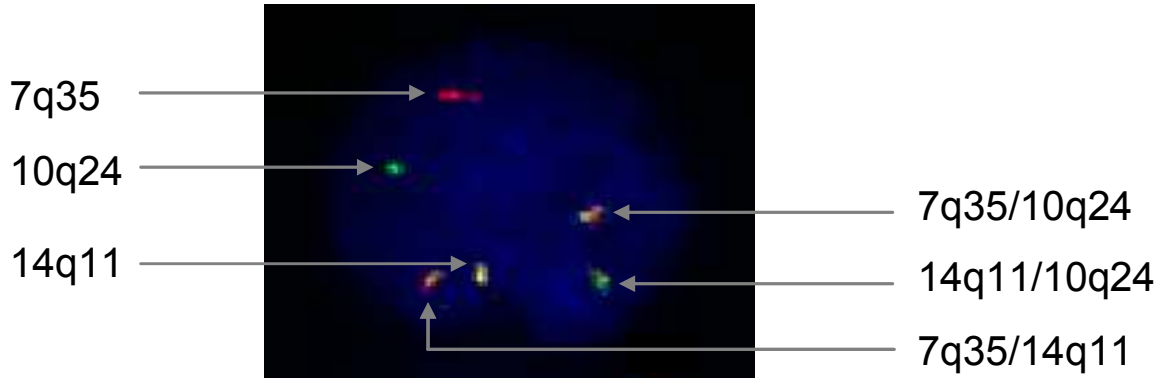
B.



Supplementary Figure S3

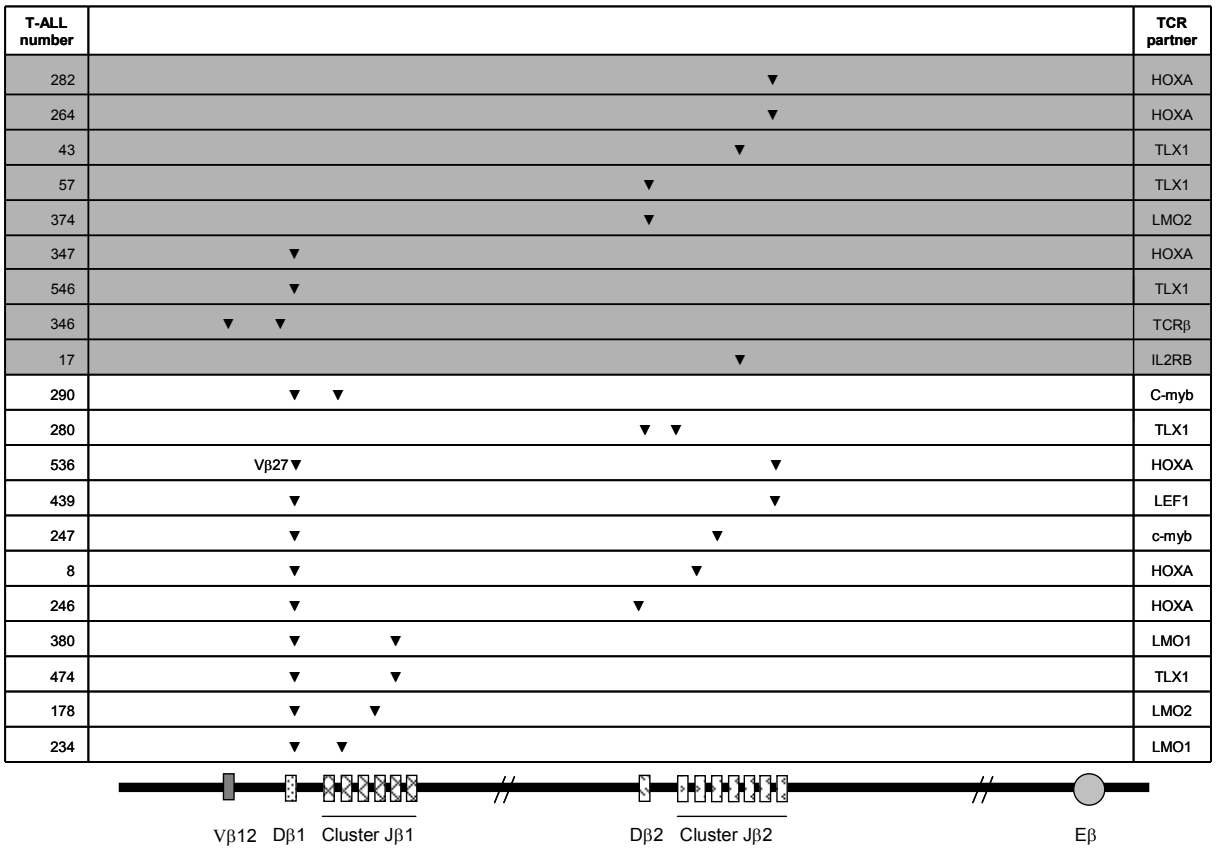


Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S5

A.



B.

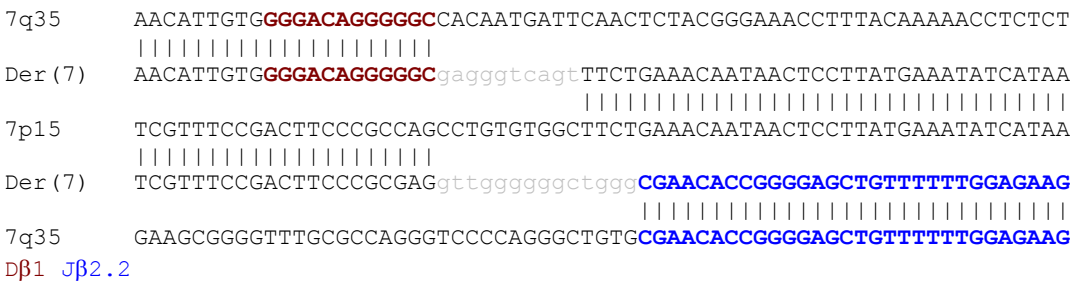
T-ALL 347 TCRβ-HOXA9 (Der(7) failed)

```
7q35      GTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTACAAAAACCTCTCTGGCGGT
          ||||||||||||
Der(7)    GTGGGGACAGGGatcaatGCCCATATCGAGGGCAGGGAGGCCTTCGCCAGCCTCACTGGGGACTG
                            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7p15      TTCGCTGCAGCTTTGTGTGCCCATATCGAGGGCAGGGAGGCCTTCGCCAGCCTCACTGGGGACTG
Dβ1
```

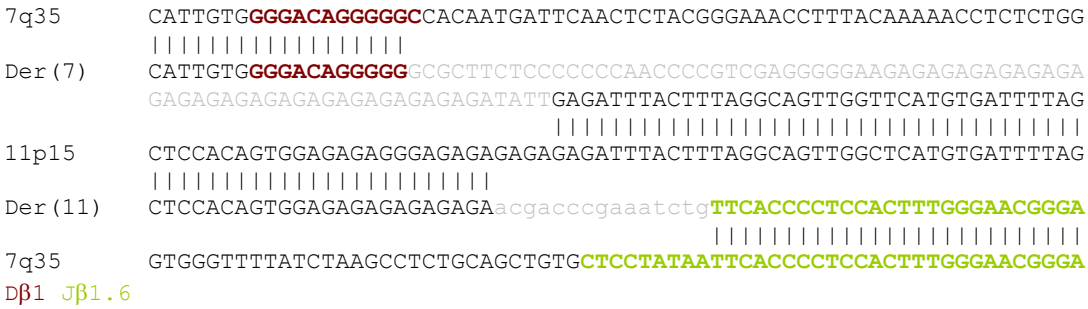
T-ALL 234 TCRβ-LMO1

```
7q35      TAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTACAAAAACCTCTC
          ||||||||||||||||
Der(7)    TAACATTGTGGGGACAGttaaggctccccttACATCTCTCCCCTCCTCAAAACTCTACAGTGG
                                          ||||||||||||||||||||||||||||||||
11p15     CAGATAGTATTATGTTGAAGCTTAAGTCAACTCACATCTCTCCCCTCCTCAAAACTCTACAGTGG
          |||||||||||||||||||||||
Der(11)   CAGATAGTATTATGTTGAAGGTTAgccgttagCTAACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCA
                                        ||||||||||||||||||||||||||||||||||
7q35      CGTCCCTTTTAGAGTGGCTATATTCTTATGTGCTAACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCA
Dβ1 Jβ1.2
```

T-ALL 8 TCRβ-HOXA9



T-ALL 380 TCRβ-LMO1



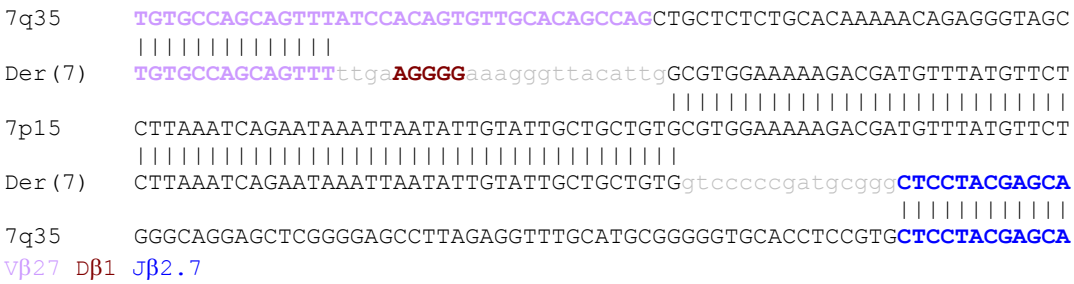
T-ALL 346 TCRβ-TCRβ



T-ALL 247 TCRβ-C-Myb



T-ALL 539 TCRβ-HOXA10



T-ALL 264 TCRβ-HOXA9 (Der 7 failed)

```
7q35      CTTAGAGGTTTGCATGCGGGGGTGCACCTCCGTGCTCCTACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACC
                                            ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(7)    GTTTCCTTTCCCTGCCTGGACTGGAGGCCCAGtcccCCTACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACC
          ||||||||||||||||||||||||||||||||
7p15      GTTTCCTTTCCCTGCCTGGACTGGAGGCCCAGAACTCTTTCGTTGCACAGCCACCGACCTGCTGT
Jβ2.7
```

T-ALL 374 TCRβ-LMO2 (Der 11 failed)

```
7q35      AAACATTTTTGTATCATGGTGTAACATTGTGGGGACTAGCGGGAGGGCACGATGATTCAGGTAGA
          ||||||||||||||||||||||||||||
Der(7)    AAACATTTTTGTATCATGGTGTAACATTGaaaGTTCGCCAGGCTGGTTTCAAACTCCTGACCTCA
                                          ||||||||||||||||||||||||||||||||||
11p13     TTGTATTTTTAGTAAAGATGGGGTTTTTCCACGTTCGCCAGGCTGGTTTCAAACTCCTGACCTCA
Dβ2
```

T-ALL 246 TCRβ-HOXA10

```
7q35      AGCTGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTACAAAAAC
          |||||||||||||||||||||||||
Der(7)    AGCTGTAACATTGTGGGGACAGGGGgggggggataATCAGGGGATACAGGCCCCTGGGTTTCTTCT
                                           |||||||||||||||||||||||||||||||||
7p15      GGGCATGTCTGCCTGGAGTGCTGTGCTGTGtttaATCAGGGGATACAGGCCCCTGGGTTTCTTCT
          ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(7)    GGGCATGTCTGCCTGGAGTGCTGTGCTGTGcagtggttcaaACTAGCGGGAGGGCACGATGATTC
                                                 |||||||||||||||||||||||||
7q35      AGGGAGGAAACATTTTTGTATCATGGTGTAACATTGTGGGGACTAGCGGGAGGGCACGATGATTC
Dβ1 Dβ2
```

T-ALL 282 TCRβ-HOXA10 (Der 7 failed)

```
7p15      TTAATATTGTATTGCTGCTGTGCGTGGAAAAAGACGATGTTTATGTTCTTATAGAATAAAAGCTG
          |||||||||||||||||
Der(7)    TTAATATTGTATTGCTGCcccgccccagggtcggcgggagagctgtaaggggatgAGCAGTACTT
                                                           ||||||||||
7q35      GAGCTCGGGGAGCCTTAGAGGTTTGCATGCGGGGGTGCACCTCCGTGCTCCTACGAGCAGTACTT
Jβ2.7
```

T-ALL 280 TCRβ-TLX1

```
7q35      AACATTGTGGGGACTAGCGGGAGGGCACGATGATTCAGGTAGAGGAGGTGCTTTTACAAAAAAAC
          |||||||||||||||||||||
Der(7)    AACATTGTGGGGACTAGCGGGagtggggttattgaagGCTCCATCGGTTCCCAGTGTTCAGAGGA
                                             ||||||||||||||||||||||||||||
10q24     TGTAAATGGCTTAGCCAGGGCCCAACACATTGTGTGTGCTCCATCGGTTCCCAGTGTTCAGAGGA
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   TGTAAATGGCTTAGCCAGGGCCCAACACATTGTGTGTtggggttctATGAGCAGTTCTTCGGGCC
                                                 ||||||||||||||||||||
7q35      GAAGGAGAAGGAATTCTGGGCAGCCCCTTCCCACTGTGCTCCTACAATGAGCAGTTCTTCGGGCC
Dβ2 Jβ2.1
```

T-ALL 474 TCRβ-TLX1

```
7q35      TGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTACAAAAACCTC
          |||||||||||||||||||||||||
Der(7)    TGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCgtgccgaggaaTCCAGCCTCACTGTGCCCAGGCCGCTCTGT
                                             ||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     GGAGACAGCCCGTAAGTGAGAAAAACTCGCTTCCCTCCAGCCTCACTGTGCCCAGGCCGCTCTGT
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   GGAGACAGCCCGTAAGTGAGAAAAACTCGCTTCCgggTCAGCCCCAGCATTTTGGTGATGGGACT
                                              ||||||||||||||||||||||||||||
7q35      CTGGGGTTTGCCACACTCATGATGCACTGTGTAGCAATCAGCCCCAGCATTTTGGTGATGGGACT
Dβ1 Jβ1.5
```

T-ALL 57 TCRβ-TLX1 (Der 10 failed)

```
7q35      TTTGTATCATGGTGTAACATTGTGGGGACTAGCGGGAGGGCACGATGATTCAGGTAGAGGAGGTG
          |||||||||||||||||||||||||
Der(7)    TTTGTATCATGGTGTAACATTGTGCACACAGACACACCTAACCACACTCCTACAGACTTACAGGC
                                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     CCTATGGATGCTGGTGCACAGGTACACACAGACACACCTAACCACACTCCTACAGACTTACAGGC
Dβ2
```

T-ALL 546 TCRβ-TLX1 (Der 10 failed)

```
7q35      TGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTACAAAAACCTC
          |||||||||||||||||||||
Der(7)    TGTAACATTGTGGGGACAGGGAGAGGAAGGAGCTTCCCTACCCCATCTACCGTAGAGGTGTCTTA
                              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     AGCCCCACTCTGTCAGTCGCAAGAGGAAGGAGCTTCCCTACCCCATCTACCGTAGAGGTGTCTTA
Dβ1
```

T-ALL 43 TCRβ-TLX1 (Der 7 failed)

```
10q24     TGCACGGGCTTGTAGTGGTGTGTGTGTAACCGTATGTGAATGTGACTGTTTCTTTTTGGGTAATT
          |||||||||||||||||||||
Der(10)   TGCACGGGCTTGTAGTGGTGTGggtgatggtaatggcacagatacgCAGTACTTCGGGCCAGGCA
                                                        ||||||||||||||||||
7q35      GCGCTCGGGTTTTTGTGCGGGGCTCGGGGGCCGTGACCAAGAGACCCAGTACTTCGGGCCAGGCA
Jβ2.5
```

T-ALL 178 TCRβ-LMO2

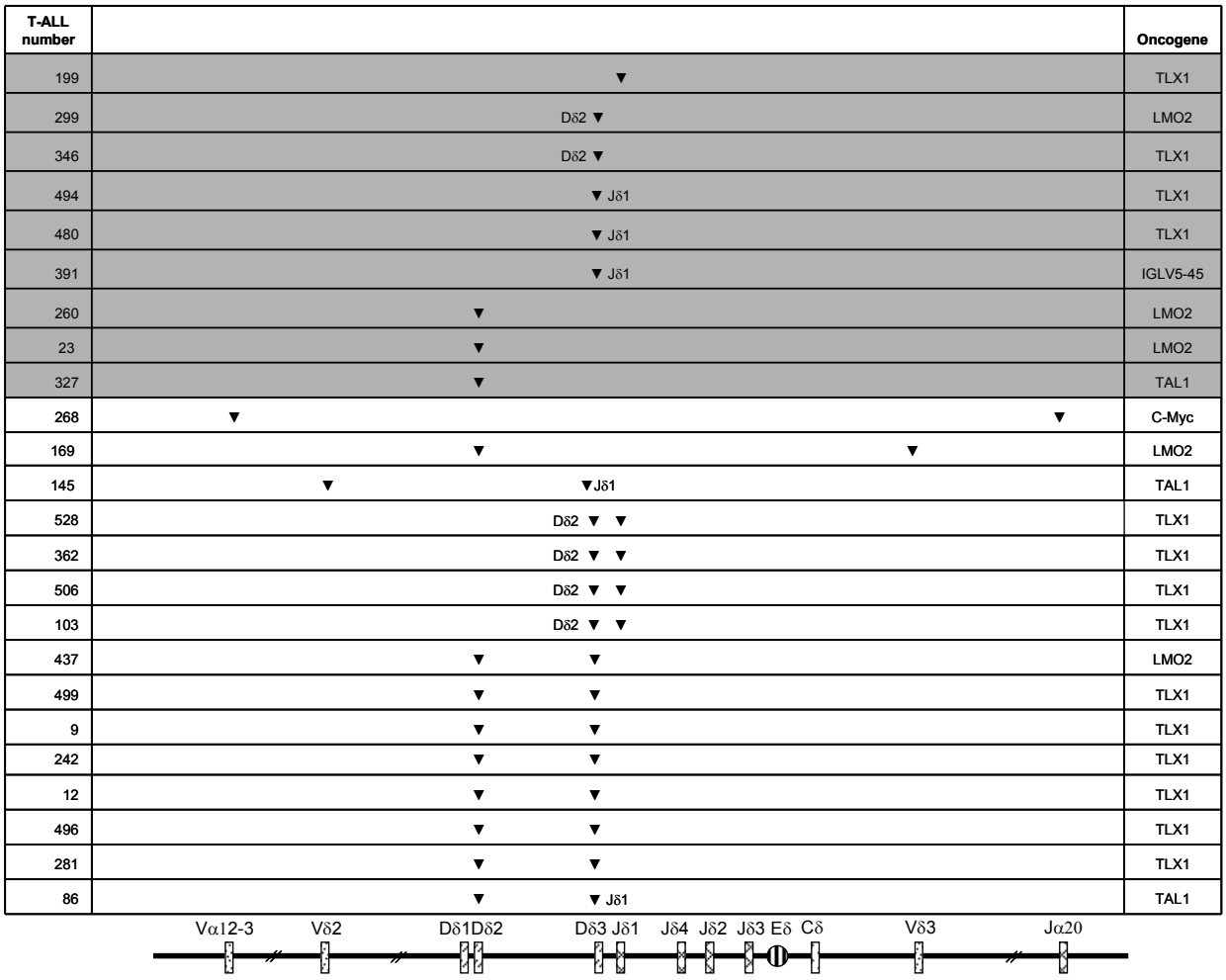
```
7q35      TGTACAAAGCTGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTA
          |||||||||||||||||||||||||
Der(7)    TGTACAAAGCTGTAACATTGTGGGGgctaaacgggcTGCATGGAAGCCAATTTGCAAGGGAGAAT
                                              ||||||||||||||||||||||||||||||
11p13     AGCTGAGATGTGGCAGGGGCCACAGTTTTGACACTGTGCATGGAAGCCAATTTGCAAGGGAGAAT
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(11)   AGCTGAGATGTGGCAGGGGCCACAGTTTTGACACTGggtctggtatgAATGAAAAACTGTTTTTT
                                                         |||||||||||||||||
7q35      AGGCAGCAGGTCGCGGTTTTCCTTCCAGTCTTTAATGTTGTGCAACTAATGAAAAACTGTTTTTT
Dβ1 Jβ1.4
```

T-ALL 290 TCRβ-C-Myb

```
7q35      TGTACAAAGCTGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTA
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(7)    TGTACAAAGCTGTAACATTGTGGGGGGACAGGGtgACCTCGGAAAGTCTGAAGCTTATCAAGTGA
                                            ||||||||||||||||||||||||||||||||
6q23      ACGAAATCCTACATCAGGCTGTGTCACTGTGTGAAACCTCGGAAAGTCTGAAGCTTATCAAGTGA
          ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(6)    ACGAAATCCTACATCAGGCTGTGTCACTGcctctcccCTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACC
                                            ||||||||||||||||||||||||||||||
7q35      GTGTCCCTTTTAGAGTGGCTATATTCTTATGTGCTAACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACC
Dβ1 Jβ1.2
```

Supplementary Figure 6

A



B

T-ALL 145 TCRδ-TAL1

```
14q11     GTGCCTGTGACACCCACCCTGCTGCAGCTCTACTTCTGAGCAGCTCAAAAACCACTGACCAG
          ||||||||||||
Der(14)   GTGCCTGTGACACgagtaagattgtataACCACACCGCAGCGTAACTGCAGGCCTCTCAGCG
                                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||
1p32      TCGCTTTGGGCGCGGCAGATCGCCCAGGACCACACCGCAGCGTAACTGCAGGCCTCTCAGCG
          ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(1)    TCGCTTTGGGCGCGGCAGATCGCCCAGGACgggatagtTGGGGGctagcatCACCGATAAAC
                                                ||||||||||||
14q11     AGGTAGGTGGGAGCAGCGCTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAAC
```

T-ALL 86 TCRδ-TAL1

```
14q11    GATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAAC
         ||||||||||||||
Der(14)  GATGTGTTTCATTGTaagataCACAGTGCCTGGCACATAGTGGGCATTCCTTCAAGAACTTAC
                               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1p32     TTATGAATCCAAAGTACCTTGCACAGTGCCTGGCACATAGTGGGCATTCCTTCAAGAAGTTAC
         ||||||||||||||||||||
Der(1)   TTATGAATCCAAAGTACCTTGtaccacccttagttcaACTGGGGGATcaagacctACACCGAT
                                                                ||||||||
14q11    GAAGGTAGGTGGGAGCAGCAGCGCTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGAT
```

T-ALL 169 TCRδ-LMO2

```
14q11    CCAAAGATGAGTTTATCGGTAAGGCACAATGAAACACATCAGTATAAAACCCTCTTCTTCCTT
         ||||||||||||||||||||
der(14)  CCAAAGATGAGTTTATCGGTAAGGgcaaaaagGGAACATGGCCCAGGTTGGGATGTGCTGGGC
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||
11p13    TCCTGGAGTCACTGGGCCAGGTACGCACACCTGGAACATGGCCCAGGTTGGGATGTGCTGGGC
         ||||||||||||||||||||||||
Der(11)  TCCTGGAGTCACTGGGCCAGGTACcctatttaaaatcccacacgacagttgAAAGGCACAGTA
                                                           ||||||||||||
14q11    GTGCCCCAGGAGTTTGTGTTATGACTTCCTGGGCACCTGCATCATAGTGCTAAAGGCACAGTA
```

T-ALL 437 TCRδ-LMO2

```
14q11    GTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTT
         ||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  GTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCggTCTGCATAAGGCATGTACTAGTTGTTAA
                                           ||||||||||||||||||||||||||||
11p13      ATGTCCCAATCACCTCATAGTTCCTGAGTCTCTCTTCTGCATAAGGCATGTACTAGTTGTTAA
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(11)  ATGTCCCAATCACCTCATAGTTCCTGAGTCTCTCTcggctCTGGGGGATACGCACAGTGCTAC
                                                 ||||||||||||||||||||||||
14q11    AACCGAGGGGAAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTAC
```

T-ALL 268 TCRα-cmyc

```
14q11    GGTGAGGTTTGTGTAGGCGACCTCGCACTGTGGTTCTAACGACTACAAGCTCAGCTTTGGAGC
                                           ||||||||||||||||||||||||||||
Der(8)   ATTCCTGTGCTGCCCCCTGCCTGACtgtaggttgaCTAACGACTACAAGCTCAGCTTTGGAGC
         ||||||||||||||||||||||||||
8q24     ATTCCTGTGCTGCCCCCTGCCTGACATTCCATCCACACTTGAGGCCCAGATTGTAAGAAGGGA
                                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  TATCGTCCCTACCTCTGTGCAATGAtgTCCATCCACACTTGAGGCCCAGATTGTAAGAAGGGA
         ||||||||||||||||||||||||||
14q11    TATCGTCCCTACCTCTGTGCAATGAGCG
```

T-ALL 327 TCRδ-TAL1 (Der(1) failed)

```
14q11    TTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTT
         ||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  TTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTTATTGCTCTGGTCTGGCTCTCTCACAGATA
                                         ||||||||||||||||||||||||||||||||
1p32     CTGGGAATACAGGAGGGTTGAGCAAAGTGAGATTATTGCTCTGGTCTGGCTCTCTCACAGATA
```

T-ALL 260 TCRδ-LMO2 (Der(11) failed)

```
14q11    TGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCCAAAA
         ||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  TGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACGTNTTNGGTTTTATCTATGCAATTATCTTATAAGCAG
                                           ||||||||||||||||||||||||||||||
11p15    CCATATTTACAGTAATAATAGTAATGGTAATAGATTTTATCTATGCAATTATCTTATAAGCAG
```

T-ALL 299 TCRδ-LMO2

```
14q11    TTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGAC
         ||||||||||||
Der(14)  TTGTGCCTTCCcatgGGATACGAtCCCNCNNNNNGTTACATAGCATTGGAACTTAGGAAAGCTCT
                                             ||||||||||||||||||||||||||||||||
11p13    CGAAATTATTGCTGGGTAAGACAATACTGTGTGTGTTACATAGCATTGGAACTTAGGAAAGCTCT
```

T-ALL 391 TCRδ-IGVL5-45 (Der(14) failed)

```
22q11    GATTTGGCACAGCAGCGCTTCTCACAGTGACACACACAGATGGGGAAGTGGGACAAAAACCTC
         ||||||||||||||||
Der(22)  GATTTGGTACAGCAGCACTTTctcTGCGGGGGGGTCCCCCCCACTAGAgtACACCGATAAACTC
                                                          ||||||||||||||
14q11    GGTAGGTGGGAGCAGCGCTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTC
```

T-ALL 23 TCRδ-LMO2 (Der(11) failed)

```
14q11    TGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCCAAAA
         |||||||||||||||||||||||||
Der(14)  TGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTCCCGTCGATTAAGCTCCTAGCACAGCAGCCTCACCTCCA
                                          ||||||||||||||||||||||||||||||||
11p15    CCCACCTCCTTTCTTCAACCCTTCACTGGTGGTTAAGCTCCTAGCACAGCAGCCTCACCTCCA
```

T-ALL 281 TCRδ-TLX1

```
14q11    GGGGAAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTA
                                                       ||||||||||||||||||||
Der(10)  TCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTacccttggCGCACAGTGCTACAAAACCTA
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24    TCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTC
                                               ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  AGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTC
         ||||||||||||||||||||||||||||||
14q11    AGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCT
```

T-ALL 9 TCRδ-TLX1

```
14q11    TGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTGT
                                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)  CCTCGCGCTGTCATTCACCCCtACTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTGT
         ||||||||||||||||||||||
10q24    CCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGACCGTG
                                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  CATTGTGCCTTCCTACgccaggcgCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGACCGTG
         ||||||||||||||||
14q11    CATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTG
```

T-ALL 242 TCRδ-TLX1

```
14q11    AAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGA
                                          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)  GAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCgtgggcctcCTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGA
         ||||||||||||||||||||||
10q24    GAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTC
                                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  ATTGTGCCTTCGTACtgggggTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTC
         ||||||||||||||||
14q11    ATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGA
```

T-ALL 12 TCRδ-TLX1

```
14q11    AGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAG
                                                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)  AGGGCCTGGGCTCCATACCTGGGGAGTAagctcGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAG
         ||||||||||||||||||||||||||||
10q24    AGGGCCTGGGCTCCATACCTGGGGAGTAGACAGTCTTCTACTTTCTAAAAAGCTGGACTTGAAAT
         TTGGAGTAAATCTCCTGGTTGAGTGACAGGTGTTTCGCAGCTGAGCCCTTGAGGAGATTCTCCAG
         TTGGGCAGAGACATCCCTTCCTCAGACGCCTTGTGGGCTGGACTCCTTTGGCCCAGTTCAAAGTG
         AGGGGAGGGCTCCCAACAGGCCGGGAAGACAGTTGACTTCACCCTTCCTTGGTTTGTCTGTCTGT
         CCGTCTCTGGGAATGGTCGCTTCCTGTTTTCCCTTTTCCTTTTAAGCCTCGCCTTCTTCCCCTCT
         TCTCTCTCTTCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCAGGCTCCTGCATCTG
                                                              ||||||||||||||||||||
Der(14)  GGGtttTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCgtactgggggTATCTCTGGCTCCTGCATCTG
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||
14q11    GGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTT
```

T-ALL 346 TCRδ-TLX1 (Der(10) failed)

```
10q24    TCTTCATGAACTACTCCGAGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTG
                                                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  TGATGTGTTTCATTGTGCCTTCgtACTGGGGGTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTG
         ||||||||||||||||||||||
14q11    TGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACA
```

T-ALL 362 TCRδ-TLX1

```
14q11    TGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCG
                                                              ||||||||||||||||||||
Der(10)  CCCTCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCccttacaaaaTCTTTGGAAAAGGAACCCG
         |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24    CCCTCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCA
                                                        ||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  ATTGTGCCTTCCcccttagtACTGGGGGATAtaagacTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCA
         ||||||||||||
14q11    ATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGA
```

T-ALL 496 TCRδ-TLX1

```
14q11    TGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTGG
                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)  CTCGGCTTCTGGCCTcccgaaccCTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAAACCTACAGAGACCTG
         ||||||||||||||||
10q24    CTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTCCCCCTCCCCTCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCT
                                                        ||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  AGAGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCT
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
14q11    AGAGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGC
```

T-ALL 499 TCRδ-TLX1

```
14q11    TAAAGCTCTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAG
                                                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)  ACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCggggCTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAG
         ||||||||||||||||||||||||||||
10q24    ACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCC
                                                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  TTCATTGTGCCTTCCatgtccgccggggtgggCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCC
         ||||||||||||||||
14q11    TTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCG
```

T-ALL 506 TCRδ-TLX1

```
14q11    CGCTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAAC
                                           ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)  CCCTCGCGCTGTCATTCACCCCccggttctgctggcACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAAC
         ||||||||||||||||||||||
10q24    CCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGAAACC
                               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  TTCATTGTGCCTTCCTcatTACGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGAAACC
         ||||||||||||||||
14q11    TTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCG
```

T-ALL 480 TCRδ-TLX1 (Der(14) failed)

```
14q11    GCTCTGTAAAGCTCTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAACCT
                                             ||||||||
Der(10)  ATCTTTTGGTGTGGGTTGGTTGAAGATAAAATTTAggtTGGGGGATttagACCGATAAACTCATC
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24    ATCTTTTGGTGTGGGTTGGTTGAAGATAAAATTTATAAAACTAAATAAAATAAAATAAAATAAAA
```

T-ALL 528 TCRδ-TLX1

```
14q11    GGTAGGTGGGAGCAGCGCTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCAT
                                                       ||||||||||||||||
Der(10)  GTTTTCCCTTTTCCTTTTAAGCCTCGCCccgtggagagtgttcggacgaACACCGATAAACTCAT
         ||||||||||||||||||||||||||||
10q24    GTTTTCCCTTTTCCTTTTAAGCCTCGCCTTGTTCCCCTCTTCTCTCTCTTCATGAACTACTCCTT
                                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  TGCCTTCCTtatagcCTGGGGGAcgtcatcacTCCCCTCTTCTCTCTCTTCATGAACTACTCCTT
         |||||||||
14q11    TGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGACCCG
```

T-ALL 494 TCRδ-TLX1 (Der(14) failed)

```
14q11    TTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGAC
                                         |||||||||
Der(10)  AGCCTCGCACCTCATTGAGAGGTccccggGGGGGATACtctcggACACCGATAAACTCATCTTTG
         ||||||||||||||||||||||||
10q24    AGCCTCGCACCTCATTGAGAGGTTATTAATAGGGAGTTTGTCTGGTGTCAGAGCGCAGACATAAA
```

T-ALL 103 TCRδ-TLX1

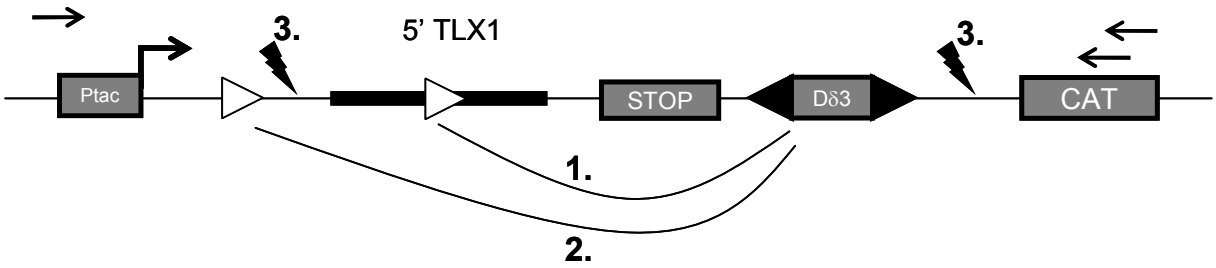
```
14q11    CTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCC
                                           ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)  TCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCggGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCC
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24    TCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTT
                                           ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  TTGTGCCTTCCTcttctagcggACTGGGGGtcacagATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTT
         ||||||||||||
14q11    TTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGAC
```

T-ALL 199 TCRδ-TLX1 (Der (14) failed)

```
14q11    CTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCC
                                           ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)  TCCTGGAGACTGGATGCAGAACAGCCCGCACCTTAACGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCC
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24    TCCTGGAGACTGGATGCAGAACAGCCCGCACCTTGTTGCAGCGCTCCAGCCGGGCTCCCGGCAGA
```

Supplementary Figure S7

A.



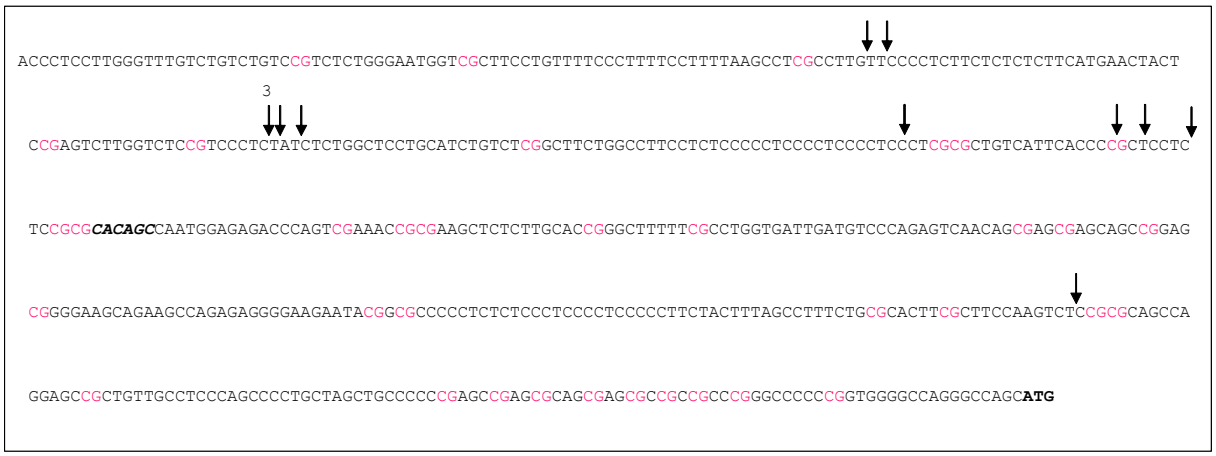
B.

Vector	Clone number	Analyzed clone	RSS control vector	cRSS TLX1	cRSS vector	Break/Repair
VkA2.27/Jk1	~ 3000	60	60	0	0	0
TLX1/Dδ3	170	69	0	0	5	64

C.

T-ALL number	TCR partner	oncogene	Cryptic site	RSS12/23	RIC
43	TCRβ	TLX1	CACACCA CTACAAGCCCGT GCATACAAT	12RSS	-32,86
86	TCRδ	TAL-1	CACAGTG CCTGGCACATAGTGGGCATTCCT TCAAGAAGT	23RSS	-54,19

Supplementary Figure S8



Legend to supplementary figures

Supplementary Figure S1

Schematic representation of type 1 (Right panel) and type 2 (Left panel) translocations.

Supplementary Figure S2

A. RT-PCR of LEF-1 in Jurkat cell line (control) and T-ALL439 (*TCRβ-LEF-1* translocation) showed loss of full length LEF-1 transcript.

B. CGH array for T-ALL439 demonstrating intragenic deletion of the untranslocated *LEF-1* allele as the TCRb-LEF1 translocation is fully balanced without loss of material (see also supplementary S5).

Supplementary Figure S3

NKX2.4 quantification in the T-ALL with a *TCRα/δ–NKX2-4* translocation, compared to T-ALLs without this translocation, PBL/BM and thymic controls.

Supplementary Figure S4

Three color FISH on T-ALL500 demonstrating translocations implicating three partners. TCRβ and TCRα/δ probes are in red and yellow respectively. The TLX1 probe is in green.

Supplementary Figure S5

Schematic representation (A) and details (B) of breakpoints in the TCRβ locus. Gray lines represented patients in which only one derivative chromosome was identified.

Supplementary Figure S6

Schematic representation (A) and details (B) of breakpoints in the TCRα/δ locus. Gray lines represented patients in which only one derivative chromosome was identified.

Supplementary Figure S7

A. Schematic representation of the recombination substrate used for extra-chromosomal recombination assays. The 5' region of *TLX1* containing the breakpoint cluster is represented by a bold bar. The transcriptional stop and the Dδ3 gene segment flanked by its RSS (black triangles) are depicted. Potential cryptic RSS are indicated by white triangles. Expression of

the CAT reporter gene requires the elimination of the stop sequence. This could be performed in different ways: either through recombination between Dδ3 RSS and a *TLX1* cryptic RSS (pathway 1) or a fortuitous but functional RSS located in the plasmid core sequence (pathway 2), or through non specific, RAG independent, break-repair (BR) recombination. B. Recombination substrate for the *TLX1*/Dδ3 Vector and the number of colonies for each pathway. C. RIC (RSS Information Content) score for cRSS.

Supplementary Figure S8

CpG ilots and TLX1 breakpoints.

Article 3

Etude du blocage de maturation dans les LAL-T TLX positives

TLX Homeodomain Oncogene Mediate T Cell Maturation Arrest in T-ALL via Interaction with ETS1 and Suppression of TCRα Gene Expression.

Cancer Cell, Avril, 2012

Dadi S*, **Le Noir S***, Payet-Bornet D*, Lhermitte L, Zacarias-Cabeza J, Bergeron J, Villarèse P, Vachez E, Dik WA, Millien C, Radford I, Verhoeyen E, Cosset FL, Petit A, Ifrah N, Dombret H, Hermine O, Spicuglia S, Langerak AW, Macintyre EA, Nadel B, Ferrier P#, Asnafi V#.
* co-premiers auteurs; # co-corresponding auteurs

Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) se caractérisent par un phénotype d'arrêt de maturation à un stade précoce de la différenciation lymphoïde T. Parmi les sous-groupes de LAL-T déjà identifiés figure l'important groupe « TLX », dans lequel les oncogènes à homéodomaine TLX1 ou TLX3 sont surexprimés consécutivement à des translocations chromosomiques de manière mutuellement exclusive dans environ 30 à 35% des LAL-T. Ces leucémies, dites « TLX^+ », se caractérisent par un stade de blocage de différenciation thymique spécifique appelé « stade cortical précoce ». Celui-ci se définit notamment par la présence de réarrangements complets du TCRβ, mais sans réarrangement du TCRα ni expression détectable du récepteur membranaire TCRαβ.
Les LAL-T TLX^+ présentent une répression épigénétique spécifique au niveau du locus du TCRα, caractérisé par la présence de marques histones dite « d'inactivation » H3K27me3. Cette conformation chromatinienne inactive interdit probablement les réarrangements Vα-Jα et ainsi, la poursuite de la différenciation normale des cellules T vers le stade $TCR\alpha\beta^+$. Un système de gène rapporteur (Eα-CAT) reconstituant l'élément core de l'Enhancer alpha (Eα) a permis la mise en évidence, après co-transfection des protéines TLX1/3, une forte répression de l'activité de l'Eα suggérant un rôle important des protéines TLX1/3 dans cette répression.

Nous avons décrypté les mécanismes moléculaires à l'origine de ce blocage, en montrant que le facteur de transcription ETS1 lie, *via* son domaine DBD (DNA Binding Domain), les oncoprotéines TLX1/3 au niveau de leur homéodomaine. Cette interaction protéique a pour effet le recrutement des oncoprotéines TLX1/3 au niveau de l'Eα, le marquage épigénétique répressif H3K27me3 évoqué ci-dessus, l'inactivation des réarrangements Vα-Jα, le blocage

du processus de maturation. Le blocage de différenciation sans apoptose qui en résulte expose la cellule à d'autres évènements oncogéniques dont l'accumulation au cours de l'histoire naturelle de la maladie finit par faire émerger le clone leucémique. Il s'agit du tout premier modèle démontrant l'action directe d'un oncogène sur le processus normal de la différenciation lymphoïde.

De manière remarquable, l'inactivation directe de TLX1, dans une lignée TLX1 positive (SIL-ALL) par une approche lentivirale, a pour conséquence une reprise normale de la différenciation lymphoïde T (i.e.: expression à la surface d'un TCRαβ), suivie d'une mort cellulaire massive par apoptose et ce, malgré l'accumulation d'autres évènements oncogéniques. De plus, la surexpression d'un TCRαβ (sans downmodulation de TLX1) a pour conséquences les mêmes effets que ceux observés lors de l'inactivation de TLX1 uniquement lorsque les cellules sont cultivées sur le stroma OP9DL1 et en présence de cytokines (SCF, FLT3-L, IL7) (**Figure 35**). Les cellules restent ainsi dépendante du blocage de maturation dont la levée semble incompatible avec leur survie et ce malgré l'accumulation de nombreux évènements oncogéniques habituellement présent dans ces hémopathies. Il n'est pas inconcevable non plus qu'un signal TCR « fort » dans une cellule qui est bloquée en autour de la β-sélection soit interprété comme un signal de sélection négative thymique et provoque une apoptose massive.

Enfin, nous proposons un modèle d'auto-sélection des clones pré-leucémiques en fonction de la configuration de la translocation. Le séquençage des points de cassures des translocations *TCR-TLX1* a révélé une configuration très différente entre les translocations impliquant le TCRδ et le TCRβ. En effet, les translocations *TCRβ-TLX1* présentent une configuration classique (i.e.: TLX1 et l'Enhancer beta sur le même dérivatif). En revanche, dans les cas de translocation *TCRα/δ-TLX1*, TLX1 et l'Eα ne sont jamais sur le même dérivatif. De façon remarquable, des translocations présentant une configuration classique (i.e:. Eα et TLX1 sur le même dérivatif) sont détectables dans des thymocytes sains post nataux. Ainsi ce type de translocation peut survenir mais n'est jamais détectée dans les LAL-T puisque l'Eα induirait une surexpression de TLX1, qui lui-même exercerait une action répressive sur l'Eα. Ce phénomène conduit donc à une boucle d'auto-extinction, qui expliquerait l'absence de translocation de ce type dans les LAL-T.

Ainsi, l'accumulation des lésions oncogénétiques n'est pas suffisante en soi pour assurer la survie des blastes leucémiques dans ce modèle de LAL-T ; le blocage de différenciation que crée l'effet « TCR manquant » est indispensable à la survie des cellules leucémiques TLX^+.

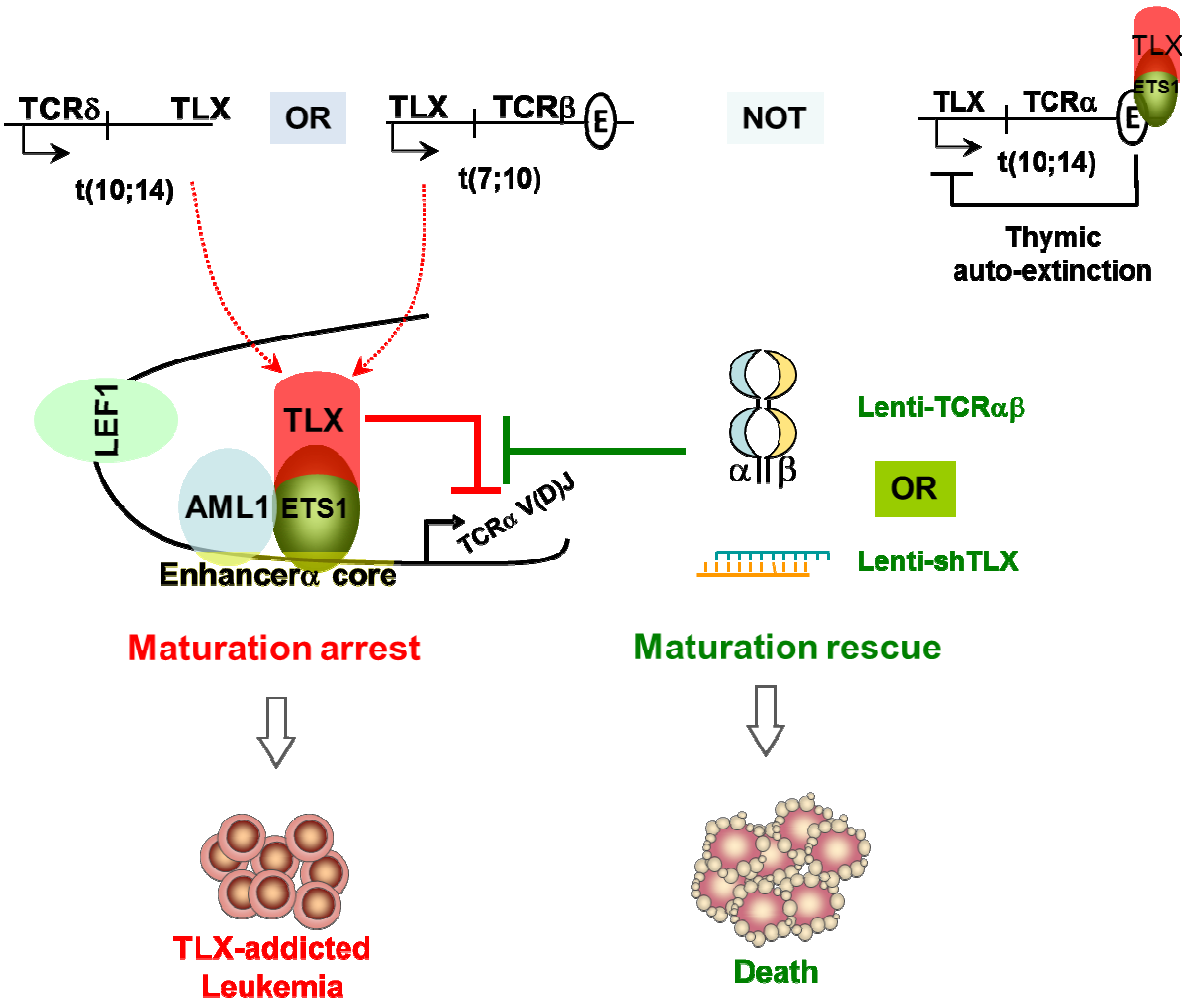


Figure 35 : Schéma représentant la fonction des protéines TLX dans le blocage de maturation observée dans les LAL-T TLX positives.

Cancer Cell
Article

TLX Homeodomain Oncogenes Mediate T Cell Maturation Arrest in T-ALL via Interaction with ETS1 and Suppression of TCRα Gene Expression

Saïda Dadi,[1,3,9] Sandrine Le Noir,[1,9] Dominique Payet-Bornet,[3,9] Ludovic Lhermitte,[1] Joaquin Zacarias-Cabeza,[3] Julie Bergeron,[1] Patrick Villarèse,[1] Elodie Vachez,[3] Willem A. Dik,[4] Corinne Millien,[1] Isabelle Radford,[2] Els Verhoeyen,[5] François-Loïc Cosset,[5] Arnaud Petit,[6] Norbert Ifrah,[7] Hervé Dombret,[8] Olivier Hermine,[1] Salvatore Spicuglia,[3] Anton W. Langerak,[4] Elizabeth A. Macintyre,[1,10] Bertrand Nadel,[3,10] Pierre Ferrier,[3,10,*] and Vahid Asnafi[1,10,*]

[1]Department of Hematologye, Université de Médecine Paris Descartes Sorbonne Cité, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR8147

[2]Department of Cytogenetics, Université Paris 5-Descartes
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants-Malades, Paris, 75015, France

[3]Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm U1104), CNRS UMR7280, Université de la Méditerranée, 13009 Marseille, France

[4]Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center, 3016 Rotterdam, Netherlands

[5]Université de Lyon, F69000; Inserm, EVIR, U758, Human Virology Department, F-69007; Ecole Normale Supérieure de Lyon, F-69007; Université Lyon 1, F-69007, Lyon, France

[6]Department of Hematology, AP-HP Hôpital Armand Trousseau, Paris 75012, France

[7]Department of Hematology, Centre Hospitalier, Angers 49933, France

[8]Department of Hematology, AP-HP Hôpital St-Louis, Paris 75010, France

[9]These authors contributed equally to this work

[10]These authors contributed equally to this work

*Correspondence: vahid.asnafi@nck.aphp.fr (V.A.), ferrier@ciml.univ-mrs.fr (P.F.)

DOI 10.1016/j.ccr.2012.02.013

SUMMARY

Acute lymphoblastic leukemias (ALLs) are characterized by multistep oncogenic processes leading to cell-differentiation arrest and proliferation. Specific abrogation of maturation blockage constitutes a promising therapeutic option in cancer, which requires precise understanding of the underlying molecular mechanisms. We show that the cortical thymic maturation arrest in T-lineage ALLs that overexpress TLX1 or TLX3 is due to binding of TLX1/TLX3 to ETS1, leading to repression of T cell receptor (TCR) α enhanceosome activity and blocked TCR-Jα rearrangement. TLX1/TLX3 abrogation or enforced TCRαβ expression leads to TCRα rearrangement and apoptosis. Importantly, the autoextinction of clones carrying TCRα-driven TLX1 expression supports TLX "addiction" in TLX-positive leukemias and provides further rationale for targeted therapy based on disruption of TLX1/TLX3.

INTRODUCTION

Acute leukemias are characterized by a multistep oncogenic process leading to the maturation arrest and malignant transformation of a hematopoietic precursor (Pui et al., 2004). Understanding of the molecular mechanisms leading to this block in maturation is a prerequisite for the development of therapeutic approaches aiming to unblock differentiation of leukemic blasts (Look, 1997). Transcription factors (TFs) that are involved in the control of cell differentiation or proliferation of normal

Significance

Targeted therapy, including abrogation of a block to cell maturation, is a promising therapeutic approach in leukemias but has so far proved difficult to implement, partly due to their multioncogenic nature, especially in T-ALL where few oncogenes/tumor suppressors have emerged as tangible candidates. Among T-ALL patients, aberrant expression of TLX1/TLX3 defines a large subgroup of leukemias with a cortical thymic developmental arrest. Our data show that this differentiation block is due to failure to rearrange TCRα and that sustained TLX expression is required for leukemic maintenance despite the acquisition of a variety of additional genetic abnormalities. Taken together, our results provide further rationale for targeted therapy based on disruption of TLX1/TLX3 in this T-ALL subset.

hematopoietic progenitors and are deregulated in acute leukemias could represent promising therapeutic targets, as described for the treatment of PML-RARA$^+$ acute promyelocytic leukemia (Degos, 1992).

Human T-lymphocyte ontogeny is a hierarchical process occurring in the thymus in which the ordered somatic recombination of V, D, and J gene segments at the TCRδ, TCRγ, TCRβ, or TCRα loci determine the development into either γδ or αβ T cell lineages (Dik et al., 2005; Spits, 2002) (Figure S1 available online). Progressive lineage restriction and acquisition of T cell potential following migration from the bone marrow to the thymus involve successive differentiation steps defined by the acquisition of a number of surface molecules, including CD5, CD1a, CD34, CD3, CD4, and CD8. TCRδ rearrangement is the first to occur, at the CD5$^+$, CD1a$^-$ CD4/8 double-negative (DN) stage, followed by concurrent TCRγ and TCRβ rearrangements coinciding with CD1a expression (Dik et al., 2005). While the occurrence of productive TCRγ and TCRδ rearrangements will determine the assembly of a γδ receptor, a complete productive TCRβ gene rearrangement will first allow surface expression of a pre-TCR complex formed by the assembly of the TCRβ chain with a pre-Tα (pTα) invariant chain. Pre-TCR surface expression, referred to as the β-selection process, is marked by arrest of TCRβ gene rearrangements and extensive cellular expansion. It is mandatory to the progression of αβ T cell precursors to the CD4/CD8 double-positive (DP) cortical thymic cell stage, and to the initiation of Vα-Jα rearrangements (von Boehmer et al., 1998). The TCRδ locus being interspersed between the Vα and Jα segments, it is deleted out during Vα-Jα recombination, marking definitive engagement to the TCRαβ lineage. The "frontiers" of the TCRδ locus may be regarded as being defined by the 5′δRec and 3′ψJα elements, as all 5′V and 3′Jα gene segments located outside these segments contribute to the functional repertoire of αβ T cells, including a few Vα/Vδ gene segments that occasionally recombine with Jδ gene segments (Krangel et al., 1998). The TCRα rearrangement is a highly regulated process, in which the TCRα enhancer (Eα) plays a primary role (Bassing et al., 2003; Sleckman et al., 1997). The molecular regulation of Eα has been intensively studied (Hawwari and Krangel, 2005; Ho et al., 1989, 1990; McMurry and Krangel, 2000). The minimal Eα core contains binding sites for three TFs, LEF-1, RUNX1/AML1, and ETS1, which have been demonstrated to be crucial for the transcriptional and *cis*-chromatin opening activities of the so-called Eα enhanceosome (Giese et al., 1995; Ho et al., 1989, 1990; Roberts et al., 1997).

T-ALL is a heterogeneous group of acute leukemias that are arrested at various stages of normal thymic-cell differentiation (Asnafi et al., 2003; Ferrando et al., 2002). Recognized T-ALL oncogenic events include transcriptional activation of proto-oncogenes, submicroscopic deletion of tumor suppressor genes, and activation of the Notch1 pathway by *NOTCH1* or *FBXW7* mutations (Aifantis et al., 2008). Among the various T-ALL oncogenic alterations reported to date, TCR chromosomal translocations represent a recurrent oncogenic hallmark of T-ALL (Cauwelier et al., 2006). Such translocations are generally believed to result from illegitimate V(D)J recombination events that lead to the ectopic activation of oncogenes owing to their relocation to the vicinity of potent *cis*-activating elements within the involved TCR locus.

Overexpression of the orphan homeobox (HOX) proteins TLX1 and TLX3 represents the most frequent oncogenic event due to chromosomal translocation in human T-ALL. TLX1 and TLX3 belong to the NKL subtype of HOX proteins. They contain a highly conserved homeodomain (HD) that is known to be involved in DNA and protein-protein interactions (Holland et al., 2007). In T-ALL, both proteins are associated with specific gene expression profiles, a variety of additional genetic mutations, and differentiation arrest at an early cortical stage of thymocyte maturation (Asnafi et al., 2004; Ferrando et al., 2002; Soulier et al., 2005). Physiological expression of *TLX1* and *TLX3* is restricted to embryonic development (Roberts et al., 1994; Shirasawa et al., 2000), and no specific function of these genes in the T cell lineage has been reported. Transgenic expression of human *TLX1* in mice induces an initial DN2 thymic block followed by development of aneuploid T-ALL, mitotic checkpoint defects, clonal TCRβ rearrangements, a mostly cortical phenotype, and a transcriptional profile similar to that observed in human TLX1$^+$ T-ALLs (De Keersmaecker et al., 2010). Corresponding data are not yet available for TLX3, and the molecular mechanisms underlying the observed developmental arrest in TLX1$^+$ and TLX3$^+$ T-ALLs remain elusive. We therefore undertook to determine if and how TLX oncoproteins were linked to the cortical thymic maturation arrest and what the impact of this specific oncogenic function was on the initiation, development, and maintenance of TLX$^+$ T-ALLs.

RESULTS

TLX-Expressing T-ALLs Undergo VβDJβ Rearrangements but Display a Strong Bias against Vα-Jα Joints

A series of 230 T-ALLs were analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) for *TLX1* and *TLX3* expression. Applying a TCR-based classification (Asnafi et al., 2003), 52 cases were immature/uncommitted (surface (s) and cytoplasmic (c) TCRβ negative) and comprised IM0, IMδ, and IMγ subtypes (i.e., harboring, respectively, a germline configuration of all three TCRβ, δ, and γ loci, or a TCRδ- or TCRγ-rearranged locus, and in some cases with an incompletely rearranged DJβ locus); 103 cases were early cortical IMβ/pre-αβ and included IMβ and pre-αβ subtypes (displaying VβDJβ rearrangement and, respectively, either a cTCRβ$^-$ or sTCR$^-$/cTCRβ$^+$ phenotype); 39 cases were sTCRαβ$^+$; and 36 were sTCRγδ$^+$ (of which 20 also harbored a VβDJβ-rearranged locus) (Table S1). Sixty-five cases (28%) demonstrated *TLX1* or *TLX3* overexpression in a mutually exclusive manner, and were henceforth referred to as TLX$^+$. Among TLX$^+$ T-ALLs, all but one demonstrated at least one VβDJβ rearrangement; this included all TCRγδ-expressing cases ($p < 0.001$). Strikingly, none of the TLX$^+$ samples displayed a sTCRαβ$^+$ phenotype, implying a uniform arrest in maturation at an early cortical cell stage, prior to TCRα chain expression.

To determine whether the lack of TCRαβ expression in TLX$^+$ T-ALLs was due to a defect in TCRα gene rearrangement or TCRα chain expression, we analyzed, by Southern blotting and DNA PCR, the status of the TCRδ locus (which is deleted during Vα-to-Jα rearrangement) in 52 phenotypically matched IMβ/pre-αβ T-ALLs (Asnafi et al., 2003), including 26 TLX$^+$ (13 each of TLX1 and TLX3) and 26 TLX$^-$ T-ALLs (Table 1). Remarkably,

Table 1. TCRδ Allele Rearrangement Status in IMβ/Pre-αβ TLX$^+$ (n = 26) and TLX$^-$ (n = 26) T-ALL

IMβ/Pre-αβ T-ALL TCRδ Allelic Status	TLX$^+$ (n = 52)	TLX$^-$ (n = 52)	p Value
GL, D-D, D-J or V-D	6 (11%)	5 (10%)	ns
VDJ	37[a] (71%)	10[b] (19%)	< 0.001
Deletion	3 (6%)	31 (60%)	< 0.001
Translocated alleles	6 (11%)	6 (11%)	ns

See also Table S1 and Figures S1 and S2.
[a]Includes 15 atypical rearrangements (seven Vα-Jδ, three Vδ8-Jδ1, one Vδ6-Jδ2, and one Vδ7-Jδ1) and 20 typical rearrangements using conventional Vδ1–3 segments.
[b]Only one atypical rearrangement (Vδ5-Jδ1).

49 of 52 (94%) TCRδ alleles were readily detected (i.e., were not deleted) in TLX$^+$ T-ALLs compared with 21 of 52 (40%) TCRδ alleles in TLX$^-$ controls ($p < 0.001$). The TCRδ locus may be regarded as defined by the 5′δRec and 3′ψJα elements (Figure S1), as all functional 5′V and 3′Jα gene segments located outside these limits were found to potentially undergo rearrangement in αβT cells, including a few Vα/Vδ gene segments that occasionally recombine with Jδ gene segments (Krangel et al., 1998). Thorough analysis of TCRδ rearrangements in TLX$^+$ versus TLX$^-$ samples by PCR cloning and sequencing demonstrated that the majority of the former samples harbored complete VδDJδ joints with, intriguingly, a high proportion involving TCRδ-specific, distal 5′ Vδ gene segments (Vδ4–6), dual TCRδ/α (Vδ7, Vδ8), or even TCRα-specific (Vα) gene segments, accounting for a total of 41% of the VDJ rearranged alleles compared to only 10% in TLX$^-$ cases (Table 1). Overall, TLX1$^+$ and TLX3$^+$ T-ALL samples displayed no significant difference in their profiles of TCRδ locus rearrangement (data not shown). These results, coupled with the lower level of TCRδ locus deletion and absence of TCRαβ expression, strongly argue for a block in V-to-Jα rearrangement in TLX$^+$ versus TLX$^-$ T-ALL samples. As Eα is required for optimal Vα-to-Jα recombination (Bassing et al., 2003; Sleckman et al., 1997), we hypothesized that Eα activity could be compromised during the course of TLX$^+$ T-ALL leukemic transformation in humans.

TLX$^+$ T-ALL Show Reduced Accessibility of the TCRα Locus

In the mouse, Eα is occupied by dedicated TFs from the CD44^{lo}CD25$^+$ (DN3) stage of thymocyte development onward, well before transcriptional and recombinational activation of—and, indeed, establishment of chromosomal accessibility at—the TCR-Jα/Cα locus, arguing that Eα binding by TFs is dissociated from its functional activity (Hernández-Munain et al., 1999; Mauvieux et al., 2003; Spicuglia et al., 2000). In order to assess the chromosomal status of the 3′ part of the TCRα locus, including Eα, in human TLX$^+$ T-ALL, we used the formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) assay, which allows the isolation of nucleosome-depleted (hence, mainly accessible) genomic DNA regions (Giresi et al., 2007). Using two primary TLX$^+$ T-ALLs, we recovered large amounts of Eα-overlapping chromosomal DNA, but the recovery of upstream DNA sequences containing the TEA promoter or the Jα58 or Jα28 segments was within the range observed for the unrelated T-ALL repressed genes PCDHGA12 and RPIB9 (Figure 1A and data not shown). In addition, quantification of the expression by RT-qPCR demonstrated a drastic decrease (~100-fold on average) of Cα transcripts in TLX$^+$ T-ALL compared with TLX$^-$ T-ALL (Figure 1B), corroborating microarray data on gene-expression analysis of similar leukemia samples (Ferrando et al., 2002). Finally, using chromatin-immunoprecipitation (ChIP)-on-chip assays we found that the H3K27me3 mark, a hallmark of silent chromatin, is significantly enriched in the TCR-Jα/Cα genomic region in TLX$^+$ T-ALL compared to TLX$^-$ T-ALL (Figures 1C and S2). In contrast, similar H3K27me3 profiles were observed in all T-ALL samples in the repressed (*GATA1*; H3K27me3-enriched) or activated (*GAPDH*; H3K27me3-depleted) control loci. Consistent with the FAIRE data of nucleosomal depletion along Eα-containing sequences, H3K27me3 enrichment in TLX$^+$ T-ALL closely surrounded but spared this discrete region. Overall, these findings imply that the unrearranged TCR-Jα/Cα alleles typically found in TLX$^+$ T-ALL blasts are poorly transcribed and most likely embedded within repressive chromatin, despite localized accessibility of Eα DNA. They further suggest that in the presence of TLX, Eα is unable to confer chromosomal accessibility to the adjacent genomic regions, notably the TCR TEA/Jα-containing region.

TLX1 and TLX3 Repress Eα Activity via Their Homeodomain

To further test the possibility that the TLX1 and TLX3 proteins interfere with Eα transcriptional activity, we used an Eα-dependent reporter that expressed chloramphenicol acetyl transferase (Eα-CAT). We found that ectopic expression of either GFP-TLX1 or GFP-TLX3 repressed Eα-CAT expression by approximately 6-fold, and that this expression was partly rescued by the co-expression of TLX1 or TLX3 siRNA, respectively (Figure 2A). We therefore evaluated the level of Eα-CAT repression exerted by TLX1 and TLX3 mutants with or without their HD (HD$^+$ and HD^{del}, respectively), in reference to that of the corresponding full-length (FL) proteins. As shown in Figure 2B, both TLX1 HD^{del} and TLX3 HD^{del} exerted a reduced repressive activity compared with their respective full-length (FL) proteins. Conversely, TLX1 HD$^+$ exerted an activity roughly equivalent to FL TLX1, whereas TLX3 HD$^+$ retained about half the repressive effect of FL TLX3. We exclude the possibility that the reduced repression activity by TLX1 HD^{del} and TLX3 HD^{del} was due to their lack of nuclear localization by demonstrating that both predominantly localized to the nucleus (Figures 2C and 2D). We conclude that TLX1 and TLX3 repress Eα transcriptional activity primarily in an HD-dependent manner.

TLX1 and TLX3 Exert Their Eα Repressive Activity by Interacting with ETS1

The Eα-mediated transcriptional activity depends on the cooperative binding of the ETS1 and RUNX1 TFs to Eα, together with the lymphoid-specific HMG domain protein LEF1. To test whether TLX1/TLX3-mediated Eα repression is ETS1, RUNX1, or LEF1 dependent, we repeated the reporter assays and removed each TF individually. The fact that Eα-CAT expression was not totally abolished in the absence of any one of these TFs (Giese et al., 1995) makes it possible to quantify repression of the residual activity after individual TF removal. In these conditions,

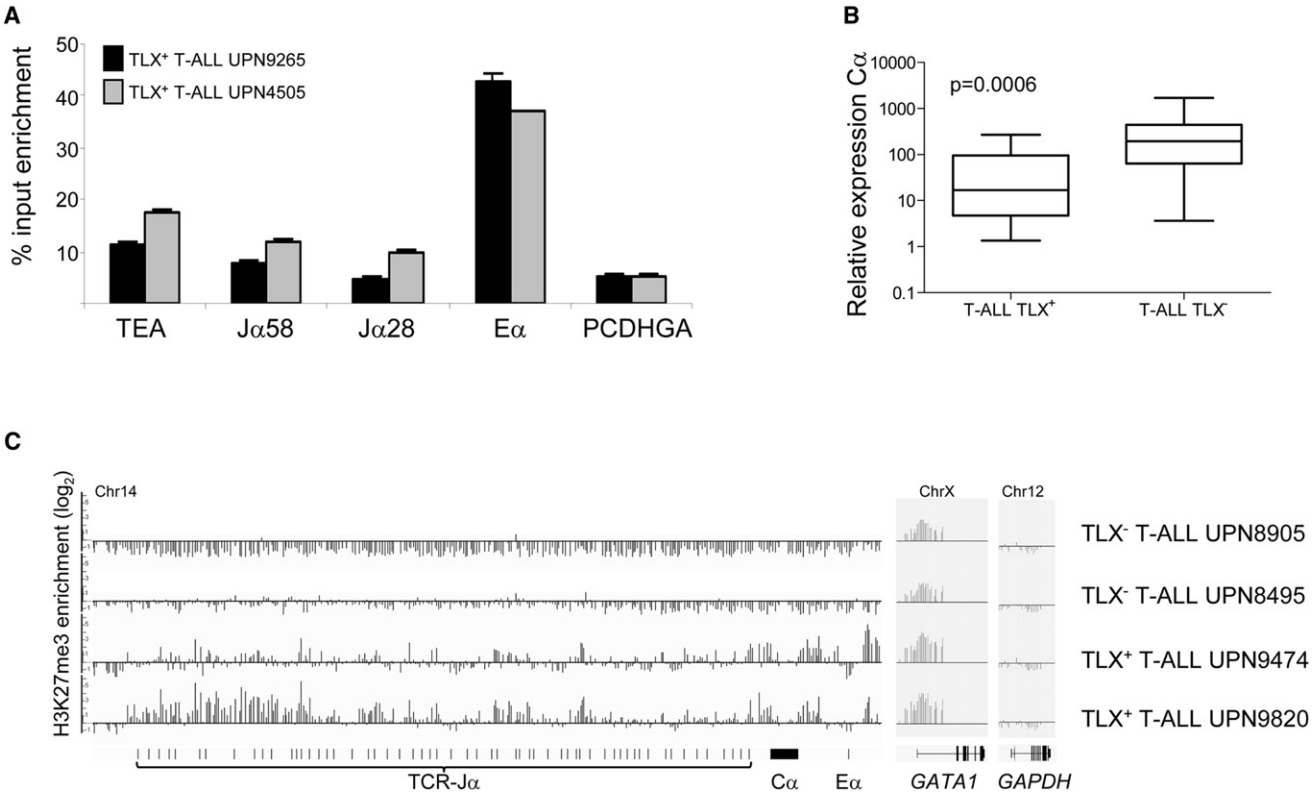


Figure 1. TLX+ T-ALLs Show Reduced Accessibility of the TCRα Locus

(A) Graph showing formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) signals on two TLX+ T-ALL primary cell samples (UPN, unique patient number), as assessed in using RT-qPCR and TEA, Jα58-, Jα28-, Eα-, or PCDHGA (a gene not expressed in T cells)-specific primers. Data represent means of duplicate measurements whereby amplification signals were normalized to those of the corresponding input DNA with error bars to represent ±SD.

(B) Box plots for relative TCR-Cα gene expression normalized to housekeeping gene Abelson1 (ABL) in phenotypically matched TLX+ (n = 23) and TLX− (n = 18) T-ALLs, as assessed by RT-qPCR.

(C) Plots of ChIP-on-chip signals for H3K27me3 relative enrichment in two TLX+ and two TLX− T-ALL cell samples. Black horizontal lines represent the no-change lines. Black vertical bars indicate H3K27me3 peaks. The positions of the TCR-Jα, Cα, and Eα genomic regions, as well as those of exons and upstream promoter sequences in the silent (*GATA1*) and expressed (*GAPDH*) control genes are indicated (exons depicted as vertical traits or black boxes). All four T-ALL samples harbor at least one unrearranged TCRα allele (not shown).

See also Figure S2.

the omission of ETS1 and, to a lesser extent, RUNX1, but not LEF1, diminished TLX1/TLX3-mediated Eα-CAT repression (Figure 2E). We also found that serial diminution of transfected ETS1-expression vector led to a progressive decrease of TLX/TLX3-mediated repression (Figure 2F). Altogether, our data imply that TLX1/TLX3-mediated repression occurs mostly via ETS1.

We therefore carried out in vitro GST-pull-down assays and found that immobilized TLX1 and TLX3 retained the ETS1 FL protein but not LEF1 (Figure 3A). The ETS1 DNA binding domain (DBD) and the TLX1 and TLX3 HD-containing regions appeared to be most important for this interaction (Figure 3A). We further performed streptavidin precipitation experiments using HeLa cells transfected with expressing vectors encoding ETS1-HA-His, LEF1-HA, and TLX1- or TLX3-Flag-SBP tagged proteins. Precipitation of TLX1/TLX3 only retained ETS1 but not LEF1 (Figure 3B). To confirm an interaction between endogenous proteins, we carried out co-immunoprecipitation (Co-IP) using TLX1+ ALL-SIL and TLX3+ DND41 cell lines and anti-TLX1 or TLX3 monoclonal antibody (mAbs), which recovered both ETS1 and the corresponding TLX in the precipitated material (Figure 3C). Finally, we investigated the subcellular localization of TLX1, TLX3, and ETS1 in TLX+ T-ALL clinical samples by cell fractionation and immunostaining. Both analyses demonstrated that TLX1, TLX3, and ETS1 localize in the nucleus (Figures 4A and 4B). Moreover, both TLX+ and TLX− T-ALL expressed similar amounts of ETS1 protein and RNA (Figure 4A and data not shown). Strikingly, the nuclear distribution of ETS1 was diffuse in TLX− patient leukemic cells and cell lines (Figure 4B) but was irregular in TLX+ nuclei and overlapped significantly with that of the TLX proteins (Figure 4C; see figure legend for statistical information). Using ALL-SIL, we showed that, as anticipated, the nuclear distribution of ETS1 became more diffuse following TLX1 downmodulation (Figure 4D).

ETS1 Mediates TLX1 and TLX3 Recruitment to Eα-Associated DNA Sequences

Given the data above in favor of an interaction between TLX1/TLX3 and ETS1 proteins impinging upon Eα activity, we next tested whether TLX1/TLX3 directly interacts with the ETS1

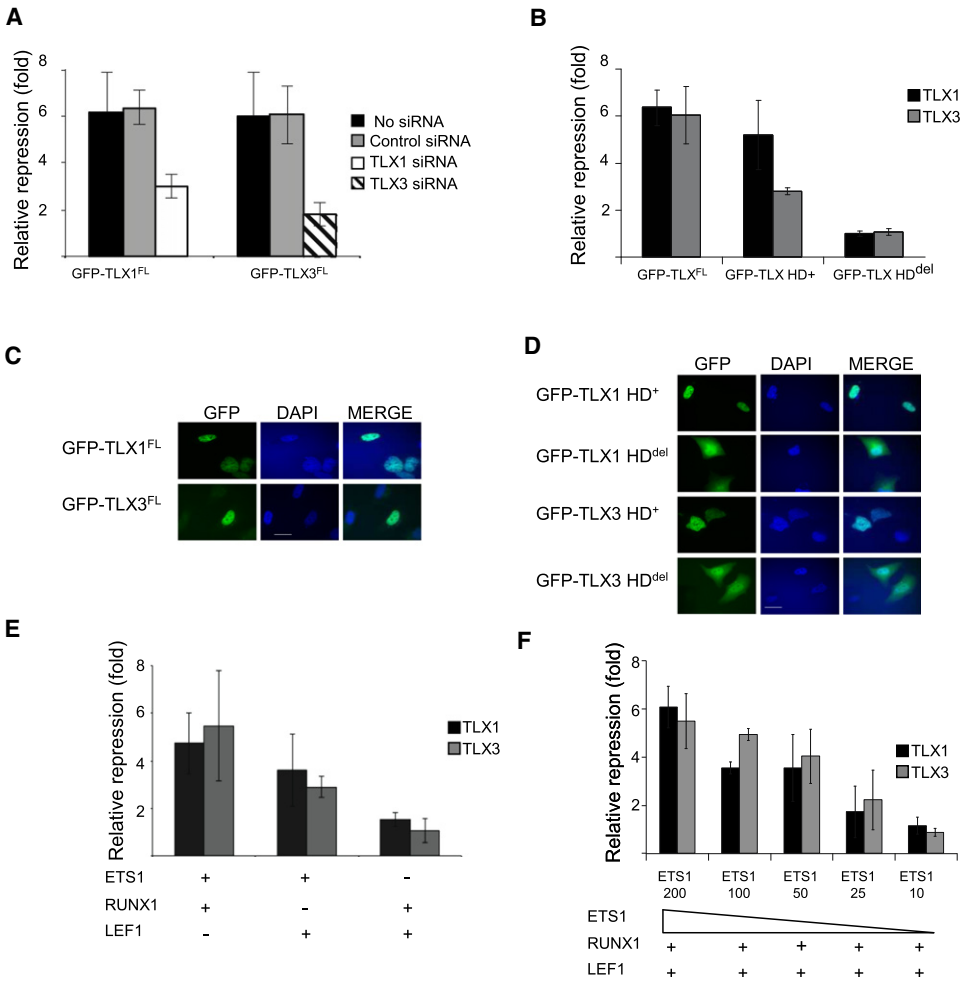


Figure 2. TLX1 and TLX3 Repress Eα-CAT Activity via Their Homeodomain

(A) Graph showing Eα-CAT fold repression in HeLa cells following transfection with GFP-TLX1^{FL} or GFP-TLX3^{FL} encoding vectors, with or without cotransfection of the indicated small interfering (si) RNAs. Data represent means of triplicate measurements whereby Eα-CAT signals were normalized to those of control cells transfected with a GFP vector, with error bars to represent ±SD.

(B) As in (A), but with HeLa cells transfected with GFP-TLX^{FL} vectors alone, or with similar vectors carrying or lacking the corresponding TLX homeodomain (GFP-TLX HD^{+} and GFP-TLX HD^{del}, respectively).

(C and D) Examples of fluorescence microscopic analysis of GFP-TLX expression in transfected HeLa cells depicted in (A) and (B). White scale bar is 10 μm.

(E) As in (A), but with HeLa cells transfected with GFP-TLX^{FL} vectors, plus (+) or minus (−) additional vectors encoding the indicated ETS1, RUNX1, or LEF1 TFs.

(F) As in (E), but using decreasing amounts (200–10 ng) of ETS1-expression vector.

binding sequences (EBS) of human Eα. Using electrophoretic mobility shift assays (EMSA) we observed no significant shift of the EBS probe when incubated with TLX1/TLX3 alone (Figure 5A, lanes 2–7). As expected, incubation with purified recombinant ETS1 led to a major shift of the labeled probe (Figure 5B, lane 1). Strikingly, the addition of TLX1 (lanes 2–4) or TLX3 (lanes 5–7) to ETS1 and EBS produced a dose-dependent super-shifted complex.

To ascertain Eα occupancy by endogenous TLX1 and TLX3 in vivo, we performed ChIP assays using ALL-SIL (TLX1^{+}), DND41 (TLX3^{+}), and, as a control, RPMI-8412 (TLX^{-}) cell lines. The ChIPed DNA was RT-qPCR amplified using Eα-specific oligonucleotide primers and primers specific for the unrelated Actin gene promoter (not bound by either ETS1 or TLX TF; data not shown), used here as a mock control for data normalization. As expected, anti-ETS1 enriched Eα-associated sequences from all three cell lines (Figure 5C). In contrast, anti-TLX1 and anti-TLX3 enriched Eα-associated sequences from only ALL-SIL and DND41, respectively, demonstrating in vivo recruitment of TLX1 and TLX3 onto Eα. Using the DND41 and ALL-SIL cell lines, we verified that knockdown of ETS1 reduced Eα-binding by both ETS1 and TLX1/TLX3 (Figure 5D). Taken together, these data indicate that TLX1 and TLX3 were recruited to Eα via their interaction with ETS1 in TLX^{+} leukemic cells.

TLX Downmodulation and Enforced TCRαβ Expression Both Lead to Redifferentiation Linked with Massive Cell Apoptosis

Our results suggest that one of the major oncogenic functions of TLX1/TLX3 in T-ALL would be to block αβ T cell development by

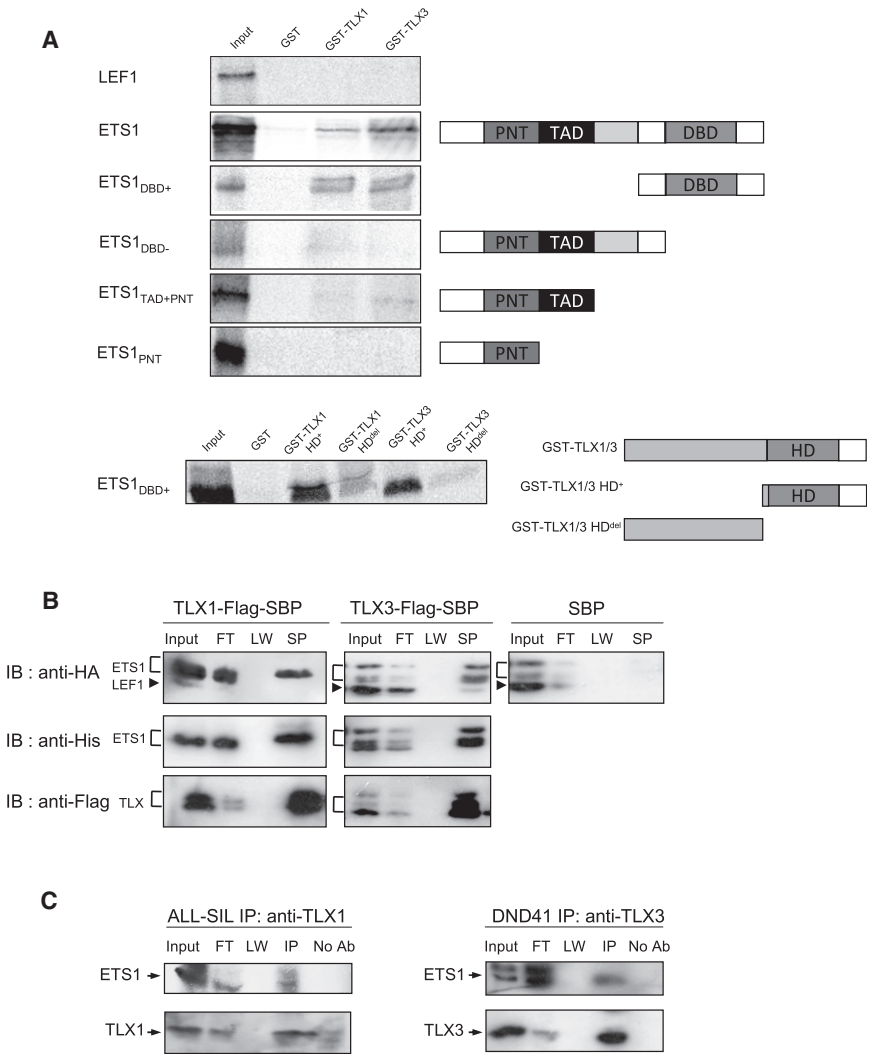


Figure 3. TLX1 and TLX3 Interact with ETS1

(A) GST, GST-TLX1, and GST-TLX3 pull-down of ^{35}S-labeled in vitro translated LEF1, ETS1, or truncated versions of ETS1: ETS1$_{DBD+}$, ETS1$_{DBD-}$, ETS1$_{TAD+PNT}$, and ETS1$_{PNT}$. The various versions of ETS1 are depicted on the right: PNT, pointed domain; TAD, transactivation domain; DBD, DNA binding domain. (Bottom) GST, GST-TLX HD^{+}, and GST-TLX HD^{del} pull-down of ^{35}S-labeled ETS1$_{DBD+}$. TLX and its truncated forms are depicted on the right: HD, homeodomain. The "Input" lanes correspond to 5% of the ^{35}S-labeled protein used for a pull-down experiment.

(B) Cell lysates from HeLa cells cotransfected with vectors expressing ETS1-HA-His, LEF1-HA, and TLX1-(or TLX3-) Flag-SBP were precipitated with streptavidin (SP) beads and then immunoblotted (IB) with either an anti-HA antibody (to reveal the fusion proteins ETS1-HA-His and LEF1-HA), an anti-His antibody (to reveal the ETS1-HA-His), or an anti-Flag antibody (to reveal TLX and to evaluate SP efficiency). Input represents 10% of cell lysate used for SP. FT, flow-through; LW, last wash.

(C) Cell lysates from ALL-SIL and DND41 cells were immunoprecipitated (IP) using anti-TLX1 (left) or anti-TLX3 (right) antibody followed by immunoblotting with indicated antibodies. The "Input" lanes correspond to 10% of cell extracts used in the Co-IP. No Ab, control IP experiment performed without antibody; FT, flow-through; LW, last wash.

inhibiting Eα activity. To further explore this possibility, we knocked down TLX1 and TLX3 expression in ALL-SIL and DND41 cell lines, respectively. While the control cells grew normally, the knockdown TLX1/ALL-SIL and TLX3/DND41 cells demonstrated massive apoptosis (Figure 6A and 6B). Strikingly, both Cα and TEA-Cα transcripts, as markers of TCR-Jα locus activation (Hernández-Munain et al., 1999; Monroe et al., 1999), were upregulated in the TLX knockdown cells (Figure 6C). Moreover, unlike transduced mock controls, the two TLX knockdown cells harbored Vα-Jα rearrangements, although with a restricted polyclonal pattern, as expected (Figure 6D). The knockdown cells further demonstrated a maturation shift, as shown by increased cell size and CD5 expression (Figure 6E). Most important, a small proportion of these cells became sTCRαβ^{+} (Figure 6F).

We then assessed whether such a redifferentiation process, including the triggering of cell death, could be induced by forced expression of sTCRαβ, thus bypassing TLX/ETS1-mediated suppression of Vα-Jα rearrangement, in a TLX^{+}/TCR^{-} T-ALL cell line. TLX1^{+} ALL-SIL cells were transduced using lentiviral multicistronic vectors enabling expression of GFP with or without TCRβ and TCRα (Figure 6G, top). GFP^{+} sTCRαβ^{+} ALL-SIL cells exhibited reduced viability and cell growth compared to GFP^{+} sTCRαβ^{-} controls when cultured in the OP9-DL1 stromal-cell system (Figure 6G, bottom). This correlated with increased apoptosis of the sTCRαβ^{+} cells, as evidenced by propidium iodide (PI)/annexin V dual staining (Figure 6H; note that Jurkat cells carrying an identical sTCRαβ were not affected). It is important to note that massive apoptosis was not observed when transduced cells were cultured in a stromal-cell-free standard culture system (Figures 6G and 6H). These data demonstrate the key role of TCR expression in mediating cell death in TLX^{+} T-ALLs and strongly suggest that the apoptosis observed upon TLX inhibition is a consequence of redifferentiation.

Overall, ectopic expression of TLX1/TLX3 in cortical thymocytes appears to be required to maintain leukemic proliferation, survival, and failure to differentiate; and defect in TCRαβ expression—via ETS1-mediated TLX recruitment onto Eα—is a major mediator in oncogenic addiction, even after acquisition of a variety of additional genetic abnormalities.

TCRα/δ Translocations Occur 5′ to TLX1 Leading to Eα-Independent TLX1 Expression

While chromosomal translocations that lead to *TLX3* deregulation in T-ALLs virtually always involve genomic partners other than *TCRα/δ* (Bernard et al., 2001; Soulier et al., 2005), those leading to *TLX1* deregulation predominantly involve *TCRα/δ*.

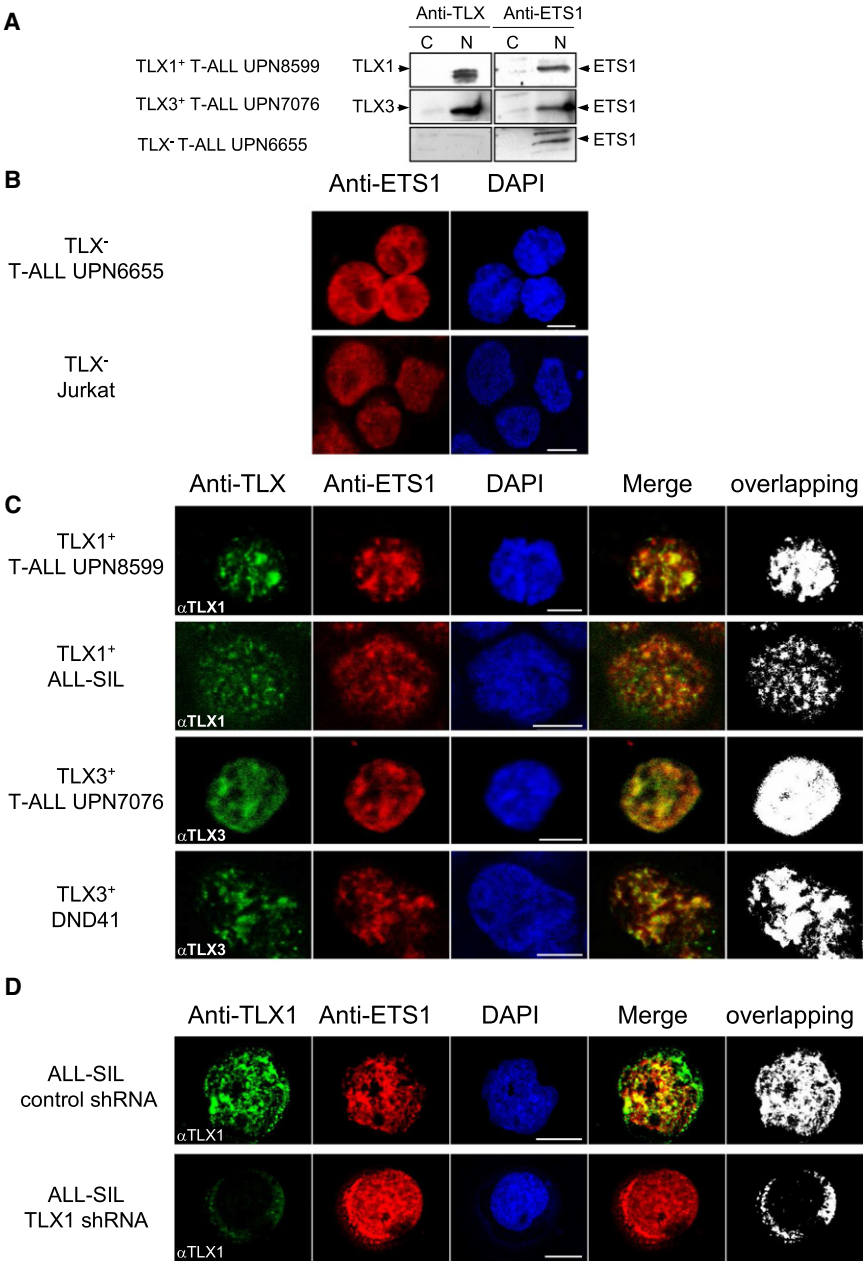


Figure 4. TLX1, TLX3 and ETS1 Colocalize in TLX$^+$ T-ALL Blast Nuclei

(A) Western blot analysis of cytoplasmic (C) and nuclear (N) extracts from TLX1$^+$, TLX1$^+$, and TLX$^-$ T-ALL cells. Blots were probed with anti-TLX and anti-ETS1 antibodies as indicated.

(B) Confocal microscopy analysis of TLX$^-$ T-ALL and cell line (Jurkat) labeled with the indicated fluorescent anti-ETS1 mAb (Alexa 647, red) or stained by DAPI.

(C) Confocal microscopy analysis of the TLX$^+$ T-ALL and cell lines ALL-SIL (TLX1$^+$) and DND41 (TLX3$^+$) labeled with the indicated fluorescent anti-TLX mAb (Alexa 488, green) and anti-ETS1 mAb (Alexa 647, red), or stained by DAPI. The merged images and overlapping areas (determined using ImageJ software) are also shown. Pearson's coefficients for the overlapping areas were as follows: $r = 0{,}851$ (UPN480); $r = 0{,}608$ (ALL-SIL); $r = 0{,}929$ (UPN364); and $r = 0{,}816$ (DND41).White scale bars are 5 μm.

(D) As in (C), but the ALL-SIL cells were transduced with TLX1-specific (TLX1 small-hairpin [sh]RNA) or nonspecific (control shRNA) RNAs as indicated. White scale bars are 5 μm.

However, if a critical oncogenic function of TLX1 is to repress Eα activity, as supported by the data above, how could Eα possibly provide sustained TLX1 expression if it is juxtaposed to and drives TLX1 expression? To get further insight into the mechanism of *TLX1* transcriptional activation, we first analyzed its expression by RT-qPCR in 526 adult and pediatric T-ALLs and identified 61 cases as TLX1$^+$. We then identified *TLX1* translocation into either the *TCRδ* locus (35 cases) or the *TCRβ* locus (12 cases) in the 47 TLX1$^+$ cases with enough material for carrying out FISH- and/or ligation-mediated (LM) PCR analysis. All informative cases tested for allelic transcripts (12 *TCRδ-TLX1* and 2 *TCRβ-TLX1*) demonstrated monoallelic *TLX1* expression, in line with a "standard" regulatory element substitution mechanism of oncogene deregulation in *cis*. We mapped the breakpoints from 8 out of 12 TCRβ-TLX1 alleles and 30 out of 35 *TCRδ-TLX1* alleles (Figure S3). While all 8 breaks from *TCRβ-TLX1* translocations mapped 3′ to *TLX1*, all 30 breaks from TCRδ-TLX1 translocations mapped 5′ to *TLX1* (Figure 7A, top lane). Consequently, whereas *TLX1* activation in *TCRβ-TLX1* fusions was consistent with a classical scenario of TCR-gene-enhancer-mediated activation (in this case, the TCRβ gene enhancer Eβ; Figure 7A, middle lanes), the *TCRδ-TLX1* translocations separated the *TLX1* gene and Eα element on the two derivative chromosomes (Figure 7A, bottom lanes), implying Eα-independent activation and/or maintenance of *TLX1* oncogenic expression.

To investigate whether *TLX1* overexpression resulted from its juxtaposition to a *cis*-regulatory element(s) within and/or upstream to the TCRδ promoter, we performed clonospecific RT-PCR across the breakpoints of both *TCRδ-TLX1* and *TCRβ-TLX1* translocations. Given the structure of these translocations, the detection of fusion transcripts in all the *TCRδ-TLX1* samples, but not in the *TCRβ-TLX1* samples (Figure 7B), was consistent with the presence of a positive regulatory element(s) within and/or upstream to the TCRδ locus that drives *TLX1* overexpression.

Eα Repression Results in a TLX1 Feed-Forward Repression Loop

Despite the obvious difference in the origin of *TLX1* transcriptional activation in *TCRβ* versus *TCRδ* translocations, we observed no significant disparity in their levels of *TLX1* expression

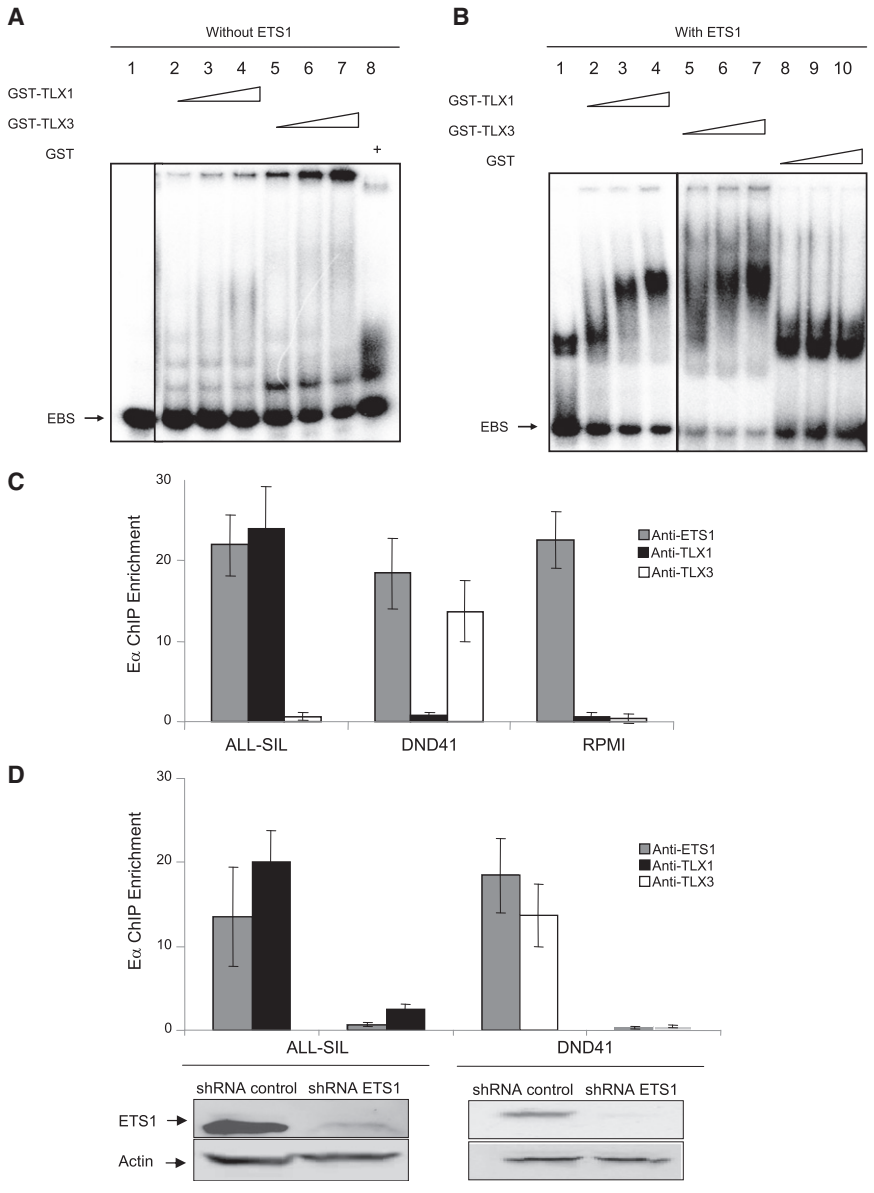


Figure 5. ETS1 Mediates TLX1 and TLX3 Recruitment to Eα-Associated DNA Sequences

(A) EMSA of the ^{32}P-labeled EBS oligonucleotide probe comprising core Eα nucleotide sequences (Giese et al., 1995) with purified recombinant GST-TLX1 and GST-TLX3 proteins. Lane 1, free EBS probe; lanes 2–4 and lanes 5–7 EBS incubated with increasing amounts (10, 50, and 100 ng) of GST-TLX1 or GST-TLX3, respectively; lane 8, EBS incubated with 100 ng of GST.

(B) As in (A), but with the presence of 20 ng of purified recombinant ETS1 protein (lanes 1–7) and ETS1 with increasing amounts (10, 50, and 100 ng) of GST (lanes 8–10).

(C) Graphs of ChIP signals for Eα from the ALL-SIL (TLX1$^+$), DND41 (TLX3$^+$), and RPMI (TLX$^-$) cell lines using anti-ETS1, anti-TLX1, and anti-TLX3 antibodies, as indicated. ChIPed DNA was qPCR amplified using Eα and actin (negative-control)-specific oligonucleotide primers. Enrichment level was determined by comparison to a standard curve from input DNA. ChIPed signal enrichments correspond to the ratios between the Eα signal and actin signal. IgG isotype control was performed to assess absence of nonspecific Eα ChIP enrichment (not shown). Data represent means of triplicate measurements with error bars to represent ±SD.

(D) As in (C), but with the ALL-SIL and DND41cells transduced with ETS1-specific or nonspecific shRNAs. Shown beneath the graph are western blots for ETS1 or actin expression from mock transduced (shRNA control) and knockdown (shRNA ETS1) cells.

(data not shown). This may reflect oncogenic selection of only those rearrangements with sufficient/optimal *TLX1* expression. We also searched for possible differences in the stage of maturation arrest and/or kinetics of *TLX1* activation. TLX1$^+$ T-ALLs are commonly arrested at a cortical TCRαβ negative stage of maturation (Ferrando et al., 2002). In keeping with this, all TLX1$^+$ T-ALL cases (whether *TCRδ* or *TCRβ* translocated) display a uniform cortical CD1a$^+$/CD34^{neg} phenotype (Asnafi et al., 2003; Ferrando et al., 2002). Furthermore, sequence analysis demonstrated that both TCRδ and TCRβ translocations occurred at a similar stage of early thymic-cell differentiation with respect to rearrangement events, since all *TCRδ*- and *TCRβ-TLX1* junctions resulted from repair mistakes introduced during, respectively, a Dδ2-Dδ3 (or Dδ3-Jδ1) rearrangement, or a Dβ-Jβ rearrangement (Figure S3). These data further implied that *TLX1* oncogenic activation uniformly took place at an immature DN/CD1a$^-$/CD34$^+$ stage of thymic cell development, while cell maturation arrest occurred at a later (cortical) stage.

We therefore hypothesized that 3′ *TCRδ-TLX1* translocations do not undergo oncogenic selection because of a feed-forward inhibitory effect exerted by TLX1 itself, inducing autorepression of Eα transcriptional activity. This would infer that TCRα/δ driven translocations with 3′ *TLX1* breakpoints could occur but would fail to be selected within an oncogenic context. As several examples of potentially oncogenic TCR translocations have previously been reported in healthy thymi (Dik et al., 2007; Marculescu et al., 2003, 2006), we searched normal thymus for putative TCRδ-TLX1 translocations with breakpoints involving either side of *TLX1* (Figure 7C, top lanes). We set up a highly sensitive double-nested qPCR allowing the recovery of rare translocation events (10^{-8}–10^{-9}) and applied this assay to screen the DNA equivalent of 10^9 thymocytes from 10 healthy postnatal thymi. Even though no *5′ type* junction was observed, two *3′ type* junctions were reliably detected (Figure 7C, bottom lanes). This demonstrates that *3′ type* TCRδ-TLX1 translocations do occur in the normal thymus and are at least no less common than *5′* translocations. The main difference between the 3′ *TCRβ-TLX1* translocations observed in T cell

leukemias and the 3′ *TCRδ-TLX1* exclusively found in nonleukemic thymi consists in their association with the Eβ or Eα element, respectively. Given the aforementioned inhibition of Eα activity by TLX1, these data support the intriguing possibility that deregulation of *TLX1*, when driven by Eα, will lead not to oncogenic selection but rather to autonomous counterselection of the chromosomal translocation due to feed-forward repression (Figure 7D).

DISCUSSION

HOX proteins in general, and TLX in particular, exert a repressive activity on transcriptional events during embryonic development (Mann et al., 2009; Merabet et al., 2005; Owens et al., 2003; Shen et al., 2001). Our study identifies TCR Eα as a target for such a repressive activity upon ectopic expression in T cell development, offering molecular insight into the stage of maturation arrest and oncogenesis of TLX$^+$ T-ALLs.

The onset of V(D)J recombination is primarily regulated at the level of chromatin and access of the RAG1/RAG2 recombinase apparatus to its DNA targets, a process that depends on the activity of transcriptional enhancers in TCR and Ig loci, including Eα and Eδ in the TCRα/δ locus (Krangel et al., 1998). Our data pinpoint a suppressive chromatin configuration around Eα and a molecular explanation to the strong bias against Vα-to-Jα rearrangement observed in TLX$^+$ T-ALLs. The TCRα repressed structure appears to specifically affect the TEA/Jα-containing region, since in cases where unrearranged TCRα/δ alleles could be analyzed for H3K27me3, the proximal, 3′ part of the TCR-Vα locus behaved similarly in TLX$^+$ and TLX$^-$ blasts (Figure S2). Although proximal Vα segments lie within the range of long-distance chromatin regulation by Eα, an active, derepressed chromatin configuration would be expected at these sequences in early cortical thymocytes due to the activity of the nearby Eδ (Hawwari and Krangel, 2005). In short, the aberrant TCRα/δ recombination patterns seen in TLX$^+$ T-ALL faithfully mirror the chromatin opening function that exclusively relies on Eα.

We have identified the ETS1 TF as a mediator, via protein-protein interaction, of this Eα-suppressing function of TLX1/TLX3. There is precedent for inhibition of a cell-developmental pathway by ETS1, MafB-ETS1 interaction having been reported to result in a block to erythroid differentiation (Sieweke et al., 1996). The precise mechanisms for the repression by TLX remain to be elucidated, but our current data provide interesting clues. Recruitment of both TLX and ETS1 onto Eα render unlikely a basic model whereby TLX sequesters ETS1 away from the enhanceosome; however, more complex, locally induced, opposing molecular switches dependent on the nature of ETS1-interacting TF partners could not be excluded (Sieweke et al., 1996). Likewise, our unpublished findings that TLX1/TLX3 still suppresses transcription on cell treatment with a histone deacetylase (HDAC) inhibitor suggest that HDAC is not involved. The creation of a distinct heterochromatin-promoting complex is plausible, since HOX proteins have been shown to fix polycomb (PcG) repressive components (Papp and Müller, 2006). Our finding of H3K27me3 enrichment along Eα-flanking genomic regions in TLX$^+$ T-ALL supports this, as H3K27me3, in addition to being a marker of repressive chromatin, is associated with activity of the PcG complex PRC2 (Sauvageau and Sauvageau, 2008). This suppressive function for TLX on Eα activity via ETS1 does not exclude protein-protein interaction with and mediation of a suppressive effect by, other TFs, such as RUNX1 (Hollenhorst et al., 2009).

ETS1 plays an important role in cell developmental controls and neoplastic processes (Dittmer, 2003). TLX1/TLX3 overexpression would therefore be expected to deregulate multiple biological networks via its interaction with ETS1. The TLX1/TLX3-ETS1-mediated Eα inhibition described here unlikely would explain the whole T-ALL oncogenic program induced by TLX1/TLX3, since Eα deletion in mice has not been associated with the development of T cell leukemia (Sleckman et al., 1997) and transgenic TLX1-driven murine leukemias demonstrate a variety of somatic genetic abnormalities (De Keersmaecker et al., 2010). TLX1/TLX3-ETS1-mediated Eα inhibition, however, likely accounts for the early cortical block in cell maturation around β-selection characteristic of these leukemias.

Inactivation of ETS1 impairs, but does not abolish, the development of DN3 thymic cell differentiation into DP cells and the defect appears to be specific to the αβ T cell lineage, as γδ T cells mature normally (Eyquem et al., 2004). In line with this, TLX$^+$ T-ALLs often express a TCRγδ, albeit in conjunction with the cytoplasmic TCRβ chain. In this context, it is noteworthy that, despite the presence of ETS1 and RUNX binding sites within Eβ, ETS1 deficiency did not affect Eβ activity (Eyquem et al., 2004), pointing to different requirements for the activity of Eβ and of Eα. As mentioned, an alternative and non-mutually-exclusive candidate for mediation of the maturation arrest might be BCL11b, recently reported to be a direct target downregulated by TLX1 (De Keersmaecker et al., 2010). Loss of BCL11b, a transcriptional repressor required for T lymphoid specification, leads, however, to a much earlier DN1/2 block (Ikawa et al., 2010; Li et al., 2000, 2004). Our data would suggest that abrogation of ETS1 activity on Eα is more likely than loss of BCL11b to explain the cortical arrest seen in human T-ALLs. As in vivo confirmation of the capacity of TLX1 to inhibit Eα-enhanceosome-driven transcription, we also show here that *TCRδ-TLX1* genomic products resulting from a t(10;14) translocation will lead to either a cell-maturation arrest and leukemogenesis or autoextinction of translocated clones, depending on the configuration of the translocation breakpoints. One interesting aspect of the autoextinction model is that in order to efficiently repress its own sustained expression *in-cis*, the TLX1 protein has to be produced prior to disrupting activity of the Eα enhanceosome on the *TLX1-TCRδ*/Eα translocated allele (Figure 7C). If so, it seems reasonable to assume that the same repression also occurs *in-trans* on the normal (nontranslocated) *TCRα* allele, leading to inhibition of *TCRα* rearrangement and a block in thymocyte differentiation. The fact that these cells do not undergo malignant transformation implies that sustained (and/or higher-level) TLX1 expression is required for leukemic transformation. Such a TLX1 "oncogene addiction" argues in favor of TLX1 being the initiating and causative oncogenic event in TLX1$^+$ T-ALL cases. This model obviously does not exclude oncogenic synergy with other abnormalities.

In line with a major role of ETS1/TLX-mediated repression of Eα in this TLX-induced oncogenic addiction, knockdown of TLX1/TLX3 led to apoptosis, concomitant TCRα transcription and rearrangement, cell-maturation, and sTCRαβ$^+$ expression

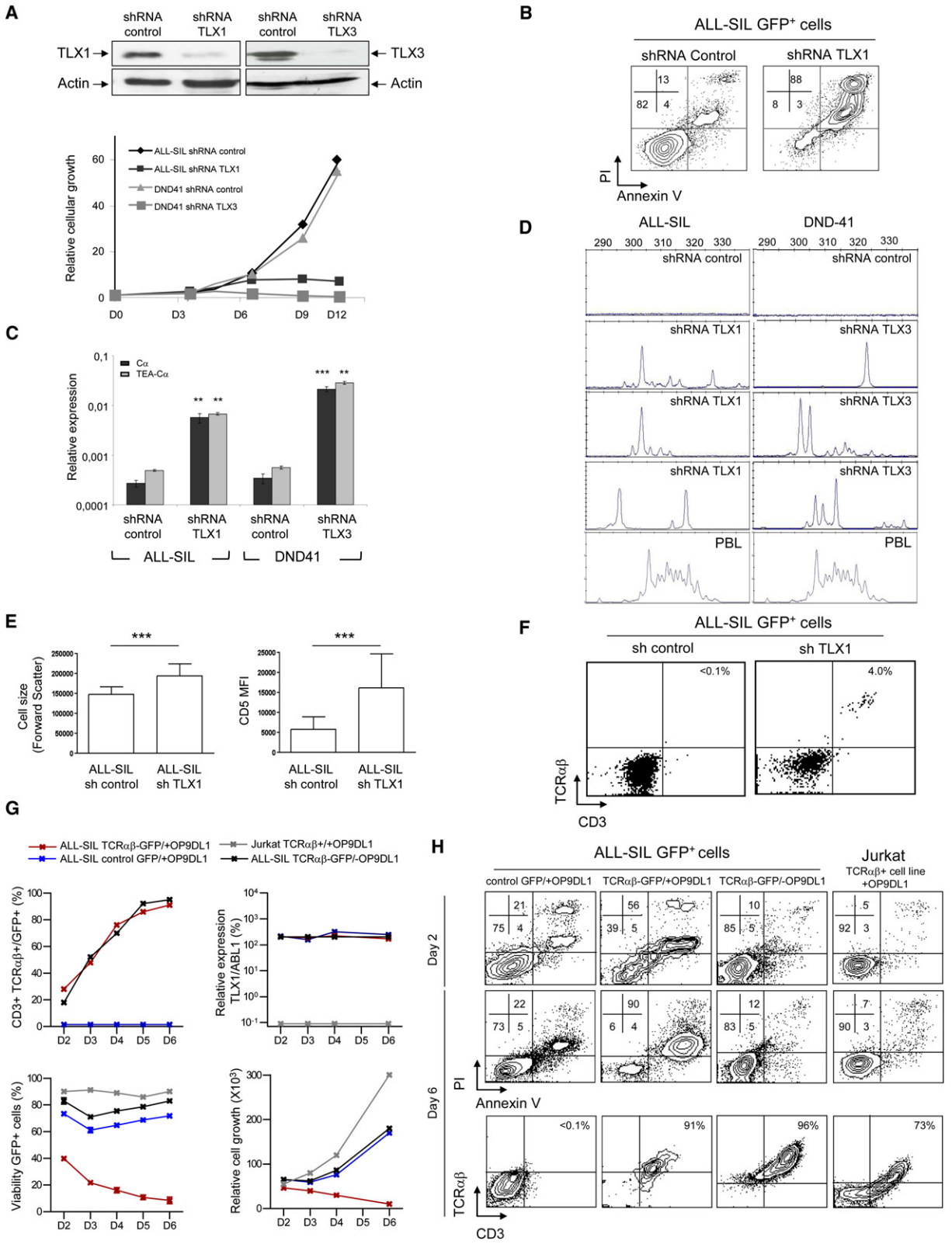


Figure 6. Abrogation of the T Cell Maturation Block Induces Cell Death

(A) Western blots for expression of TLX1 (top left), TLX3 (top right), and the actin control (bottom) in ALL-SIL and DND41 cells transduced with specific or nonspecific (control) shRNA. The graph shows cellular growth at days (D) 3, 6, 9, and 12 of cell culture.

in a significant proportion of cells. This implies that continuous TLX expression is required for maintenance of leukemic cell survival and blocked differentiation, and that both may be intricately linked. The fact that the apoptotic effect of TLX1 abrogation was mimicked by transducing a TCRαβ transgene in TLX1/ALL-SIL cells in the presence, but not in the absence, of stroma supports these conclusions. Thus, as predicted from a bypass of the ETS1/TLX-mediated Eα inhibitory control, both enforced sTCRαβ expression leading to exit from β-selection and TLX abrogation lead to a similar outcome (i.e., apoptosis). Different outcomes (cell death versus proliferation) depending on the presence or absence of OP9-DL1 stroma are likely to reflect a role for stromal (or other ligand) interaction in cell death following TCRαβ expression and differentiation. In general, T cell responses require costimulation-engagement of the clonotypic TCR together with that of distinct coreceptors and cognate ligands. Our current findings offer a unique opportunity to explore such a partnership in TLX$^+$ T-ALL tumorigenesis in prospective studies.

Taken together, our results demonstrate that the maturation block observed in TLX$^+$ T-ALLs is in large part due to ETS1-mediated TLX recruitment to the Eα core, leading to repression of Eα and blocked Vα-Jα rearrangement. Failure to express a TCRα gene arrests development of αβ-committed thymocytes around β-selection, when a variety of cell-proliferation signals are likely to be maintained, hence contributing to oncogenesis. This blockage can be overcome by TLX1/3 abrogation or by downstream TCRαβ expression within an appropriate cellular context. These observations have fundamental consequences both for targeted therapy in TLX$^+$ T-ALLs and for the role of aberrant TCR expression in T lymphoid oncogenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Full Experimental Procedures and any associated references are available in the Supplemental Experimental Procedures.

Patient Analysis and Clinical Diagnosis

Diagnostic samples of peripheral blood or bone marrow from T-ALL patients included in the GRAALL or FRALLE protocols were investigated. Approval was obtained from institutional review boards of institutions participating in this study; the full list of participating centers is given in Supplemental Experimental Procedures. The age cut-off between pediatric and adult cases was 18 years. All samples contained ≥80% blasts. Informed consent was obtained according to the declaration of Helsinki. DNA and RNA extraction and identification of TCRδ, TCRγ, and TCRβ clonal rearrangement were identified as described (Asnafi et al., 2003).

CAT-Reporter Assays

CAT-transactivation assays were performed as described (Giese et al., 1995).

Streptavidin Precipitations and Immunoprecipitations

HeLa cells were cotransfected using expression vectors for ETS1-*HA*-*His*, LEF1-*HA*, and either TLX1-SBP-Flagx3 or TLX3-SBP-Flagx3, or the empty expression vector SBP-Flagx3 as a control. ALL-SIL (TLX1$^+$) and DND41 SIL (TLX3$^+$) cells were used for protein IPs. Nuclear extracts were prepared and incubated with streptavidin agarose beads or with anti-TLX1 (16F6) or anti-TLX3 (10A5) mAbs, respectively, covalently linked to protein G agarose beads. After washes, precipitated proteins were detected by western blot analysis.

Fluorescence and Immunofluorescence Analyses

For EGFP fluorescence analysis, HeLa cells plated on coverslips were transiently transfected with EGFP-fusion constructs and further cultured for 48 hr. Imaging was performed using a Zeiss (LSM-510) confocal microscope. For immunofluorescence analysis, cell lines or primary blast cells (1×10^5) were cytospun onto glass slides. Images were obtained on a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope and merged using Leica LAS AF software.

Chromatin Immunoprecipitation

ChIPs from the ALL-SIL, DND41, and RPMI cell lines or from T-ALL samples were performed according to the Agilent protocol version 10.0 (http://www.chem.agilent.com), using anti-TLX1 (16F6), anti-TLX3 (10A5), anti-H3K27me3 (05851, Abcam), and anti-ETS1 (sc-350, C-20X, Santa Cruz) mAbs.

TLX1 and TLX3 Knockdown

MISSION TRC shRNA Target Set vectors for TLX1 (TRCN0000014995), TLX3 (TRCN0000018030), and ETS1 (TRCN0000231917) were purchased from Sigma. Knockdown of the corresponding endogenous RNA transcripts was performed by transduction of the ALL-SIL and DND41 cell lines.

Screening for TCR-TLX1 junctions

Screening for 3′ *type* t(10;14)(q24;q11) translocations was performed using pooled thymocytes from 10 healthy children undergoing cardiac surgery.

ACCESSION NUMBER

The ChIP-on-chip data have been deposited at ArrayExpress (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/) with the accession number E-MEXP-3527.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes one table, three figures, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at doi:10.1016/j.ccr.2012.02.013.

(B) Flow cytometric analysis of TLX1$^+$ ALL-SIL cells following transduction with retroviruses encoding the GFP protein and either control (nonspecific) or TLX1-specific shRNAs. GFP$^+$-transduced cells were gated for analysis of AnnexinV/PI staining.
(C) RT-qPCR quantification of Cα and TEA-Cα transcripts in ALL-SIL/DND41 following shRNA (TLX-specific versus mock control) transduction. Cα and TEA-Cα transcript levels are shown relative to those of ABL control transcripts (**p value ≤ 0.01; ***p value ≤ 0.001), with error bars to represent ±SD.
(D) Multiplex RT-PCR analysis of Vα-Jα-Cα rearrangements from ALL-SIL (left) and DND41 (right) cDNA, following mock control (top) or TLX-specific (second to fourth panel pairs) shRNA transduction and 9 days of cell culture. Normal TCRαβ rearranged repertoires give a Gaussian distribution of variable length Vα-Jα-rearranged PCR fluorescent products, as found in normal PBLs (bottom). Abrogation of TLX1/TLX3 allows a variety of Vα-Jα rearrangements.
(E) Histograms of forward scatter and CD5 mean of fluorescence of GFP$^+$ ALL-SIL cells assessed by flow cytometry, following shRNA transduction. Error bars represent ±SD. ***p ≤ 0.001, Student test.
(F) Flow cytometric analysis of GFP$^+$ ALL-SIL cells for CD3 and TCRαβ surface expression.
(G) Kinetics of CD3 and TCRαβ surface expression (top left), and cell viability and growth (bottom), analyzed for GFP$^+$ cells in the indicated cell lines, with or without transduction of TCRαβ cDNAs and with or without OP9-DL1 stromal culture conditions. RT-qPCR analysis for TLX1 transcription in Jurkat and ALL-SIL cells is also shown (top right).
(H) Top and middle cytographs are as in (B), but with the ALL-SIL cells treated as in (G). Bottom cytographs are as in (F), but with the ALL-SIL cells treated as in (G). Jurkat cells are shown as TCRαβ$^+$ TLX1$^-$ controls cultured in identical conditions.

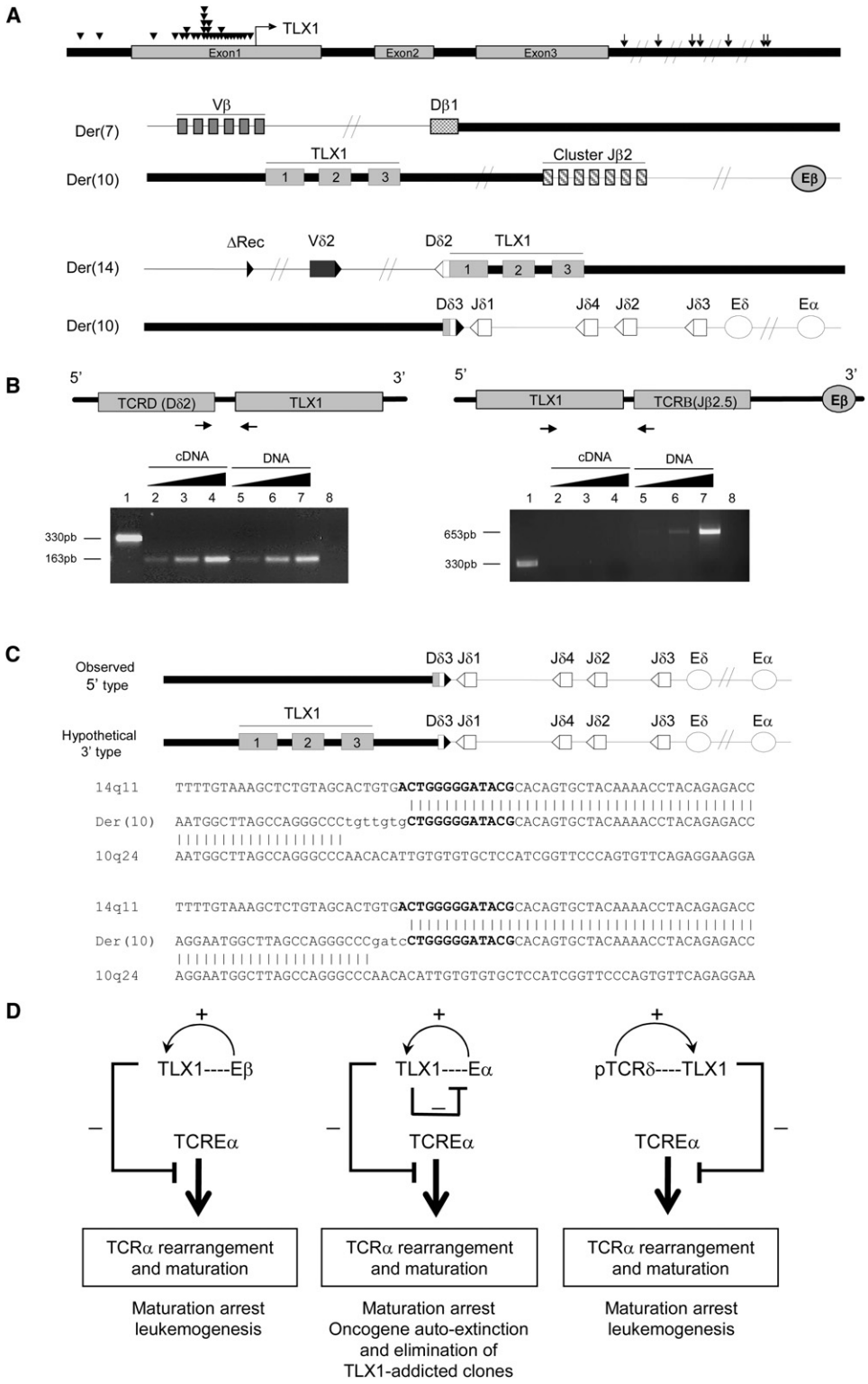


Figure 7. Molecular Analysis of *TCRβ-TLX1* and *TCRδ-TLX1* Translocations

(A) Top lane, schematic representation of the *TLX1* locus (10q24). Arrowheads and arrows indicate the relative positions of breakpoints in *TCRβ*- and *TCRδ-TLX1* translocations, respectively; middle and bottom lanes, representations of *TCRβ*- and *TCRδ-TLX1* typical translocations. Thick and thin lines depict the 10q24 and 7q34 chromosomal regions, respectively (sequences of the *TCR-TLX* breakpoint junctions are reported in Figure S3).

(B) *TCRδ-TLX1* translocations, but not *TCRβ-TLX1* translocations, generate TCR-TLX fusion transcripts. Fusion sequences resulting from *TCRδ-TLX1* translocations (left) or *TCRβ-TLX1* translocations (right) are depicted and PCR primers indicated for 150 ng of cDNA amplified using TLX1-specific primers (lane 1), 15,

ACKNOWLEDGMENTS

We thank participants in the LALA-94, GRAALL-2003/05, FRAALLE-93/2000, Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) (project OC2001/003), and COG ALL (project #2002-09) study groups for collecting and providing biological samples and data sets. Samples were collected and processed by the AP-HP "Direction de Recherche Clinique" Tumor Bank at Necker-Enfants Malades. We are grateful to: V. Lheritier for her help in collecting clinical samples; Dr. M. Pierres (CIML) for the generation of anti-TLX1/3 mAbs; the Paris-Descartes Institute for Research at Necker-Enfants Malades (IRNEM) Cell Imaging and Cell sorting plateforms; Dr. R. Grosschedl (University of Munich, Germany) for the gift of materials for TCRαenhCAT reporter assays; and Dr. Emmanuelle Six for cell culture assistance.

S.D. was supported by grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), and the Société Française d'Hématologie (SFH). J.Z.-C. was supported by a fellowship from the Agence Nationale de la Recherche (ANR). J.B. was supported by the National Cancer Institute of Canada (NCIC), Terry Fox Foundation (TFF) award. A.W.L. and W.A.D. were supported by the Dutch Cancer Society, Grant EMCR 2002-2707. S.L.N. was supported by the Institut National du Cancer (INCa-DHOS) and a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). This work was supported by grants from ARC, the Fondation de France/Comité Leucémie and Enfants et Santé, in association with the Société Française de Lutte contre les Cancers et Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent (SFCE). Work in the P.F. laboratory is supported by institutional grants from Inserm and CNRS, and by grants from the Commission of the European Communities, the ANR, INCa, and the Fondation Princesse Grace de Monaco. Work in the BN laboratory is supported by institutional grants from Inserm and CNRS, and grants from INCa and the Fondation de France.

S.D., S.L.N., D.P.B., L.L., E.Va., J.C.Z., P.V., and S.S. performed cellular and molecular biology experiments; W.A.D. and A.W.L. provided material and data; E.Ve. and F.L.C. provided lentiviral shRNAs; J.B., C.M., and I.R. contributed to LM-PCR and FISH analysis; A.P., N.I., H.D., and O.H. provided clinical materials and data; S.D., S.L.N., D.P.B., B.N., E.A.M., P.F., and V.A. analyzed data and wrote the manuscript; D.P.B., B.N., E.A.M., P.F., and V.A. oversaw conceptual development of the project, analyzed data, and wrote the manuscript.

Received: April 2, 2010
Revised: January 3, 2012
Accepted: February 13, 2012
Published: April 16, 2012

REFERENCES

Aifantis, I., Raetz, E., and Buonamici, S. (2008). Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. Nat. Rev. Immunol. *8*, 380–390.

Asnafi, V., Beldjord, K., Boulanger, E., Comba, B., Le Tutour, P., Estienne, M.H., Davi, F., Landman-Parker, J., Quartier, P., Buzyn, A., et al. (2003). Analysis of TCR, pT α, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. Blood *101*, 2693–2703.

Asnafi, V., Beldjord, K., Libura, M., Villarese, P., Millien, C., Ballerini, P., Kuhlein, E., Lafage-Pochitaloff, M., Delabesse, E., Bernard, O., and Macintyre, E. (2004). Age-related phenotypic and oncogenic differences in T-cell acute lymphoblastic leukemias may reflect thymic atrophy. Blood *104*, 4173–4180.

Bassing, C.H., Tillman, R.E., Woodman, B.B., Canty, D., Monroe, R.J., Sleckman, B.P., and Alt, F.W. (2003). T cell receptor (TCR) α/δ locus enhancer identity and position are critical for the assembly of TCR δ and α variable region genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 2598–2603.

Bernard, O.A., Busson-LeConiat, M., Ballerini, P., Mauchauffé, M., Della Valle, V., Monni, R., Nguyen Khac, F., Mercher, T., Penard-Lacronique, V., Pasturaud, P., et al. (2001). A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. Leukemia *15*, 1495–1504.

Cauwelier, B., Dastugue, N., Cools, J., Poppe, B., Herens, C., De Paepe, A., Hagemeijer, A., and Speleman, F. (2006). Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRbeta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes. Leukemia *20*, 1238–1244.

De Keersmaecker, K., Real, P.J., Gatta, G.D., Palomero, T., Sulis, M.L., Tosello, V., Van Vlierberghe, P., Barnes, K., Castillo, M., Sole, X., et al. (2010). The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation. Nat. Med. *16*, 1321–1327.

Degos, L. (1992). All-trans-retinoic acid treatment and retinoic acid receptor α gene rearrangement in acute promyelocytic leukemia: a model for differentiation therapy. Int. J. Cell Cloning *10*, 63–69.

Dik, W.A., Pike-Overzet, K., Weerkamp, F., de Ridder, D., de Haas, E.F., Baert, M.R., van der Spek, P., Koster, E.E., Reinders, M.J., van Dongen, J.J., et al. (2005). New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. J. Exp. Med. *201*, 1715–1723.

Dik, W.A., Nadel, B., Przybylski, G.K., Asnafi, V., Grabarczyk, P., Navarro, J.M., Verhaaf, B., Schmidt, C.A., Macintyre, E.A., van Dongen, J.J., and Langerak, A.W. (2007). Different chromosomal breakpoints impact the level of LMO2 expression in T-ALL. Blood *110*, 388–392.

Dittmer, J. (2003). The biology of the Ets1 proto-oncogene. Mol. Cancer *2*, 29.

Eyquem, S., Chemin, K., Fasseu, M., and Bories, J.C. (2004). The Ets-1 transcription factor is required for complete pre-T cell receptor function and allelic exclusion at the T cell receptor β locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *101*, 15712–15717.

Ferrando, A.A., Neuberg, D.S., Staunton, J., Loh, M.L., Huard, C., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Pui, C.H., Downing, J.R., Gilliland, D.G., et al. (2002). Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell *1*, 75–87.

Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J.R., and Grosschedl, R. (1995). Assembly and function of a TCR α enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. Genes Dev. *9*, 995–1008.

Giresi, P.G., Kim, J., McDaniell, R.M., Iyer, V.R., and Lieb, J.D. (2007). FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. Genome Res. *17*, 877–885.

75, or 150 ng of cDNA (lanes 2–4, respectively) and 1, 10, or 100 ng of genomic DNA (lanes 5–7, respectively) amplified using *TCR-TLX1* hybrid primers. The absence of genomic DNA contamination in the cDNA fractions was tested by qPCR using albumin-specific primers (lane 8).

(C) Schematic representations of the observed 5′ (Der[14]) and hypothetical 3′ (Der[10]) types of *TCRδ-TLX1* translocations. The nucleotide sequences of two 3′ *type TCRδ-TLX1* junctions amplified from healthy thymi are shown; N regions and Dδ3-specific nucleotides are indicated in bold and lowercase letters, respectively.

(D) Model of how TLX1 addiction may drive autoselection of chromosomal translocations via *trans* repression of the Eα enhanceosome. (Left) In t(7;10) translocation, TLX1 ectopic expression is driven by the TCRβ gene enhancer (Eβ), leading to Eα repression and inhibition of *TCRα* gene rearrangement. (Right) An identical scenario occurs when TLX1 ectopic expression is driven by TCRδ regulatory elements, i.e., in a subset of t(10;14) in which TLX1 and Eα are segregated on different derivative chromosomes. (Middle) In a distinct subset of t(10;14), TLX1 segregates on der(10) and is linked to Eα. Eα-driven TLX1 expression leads to Eα repression and the extinction of its own expression. This form of t(10;14) can be found in the thymus from hematologically healthy individuals, but not in T-ALL samples, implying that the resulting unsustained/cyclic TLX1 expression may not be sufficient for full leukemic transformation.

See also Figure S3.

Hawwari, A., and Krangel, M.S. (2005). Regulation of TCR δ and α repertoires by local and long-distance control of variable gene segment chromatin structure. J. Exp. Med. *202*, 467–472.

Hernández-Munain, C., Sleckman, B.P., and Krangel, M.S. (1999). A developmental switch from TCR delta enhancer to TCR α enhancer function during thymocyte maturation. Immunity *10*, 723–733.

Ho, I.C., Yang, L.H., Morle, G., and Leiden, J.M. (1989). A T-cell-specific transcriptional enhancer element 3′ of C α in the human T-cell receptor α locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 6714–6718.

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 α gene enhancer. Science *250*, 814–818.

Holland, P.W., Booth, H.A., and Bruford, E.A. (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. BMC Biol. *5*, 47.

Hollenhorst, P.C., Chandler, K.J., Poulsen, R.L., Johnson, W.E., Speck, N.A., and Graves, B.J. (2009). DNA specificity determinants associate with distinct transcription factor functions. PLoS Genet. *5*, e1000778.

Ikawa, T., Hirose, S., Masuda, K., Kakugawa, K., Satoh, R., Shibano-Satoh, A., Kominami, R., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2010). An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. Science *329*, 93–96.

Krangel, M.S., Hernandez-Munain, C., Lauzurica, P., McMurry, M., Roberts, J.L., and Zhong, X.P. (1998). Developmental regulation of V(D)J recombination at the TCR α/δ locus. Immunol. Rev. *165*, 131–147.

Li, A., Rue, M., Zhou, J., Wang, H., Goldwasser, M.A., Neuberg, D., Dalton, V., Zuckerman, D., Lyons, C., Silverman, L.B., et al; Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium. (2004). Utilization of Ig heavy chain variable, diversity, and joining gene segments in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia: implications for the mechanisms of VDJ recombination and for pathogenesis. Blood *103*, 4602–4609.

Li, R., Pei, H., and Watson, D.K. (2000). Regulation of Ets function by protein-protein interactions. Oncogene *19*, 6514–6523.

Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science *278*, 1059–1064.

Mann, R.S., Lelli, K.M., and Joshi, R. (2009). Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. Curr. Top. Dev. Biol. *88*, 63–101.

Marculescu, R., Vanura, K., Le, T., Simon, P., Jäger, U., and Nadel, B. (2003). Distinct t(7;9)(q34;q32) breakpoints in healthy individuals and individuals with T-ALL. Nat. Genet. *33*, 342–344.

Marculescu, R., Vanura, K., Montpellier, B., Roulland, S., Le, T., Navarro, J.M., Jäger, U., McBlane, F., and Nadel, B. (2006). Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. DNA Repair (Amst.) *5*, 1246–1258.

Mauvieux, L., Villey, I., and de Villartay, J.P. (2003). TEA regulates local TCR-Jalpha accessibility through histone acetylation. Eur. J. Immunol. *33*, 2216–2222.

McMurry, M.T., and Krangel, M.S. (2000). A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. Science *287*, 495–498.

Merabet, S., Pradel, J., and Graba, Y. (2005). Getting a molecular grasp on Hox contextual activity. Trends Genet. *21*, 477–480.

Monroe, R.J., Sleckman, B.P., Monroe, B.C., Khor, B., Claypool, S., Ferrini, R., Davidson, L., and Alt, F.W. (1999). Developmental regulation of TCR δ locus accessibility and expression by the TCR δ enhancer. Immunity *10*, 503–513.

Owens, B.M., Zhu, Y.X., Suen, T.C., Wang, P.X., Greenblatt, J.F., Goss, P.E., and Hawley, R.G. (2003). Specific homeodomain-DNA interactions are required for HOX11-mediated transformation. Blood *101*, 4966–4974.

Papp, B., and Müller, J. (2006). Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. Genes Dev. *20*, 2041–2054.

Pui, C.H., Relling, M.V., and Downing, J.R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. N. Engl. J. Med. *350*, 1535–1548.

Roberts, C.W., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1994). Hox11 controls the genesis of the spleen. Nature *368*, 747–749.

Roberts, J.L., Lauzurica, P., and Krangel, M.S. (1997). Developmental regulation of VDJ recombination by the core fragment of the T cell receptor α enhancer. J. Exp. Med. *185*, 131–140.

Sauvageau, M., and Sauvageau, G. (2008). Polycomb group genes: keeping stem cell activity in balance. PLoS Biol. *6*, e113.

Shen, W.F., Krishnan, K., Lawrence, H.J., and Largman, C. (2001). The HOX homeodomain proteins block CBP histone acetyltransferase activity. Mol. Cell. Biol. *21*, 7509–7522.

Shirasawa, S., Arata, A., Onimaru, H., Roth, K.A., Brown, G.A., Horning, S., Arata, S., Okumura, K., Sasazuki, T., and Korsmeyer, S.J. (2000). Rnx deficiency results in congenital central hypoventilation. Nat. Genet. *24*, 287–290.

Sieweke, M.H., Tekotte, H., Frampton, J., and Graf, T. (1996). MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. Cell *85*, 49–60.

Sleckman, B.P., Bardon, C.G., Ferrini, R., Davidson, L., and Alt, F.W. (1997). Function of the TCR α enhancer in αβ and γδT cells. Immunity *7*, 505–515.

Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.M., Regnault, A., Garcia-Peydro, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.L., and Sigaux, F. (2005). HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). Blood *106*, 274–286.

Spicuglia, S., Payet, D., Tripathi, R.K., Rameil, P., Verthuy, C., Imbert, J., Ferrier, P., and Hempel, W.M. (2000). TCRalpha enhancer activation occurs via a conformational change of a pre-assembled nucleo-protein complex. EMBO J. *19*, 2034–2045.

Spits, H. (2002). Development of αβ T cells in the human thymus. Nat. Rev. Immunol. *2*, 760–772.

von Boehmer, H., Aifantis, I., Azogui, O., Feinberg, J., Saint-Ruf, C., Zober, C., Garcia, C., and Buer, J. (1998). Crucial function of the pre-T-cell receptor (TCR) in TCR β selection, TCR β allelic exclusion and αβ versus γδ lineage commitment. Immunol. Rev. *165*, 111–119.

Cancer Cell, Volume *21*

Supplemental Information

TLX Homeodomain Oncogenes Mediate T Cell Maturation Arrest in T-ALL via Interaction with ETS1 and Suppression of TCRα Gene Expression

Saïda Dadi, Sandrine Le Noir, Dominique Payet-Bornet, Ludovic Lhermitte, Joaquin Zacarias-Cabeza, Julie Bergeron, Patrick Villarèse, Elodie Vachez, Willem A. Dik, Corinne Millien, Isabelle Radford, Els Verhoeyen, François-Loïc Cosset, Arnaud Petit, Norbert Ifrah, Hervé Dombret, Olivier Hermine, Salvatore Spicuglia, Anton W. Langerak, Elizabeth A. Macintyre, Bertrand Nadel, Pierre Ferrier, and Vahid Asnafi

Inventory of Supplemental Information

Table S1. Related to Table 1.

Figure S1. Related to Table 1.

Figure S2. Related to Figure 1.

Figure S3. Related to Figure 7.

Supplemental Experimental Procedures

Supplemental Data

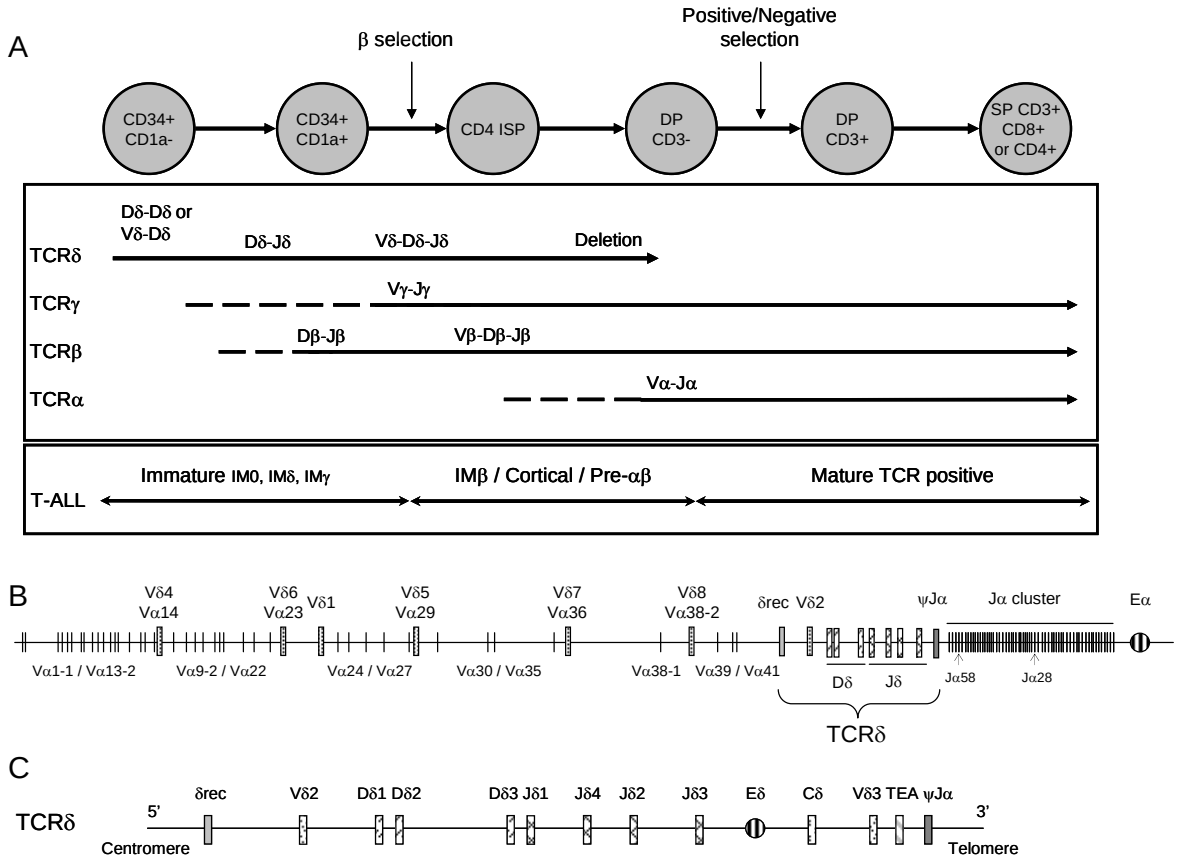


Figure S1, related to Table 1. Human T cell differentiation and V(D)J recombination.

A: The main human T-cell differentiation stages phenotypically defined by distinctive surface markers are depicted (top), with the corresponding hierarchical genomic rearrangements (middle). For clarity, only TCRαβ lineage commitment is shown. Dotted lines indicate initiation of the indicated rearrangement, and plain horizontal arrows indicate completed rearrangement followed by continuous expression of the TCR chain. TCR-based classification of T-ALLs (Asnafi et al., 2003) allows their subdivision into the (*1*) cTCRβ and TCR negative, Immature (IM); (*2*) cTCRβ-expressing, sCD3/TCR-negative pre-αβ; and (*3*) "Mature", TCRαβ- or TCRγδ- expressing (bottom). IM T-ALLs can be further subdivided according to their TCR rearrangement profiles into (*i*) IM0 (all TCRδ, TCRγ and TCRβ genes in the germline configuration); (*ii*) IMδ (isolated TCRδ rearrangement); (*iii*) IMγ (TCRδ and

TCRγ rearrangements but no or incomplete TCRβ DJ rearrangement) and (*iv*) IMβ (complete TCRβ VDJ rearrangement).

B: Schematic representation of the TCRα/δ locus, with the TCRδ locus embedded within the TCRα locus.

C: Zoom of the TCRδ locus, bordered by the 5'δRec and 3'ψJα genomic elements. This domain includes the TCRδ gene enhancer (Eδ) and T early alpha (TEA) promoter of downstream (*i.e.*, in the 3' direction) germline transcripts.

Table S1, related to Table 1. TCRβ gene rearrangement status and cell maturation arrest in TLX^+ and TLX^- T-ALLs.

TCRβ VDJ	phenotype	**TLX^+ (n=65)**	**TLX^- (n=165)**
Negative	IM0/δ/γ	1/52 **(2%)**	51/52 **(98%)**
	TCRγδ	0/16 **(0%)**	16/16 **(100%)**
Positive	TCRγδ	10/20 **(50%)**	10/20 **(50%)**
	IMβ/Pre-αβ	54/103 **(52%)**	49/103 **(48%)**
	TCRαβ	0/39 **(0%)**	39/39 **(100%)**

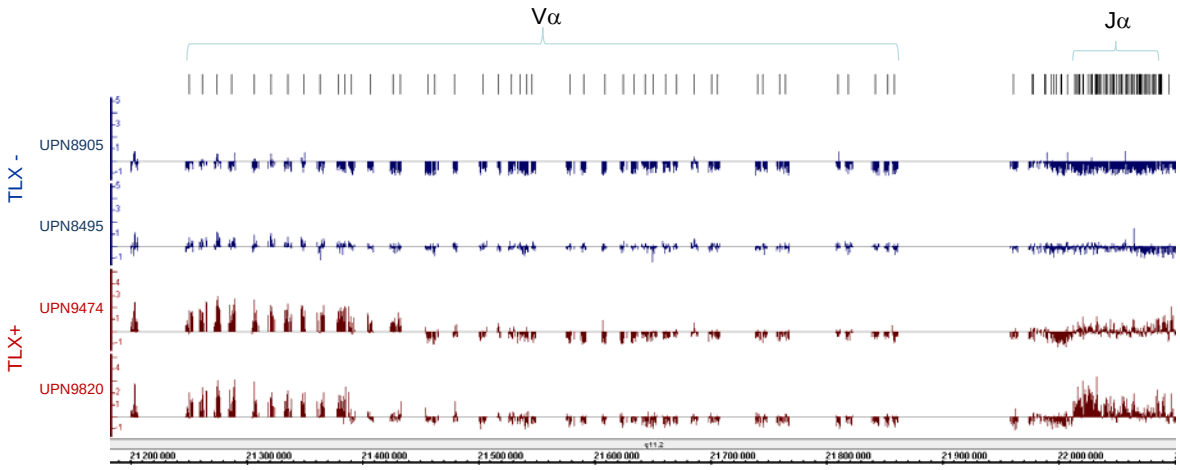


Figure S2, related to Figure 1. Relative H3K27me3 enrichment at the 5' region of the TCRα/δ locus in two TLX$^+$ and two TLX$^-$ T-ALL samples.

Legend as in Figure 1C. The positions of the Vα and Jα genomic regions are shown at the top. All four T-ALL samples harbor at least one unrearranged TCRα allele, as verified by CGH array (data not shown).

T-ALL T273

```
14q11     CTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCC
                                                ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   TCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTtcggaccgCCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCC
          ||||||||||||||||||||||||||||
10q24     TCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGAAACCGCG
                                          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   TCATTGTGCCTTCCTACTGGGGGagaggCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGAAACCGCG
          ||||||||||||||||||
14q11     TCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGT
```

T-ALL T103

```
14q11     CTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCC
                                              ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   TCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCggGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCC
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     TCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTT
                                              ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   TTGTGCCTTCCTcttctagcggACTGGGGGtcacagATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTT
          ||||||||||||
14q11     TTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGAC
```

T-ALL T281

```
14q11     GGGGAAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTA
                                                      ||||||||||||||||||||||
Der(10)   TCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTacccttggCGCACAGTGCTACAAAACCTA
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     TCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTC
                                              ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   AGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTC
          ||||||||||||||||||||||||||||||
14q11     AGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCT
```

T-ALL T9

```
14q11     TGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTGT
                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   CCTCGCGCTGTCATTCACCCCtACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTGT
          ||||||||||||||||||||||
10q24     CCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGACCGTG
                                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   CATTGTGCCTTCCTACgccaggcgCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGACCGTG
          ||||||||||||||||
14q11     CATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTG
```

T-ALL T259

```
14q11     GTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTGTACAAAAACTGCAGGGGCAA
                                                          ||||||||||||||||||
Der(10)   CTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCacCAAAAACTGCAGGGGCAA
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     CTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTCCCCC
                                                          ||||||||||||||||||||
Der(14)   AGGAAGAAGAGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCAcgtaagggccgTTCTGGCCTTCCTCTCCCCC
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||
14q11     AGGAAGAAGAGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGC
```

T-ALL T269

```
14q11     GAAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAG
                                            ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   CCTCGCGCTGTCATTCACCtgaacacggatACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAG
          ||||||||||||||||||
```

```
10q24      CCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGAAACCG
                                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)    TCATTGTGCCTTCCTACaacccCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGAAACCG
           ||||||||||||||||||
14q11      TCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGT
```

T-ALL T242

```
14q11      AAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGA
                                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)    GAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCgtgggcctcCTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGA
           ||||||||||||||||||||
10q24      GAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTC
                                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)    ATTGTGCCTTCGTACtgggggTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTC
           ||||||||||||||||
14q11      ATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGA
```

T-ALL T12

```
14q11      AGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAG
                                             ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)    AGGGCCTGGGCTCCATACCTGGGGAGTAagctcGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAG
           ||||||||||||||||||||||||||||||
10q24      AGGGCCTGGGCTCCATACCTGGGGAGTAGACAGTCTTCTACTTTCTAAAAAGCTGGACTTGAAAT
           TTGGAGTAAATCTCCTGGTTGAGTGACAGGTGTTTCGCAGCTGAGCCCTTGAGGAGATTCTCCAG
           TTGGGCAGAGACATCCCTTCCTCAGACGCCTTGTGGGCTGGACTCCTTTGGCCCAGTTCAAAGTG
           AGGGGAGGGCTCCCAACAGGCCGGGAAGACAGTTGACTTCACCCTTCCTTGGTTTGTCTGTCTGT
           CCGTCTCTGGGAATGGTCGCTTCCTGTTTTCCCTTTTCCTTTTAAGCCTCGCCTTCTTCCCCTCT
           TCTCTCTCTTCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCAGGCTCCTGCATCTG
                                                    ||||||||||||||||||||||
Der(14)    GGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCgtactgggggTATCTCTGGCTCCTGCATCTG
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||
14q11      GGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTT
```

T-ALL T200

```
14q11      GTAGGTGGGAGCAGCGCTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCATC
                                                              ||||||||||||||||
Der(10)    TCAGGGCCTGGGCTCCATACCTGGGGAGTAgaaagtacggttgcgggggcACCGATAAACTCATC
           ||||||||||||||||||||||||||||||
10q24      TCAGGGCCTGGGCTCCATACCTGGGGAGTAGACAGTCTTCTACTTTCTAAAAAGCTGGACTTGAA
                                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)    TGTGCCTTCCattaaagggtagTGGGtgtattggGTCTTCTACTTTCTAAAAAGCTGGACTTGAA
           ||||||||||
14q11      TGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGACC
```

T-ALL T226

```
14q11      AGGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGA
                                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)    AGGTCTCCGTCCCTCagggtccctcgtttACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGA
           ||||||||||||||||
10q24      AGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTCCCCCTC
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)    TGTGCCTTCCTtgatgATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTCCCCCTC
           ||||||||||||
14q11      TGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGACC
```

T-ALL T346(Der(10) failed)

```
10q24      TCTTCATGAACTACTCCGAGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTG
                                                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)    TGATGTGTTTCATTGTGCCTTCgtACTGGGGGTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTG
           ||||||||||||||||||||||
14q11      TGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACA
```

T-ALL T362

```
14q11     TGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAACCCG
                                                  ||||||||||||||||||||
Der(10)   CCCTCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCccttacaaaaTCTTTGGAAAAGGAACCCG
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     CCCTCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCA
                                              ||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   ATTGTGCCTTCCccccttagtACTGGGGGATAtaagacTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCA
          ||||||||||||
14q11     ATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGA
```

T-ALL T6329

```
14q11     GTGTGAAACCGAGGGGAAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTG
                                                  ||||||||||||||||||||
Der(10)   CTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGccaccttcaccgcgtggtgggttcCTGGGGGATACGCACAGTG
          ||||||||||||||||||||||
10q24     CTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCCT
                                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   TTGTGCCTTCCTttacgcgaggctccctTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCCT
          ||||||||||||
14q11     TTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGAC
```

T-ALL T7001

```
14q11     TAGTGTGAAACCGAGGGGAAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAG
                                                  ||||||||||||||||||
Der(10)   CATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTggctttgggcgtgCTGGGGGATACGCACAG
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     CATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTC
                                          ||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(1)4   GATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACgttaagaagcATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTC
          ||||||||||||||||||||||||||
14q11     GATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACAC
```

T-ALL T605046

```
14q11     TCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTGTACAAAAAC
                                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   CCTCTTCTCTCTCTTCATGAACTACTgtACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTGTACAAAAAC
          ||||||||||||||||||||||||||
10q24     CCTCTTCTCTCTCTTCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGC
                                              ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   AGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGC
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
14q11     AGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCT
```

T-ALL T430(Der(14) failed)

```
14q11     TTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGAC
                                        |||||||||
Der(10)   TGGTGATTGATGTCCCAGAGTCAACAGCaGGGGGATACcctCCGATAAACTCATCTTTGGAAAAG
          ||||||||||||||||||||||||||||
10q24     TGGTGATTGATGTCCCAGAGTCAACAGCGAGCGAGCAGCCGGAGCGGGGAAGCAGAAGCCAGAGA
```

T-ALL T443

```
14q11     CGAGGGGAAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAAC
                                                  ||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   TCTCTCTTCATGAACTACTCCGAGTCTTagccgggggggTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAAC
          ||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     TCTCTCTTCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTC
                                          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   TTTATACTGATGTGTTTCACTGgggcccGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTC
          ||||||||||||||||||||||
14q11     TTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGGCCTTTGTC
```

T-ALL T503

```
14q11     CGAGGGGAAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAAA
                                                 ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   CTCGCCTTGTTCCCCTCTTCTCTCTCTTCATGActgcCTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAAA
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     CTCGCCTTGTTCCCCTCTTCTCTCTCTTCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTAT
                                                 ||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   GAGGGTTTTATACTGATGTGTTTCATGGTaatccCTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTAT
          ||||||||||||||||||||||||||||||
14q11     GAGGGTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCT
```

T-ALL T496

```
14q11     TGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTGG
                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   CTCGGCTTCTGGCCTcccgaaccCTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAAACCTACAGAGACCTG
          ||||||||||||||||
10q24     CTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTCCCCCTCCCCTCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCT
                                                    ||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   AGAGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCT
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
14q11     AGAGGGTTTTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGC
```

T-ALL T499

```
14q11     TAAAGCTCTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAG
                                        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   ACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCggggCTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAG
          ||||||||||||||||||||||||||||
10q24     ACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCC
                                          ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   TTCATTGTGCCTTCCatgtccgccggggtgggCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCC
          ||||||||||||||||
14q11     TTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCG
```

T-ALL T460

```
14q11     ATCTTGCTGAACCGAGGGGAAGTTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACA
                                                                ||||||||||||
Der(10)   CTCTTCTCTCTCTTCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTgcttgtGGGATACGCACA
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     CTCTTCTCTCTCTTCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCA
                                                          ||||||||||||||||||
Der(14)   TTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTAgaaactaagggaaggaTATCTCTGGCTCCTGCA
          ||||||||||||||||||||||||||||||||
14q11     TTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCC
```

T-ALL T506

```
14q11     CGCTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAAC
                                                 ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   CCCTCGCGCTGTCATTCACCCCccggttctgctggcACCGATAAACTCATCTTTGGAAAAGGAAC
          ||||||||||||||||||||||
10q24     CCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGAAACC
                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   TTCATTGTGCCTTCCTcatTACGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGAAACC
          ||||||||||||||||
14q11     TTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCG
```

T-ALL T480 (Der(14) failed)

```
14q11     GCTCTGTAAAGCTCTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAACCT
                                                 ||||||||
Der(10)   ATCTTTTGGTGTGGGTTGGTTGAAGATAAAATTTAggtTGGGGGATttagACCGATAAACTCATC
          ||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     ATCTTTTGGTGTGGGTTGGTTGAAGATAAAATTTATAAAACTAAATAAAATAAAATAAAATAAAA
```

T-ALL T528

```
14q11     GGTAGGTGGGAGCAGCGCTGAGGTTTTTGGAACGTCCTCAAGTGCTGTGACACCGATAAACTCAT
                                                                ||||||||||||||||
Der(10)   GTTTTCCCTTTTCCTTTTAAGCCTCGCCccgtggagagtgttcggacgaACACCGATAAACTCAT
          ||||||||||||||||||||||||||||
10q24     GTTTTCCCTTTTCCTTTTAAGCCTCGCCTTGTTCCCCTCTTCTCTCTCTTCATGAACTACTCCTT
                                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   TGCCTTCCTtatagcCTGGGGGAcgtcatcacTCCCCTCTTCTCTCTCTTCATGAACTACTCCTT
            |||||||
14q11     TGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCAGCCGTGACCCG
```

T-ALL T501(Der(10) failed)

```
10q24     CTGGCCTTCCTCTCCCCCTCCCCTCCCCTCCCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGC
                                        ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   TTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTCTCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGC
          ||||||||||||||||||||||||||||||||
14q11     TTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCC
```

T-ALL T48(Der(10) failed)

```
10q24      CTTGTTCCCCTCTTCTCTCTCTTCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTG
                                                                ||||||||||||||||||
Der(14)    TTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTAagaggttcggagcggTCCGTCCCTCTATCTCTG
           ||||||||||||||||||||||||||||||||
14q11      TTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCC
```

T-ALL T461(Der(10) failed)

```
10q24     GAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTC
                                                ||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   TTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTAagcagATCTGTCTCGGCTTCTGGCCTTCCTCTC
          ||||||||||||||||||||||||||||||||
14q11     TTTATACTGATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCC
```

T-ALL T553

```
14q11     TAAAGCTCTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAG
                                          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   CTCTTCATGAACTACTCCcgtatgggtcttACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAG
          ||||||||||||||||||
10q24     CTCTTCATGAACTACTCCGAGTCTTGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCG
                                    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)   ATGTGTTTCATTGTGCCTTCCacccGGTCTCCGTCCCTCTATCTCTGGCTCCTGCATCTGTCTCG
          ||||||||||||||||||||
14q11     ATGTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACC
```

T-ALL T494(Der(14) failed)

```
14q11    TTTTTGTAAAGCTCTGTAGCACTGTGACTGGGGGATACGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGAC
                                        |||||||||
Der(10)  AGCCTCGCACCTCATTGAGAGGTccccggGGGGGATACtctcggACACCGATAAACTCATCTTTG
         ||||||||||||||||||||||
10q24    AGCCTCGCACCTCATTGAGAGGTTATTAATAGGGAGTTTGTCTGGTGTCAGAGCGCAGACATAAA
```

T-ALL T452(Der(10) failed)

```
10q24    TCGCGCTGTCATTCACCCCGCTCCTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGAAACCGCG
                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(14)  GTGTTTCATTGTGCCTTCCTACcgTCTCCGCGCACAGCCAATGGAGAGACCCAGTCGAAACCGCG
         ||||||||||||||||||||||
14q11    GTGTTTCATTGTGCCTTCCTACCACACAGGTTGGAGTGCATTAAGCCTTTGTCCAAAAACACCCA
```

T-ALL T178

```
7q35     TAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTACAAAAACCTCTC
         ||||||||||||||||||||||
Der(7)   TAACATTGTGGGGACAGGGGGCtaaggaacATTGAAGTTTAAAGAGACTAAGCAGGGGCCAGGCG
                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
10q24     ATTTTTATCCCTGCTTTATACATAACGAAAATTGAAGTTTAAAGAGACTAAGCAGGGGCCAGGCG
          ||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   ATTTTTATCCCTGCTTTATACATAACGAtcgggatggcgaCAAGAGACCCAGTACTTCGGGCCAG
                                                  |||||||||||||||||||||||||
7q35      ACTGCGCTCGGGTTTTTGTGCGGGGCTCGGGGGCCGTGACCAAGAGACCCAGTACTTCGGGCCAG
Dβ1 Jβ2.5
```

T-ALL T051 (Der(10) failed)

```
7q35      TTTGTACAAAGCTGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTT
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(7)    TTTGTACAAAGCTGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCgACACATTGTGTGTGCTCCATCGGTTCCC
                                               ||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     TGTGAAGGTGGGATGTAAATGGCTTAGCCAGGGCCCAACACATTGTGTGTGCTCCATCGGTTCCC
Dβ1
```

T-ALL T280

```
7q35      AACATTGTGGGGACTAGCGGGAGGGCACGATGATTCAGGTAGAGGAGGTGCTTTTACAAAAAAAC
          ||||||||||||||||||||
Der(7)    AACATTGTGGGGACTAGCGGGagtggggttattgaagGCTCCATCGGTTCCCAGTGTTCAGAGGA
                                               ||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     TGTAAATGGCTTAGCCAGGGCCCAACACATTGTGTGCTCCATCGGTTCCCAGTGTTCAGAGGA
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   TGTAAATGGCTTAGCCAGGGCCCAACACATTGTGTGTtggggttctATGAGCAGTTCTTCGGGCC
                                                     ||||||||||||||||||||
7q35      GAAGGAGAAGGAATTCTGGGCAGCCCCTTCCCACTGTGCTCCTACAATGAGCAGTTCTTCGGGCC
Dβ2 Jβ2.1
```

T-ALL T537

```
7q35      TAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTACAAAAACCTCTC
          ||||||||||||||||||
Der(7)    TAACATTGTGGGGACAGGGcgGTATTCTCCGTGGCACCCTCGGAAATGCAGGGGTGGCTGTTACT
                             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     GAGCCGAGGCTCTGGGAGCTTGTATTCTCCGTGGCACCCTCGGAAATGCAGGGGTGGCTGTTACT
          ||||||||||||||||||||
Der(10)   GAGCCGAGGCTCTGGGAGCTTagacctcagcgagaacaCTACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCAC
                                               ||||||||||||||||||||||||||||
7q35      CCTTAGAGGTTTGCATGCGGGGGTGCACCTCCGTGCTCCTACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCAC
Dβ1 Jβ2.7
```

T-ALL T43(Der(7) failed)

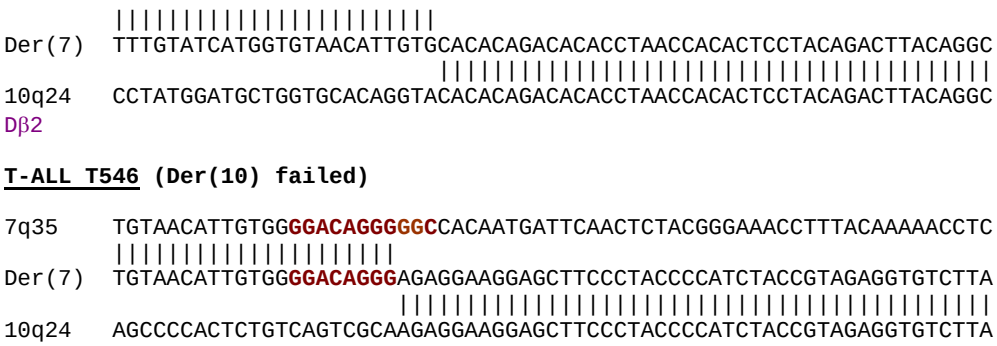
```
10q24     TGCACGGGCTTGTAGTGGTGTGTGTGTAACCGTATGTGAATGTGACTGTTTCTTTTTGGGTAATT
          ||||||||||||||||||||||
Der(10)   TGCACGGGCTTGTAGTGGTGTGggtgatggtaatggcacagatacgCAGTACTTCGGGCCAGGCA
                                                        |||||||||||||||||||
7q35      GCGCTCGGGTTTTTGTGCGGGGCTCGGGGGCCGTGACCAAGAGACCCAGTACTTCGGGCCAGGCA
Jβ2.5
```

T-ALL T474

```
7q35      TGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCCACAATGATTCAACTCTACGGGAAACCTTTACAAAAACCTC
          |||||||||||||||||||||||
Der(7)    TGTAACATTGTGGGGACAGGGGGCgtgccgaggaaTCCAGCCTCACTGTGCCCAGGCCGCTCTGT
                                             ||||||||||||||||||||||||||||||||
10q24     GGAGACAGCCCGTAAGTGAGAAAAACTCGCTTCCCTCCAGCCTCACTGTGCCCAGGCCGCTCTGT
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Der(10)   GGAGACAGCCCGTAAGTGAGAAAAACTCGCTTCCgggTCAGCCCCAGCATTTTGGTGATGGGACT
                                               ||||||||||||||||||||||||||||
7q35      CTGGGGTTTGCCACACTCATGATGCACTGTGTAGCAATCAGCCCCAGCATTTTGGTGATGGGACT
Dβ1 Jβ1.5
```

T-ALL T57 (Der(10) failed)

```
7q35     TTTGTATCATGGTGTAACATTGTGGGGACTAGCGGGAGGGCACGATGATTCAGGTAGAGGAGGTG
```



T-ALL T546 (Der(10) failed)

Figure S3, related to Figure 7. Molecular junctions of *TCRδ-TLX1* and *TCRβ-TLX1* translocations.

Nucleotide sequences for the Dδ2, Dδ3 and Jδ1 gene segments are depicted in yellow, orange and dark green, respectively. Those for the Dβ1 and Dβ2 gene segments are highlighted in brown and purple, respectively. Jβ1 gene segments are in green, and Jβ2 gene segments in dark blue. The *RSS like* sequences are underlined and untemplated nucleotides (N diversity) are indicated in lowercase.

Supplemental Experimental Procedures

Institutions whose IRB approved the study

Department	Institutions whose IRB approved the study
Hematology	C.H.U. D'ANGERS 4 Rue Larrey 49033 ANGERS
Hematology	Hôpital JEAN MINJOZ 3 Bd Alexandre Fleming 25030 BESANCON
Hematology	Hôpital AVICENNE 125, bd Stalingrad 93009 Bobigny Cedex
Hematology	Hôpital du HAUT LEVEQUE Centre François Magendie Av. de Magellan 33604 PESSAC
Hematology	CHU 5 Av. FOCH - B.P 824 29609 BREST Cedex
Hematology	Hôpital CLEMENCEAU Avenue Georges CLEMENCEAU 14033 CAEN Cedex
Hematology	Hôpital Militaire PERCY 101 Av. Henri Barbusse 92141 CLAMART
Hematology	CHU Estaing 1 Place Lucie Aubrac 63003 Clermont-Ferrand cedex 1
Hematology	Hôpital HENRI MONDOR 51, av du Marechal de Tassigny 94010 CRETEIL Cedex
Hematology	Hôpital du BOCAGE Bd du Marechal de Lattre de Tassigny - BP 1542 21034 DIJON CEDEX
Hematology	Hôpital A. MICHALLON Av. du Maquis du Gresivaudan-BP 217 38043 GRENOBLE
Hematology	Hôpital Claude Huriez Place de VERDUN 59037 LILLE Cedex
Hematology	Hôpital Dupuytren 2 Av. Martin Luther King 87042 LIMOGES Cedex

Hematology	Centre Hospitalier Lyon Sud Pavillon Marcel Berard, secteur 1G 69310 PIERRE BENITE
Hematology	Institut Paoli Calmettes 232 bd Sainte Marguerite - BP 156 13273 MARSEILLE CEDEX 09
Onco- Hematology	Hôpital LAPEYRONIE 371 Av. du Doyen Gaston Giraud 34295 MONTPELLIER Cedex 5
Hematology	Hôpital de BRABOIS Av de Bourgogne 54511 VANDOEUVRE LES NANCY
Hematology	HOTEL DIEU Place Alexis Ricordeau 44093 NANTES cedex 1
Hematology	Hôpital de l'ARCHET 1 151 Route St Antoine de Ginestière - BP 3079 06202 NICE
Medical oncology	Hôpital de la Source 14 Av. de l'Hôpital BP 6709 45 067 ORLEANS cedex 2
Hematology	Hôpital COCHIN 27, rue du Faubourg Saint-Jacques 75679 PARIS Cedex 14
Hematology	Hôpital NECKER Enfants Malades 149, rue de Sèvres 75743 PARIS Cedex 15
Hematology	Hôpital PITIE SALPETRIERE 47-83, boulevard de l'Hôpital 75651 PARIS Cedex 13
Hematology	Hôpital SAINT LOUIS 1, avenue Claude-Vellefaux 75475 PARIS Cedex 10
Onco- Hematology	Hôpital Armand Trousseau AP-HP 26, avenue du Dr Arnold Netter 75571 Paris Cedex 12
Onco- Hematology	Hôpital de la Miletrie CHU Poitiers 2 rue de la Miletrie - BP 577 86021 POITIERS CEDEX
Hematology	Hôpital Robert Debre Avenue du General Koenig 51092 REIMS Cedex
Hematology	Hôpital de PONTCHAILLOU 2 Rue Henri Le Guilloux 35033 RENNES
Hematology	Hôpital Victor PROVO 11-17 Bd Lacordaire - BP 359 59100 ROUBAIX

Hematology	Centre HENRI BECQUEREL Rue d'Amiens 76038 ROUEN CEDEX
Hematology	Institut de Cancerologie de la Loire 108 bis avenue Albert Raymond 42270 SAINT-PRIEST-EN-JAREZ Cedex
Onco- Hematology	Hôpital de HAUTEPIERRE Avenue Molière 67098 STRASBOURG
Hematology	Hôpital de PURPAN 1 Place du Dr Baylac - TSA 40031 31059 TOULOUSE cedex 03
Hematology	Hôpital BRETONNEAU 2 Bd Tonnele 37044 TOURS
Hematology	HOTEL DIEU Avenue Desandrouin-BP 479 59322 VALENCIENNES
Onco- Hematology	CH de Versailles, Hôpital Mignot 177, rue de Versailles 78157 LE CHESNAY Cedex
Hematology	INSTITUT GUSTAVE ROUSSY 39 Rue Camille Desmoulins 94805 VILLEJUIF CEDEX

Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE)

FAIRE was performed according to the protocol described by (Giresi et al., 2007), with a few modifications. Briefly, $2x10^6$ $Rag2^{-/-}$ (Shinkai et al., 1992) mouse thymocytes or 10^7 TLX^+ human T-ALLs cells were treated with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature for protein-protein/protein-DNA cross-linking. Following addition of Glycine to a final concentration of 250 mM, the cells were washed once in cold PBS and harvested. Nuclei were extracted using successively LB1 buffer (50 mM Hepes pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerol, 0.5% NP-40 and 0.25% Triton X-100) and LB2 buffer (10 mM Trsi-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1% Na-Deoxicholate and 0.5% N-Lauroylsarcosine) containing a protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were sonicated 14 times on a S-4000 Sonifier (Misonix) (pulses of 30 seconds) to obtain DNA fragments measuring between 200 and 500 bp. Soluble chromatin was isolated following three consecutive phenol-chloroform extractions. Samples were then incubated overnight at 65°C to reverse cross-linking. DNA was finally purified using the MinElute PCR purification kit

(Qiagen). Enriched DNA fragments from human FAIRE experiments were assessed by RQ-PCR.

Microarray hybridization

H3K27me3 ChIP samples were hybridized with input DNA, to custom arrays (Agilent, Santa Clara, USA) covering the human (H3K27me3 ChIP) TCRα/δ locus along with the promoter regions of Refseq genes (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq), following the manufacturer instructions. Median-normalized $\log_2$ enrichment ratios were calculated using CoCAS software (Benoukraf et al., 2009). Processed data was visualized using the IGB tool (Nicol et al., 2009).

Expression vector constructs

TLX1 and TLX3 cDNAs were prepared using mRNA extracted from the ALL-SIL and DND41 cell lines, respectively, and were subcloned into the pEGFPC1 vector (Clontech, St-Germain-en-Laye, France) (GFP tagged proteins) or pGEX4T1 vector (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) (GST tagged proteins). The Eα-CAT reporter construct and RUNX1, ETS1-*HA*-*His* and LEF1-*HA* expression vectors (Giese et al., 1995) were obtained from Dr. R. Grosschedl (University of Munich, Germany). Tricistronic TCRα-TCRβ-GFP vector was designed from Jurkat TCRαβ sequence, and was subcloned into TRIP vector.

Cell lines and cell culture

HeLa cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 50 µg/ml streptomycin, 50 IU penicillin, and 10% FCS. The ALL-SIL, DND41 and RPMI-8402 cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 50 µg/ml streptomycin, 50 IU penicillin, and 10% fetal calf serum, as recommended (DSMZ, Braunschweig, Germany, ACC 511, ACC 525 and ACC 290, respectively) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO2. For co-culture experiment, 10 X 103 cells were added to confluent OP9DL1 in a α-MEM media supplemented with 20% FBS (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Illkrich, France), 50 µg/ml streptomycin and 50 IU penicillin. Recombinant human cytokines FLT3-L (5 ng/mL), IL-7 (2 ng/mL) and SCF (10 ng/mL) (Peprotech, Rock Hill) were added to the culture.

CAT-reporter assays

HeLa cells were transiently transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen, Eragny-sur-Oise, France), according to the supplier's recommendations. CAT-transactivation assays were performed using, respectively, the Eα-CAT reporter construct together with expression vectors for RUNX1, ETS1, LEF1 and either GFP control or full length (^{FL}) GFP-TLX1, or GFP-TLX3, or homeodomain (HD) deleted [GFP-TLX1-HD^{del} (aa 1-191) or GFP-TLX3-HD^{del} (aa 3-144)] or HD containing GFP-TLX1-HD^{+} (aa 189-329) or GFP-TLX3-HD^{+} (aa 154-291). Expression of CAT activity was determined using the 'CAT ELISA' kit (Roche,Neuilly sur Seine, France).

Chromatin Immunoprecipitation

Anti-TLX1 (16F6), anti-TLX3 (10A5), anti-H3K27me3 (05851, Abcam), and anti-ETS1 (sc-350, C-20X, Santa Cruz) mAb-mediated ChIPs using the ALL-SIL, DND41 and RPMI cell lines or T-ALL samples were performed according to the Agilent protocol version 10.0: http://www.chem.agilent.com. The samples were sonicated on ice using an Ultrasonics sonicator (Vibra-cell VCX130, SONICS) at setting 12 for fifteen cycle 30-s pulses ON/OFF in order to obtain an average length for DNA fragments of approximately 600 bp. ChIP DNA was purified by phenol/chloroform extraction and QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen). TLX1, TLX3 and ETS1 ChIP samples were analyzed by RQ-PCR with the following oligonucleotide primers: Eα Forward: 5'-TTCCATGACGTCATGGTTACC-3'; Eα Reverse: 5'-GCGATGCTATCTCTAACTCAG-3'; Actin Forward: 5'-CTCCCATTGTCTACCT CAGTTTC-3' ; Actin Reverse : 5'-CTTATGTGCTGAGAAGGTGGTG-3'

Mice anti-TLX1 and anti-TLX3 Human monoclonal antibodies production

Monoclonal antibodies (mAbs) against human TLX1 (16F6) and TLX3 (10A5) were generated on the mAb platform of the CIML, by immunizing mice with, respectively, TLX1 and TLX3 peptides coupled to ovalbumin. 20 mer-peptides were designed by human/mouse sequence alignment, and the most divergent region was chosen. 40 days after the first immunization, mice spleens were collected and hybridomas were made by a fusion of splenocytes with X63 tumor cells, further selected by culture in HAT medium. Hybridoma supernatants were screened by Elisa, using TLX1 or TLX3 (peptide)-coated plates.

GST pull-down assays

GST fusion proteins were expressed in *E. coli* (strain BL21) and were purified using glutathione-sepharose beads. [^{35}S]-Met-labeled proteins were obtained using the TNT T7 quick-coupled transcription/translation system (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Radiolabelled proteins were incubated with ~0.5 µg of GST fusion proteins in binding buffer [150 mM Nacl, 50 mM Tris-HCl (pH 8, 0), 0,1% Triton X-100, 1X of inhibitory proteases cocktail (complete EDTA free, Roche), 1 mg/ml BSA and DNaseI (37,5 U/µl), for 1 hour at 4°C. The beads were washed 5 times in binding buffer, re-suspended in Laemmli buffer, and the eluted proteins were separated by SDS-PAGE. The gels were transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). The membranes were stained with Coomassie Blue and were exposed to a phosphorImager screen for 4-12 hr.

Streptavidin precipitations and immunoprecipitations

1.10^7 HeLa cells were co-transfected with expression vectors for ETS1-*HA*-*His*, LEF1-*HA*, and either TLX1-SBP-Flagx3 or TLX3-SBP-Flagx3, or the empty expression vector SBP-Flagx3 as a control. 24 hr post-transfection, nuclear extracts were prepared using the QProteom Nuclear Protein kit (QIAGEN, Courtabeuf, France) and then incubated for 2 hr at 4°C with 25 µl of steptavidin agarose beads (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Following 4 washes in washing buffer (150 mM Nacl, 10 mM Tris HCl pH 7.8), Straptavidin-precipitated proteins were detected by Western blot analysis using antibodies against HA (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), His (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France), and Flag (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). 2.10^8 ALL-SIL or DND41 cells were used for TLX1 and TLX3 protein IPs, respectively. Nuclear extracts, prepared as described previously (Dignam et al., 1983), were incubated for 2 hr at 4°C with ~15 µg of anti-TLX1 (16F6) or anti-TLX3 (10A5) mAbs covalently linked on protein G agarose beads (Upstate, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). After 4 washes in 100 mM Nacl, 15 mM Tris,HCl pH 7.8, the bound proteins were eluted and detected by Western blot analysis using anti-ETS1 (C-20, Santa Cruz), anti-TLX1 (16F6) and anti-TLX3 (10A5) antibodies.

Immunofluorescence analyses

For EGFP fluorescence analysis, HeLa cells plated on coverslips were transiently transfected with EGFP-fusion constructs and further incubated for 48 hr. Coverslips were fixed in

PBS/4% formaldehyde, washed, and then incubated for 5 min with DAPI/PBS (1µg/ml) and mounted in Vectashield H-1000 (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA). Imaging was performed using a Zeiss (LSM-510) confocal microscope. For immunofluorescence analysis, cell lines or primary blastic cells ($1x10^5$) were cytospun onto glass slides. The cells were air-dried overnight at room temperature, then fixed with ice-cold acetone and PBS/formaldehyde (2%) 20 min at room temperature and, finally, with ice-cold 70% ethanol, 5 min at 4°C. The cells were then permeabilized by incubation for 20 min in PBS supplemented with 10% FCS and 0.5 to 1% Triton X-100, before incubation for 1 hr at room temperature with primary antibody [mouse anti-TLX1 (16F6), anti-TLX3 (10A5), and/or rabbit anti-ETS1 (C-20, Santa Cruz)] in antibody dilution buffer (PBS, 1% BSA, 0.1% Tween20). The cells were washed five times in washing buffer (PBS, 1% BSA, 1mM glycine), then incubated for 1 hr in the dark with an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen) and Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen), at a dilution of 1:200 in antibody dilution buffer. The slides were washed a further five times in washing buffer supplemented with 50mM ammonium chloride, and mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories). Images were obtained on a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope and merged using Leica LAS AF software. Statistical analyses were performed with ImageJ software and Jacop (Bolte and Cordelieres, 2006).

Electromobility Shift Assays (EMSA)

Oligonucleotide 5'-TCTCCCGCAGAAGCCACATCCTCTGGAAAGA-3', corresponding to the Eα core element containing ETS1 and RUNX1 binding sites, was radio-labeled using γ^{32}P-ATP (GE-Healthcare, Amersham, Saclay, France), and then hybridized with its complementary strand. The duplex was incubated at 4°C for 30 min with GST-TLX1, GST-TLX3 (proteins purified by FPLC) and/or ETS1-His (purified on chelating sepharose fast flow column; GE-Healthcare, Amersham, Saclay, France) in binding buffer (100 mM NaCl, 30 mM Hepes pH 7.4, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM $ZnSO_4$, 2 mM $MgCl_2$, 10% glycerol) supplemented with poly dIdC (1 µg/reaction). The samples were loaded onto 8% polyacrylamide gels and electrophoresed in 0.5 X TBE buffer. The gels were exposed to a FUJI screen and were afterwards analyzed using FUJI FLA-3000 apparatus.

TLX1 and TLX3 knockdown

TLX1 MISSION™ TRC shRNA Target Set (TRCN0000014995), TLX3 MISSION™ TRC shRNA Target Set (TRCN0000018030) and ETS1 MISSION™ TRC shRNA Target Set (TRCN0000231917) plasmid vectors were purchased from Sigma. Knockdown of the endogenous TLX1, TLX3 and ETS1 RNA transcripts was performed by transduction of the ALL-SIL and DND41 cell lines. MISSION shRNA-pLKO.1-puro control transduction particles were used as a negative control. Transductions were performed in RPMI medium supplemented with polybrene (8 μg/ml). The transduced cells were selected for resistance to puromycin (1,4 μg/ml). Knockdown efficiency was validated by Western blot using anti-TLX1/3 mAbs 16F6, 10A5 and anti ETS1 (C-20, Santa Cruz). Lentiviral vectors were generated by Ca-Phosphate transient transfection of 293T cells with Gag-Pol HIV packaging construct, the shRNA-lentivector encoding plasmid (Sigma) and a VSV-G glycoprotein encoding plasmid. The medium was changed 16 h post-transfection with Optimem medium (Invitrogen) and viral supernatant was harvested 48 hours post-transfection. Concentration of the vectors was performed by low speed centrifugation of the viral supernatant at 4°C overnight at 3000 g. To determine vector titers, serial dilutions of vector preparation were added to 293T cells and MOIs were calculated accordingly.

Gene expression analysis

RNA was isolated using RNeasy (QIAGEN) and converted into cDNA using MMLV RT II (Invitrogen). Real-time PCR reactions were performed using Taqman universal master mix kit and on a 7900HT Real-time PCR system (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primer sequences are available upon request. Relative expression levels were calculated for each gene using the Ct method using ABL for normalization.

FACS analysis and cell sorting

Electronic sorting of GFP positive shRNA transduced cells was performed using a FACS Aria II Cell sorter (BD Biosciences). Cell preparations were incubated with optimal dilutions of monoclonal antibodies specific for CD5 (L17F12), CD3 (UCHT1) and TCRαβ (IP26). Viability experiments were performed using Annexin V-APC and propidium iodide (PI) according to the manufacturer instructions. All reagents were purchased by BD Biosciences

except TCRαβ (BioLegend). Surface stained cells were analyzed using a FACS CANTO II (BD Biosciences).

Multiplex TCRα RT-PCR analysis

This method is an adapted version of the assay by Dik et al. (manuscript in preparation). One µg of total RNA was reverse transcribed as described above. RNA quality and quantity was assessed relative to the *ABL* housekeeping gene, as designed within the Europe against Cancer network (Gabert et al., 2003) on an ABI PRISM ^{TM} 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 20 ng was amplified in each tube of PCR with 1U of Qiagen Hotstart, 2mM of MgCl2, 20% Q solution, 10mM dNTP final concentration and 10pmol of each primer. The Taq polymerase was actived 15min at 95°c, after 37 cycle at 94°c during 30sec, 63°c 45sec, 72°c 1min30. The final elongation was 72°c during 10min. The negative control is the PBMC of donor and the positive control is the JURKAT cell line. Primers sequences used for the TCRA transcript amplification are listed in Supplementary Experimental procedures.

Allelic expression analysis

PCR amplification and sequencing of genomic DNA identified polymorphic markers in the 3' untranslated region (3'UTR) of *TLX1,* as described (Ferrando et al., 2004). DNAse-treated mRNA from heterozygous samples was reverse transcribed, amplified, and sequenced. The monoallelic or biallelic expression pattern was determined by sequence analysis.

Ligation Mediated PCR (LM-PCR)

LM-PCR assays were performed as described previously (Bergeron et al., 2007; Dik et al., 2007). Briefly, 330ng of genomic DNA was digested using a combination of six blunt end restriction enzymes (*Dra*I, *Pvu*II, *Stu*I, *Sma*I, *Ssp*I and *Eco*RV). For the TCRδ-based LM-PCR rounds, ligation of 50pmol of an adaptor to both ends of the restriction fragments was followed by two rounds of PCR using nested adaptor-specific (AP1 and AP2) oligonucleotide primers, as well as Jδ1 or Dδ3 specific oligonucleotide primers. For the TCRβ-based LM-PCR reactions, Dβ1, Dβ2, Jβ1.6 and Jβ2.7 specific primers were used. All primers are listed in Supplementary Experimental procedures. The LM-PCR products were sequenced in both directions, using the specific primer and the nested adaptor specific primer (AP2). The

sequences were blasted to the NCBI nucleotide database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) and Ensembl genome browser (http://www.ensembl.org/Multi/blastview). Junctions identified by LM-PCR were validated with a specific primer set flanking the identified breakpoint.

Fluorescent in situ hybridization

FISH was performed on interphase nuclei from cytospins or isolated nuclei from cytogenetic preparations for karytotype analysis. BAC clones (obtained from the Human Genome Browser Database) used for FISH analysis are listed in Supplementary Experimental procedures.

Screening for TCR-TLX1 junctions

Screening for 3' *type* t(10;14)(q24;q11) translocations was performed using pooled thymocytes from 10 healthy human children undergoing cardiac surgery. A semi-nested PCR was performed using 4µg of genomic DNA and appropriate oligonucleotide primers (listed in Supplementary Experimental Procedures). PCR conditions were as follows: 15 cycles at 60°C, followed by 40 cycles at 60°C on a Taqman 7900HT (Applied Biosciences). T-ALL UPN242 cells served as a positive control. Amplified DNA was diluted in DNA PBL to perform a standard curve from 10^{-2} to 10^{-6} copies of rearranged DNA. For breakpoint screening of the 3' *TLX1* type, DNA from TCRβ-TLX1 breakpoint in the T-ALL UPN250 and T-ALL T051 clinical samples were investigated. A nested PCR was performed on 4µg DNA, using appropriate oligonucleotide primers (Supplementary Experimental Procedures). PCR conditions were as follows: 15 cycles at 54°C, followed by 40 cycles at 60°C on a Taqman 7900HT.

Primers sequences and BAC clones

Multiplex mix PCR tubes

TCRA PCR				
Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5
Cα	Cα	Cα	Cα	Cα
Vα1-1	Vα3	Vα5	Vα2	Vα1-2
Vα8-4	Vα4	Vα8-1	Vα6	Vα8-2
Vα8-7	Vα9-2	Vα22	Vα7	Vα9-1

Vα12-1	Vα13-1	Vα24	Vα8-3	Vα10
Vα12-2	Vα16	Vα26-2	Vα8-5 (p)	Vα11 (p)
Vα12-3	Vα17	Vα27	Vα8-6	Vα13-2
Vα30	Vα18	Vα29	Vα19	Vα14
Vα35	Vα31 (p)	Vα32 (p)	Vα20	Vα15 (p)
Vα39	Vα33 (p)	Vα36	Vα23	Vα21
Vα40	Vα38-2	Vα37 (p)	Vα26-1	Vα25
Vα41		Vα38-1	Vα28 (p)	Vα34

Primers sequences of different Valpha and Calpha.

Séquences (5'-3')	Primer	Séquences (5'-3')	Primer
Ned_GGTACACGGCAGGGTCAG	Cα	6Fam_AGGGTCAGGGTTCTGGATAT	Cα_int
GAGCCATTGTCCAGATAAACTG	Vα1-1	GTTGCTGAAGGGAATCCTCT	Vα3
GTGCCATTGTCCAGATCAACT	Vα1-2	GGGGAAGATGCTGTCATCAA	Vα30
GGAAAGAACTGCACTCTTCAA	Vα10	GTGAGACCGTGAAACTGGACT	Vα31
GGAATGCATGCCGTTCTTAAT	Vα11	GAAATGGCCGTTATTAATGACA	Vα32
CCAGAGGGAGCCACTGTC	Vα12-1	AGGCAGAAAGGAGTAGCTGTGA	Vα33
GAGCCATTGCCTCTCTCAACT	Vα12-2	GGGAAAGAATCTCACCATAAACT	Vα34
GGGAGCCATTGTTTCTCTCA	Vα12-3	GGAGAAGATGTCTCCATGAACT	Vα35
GAGACAGCGCTGTTATCAAGTG	Vα13-1	GGGAGACACCGTAACTCTCAAT	Vα36
CCAGGAGGGTGACAACTCTATT	Vα13-2	GGAAGGTGACAGCGTCACA	Vα37
AGGAGGCTGTGACTCTGGACT	Vα14	GCAGGAGGCAGAGACTGTG	Vα38-1
GGGAATGCACAACATTCTTAAT	Vα15	TCTGTGCAGGAGGCAGAGA	Vα38-2
TTTAAAGGGGCCCCAGTG	Vα16	CATGCAGGAGGGAAAAAACT	Vα39
AGGAGGGTGAAAATGCCA	Vα17	AGAAGTGAACATAACCTGTAGCCA	Vα4
CCAGTTACCCTCCCTGAGAG	Vα18	GGAGGGAGCATCTGTGACT	Vα40
TGGTGGAGAAGGAGGATGTG	Vα19	GCCCAGGAAGGAGAATTTATCA	Vα41
GGAGCTGTGGTGGAAATCT	Vα2	ACAGCTCCGTTATAAACTGCAC	Vα5
CAGGAGGGAGAGAGTAGCAGTC	Vα20	ACATTCAGGAGGGTAAAACGG	Vα6
AAGGAGAAAACTTGGTTCTCAACT	Vα21	CGTTGCCTCCATGAGCTG	Vα7
GGAGGGAGCCAATTCCAC	Vα22	GCCTCACTGGAGTTGGGAT	Vα8-1
CCAGAAAGGAGGGATTTCAATTA	Vα23	AACCCCGGTGCTGCTG	Vα8-2
GGGAGACAGCACCAATTTCA	Vα24	GGAGCCTCACTGGAGTTGAGA	Vα8-3
GGAGAGGACTTCACCACGTACT	Vα25	GGAGCCCTGGTTCTGCTG	Vα8-4
GCTGCAAACCTGCCTTGTAA	Vα26-1	GAAGGAGCCTCACTGGAGTT	Vα8-5
GAGCCTGTTCACTTGCCTTG	Vα26-2	AAGCCCCTGTGGAGCTG	Vα8-6
GGGAGAAAATCTCACTGTGTACT	Vα27	AAGAAGCCCCTCTGGAACTG	Vα8-7
GAAGAAATTCATTCCTGGTGTG	Vα28	TTCCCTGATTGTGAACTGCTC	Vα9-1
GCGTCCAGGAAGGAAGAATTT	Vα29	AAACTGCACGTACACAGCCA	Vα9-2

LM-PCR primers

Dβ1 I	CAGTGCCTGGAGGTGAGAAGGAAG
Dβ1 II	CACCCTCCACTCCCCTCAAAGG
Dβ2 I	GCTCAGGGTGATGCATGTTCCAAGG

Dβ2 II	GCTCAGGGTTAACCTCTGCCACCTG
Jβ1 I	GCAACACAGCAGAGCAACAAGCTGG
Jβ1 II	GCAACTGATCATTGCAGTCAAACCAGG
Jβ2 I	CTGCTCAGCTTTCCGGACTCTGAG
Jβ2 II	CTGACCCCGGACACCCAGCTCCTCCAG
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
Dδ3	TGGGACCCAGGGTgAGGATAT
Jδ1	GTTCCACAGTCACGGGTTC

Primers used for TCR-TLX1 junction screnning in healthy thymi

TLX1-P1	GACATCCCTTCCTCAGAC
TLX1-S1	CTTCTCTCTCTTCATGAACTAC
Dδ3	CACAGCAAGCAGCTTCCCTC
Dδ3probe1	CTGGGTCCCATGCCTCAGGAGACAA
TLX1-P2	AAGGAGCTGTTGTGAAGG
TLX1-S2	ATGTAAATGGCTTAGCCAGG
Dδ3-P2	TGTGTTTGTCTCCTGAGGC
Dδ3-P2	GGTGAGGATATCCCAGGGAAATGG
Dδ3probe2	ACCTGTACAAAAACTGCAGGG

BAC clones used for FISH analysis

Locus	Centromeric	Télomeric
TCRβ (7q34)	RP11-1084E14	CTD-2152B9
	RP11-615P18	RP11-114L10
TCRδ (14q11)	CTD-2552B11	RP11-14F22
	RP11-242H9	RP11-1083M21
TLX1 (10q24)	RP11-1031N22	RP11-324L3
	RP11-179B2	RP11-1119018

Supplemental References

Benoukraf, T., Cauchy, P., Fenouil, R., Jeanniard, A., Koch, F., Jaeger, S., Thieffry, D., Imbert, J., Andrau, J. C., Spicuglia, S., and Ferrier, P. (2009). CoCAS: a ChIP-on-chip analysis suite. Bioinformatics *25*, 954-955.

Bergeron, J., Clappier, E., Radford, I., Buzyn, A., Millien, C., Soler, G., Ballerini, P., Thomas, X., Soulier, J., Dombret, H., *et al.* (2007). Prognostic and oncogenic relevance of TLX1/HOX11 expression level in T-ALLs. Blood *110*, 2324-2330.

Bolte, S., and Cordelieres, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. J Microsc *224*, 213-232.

Capone, M., Hockett, R. D., Jr., and Zlotnik, A. (1998). Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 12522-12527.

Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res *11*, 1475-1489.

Ferrando, A. A., Herblot, S., Palomero, T., Hansen, M., Hoang, T., Fox, E. A., and Look, A. T. (2004). Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood *103*, 1909-1911.

Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V. H., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, J. M., Cave, H., *et al.* (2003). Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia *17*, 2318-2357.

Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. J Immunol *150*, 4244-4252.

Huynh, K. D., Fischle, W., Verdin, E., and Bardwell, V. J. (2000). BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. Genes Dev *14*, 1810-1823.

Kang, J., and Raulet, D. H. (1997). Events that regulate differentiation of alpha beta TCR+ and gamma delta TCR+ T cells from a common precursor. Semin Immunol *9*, 171-179.

Nicol, J. W., Helt, G. A., Blanchard, S. G., Jr., Raja, A., and Loraine, A. E. (2009). The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. Bioinformatics *25*, 2730-2731.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell *68*, 855-867.

Spits, H., Blom, B., Jaleco, A. C., Weijer, K., Verschuren, M. C., van Dongen, J. J., Heemskerk, M. H., and Res, P. C. (1998). Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. Immunol Rev *165*, 75-86.

Discussion

Le développement T précoce, réarrangement du locus du TCRδ

Lors du développement T, la cinétique ordonnée de réarrangement des différents loci de TCR et bien établie. Le locus du TCRδ est le premier à se réarranger suivi du locus TCRγ de façon quasi concomitante puis le locus TCRβ et enfin le locus du TCRα dont le réarrangement est bien plus tardif (Blom et al., 1998). Le TCRδ et le TCRβ sont les deux loci les plus complexes car ils possèdent des segments D à la différence des loci des TCRγ et TCRα. Le locus du TCRβ est bien ordonné ; un réarrangement Dβ-Jβ s'effectue en premier généralement sur les deux allèles suivi de l'utilisation d'un segment V pour effectuer un réarrangement complet VDJ. C'est ordonnement répond à la restriction B12-23 car aucun réarrangement V-J est observé bien que le règle 12/23 l'autorise. Le locus IgH subit un ordonnement comparable à celui observé pour le locus du TCRβ mais la restriction B12/23 ne s'applique pas à ce locus car les segments D contiennent de part et d'autre un 12RSS empêchant ainsi toute possibilité de réarrangement direct V-J. Il a été démontré chez la souris que l'ordonnement du TCRβ est régulé par un mécanisme de « RAG deposition » dépendant du facteur de transcription c-Fos (Wang et al., 2008). En effet, c-Fos se fixe sur le Dβ1/2-23RSS et recrute les protéines RAG1/2 pour induire le réarrangement Dβ-Jβ. Le site de fixation pour c-Fos sur le Dβ1/2-23RSS est conservé chez l'homme ce qui suggère un mécanisme de régulation identique.

Dans cette étude, nous avons démontré que les réarrangements précoces du locus TCRδ sont ordonnés et répondent à la restriction B12/23 jusqu'alors non suspectée pour ce locus. En effet, le réarrangement Dδ2-Dδ3 est le premier à s'effectuer, il s'ensuit l'utilisation du segment Jδ1 pour former un réarrangement Dδ2-Dδ3-Jδ1. Un réarrangement direct Dδ2-Jδ1 n'est jamais observé bien que la règle 12/23 le permet. Le réarrangement Dδ2-Dδ3 est finement régulé par le facteur de transcription RUNX1 en se fixant sur le Dδ2-23RSS et à la protéine RAG1.

Il semble de plus en plus évident que les protéines RAG n'agissent pas seules mais sont aidées de facteur de transcription pour apporter une régulation plus fine. En effet, après l'identification du facteur de transcription c-Fos et son action dans la régulation de l'ordonnement des réarrangements du TCRβ (Wang et al., 2008), nous identifions RUNX1 comme un facteur de transcription avec un rôle majeur dans la régulation de la recombinaison

précoce du TCRδ humain. De plus, le facteur CTCF intervient dans la régulation des réarrangements du locus IgH en permettant l'accès aux segments V, une fois le réarrangement D_H-J_H effectué (Guo et al., 2011) . Il joue comme un répresseur transcriptionnel en se liant à des éléments insulateur, ce qui a pour conséquence un blocage de la communication entre enhancers et promoteur. Enfin, la régulation du locus IgH dans les cellules B fait intervenir le facteur de transcription PAX5 qui, par sa liaison à RAG1, régule l'utilisation des segments V les plus distaux (Zhang et al., 2006).

RUNX1, RUNX2 et RUNX3 sont des facteurs de transcriptions de la famille RUNX. Ces membres se lient à l'ADN au niveau de séquences consensus avec le co-facteur CBFβ. Dans le système hématopoïétique RUNX1 est le membre le plus exprimé et est essentiel pour l'hématopoïèse définitive durant l'embryogenèse. En effet, l'inactivation de runx1 chez la souris entrave l'émergence des HSC. Chez la souris adulte, son inactivation altère la maturation lymphoïde et mégakaryocytaire (Growney et al., 2005; Ichikawa et al., 2004) et conduit à l'épuisement des HSC (Cai et al., 2011; Jacob et al., 2010). RUNX1 est considéré comme un régulateur important des réarrangements des TCRs, des sites de fixation pour RUNX1 sont identifiés au niveau des enhancers du TCRβ et du TCRα (Sleckman et al., 1997; Tripathi et al., 2002). Nos résultats mettent en évidence un nouveau rôle pour RUNX1 dans la régulation des réarrangements les plus précoces du TCRδ.

Des différences notables existent entre les thymopoïèses Humaine et Murine. Ces différences sont phénotypiques et également au niveau de l'organisation des loci des TCRs (**Figures 10-11**). En effet, le Dδ1-23RSS murin (équivalent du Dδ2-23RSS humain) ne présente pas de site de fixation pour RUNX1 suggérant une régulation différente entre l'Homme et la Souris pour le locus du TCRδ. De plus, les modèles murins présentant des KO de RUNX1 ne présentent pas de blocage de maturation au stade correspondant à ce réarrangement. Cela s'explique par deux raisons évidentes, la première par l'absence du site de fixation de RUNX1 et la seconde par une activation du transgène *Lck-Cre* ou *Mx1-cre* à un stade plus tardif DN2/DN3, stade auquel le réarrangement Dδ2-Dδ3 est déjà réalisé (Ichikawa et al., 2004; Taniuchi et al., 2002). Le KO de RUNX1 trop précoce étant létal, il est important de ne pas l'induire trop précocement (Wang et al., 1996). Le rôle de RUNX1 dans la régulation des réarrangements précoces du TCRδ semble donc être propre à l'Homme.

Le site de fixation pour RUNX1 5' TGTGGT 3' (5' ACCACA 3') contient un CAC, séquence minimum la plus conservé de l'heptamère. Il est donc probable d'identifier des sites consensus de fixation à RUNX1 au niveau des RSS des TCRs et des immunoglobulines. Cependant, une étude *in silico* pour ce site de fixation au niveau des segments et RSS D et J des loci du TCRβ et TCRδ ne permet pas d'identifier un tel site suggérant bien la spécificité au niveau du Dδ2-23RSS.

Le mécanisme que nous décrivons concerne uniquement les réarrangements très précoces du TCRδ. A ce jour la question reste ouverte concernant la régulation de l'utilisation des segments V et notamment le choix entre les segments V propres au TCRδ et ceux partagés avec le locus du TCRα. De plus, nous observons dans les thymocytes normaux des réarrangements Vδ2-Dδ3 qui surviennent aux stades précoces. Ces réarrangements ne possèdent pas de segments Dδ2 suggérant une régulation différente entre la formation de ces réarrangements et les réarrangements Dδ2-Dδ3-Jδ1. Une étude a démontré la possibilité d'effectuer des réarrangements incomplets de Dδ2-Dδ3 et Vδ2-Dδ3 dans une lignée non lymphoïde (BOSC23) mais pas de réarrangements du TCRβ (Langerak et al., 2001). Les réarrangements Dδ2-Dδ3 sont possibles avec le simple ajout de RAG1/2 dans la lignée alors que les réarrangements Vδ2-Dδ3 nécessitent l'ajout supplémentaire des protéines bHLH E47 ou HEB, suggérant un rôle possible de ces protéines dans la régulation de ce réarrangement.

De plus, les réarrangements Dδ2-Dδ3 présents dans cette lignée sont particuliers puisque la machinerie de recombinaison n'utilise pas les RSS normalement utilisés dans ce type de réarrangement (i.e.: Dδ2-23RSS et Dδ3-12RSS) mais les RSS « extérieurs » soit les Dδ2-12RSS et le Dδ3-23RSS, conduisant ainsi à la délétion des deux segments TCR (Langerak et al., 2001). Des expériences de recombinaison *in vitro* utilisant un vecteur avec le site de fixation muté pour RUNX1 (pD2^{m}D3J1) conduit à la même observation, c'est à dire l'utilisation des RSS « extérieurs » et ainsi la génération d'un épisome plus grand (CE Dδ2-Dδ3) (**Figure 36**). La lignée BOSC23 n'exprime pas de transcrit RUNX1, il serait donc intéressant de reproduire les expériences de Langerak et *al* en ajoutant RUNX1 et ensuite analyser les réarrangements Dδ2-Dδ3 dans l'idée de rétablir un réarrangement Dδ2-Dδ3 normal.

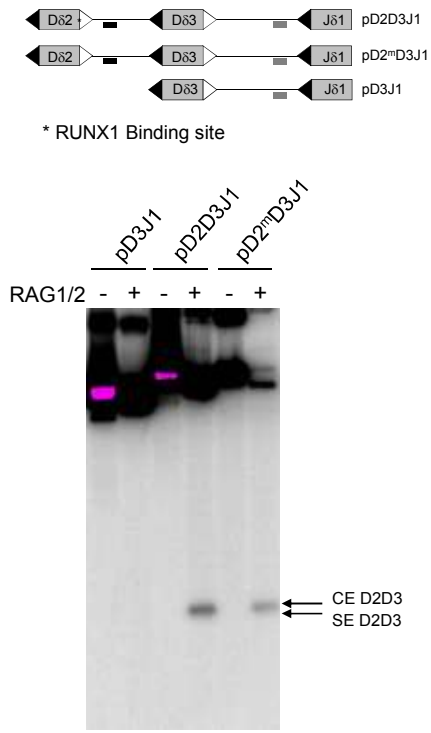


Figure 36 : Dérégulation du réarrangement Dδ2-Dδ3 en l'absence de RUNX1.
Le panel du haut représente les constructions utilisées pour la recombinaison *in vitro* avec les 23RSS et le 12 RSS représentés avec des triangles blancs et noirs respectivement. Les traits noirs et gris représentent les sondes radiomarquées. Le panel du bas montre l'autoradiographie de la recombinaison *in vitro.*

Des mutations de RUNX1 sont décrites dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) avec une fréquence (25%) beaucoup plus importante dans les LAM plus immature (LAM0) (Osato et al., 1999; Preudhomme et al., 2000). Il a été récemment décrit que les LAM à caryotype normal avec des mutations de RUNX1 sont souvent associées à la présence marqueurs lymphoïdes (Greif et al., 2012) suggérant un choix d'engagement T de la cellule mais une absence de différenciation définitive probablement dû à une anomalie empêchant cette différenciation. Cette anomalie pourrait être la mutation de RUNX1 et le blocage des réarrangements du TCRδ. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la réintroduction de RUNX1 dans ces cellules et d'analyser la reprise des réarrangements précoces du TCRδ.

L'oncogenèse des LAL-T

Les translocations avec le TCR

Les translocations chromosomiques impliquant les loci des TCRs est une marque des LAL-T (Aplan, 2006; Kuppers and Dalla-Favera, 2001). Notre étude a porté sur une cohorte de 280 patients et a identifiée 14% et 19% des cas présentent une translocation avec le TCRβ et le TCRδ, respectivement. Ces résultats sont en ligne avec l'étude de Cauwelier et *al* (Cauwelier et al., 2006). Notre étude a permis d'identifier quatre nouveaux partenaires impliqués dans les translocations (**Article 3-Figure 1**). La translocation à trois partenaires *TCRα/δ-GNAQ-TLX1* a vraisemblablement pour conséquence la dérégulation de TLX1 et non de GNAQ. La translocation *TCRβ-LEF1* induit une cassure du gène puisque le point de cassure se situe dans l'intron 3. De plus ce patient possède une délétion intragénique du locus de *LEF1*, mise en évidence par CGH Array (Array Comparative Genomic Hybridization). Ces deux anomalies conduisent à une inactivation totale de LEF1. Ces observations sont aussi en accord avec le possible rôle de « tumeur suppresseur » suggéré par Gutierrez et *al* pour LEF1 (Gutierrez et al., 2010). Le gène *IL2RB* a déjà été décrit impliqué dans une translocation dans une LAL-T mais avec un partenaire inconnu sur le chromosome 1 (Berger and Bernard, 2007). Enfin, la translocation *TCRα/δ-NKX2-4* avait déjà été suspectée par caryotype dans l'étude de Cauwelier et *al* (Cauwelier et al., 2006). Ce gène à homéodomaine appartient à la famille NKL dont les membres sont de plus en plus décrits dans les LAL-T. Les gènes *NKX2-1* et *NKX2-2* ont été décrit lors de translocation impliquant les loci IgH/TCR (Homminga et al., 2011). Une translocation impliquant les gènes *NKX2-5* et *BCL11B* a été observée dans une lignée pédiatrique de LAL-T (Nagel et al., 2003). L'ensemble de ces observations suggère que les membres de la famille NKL peuvent être impliqués dans le réseau oncogénique des LAL-T.

Mécanisme de la translocation

Deux principaux types de translocations impliquant les loci des TCRs sont décrits (**Figures 30-31**) (Marculescu et al., 2006).

Les translocations de type 2 se caractérisent par la présence de trois partenaires : deux segments TCR et d'un oncogène. La grande majorité des translocations identifiées dans notre étude présente cette configuration suggérant une translocation de type 2, c'est-à-dire non

médié par RAG. Cependant, de nombreux pseudo RSS sont présents dans le génome et parfois au niveau d'oncogène suggérant la possibilité de translocation de type 1. Un pseudo RSS a été décrit au niveau des point de cassures sur *TLX1* (Raghavan et al., 2001b). Une étude a testé fonctionnellement le pouvoir recombinogénique de pseudo RSS situés prêt d'oncogène et peu de ces pseudo RSS ont vraiment la possibilité d'être ciblés par les protéines RAG (Vanura et al., 2009), renforçant ainsi que peu de translocation survenant dans les LAL-T sont de type 1.

Lors des translocations de type 2, l'origine de la cassure double brins sur l'oncogène n'est pas connue. Certaines hypothèses ont été formulées comme la présence d'ADN non B, tel que l'ADN Z, qui est une double hélice gauche à la différence de l'ADN B qui tourne à droite, (Raghavan et al., 2004) ou la présence d'îlots CpG essentiellement lors des translocations dans les cellules B (Tsai et al., 2008). Le mécanisme de cassure au niveau de l'oncogène partenaire reste à identifier, il est fort possible que plusieurs causes soient à l'origine de la cassure et dépendent du contexte cellulaire.

Rôle de RUNX1 dans la survenue de la translocation

Le séquençage des points de cassure des translocations TCRα/δ indique que la translocation s'effectue dans la grande majorité des cas lors d'un réarrangement utilisant les segments Dδ2-Dδ3 (**Article 2-Figure S3, Article 3-Figure S6**). Dans l'**article 1**, nous montrons le rôle majeur de RUNX1 dans la régulation du réarrangement précoce Dδ2-Dδ3. De ce fait, il est envisageable que RUNX1 intervienne dans la survenue de ces translocations. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons séquencé l'ensemble du gène RUNX1 et analyser les pertes génomiques, par CGH Array, au niveau du locus RUNX1 sur une série de LAL-T présentant ou non des translocations TCR. Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence aucun lien autre le rôle physiologique de RUNX1 sur le réarrangement Dδ2-Dδ3 et la forte fréquence de survenue de translocation utilisant ces segments TCR.

Le taux de protéines RAG1/2 est très faible lors du réarrangement Dδ2-Dδ3, le rôle d' « aimant » joué par RUNX1 pour faciliter les réarrangements physiologiques pourrait avoir en contrepartie la création de nombreuses cassures doubles brins ce qui favoriserait alors des erreurs de recombinaison V(D)J et l'activation oncogénique.

Découplage entre la survenue de la translocation et l'activation de l'oncogène

Les translocations que nous avons clonées montrent, pour la grande majorité des cas, une utilisation des segments Dδ2, Dδ3 et Jδ1 lors des translocations impliquant le TCRδ et les segments Dβ et Jβ lors des translocations impliquant le TCRβ. Les réarrangements utilisant ces segments sont précoces et s'effectuent au stade DN. Cependant, les LAL-T présentant ces translocations sont bloquées à un stade plus tardif (cortical ou pré-αβ), suggérant un découplage entre l'activation de l'oncogène et l'arrêt de maturation observé dans la LAL-T. Cette observation suggère qu'au moment de la translocation la cellule n'acquière pas un avantage prolifératif et/ou d'effet anti-apoptotique et que l'effet de l'oncogène ne se manifeste qu'au stade d'arrêt de maturation observé. Ce phénomène que nous avons identifié pour la première fois dans les LAL-T a été bien décrit pour le lymphome folliculaire et la translocation *Igh-Bcl2*. En effet, la translocation survient lors d'un réarrangement D_H-J_H dans la moelle osseuse. Cependant, Bcl2 ne confère aucun avantage à la cellule tant que celle-ci n'a pas gagnée le centre germinatif, lieu où Bcl2 est normalement éteint (Kuppers and Dalla-Favera, 2001; Roulland et al., 2011). Il a été observé dans un modèle murin *Notch1,* dans lequel une surexpression intracellulaire de Notch1 (ICN1) est induite dans des cellules Lin^- de moelle osseuse, la génération de cellules DP $TCR\alpha\beta^+$ avec un TCRβ monoclonal et un TCRα polyclonal ce qui suggère un découplage (Li et al., 2008).

TLX1 est l'oncogène le plus fréquemment dérégulé dans les LAL-T, essentiellement de l'adulte (20%) (Ferrando et al., 2004). TLX1 fait partie de la famille des oncogènes de type A, qui regroupe les oncogènes responsables d'un stade d'arrêt de maturation (De Keersmaecker et al., 2005; Van Vlierberghe et al., 2008a).

Les translocations *TCR-TLX1* surviennent également à des stades très précoces lors des réarrangements incomplets des loci TCRδ et TCRβ. Néanmoins, ces LAL-T sont bloquées autour de la β-sélection (Asnafi et al., 2004; Ferrando et al., 2002a; van Grotel et al., 2006). Nous avons montré que les LAL-T TLX1/3 positives présentent un réarrangement complet du TCRβ mais pas de réarrangement du TCRα (**Article 2-Tableau 1**). Cette absence de réarrangement du TCRα s'explique par l'action répressive des protéines TLX1/3 sur l'Eα (**Article 2-Figure 2**) *via* ETS1 (**Article 2-Figure 5**). Ainsi, nous décortiquons ici, le découplage entre l'activation de l'oncogène et son effet, dans ce cas plus tardif.

Différence dans le mécanisme d'activation de l'oncogène en fonction du TCR impliqué

Lors d'une translocation entre un oncogène et un TCR, il est classiquement admis que l'enhancer du TCR induit la surexpression de l'oncogène.

L'étude de la configuration des translocations que nous avons clonées a permis de mettre en évidence deux configurations distinctes et ainsi deux mécanismes de surexpression. En effet, toutes les translocations TCRβ-oncogènes présentent une configuration classique c'est à dire l'enhancer beta et l'oncogène sur le même dérivatif ce qui en accord avec une dérégulation classique (**Article 2-Figure 7A, article 3-Figure 2**). En revanche, les configurations sont plus hétérogènes quand le TCRα/δ est impliqué dans la translocation (**Article 2-Figure 7, Article 3-Figure 3**). De rares cas présentent une configuration classique mais la majorité présente une configuration avec l'Eα et l'oncogène sur deux dérivatifs différents.

A titre d'exemple ; la majorité des translocations *TCRα/δ-LMO2* sont dans une configuration non classique. Dans ces cas, la surexpression de LMO2 est induite par la délétion d'un élément régulateur négatif (NRE) situé normalement en amont du promoteur de LMO2 (Dik et al., 2007). Il est probable qu'un mécanisme similaire soit impliqué dans la surexpression de l'oncogène dans les cas de translocations TCRα/δ-oncogènes en l'absence de l'Eα sur le dérivatif portant l'oncogène.

Que la surexpression de l'oncogène soit médiée par l'Eα, l'Eβ, par la délétion d'un NRE ou par des mécanismes encore non décrit, il est important de noter que le niveau d'expression de l'oncogène est relativement identique quel que soit le mode de dérégulation (**Article 3-Figure 4C**). Cette observation laisse suggérer la nécessité d'un niveau minimum de surexpression de l'oncogène pour une sélection clonale.

Les translocations *TCRα/δ-TLX1* sont particulières car les cassures doubles brins sur TLX1 s'effectuent dans l'exon 1 ce qui a pour conséquence le positionnement du promoteur de *TLX1* et le gène *TLX1* sur deux dérivatifs différents, empêchant ainsi toute expression de TLX1 par son propre promoteur. En effet, nous avons mis en évidence un transcrit de fusion entre le TCRδ et TLX1 (**Article 2-Figure 7B**). De plus, une analyse par FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) dans des souris $RAG2^{-/-}$, a permis d'identifier deux régions activatrices en amont du segment Dδ2 (**Figure 37**). Ces deux régions ont possiblement un rôle dans la surexpression de TLX1. Ce genre de région promotrice en amont d'un segment D a précédemment été décrite en amont du segment Dδ2

chez la souris, l'équivalent du segments Dδ3 humain (Carabana et al., 2005) renforçant le rôle que ces deux régions pourraient avoir dans la dérégulation de TLX1.

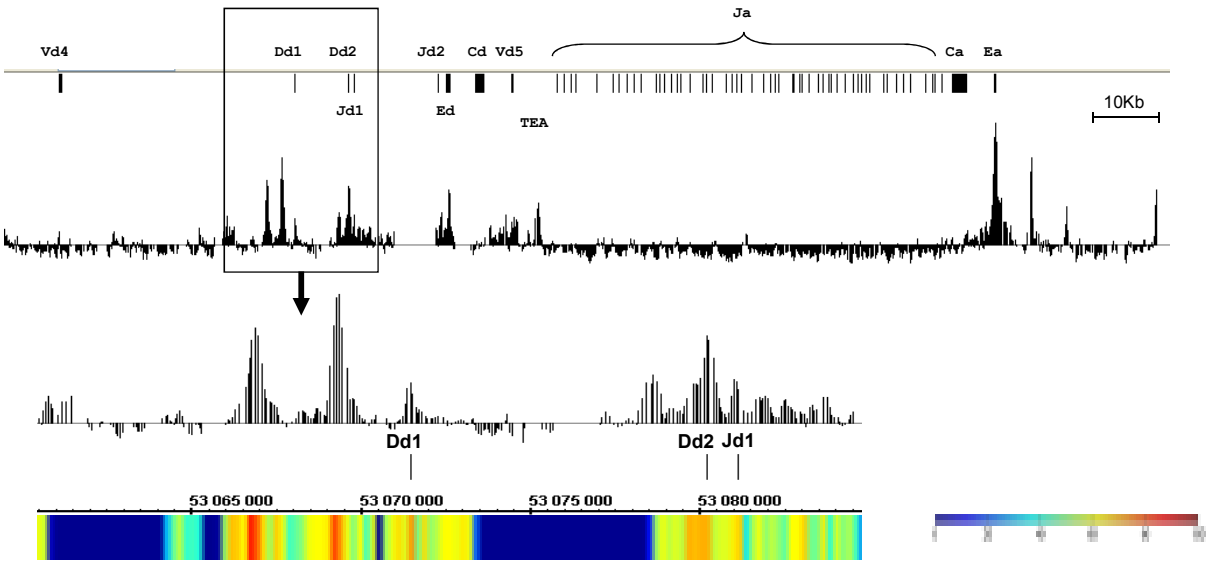


Figure 37 : Enrichissement FAIRE du locus TCRδ murin.
Le panel du haut représente la moyenne des log2 ratios sur le locus du TCRα/δ. Le panel du bas représente un zoom sur la région de 24kb autour des segments D et J. Le colorogramme représente le degré d'homologie de séquence entre l'homme et la souris.

Autosélection du clone "pré-leucémique" en fonction de la configuration de la translocation

Les translocations *TCRa/δ-TLX1* observées dans les LAL-T ne sont jamais en configuration classique (i.e.: *TLX1* et Eα sur le même dérivatif). Pourtant, cela est faisable puisque des translocations de ce type sont identifiées dans le thymus sain (**Article 2-Figure 7C**). Cela suggère que les clones portant ce type de translocation ne sont pas sélectionnés. De plus, il n'est pas rare d'identifier des translocations dans le thymus comme cela a déjà été démontré dans les cas de translocations *TCRβ-TAL2* et *TCRα/δ-LMO2* (Dik et al., 2007; Marculescu et al., 2003).

Nous proposons donc le modèle suivant : les translocations *TCR-TLX1* identifiées dans les LAL-T induisent un blocage de maturation et ainsi la leucemogenèse alors que les translocations identifiées dans le thymus ne sont jamais sélectionnées en raison d'une boucle d'auto-extinction Eα-TLX1 dans les clones pré-leucémiques (**Article 2-Figure 7D**). Dans ce dernier modèle, il est nécessaire que la protéine TLX1 soit produite dans un premier temps

d'où une inhibition des réarrangements du TCRα et le blocage de maturation. Néanmoins, ces cellules ne deviennent pas leucémiques impliquant qu'un niveau d'expression soutenue de TLX1 est requis pour la transformation leucémique.

L'oncogène *TLX3* est très peu dérégulé par des translocations TCR, mais les rares cas rapportés présentent une configuration avec l'Eα et *TLX3* sur deux dérivatifs différents (Hansen-Hagge et al., 2002), suggérant une surexpression de TLX3 indépendant de l'Eα. De plus, aucune translocation *TCRβ-TLX3* n'a été décrite. Cette observation amène à se poser la question de l'éventuel rôle répresseur que TLX3 pourrait avoir sur l'Eβ, bien que TLX1 ne possède pas d'effet répressif sur l'Eβ.

Il est bien établi que malgré leur grande homologie de structure, ces deux oncogènes possèdent de grandes différences. En effet, leurs expressions et fonctions physiologiques divergent spatialement et temporellement dans l'organisme (Voir paragraphe III.4.2). Bien que ces deux oncogènes soient dérégulés dans la même pathologie, et présentent un phénotype de LAL-T avec un arrêt de maturation au stade cortical ou pré-αβ, les conséquences en terme de pronostic de ces deux oncogènes sont différents. En effet, si tous les auteurs rapportent un impact pronostiques favorable de la surexpression de TLX1, les LAL-T TLX3 ont un comportement clinique bien différent avec un pronostic neutre voir défavorable selon les études (Attarbaschi et al., 2009; Ballerini et al., 2002; Bergeron et al., 2007; Ferrando et al., 2004).

Rôle oncogénique de TLX1 et perspective thérapeutique

En ligne avec le rôle majeur du couple ETS1/TLX1/3 sur la répression de l'Eα, la downmodulation de TLX1 par Sh-RNA dans une lignée TLX1 positive (SIL-ALL) induit une forte apoptose et une différenciation avec l'expression du transcrit du TCRα, le réarrangement du locus du TCRα et l'expression à la surface d'un TCRαβ. Cela implique que l'expression continue de TLX1 est nécessaire au maintien des cellules leucémiques et au blocage de maturation. Ainsi, et de manière remarquable, l'expression d'un TCRαβ exogène en présence de TLX1 conduit aux mêmes effets, probablement par le contournement de la répression de l'Eα médié par le couple ETS1/TLX1. Il est fort à parier que les mêmes effets seront observés lors de l'inactivation de TLX3 dans une lignée TLX3 positive (DND41).

Lors de l'expression d'un TCRαβ exogène, l'apoptose n'est observée qu'en condition de culture sur stroma OP9DL1 laissant suggérer un rôle de DL1, le ligand de NOTCH1 ou du

stroma en lui-même dans l'induction de l'apoptose. L'expression du pré-TCR et du TCRαβ est finement régulé lors de la maturation thymique. Les fonctions du pré-TCR et du TCR ne sont pas interchangeable, puisque l'expression du TCRα, sans expression du pTα, au stade DN3 provoque des défauts importants lors de de maturation (von Boehmer and Fehling, 1997). L'expression d'un TCRαβ dans une cellule en cours de β-sélection n'est pas physiologique, il est donc possible que les cellules meurent suite à une « sélection négative », car elles reçoivent signal TCR fort à un moment inapproprié de la différenciation thymique.

L'ensemble de ces observations ont des conséquences importantes à la fois sur l'objectif de thérapies ciblées dans le sous-groupe des LAL-T TLX positive et sur le rôle de l'expression aberrante d'un TCR dans l'oncogenèse lymphoïde T.

Références bibliographiques

Aifantis, I., Raetz, E., and Buonamici, S. (2008). Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. Nat Rev Immunol *8*, 380-390.

Aleman, K., Noordzij, J.G., de Groot, R., van Dongen, J.J., and Hartwig, N.G. (2001). Reviewing Omenn syndrome. European journal of pediatrics *160*, 718-725.

Alexandre, D., Chuchana, P., Roncarolo, M.G., Yssel, H., Spits, H., Lefranc, G., and Lefranc, M.P. (1991). Reciprocal hybrid joints demonstrate successive V-J rearrangements on the same chromosome in the human TCR gamma locus. Int Immunol *3*, 973-982.

Anderson, M.K., Hernandez-Hoyos, G., Diamond, R.A., and Rothenberg, E.V. (1999). Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. Development *126*, 3131-3148.

Andrew, D., and Aspinall, R. (2001). Il-7 and not stem cell factor reverses both the increase in apoptosis and the decline in thymopoiesis seen in aged mice. J Immunol *166*, 1524-1530.

Aplan, P.D. (2006). Causes of oncogenic chromosomal translocation. Trends Genet *22*, 46-55.

Aplan, P.D., Lombardi, D.P., Ginsberg, A.M., Cossman, J., Bertness, V.L., and Kirsch, I.R. (1990). Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. Science (New York, NY *250*, 1426-1429.

Aplan, P.D., Lombardi, D.P., Reaman, G.H., Sather, H.N., Hammond, G.D., and Kirsch, I.R. (1992). Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood *79*, 1327-1333.

Arai, Y., Hatano, M., and Tokuhisa, T. (1997). A negative regulatory region of the murine Hox11 gene. Gene *193*, 73-79.

Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. Nature *362*, 761-763.

Argiropoulos, B., and Humphries, R.K. (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. Oncogene *26*, 6766-6776.

Armstrong, S.A., and Look, A.T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol *23*, 6306-6315.

Asnafi, V., Beldjord, K., Boulanger, E., Comba, B., Le Tutour, P., Estienne, M.H., Davi, F., Landman-Parker, J., Quartier, P., Buzyn, A*., et al.* (2003a). Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. Blood *101*, 2693-2703.

Asnafi, V., Beldjord, K., Libura, M., Villarese, P., Millien, C., Ballerini, P., Kuhlein, E., Lafage-Pochitaloff, M., Delabesse, E., Bernard, O*., et al.* (2004). Age-related phenotypic and oncogenic differences in T-cell acute lymphoblastic leukemias may reflect thymic atrophy. Blood *104*, 4173-4180.

Asnafi, V., Buzyn, A., Le Noir, S., Baleydier, F., Simon, A., Beldjord, K., Reman, O., Witz, F., Fagot, T., Tavernier, E*., et al.* (2009a). NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. Blood *113*, 3918-3924.

Asnafi, V., Le Noir, S., Lhermitte, L., Gardin, C., Legrand, F., Vallantin, X., Malfuson, J.V., Ifrah, N., Dombret, H., and Macintyre, E. (2009b). JAK1 mutations are not frequent events in adult T-ALL: a GRAALL study. Br J Haematol *148*, 178-179.

Asnafi, V., Radford-Weiss, I., Dastugue, N., Bayle, C., Leboeuf, D., Charrin, C., Garand, R., Lafage-Pochitaloff, M., Delabesse, E., Buzyn, A*., et al.* (2003b). CALM-AF10 is a common fusion transcript in T-ALL and is specific to the TCRgammadelta lineage. Blood *102*, 1000-1006.

Aspinall, R., and Andrew, D. (2000). Thymic involution in aging. J Clin Immunol *20*, 250-256.

Aster, J.C., Pear, W.S., and Blacklow, S.C. (2008). Notch signaling in leukemia. Annu Rev Pathol *3*, 587-613.

Attarbaschi, A., Pisecker, M., Inthal, A., Mann, G., Janousek, D., Dworzak, M., Potschger, U., Ullmann, R., Schrappe, M., Gadner, H.*, et al.* (2009). Prognostic relevance of TLX3 (HOX11L2) expression in childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia treated with Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) protocols containing early and late re-intensification elements. Br J Haematol *148*, 293-300.

Baer, R., Chen, K.C., Smith, S.D., and Rabbitts, T.H. (1985). Fusion of an immunoglobulin variable gene and a T cell receptor constant gene in the chromosome 14 inversion associated with T cell tumors. Cell *43*, 705-713.

Bain, G., Romanow, W.J., Albers, K., Havran, W.L., and Murre, C. (1999). Positive and negative regulation of V(D)J recombination by the E2A proteins. The Journal of experimental medicine *189*, 289-300.

Balgobind, B.V., Van Vlierberghe, P., van den Ouweland, A.M., Beverloo, H.B., Terlouw-Kromosoeto, J.N., van Wering, E.R., Reinhardt, D., Horstmann, M., Kaspers, G.J., Pieters, R.*, et al.* (2008). Leukemia-associated NF1 inactivation in patients with pediatric T-ALL and AML lacking evidence for neurofibromatosis. Blood *111*, 4322-4328.

Ballerini, P., Blaise, A., Busson-Le Coniat, M., Su, X.Y., Zucman-Rossi, J., Adam, M., van den Akker, J., Perot, C., Pellegrino, B., Landman-Parker, J.*, et al.* (2002). HOX11L2 expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. Blood *100*, 991-997.

Barndt, R.J., Dai, M., and Zhuang, Y. (2000). Functions of E2A-HEB heterodimers in T-cell development revealed by a dominant negative mutation of HEB. Mol Cell Biol *20*, 6677-6685.

Barnes, D.E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A., and Lindahl, T. (1998). Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. Curr Biol *8*, 1395-1398.

Barreto, V., Marques, R., and Demengeot, J. (2001). Early death and severe lymphopenia caused by ubiquitous expression of the Rag1 and Rag2 genes in mice. Eur J Immunol *31*, 3763-3772.

Bash, R.O., Crist, W.M., Shuster, J.J., Link, M.P., Amylon, M., Pullen, J., Carroll, A.J., Buchanan, G.R., Smith, R.G., and Baer, R. (1993). Clinical features and outcome of T-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood with respect to alterations at the TAL1 locus: a Pediatric Oncology Group study. Blood *81*, 2110-2117.

Bash, R.O., Hall, S., Timmons, C.F., Crist, W.M., Amylon, M., Smith, R.G., and Baer, R. (1995). Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. Blood *86*, 666-676.

Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C., and Willemze, R. (2004). Adult acute lymphoblastic leukaemia. Crit Rev Oncol Hematol *50*, 223-261.

Bassing, C.H., Alt, F.W., Hughes, M.M., D'Auteuil, M., Wehrly, T.D., Woodman, B.B., Gartner, F., White, J.M., Davidson, L., and Sleckman, B.P. (2000). Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. Nature *405*, 583-586.

Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. Cell *109 Suppl*, S45-55.

Bassing, C.H., Tillman, R.E., Woodman, B.B., Canty, D., Monroe, R.J., Sleckman, B.P., and Alt, F.W. (2003). T cell receptor (TCR) alpha/delta locus enhancer identity and position are critical for the assembly of TCR delta and alpha variable region genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *100*, 2598-2603.

Baumann, M., Mamais, A., McBlane, F., Xiao, H., and Boyes, J. (2003). Regulation of V(D)J recombination by nucleosome positioning at recombination signal sequences. Embo J *22*, 5197-5207.

Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., and van't Veer, M.B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia *9*, 1783-1786.

Berger, R., and Bernard, O.A. (2007). Interleukin-2 receptor beta chain locus rearrangement in a T-cell acute lymphoblastic leukemia. Pathologie-biologie *55*, 56-58.

Bergeron, J., Clappier, E., Cauwelier, B., Dastugue, N., Millien, C., Delabesse, E., Beldjord, K., Speleman, F., Soulier, J., Macintyre, E.*, et al.* (2006). HOXA cluster deregulation in T-ALL associated with both a TCRD-HOXA and a CALM-AF10 chromosomal translocation. Leukemia *20*, 1184-1187.

Bergeron, J., Clappier, E., Radford, I., Buzyn, A., Millien, C., Soler, G., Ballerini, P., Thomas, X., Soulier, J., Dombret, H.*, et al.* (2007). Prognostic and oncogenic relevance of TLX1/HOX11 expression level in T-ALLs. Blood *110*, 2324-2330.

Bergman, Y., Fisher, A., and Cedar, H. (2003). Epigenetic mechanisms that regulate antigen receptor gene expression. Curr Opin Immunol *15*, 176-181.

Bernard, O.A., Busson-LeConiat, M., Ballerini, P., Mauchauffe, M., Della Valle, V., Monni, R., Nguyen Khac, F., Mercher, T., Penard-Lacronique, V., Pasturaud, P.*, et al.* (2001). A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. Leukemia *15*, 1495-1504.

Bijl, J., van Oostveen, J.W., Kreike, M., Rieger, E., van der Raaij-Helmer, L.M., Walboomers, J.M., Corte, G., Boncinelli, E., van den Brule, A.J., and Meijer, C.J. (1996). Expression of HOXC4, HOXC5, and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue. Blood *87*, 1737-1745.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev *16*, 6-21.

Blom, B., Heemskerk, M.H., Verschuren, M.C., van Dongen, J.J., Stegmann, A.P., Bakker, A.Q., Couwenberg, F., Res, P.C., and Spits, H. (1999a). Disruption of alpha beta but not of gamma delta T cell development by overexpression of the helix-loop-helix protein Id3 in committed T cell progenitors. Embo J *18*, 2793-2802.

Blom, B., Res, P.C., and Spits, H. (1998). T cell precursors in man and mice. Crit Rev Immunol *18*, 371-388.

Blom, B., Verschuren, M.C., Heemskerk, M.H., Bakker, A.Q., van Gastel-Mol, E.J., Wolvers-Tettero, I.L., van Dongen, J.J., and Spits, H. (1999b). TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. Blood *93*, 3033-3043.

Bockman, D.E. (1997). Development of the thymus. Microsc Res Tech *38*, 209-215.

Bogue, M.A., Jhappan, C., and Roth, D.B. (1998). Analysis of variable (diversity) joining recombination in DNAdependent protein kinase (DNA-PK)-deficient mice reveals DNA-PK-independent pathways for both signal and coding joint formation. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 15559-15564.

Bories, J.C., Willerford, D.M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stehelin, D., and Alt, F.W. (1995). Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. Nature *377*, 635-638.

Bosma, M.J., and Carroll, A.M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. Annu Rev Immunol *9*, 323-350.

Boulukos, K.E., Pognonec, P., Rabault, B., Begue, A., and Ghysdael, J. (1989). Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro. Mol Cell Biol *9*, 5718-5721.

Brake, R.L., Kees, U.R., and Watt, P.M. (1998). Multiple negative elements contribute to repression of the HOX11 proto-oncogene. Oncogene *17*, 1787-1795.

Brandt, V.L., and Roth, D.B. (2004). V(D)J recombination: how to tame a transposase. Immunol Rev *200*, 249-260.

Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. Cell *100*, 391-398.

Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M.C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J.L., Hufnagel, M., le Deist, F.*, et al.* (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. Cell *124*, 287-299.

Buffler, P.A., Kwan, M.L., Reynolds, P., and Urayama, K.Y. (2005). Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. Cancer Invest *23*, 60-75.

Cai, X., Gaudet, J.J., Mangan, J.K., Chen, M.J., De Obaldia, M.E., Oo, Z., Ernst, P., and Speck, N.A. (2011). Runx1 loss minimally impacts long-term hematopoietic stem cells. PLoS One *6*, e28430.

Carabana, J., Ortigoza, E., and Krangel, M.S. (2005). Regulation of the murine Ddelta2 promoter by upstream stimulatory factor 1, Runx1, and c-Myb. J Immunol *174*, 4144-4152.

Cauwelier, B., Dastugue, N., Cools, J., Poppe, B., Herens, C., De Paepe, A., Hagemeijer, A., and Speleman, F. (2006). Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRbeta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes. Leukemia *20*, 1238-1244.

Cayuela, J.M., Madani, A., Sanhes, L., Stern, M.H., and Sigaux, F. (1996). Multiple tumor-suppressor gene 1 inactivation is the most frequent genetic alteration in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood *87*, 2180-2186.

Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. Nature cell biology *5*, 675-679.

Chan, D.W., Chen, B.P., Prithivirajsingh, S., Kurimasa, A., Story, M.D., Qin, J., and Chen, D.J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. Genes Dev *16*, 2333-2338.

Chen, L., Trujillo, K., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2000). Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. J Biol Chem *275*, 26196-26205.

Chervinsky, D.S., Zhao, X.F., Lam, D.H., Ellsworth, M., Gross, K.W., and Aplan, P.D. (1999). Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice. Mol Cell Biol *19*, 5025-5035.

Chetty, R., Pulford, K., Jones, M., Mathieu-Mahul, D., Close, P., Hussein, S., Pallesen, G., Ralfkiaer, E., Stein, H., Gatter, K.*, et al.* (1995). SCL/Tal-1 expression in T-acute lymphoblastic leukemia: an immunohistochemical and genotypic study. Hum Pathol *26*, 994-998.

Chien, Y.H., Iwashima, M., Wettstein, D.A., Kaplan, K.B., Elliott, J.F., Born, W., and Davis, M.M. (1987). T-cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes. Nature *330*, 722-727.

Ciofani, M., Knowles, G.C., Wiest, D.L., von Boehmer, H., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2006). Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. Immunity *25*, 105-116.

Clappier, E., Cuccuini, W., Cayuela, J.M., Vecchione, D., Baruchel, A., Dombret, H., Sigaux, F., and Soulier, J. (2006). Cyclin D2 dysregulation by chromosomal translocations to TCR loci in T-cell acute lymphoblastic leukemias. Leukemia *20*, 82-86.

Clappier, E., Cuccuini, W., Kalota, A., Crinquette, A., Cayuela, J.M., Dik, W.A., Langerak, A.W., Montpellier, B., Nadel, B., Walrafen, P.*, et al.* (2007). The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. Blood *110*, 1251-1261.

Cobb, R.M., Oestreich, K.J., Osipovich, O.A., and Oltz, E.M. (2006). Accessibility control of V(D)J recombination. Advances in immunology *91*, 45-109.

Condorelli, G.L., Facchiano, F., Valtieri, M., Proietti, E., Vitelli, L., Lulli, V., Huebner, K., Peschle, C., and Croce, C.M. (1996). T-cell-directed TAL-1 expression induces T-cell malignancies in transgenic mice. Cancer research *56*, 5113-5119.

Costantini, S., Woodbine, L., Andreoli, L., Jeggo, P.A., and Vindigni, A. (2007). Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. DNA Repair (Amst) *6*, 712-722.

Coustan-Smith, E., Mullighan, C.G., Onciu, M., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Pei, D., Cheng, C., Su, X., Rubnitz, J.E., Basso, G.*, et al.* (2009). Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. Lancet Oncol *10*, 147-156.

Cowell, L.G., Davila, M., Yang, K., Kepler, T.B., and Kelsoe, G. (2003). Prospective estimation of recombination signal efficiency and identification of functional cryptic signals in the genome by statistical modeling. The Journal of experimental medicine *197*, 207-220.

Cuomo, C.A., Mundy, C.L., and Oettinger, M.A. (1996). DNA sequence and structure requirements for cleavage of V(D)J recombination signal sequences. Mol Cell Biol *16*, 5683-5690.

Curry, J.D., Geier, J.K., and Schlissel, M.S. (2005). Single-strand recombination signal sequence nicks in vivo: evidence for a capture model of synapsis. Nat Immunol *6*, 1272-1279.

Dadi, S., Le Noir, S., Payet-Bornet, D., Lhermitte, L., Zacarias-Cabeza, J., Bergeron, J., Villarese, P., Vachez, E., Dik, W.A., Millien, C.*, et al.* (2012). TLX Homeodomain Oncogenes Mediate T Cell Maturation Arrest in T-ALL via Interaction with ETS1 and Suppression of TCRalpha Gene Expression. Cancer Cell *21*, 563-576.

Dai, Y., Kysela, B., Hanakahi, L.A., Manolis, K., Riballo, E., Stumm, M., Harville, T.O., West, S.C., Oettinger, M.A., and Jeggo, P.A. (2003). Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *100*, 2462-2467.

Dalloul, A.H., Patry, C., Salamero, J., Canque, B., Grassi, F., and Schmitt, C. (1999). Functional and phenotypic analysis of thymic CD34+CD1a- progenitor-derived dendritic cells: predominance of CD1a+ differentiation pathway. J Immunol *162*, 5821-5828.

Davodeau, F., Peyrat, M.A., Gaschet, J., Hallet, M.M., Triebel, F., Vie, H., Kabelitz, D., and Bonneville, M. (1994). Surface expression of functional T cell receptor chains formed by interlocus recombination on human T lymphocytes. The Journal of experimental medicine *180*, 1685-1691.

De Keersmaecker, K., Marynen, P., and Cools, J. (2005). Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Haematologica *90*, 1116-1127.

Del Porto, P., Bruno, L., Mattei, M.G., von Boehmer, H., and Saint-Ruf, C. (1995). Cloning and comparative analysis of the human pre-T-cell receptor alpha-chain gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 12105-12109.

Delabesse, E., Bernard, M., Meyer, V., Smit, L., Pulford, K., Cayuela, J.M., Ritz, J., Bourquelot, P., Strominger, J.L., Valensi, F.*, et al.* (1998). TAL1 expression does not occur in the majority of T-ALL blasts. Br J Haematol *102*, 449-457.

Demengeot, J., Oltz, E.M., and Alt, F.W. (1995). Promotion of V(D)J recombinational accessibility by the intronic E kappa element: role of the kappa B motif. International immunology *7*, 1995-2003.

Dik, W.A., Brahim, W., Braun, C., Asnafi, V., Dastugue, N., Bernard, O.A., van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Macintyre, E.A., and Delabesse, E. (2005a). CALM-AF10+ T-ALL expression profiles are characterized by overexpression of HOXA and BMI1 oncogenes. Leukemia *19*, 1948-1957.

Dik, W.A., Nadel, B., Przybylski, G.K., Asnafi, V., Grabarczyk, P., Navarro, J.M., Verhaaf, B., Schmidt, C.A., Macintyre, E.A., van Dongen, J.J.*, et al.* (2007). Different chromosomal breakpoints impact the level of LMO2 expression in T-ALL. Blood *110*, 388-392.

Dik, W.A., Pike-Overzet, K., Weerkamp, F., de Ridder, D., de Haas, E.F., Baert, M.R., van der Spek, P., Koster, E.E., Reinders, M.J., van Dongen, J.J*., et al.* (2005b). New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. J Exp Med *201*, 1715-1723.

Ding, Q., Reddy, Y.V., Wang, W., Woods, T., Douglas, P., Ramsden, D.A., Lees-Miller, S.P., and Meek, K. (2003). Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. Mol Cell Biol *23*, 5836-5848.

Dittmer, J. (2003). The biology of the Ets1 proto-oncogene. Mol Cancer *2*, 29.

Drouet, J., Delteil, C., Lefrancois, J., Concannon, P., Salles, B., and Calsou, P. (2005). DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. J Biol Chem *280*, 7060-7069.

Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. Advances in immunology *86*, 43-112.

Dudley, E.C., Girardi, M., Owen, M.J., and Hayday, A.C. (1995). Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor. Curr Biol *5*, 659-669.

Duverger, O., and Morasso, M.I. (2008). Role of homeobox genes in the patterning, specification, and differentiation of ectodermal appendages in mammals. J Cell Physiol *216*, 337-346.

Eastman, Q.M., Leu, T.M., and Schatz, D.G. (1996). Initiation of V(D)J recombination in vitro obeying the 12/23 rule. Nature *380*, 85-88.

Egawa, T., Tillman, R.E., Naoe, Y., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (2007). The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. J Exp Med *204*, 1945-1957.

Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., and Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell *66*, 649-661.

Emambokus, N., Vegiopoulos, A., Harman, B., Jenkinson, E., Anderson, G., and Frampton, J. (2003). Progression through key stages of haemopoiesis is dependent on distinct threshold levels of c-Myb. Embo J *22*, 4478-4488.

Engel, I., and Murre, C. (2001). The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. Nat Rev Immunol *1*, 193-199.

Engler, P., Haasch, D., Pinkert, C.A., Doglio, L., Glymour, M., Brinster, R., and Storb, U. (1991). A strain-specific modifier on mouse chromosome 4 controls the methylation of independent transgene loci. Cell *65*, 939-947.

Ferrando, A., Neuberg, D., Dodge, R.K., Paietta, E., Larson, R.A., Wiernik, P.H., Rowe, J.M., Bloomfield, C.D., Caligiuri, M.A., and Look, A.T. (2002a). Adult T-Cell ALL Patients Whose Lymphoblasts Express the HOX11 Oncogene Have an Excellent Prognosis When Treated with Chemotherapy and Are Not Candidates for Allogeneic Bone Marrow Transplantaton in First Remission. Blood *100*, 154a.

Ferrando, A.A., Armstrong, S.A., Neuberg, D.S., Sallan, S.E., Silverman, L.B., Korsmeyer, S.J., and Look, A.T. (2003). Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. Blood *102*, 262-268. Epub 2003 Mar 2013.

Ferrando, A.A., Neuberg, D.S., Dodge, R.K., Paietta, E., Larson, R.A., Wiernik, P.H., Rowe, J.M., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., and Look, A.T. (2004). Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Lancet *363*, 535-536.

Ferrando, A.A., Neuberg, D.S., Staunton, J., Loh, M.L., Huard, C., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Pui, C.H., Downing, J.R., Gilliland, D.G.*, et al.* (2002b). Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell *1*, 75-87.

Fisch, P., Boehm, T., Lavenir, I., Larson, T., Arno, J., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1992). T-cell acute lymphoblastic lymphoma induced in transgenic mice by the RBTN1 and RBTN2 LIM-domain genes. Oncogene *7*, 2389-2397.

Flex, E., Petrangeli, V., Stella, L., Chiaretti, S., Hornakova, T., Knoops, L., Ariola, C., Fodale, V., Clappier, E., Paoloni, F.*, et al.* (2008). Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. The Journal of experimental medicine *205*, 751-758.

Foss, D.L., Donskoy, E., and Goldschneider, I. (2001). The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. The Journal of experimental medicine *193*, 365-374.

Franchini, D.M., Benoukraf, T., Jaeger, S., Ferrier, P., and Payet-Bornet, D. (2009). Initiation of V(D)J recombination by Dbeta-associated recombination signal sequences: a critical control point in TCRbeta gene assembly. PLoS One *4*, e4575.

Frank, K.M., Sekiguchi, J.M., Seidl, K.J., Swat, W., Rathbun, G.A., Cheng, H.L., Davidson, L., Kangaloo, L., and Alt, F.W. (1998). Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. Nature *396*, 173-177.

Fugmann, S.D., Villey, I.J., Ptaszek, L.M., and Schatz, D.G. (2000). Identification of two catalytic residues in RAG1 that define a single active site within the RAG1/RAG2 protein complex. Mol Cell *5*, 97-107.

Gale, R.P. (1987). Development of the immune system in human fetal liver. Thymus *10*, 45-56.

Gao, J.P., Uchida, T., Wang, C., Jiang, S.X., Matsumoto, K., Satoh, T., Minei, S., Soh, S., Kameya, T., and Baba, S. (2000). Relationship between p53 gene mutation and protein expression: clinical significance in transitional cell carcinoma of the bladder. Int J Oncol *16*, 469-475.

Gao, Y., Chaudhuri, J., Zhu, C., Davidson, L., Weaver, D.T., and Alt, F.W. (1998a). A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. Immunity *9*, 367-376.

Gao, Y., Sun, Y., Frank, K.M., Dikkes, P., Fujiwara, Y., Seidl, K.J., Sekiguchi, J.M., Rathbun, G.A., Swat, W., Wang, J.*, et al.* (1998b). A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. Cell *95*, 891-902.

Gellert, M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. Annu Rev Biochem *71*, 101-132.

Ghozi, M.C., Bernstein, Y., Negreanu, V., Levanon, D., and Groner, Y. (1996). Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 1935-1940.

Ghysdael, J., Gegonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D., and Stehelin, D. (1986). Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-ets oncogene-encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *83*, 1714-1718.

Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J.R., and Grosschedl, R. (1995). Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. Genes Dev *9*, 995-1008.

Giliani, S., Mori, L., de Saint Basile, G., Le Deist, F., Rodriguez-Perez, C., Forino, C., Mazzolari, E., Dupuis, S., Elhasid, R., Kessel, A.*, et al.* (2005). Interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ralpha) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. Immunol Rev *203*, 110-126.

Gluzman, D.F., Abramenko, I.V., Sklyarenko, L.M., Nadgornaya, V.A., Zavelevich, M.P., Bilous, N.I., and Poludnenko, L.Y. (1999). Acute leukemias in children from the city of Kiev and Kiev region after the Chernobyl NPP catastrophe. Pediatr Hematol Oncol *16*, 355-360.

Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. J Immunol *150*, 4244-4252.

Godfrey, D.I., Zlotnik, A., and Suda, T. (1992). Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. J Immunol *149*, 2281-2285.

Golding, A., Chandler, S., Ballestar, E., Wolffe, A.P., and Schlissel, M.S. (1999). Nucleosome structure completely inhibits in vitro cleavage by the V(D)J recombinase. Embo J *18*, 3712-3723.

Goldschneider, I. (2006). Cyclical mobilization and gated importation of thymocyte progenitors in the adult mouse: evidence for a thymus-bone marrow feedback loop. Immunol Rev *209*, 58-75.

Grabher, C., von Boehmer, H., and Look, A.T. (2006). Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Nat Rev Cancer *6*, 347-359.

Graux, C., Cools, J., Melotte, C., Quentmeier, H., Ferrando, A., Levine, R., Vermeesch, J.R., Stul, M., Dutta, B., Boeckx, N.*, et al.* (2004). Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet *36*, 1084-1089.

Graux, C., Cools, J., Michaux, L., Vandenberghe, P., and Hagemeijer, A. (2006). Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. Leukemia *20*, 1496-1510.

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., and Lieber, M.R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. Nature *388*, 492-495.

Grawunder, U., Zimmer, D., Fugmann, S., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (1998). DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. Mol Cell *2*, 477-484.

Greif, P.A., Konstandin, N.P., Metzeler, K.H., Herold, T., Pasalic, Z., Ksienzyk, B., Dufour, A., Schneider, F., Schneider, S., Kakadia, P.M.*, et al.* (2012). RUNX1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes. Haematologica.

Grier, D.G., Thompson, A., Kwasniewska, A., McGonigle, G.J., Halliday, H.L., and Lappin, T.R. (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. J Pathol *205*, 154-171.

Growney, J.D., Shigematsu, H., Li, Z., Lee, B.H., Adelsperger, J., Rowan, R., Curley, D.P., Kutok, J.L., Akashi, K., Williams, I.R.*, et al.* (2005). Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. Blood *106*, 494-504.

Grundy, G.J., Ramon-Maiques, S., Dimitriadis, E.K., Kotova, S., Biertumpfel, C., Heymann, J.B., Steven, A.C., Gellert, M., and Yang, W. (2009). Initial stages of V(D)J recombination: the organization of RAG1/2 and RSS DNA in the postcleavage complex. Mol Cell *35*, 217-227.

Gu, J., Lu, H., Tsai, A.G., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2007). Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence. Nucleic Acids Res *35*, 5755-5762.

Gu, T.L., Goetz, T.L., Graves, B.J., and Speck, N.A. (2000). Auto-inhibition and partner proteins, core-binding factor beta (CBFbeta) and Ets-1, modulate DNA binding by CBFalpha2 (AML1). Mol Cell Biol *20*, 91-103.

Gu, Y., Jin, S., Gao, Y., Weaver, D.T., and Alt, F.W. (1997). Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *94*, 8076-8081.

Guo, C., Yoon, H.S., Franklin, A., Jain, S., Ebert, A., Cheng, H.L., Hansen, E., Despo, O., Bossen, C., Vettermann, C*., et al.* (2011). CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. Nature *477*, 424-430.

Gutierrez, A., Sanda, T., Ma, W., Zhang, J., Grebliunaite, R., Dahlberg, S., Neuberg, D., Protopopov, A., Winter, S.S., Larson, R.S*., et al.* Inactivation of LEF1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood *115*, 2845-2851.

Gutierrez, A., Sanda, T., Ma, W., Zhang, J., Grebliunaite, R., Dahlberg, S., Neuberg, D., Protopopov, A., Winter, S.S., Larson, R.S*., et al.* (2010). Inactivation of LEF1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood *115*, 2845-2851.

Haddad, R., Guardiola, P., Izac, B., Thibault, C., Radich, J., Delezoide, A.L., Baillou, C., Lemoine, F.M., Gluckman, J.C., Pflumio, F*., et al.* (2004). Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. Blood *104*, 3918-3926.

Haddad, R., Guimiot, F., Six, E., Jourquin, F., Setterblad, N., Kahn, E., Yagello, M., Schiffer, C., Andre-Schmutz, I., Cavazzana-Calvo, M*., et al.* (2006). Dynamics of thymus-colonizing cells during human development. Immunity *24*, 217-230.

Haks, M.C., Lefebvre, J.M., Lauritsen, J.P., Carleton, M., Rhodes, M., Miyazaki, T., Kappes, D.J., and Wiest, D.L. (2005). Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage. Immunity *22*, 595-606.

Han, J.O., Steen, S.B., and Roth, D.B. (1997). Ku86 is not required for protection of signal ends or for formation of nonstandard V(D)J recombination products. Mol Cell Biol *17*, 2226-2234.

Hansen-Hagge, T.E., Schafer, M., Kiyoi, H., Morris, S.W., Whitlock, J.A., Koch, P., Bohlmann, I., Mahotka, C., Bartram, C.R., and Janssen, J.W. (2002). Disruption of the RanBP17/Hox11L2 region by recombination with the TCRdelta locus in acute lymphoblastic leukemias with t(5;14)(q34;q11). Leukemia *16*, 2205-2212.

Hansson, A., Manetopoulos, C., Jonsson, J.I., and Axelson, H. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL inhibits the expression of the p16INK4A and pTalpha genes. Biochem Biophys Res Commun *312*, 1073-1081.

Hao, Q.L., Zhu, J., Price, M.A., Payne, K.J., Barsky, L.W., and Crooks, G.M. (2001). Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. Blood *97*, 3683-3690.

Hawley, R.G., Fong, A.Z., Lu, M., and Hawley, T.S. (1994). The HOX11 homeobox-containing gene of human leukemia immortalizes murine hematopoietic precursors. Oncogene *9*, 1-12.

Hawley, R.G., Fong, A.Z., Reis, M.D., Zhang, N., Lu, M., and Hawley, T.S. (1997). Transforming function of the HOX11/TCL3 homeobox gene. Cancer research *57*, 337-345.

Hawwari, A., and Krangel, M.S. (2005). Regulation of TCR delta and alpha repertoires by local and long-distance control of variable gene segment chromatin structure. The Journal of experimental medicine *202*, 467-472.

Hawwari, A., and Krangel, M.S. (2007). Role for rearranged variable gene segments in directing secondary T cell receptor alpha recombination. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 903-907.

Hayashi, K., Natsume, W., Watanabe, T., Abe, N., Iwai, N., Okada, H., Ito, Y., Asano, M., Iwakura, Y., Habu, S*., et al.* (2000). Diminution of the AML1 transcription factor function causes differential effects on the fates of CD4 and CD8 single-positive T cells. J Immunol *165*, 6816-6824.

Hayes, S.M., Li, L., and Love, P.E. (2005). TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. Immunity *22*, 583-593.

Hayes, S.M., Shores, E.W., and Love, P.E. (2003). An architectural perspective on signaling by the pre-, alphabeta and gammadelta T cell receptors. Immunol Rev *191*, 28-37.

Haynes, B.F., and Heinly, C.S. (1995). Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. The Journal of experimental medicine *181*, 1445-1458.

Hecht, F., Hecht, B.K., and Kirsch, I.R. (1987). Fragile sites limited to lymphocytes: molecular recombination and malignancy. Cancer Genet Cytogenet *26*, 95-104.

Heemskerk, M.H., Blom, B., Nolan, G., Stegmann, A.P., Bakker, A.Q., Weijer, K., Res, P.C., and Spits, H. (1997). Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. The Journal of experimental medicine *186*, 1597-1602.

Herblot, S., Steff, A.M., Hugo, P., Aplan, P.D., and Hoang, T. (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. Nat Immunol *1*, 138-144.

Hesslein, D.G., and Schatz, D.G. (2001). Factors and forces controlling V(D)J recombination. Adv Immunol *78*, 169-232.

Hewitt, S.L., Chaumeil, J., and Skok, J.A. (2010). Chromosome dynamics and the regulation of V(D)J recombination. Immunol Rev *237*, 43-54.

Hinz, T., Allam, A., Wesch, D., Schindler, D., and Kabelitz, D. (2000). Cell-surface expression of transrearranged Vgamma-cbeta T-cell receptor chains in healthy donors and in ataxia telangiectasia patients. Br J Haematol *109*, 201-210.

Hiom, K., and Gellert, M. (1997). A stable RAG1-RAG2-DNA complex that is active in V(D)J cleavage. Cell *88*, 65-72.

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 (New York, NY *250*, 814-818.

Ho, I.C., Yang, L.H., Morle, G., and Leiden, J.M. (1989). A T-cell-specific transcriptional enhancer element 3' of C alpha in the human T-cell receptor alpha locus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *86*, 6714-6718.

Holland, P.W., Booth, H.A., and Bruford, E.A. (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. BMC Biol *5*, 47.

Homminga, I., Pieters, R., Langerak, A.W., de Rooi, J.J., Stubbs, A., Verstegen, M., Vuerhard, M., Buijs-Gladdines, J., Kooi, C., Klous, P*., et al.* Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell *19*, 484-497.

Homminga, I., Pieters, R., Langerak, A.W., de Rooi, J.J., Stubbs, A., Verstegen, M., Vuerhard, M., Buijs-Gladdines, J., Kooi, C., Klous, P*., et al.* (2011). Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell *19*, 484-497.

Hosoya, T., Kuroha, T., Moriguchi, T., Cummings, D., Maillard, I., Lim, K.C., and Engel, J.D. (2009). GATA-3 is required for early T lineage progenitor development. The Journal of experimental medicine *206*, 2987-3000.

Hsieh, C.L., Gauss, G., and Lieber, M.R. (1992). Replication, transcription, CpG methylation and DNA topology in V(D)J recombination. Current topics in microbiology and immunology *182*, 125-135.

Huang, G., Shigesada, K., Ito, K., Wee, H.J., Yokomizo, T., and Ito, Y. (2001). Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. Embo J *20*, 723-733.

Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M*., et al.* (2004). AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. Nat Med *10*, 299-304.

Irving, B.A., Alt, F.W., and Killeen, N. (1998). Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. Science (New York, NY *280*, 905-908.

Jackson, A.M., and Krangel, M.S. (2006). Turning T-cell receptor beta recombination on and off: more questions than answers. Immunol Rev *209*, 129-141.

Jacob, B., Osato, M., Yamashita, N., Wang, C.Q., Taniuchi, I., Littman, D.R., Asou, N., and Ito, Y. (2010). Stem cell exhaustion due to Runx1 deficiency is prevented by Evi5 activation in leukemogenesis. Blood *115*, 1610-1620.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. Science (New York, NY *293*, 1074-1080.

Jeong, E.G., Kim, M.S., Nam, H.K., Min, C.K., Lee, S., Chung, Y.J., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2008). Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers. Clin Cancer Res *14*, 3716-3721.

Jiang, Q., Li, W.Q., Aiello, F.B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A.R., and Durum, S.K. (2005). Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. Cytokine & growth factor reviews *16*, 513-533.

Jones, J.M., and Gellert, M. (2002). Ordered assembly of the V(D)J synaptic complex ensures accurate recombination. Embo J *21*, 4162-4171.

Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. Genome Biol *5*, 226.

Jung, D., Bassing, C.H., Fugmann, S.D., Cheng, H.L., Schatz, D.G., and Alt, F.W. (2003). Extrachromosomal recombination substrates recapitulate beyond 12/23 restricted VDJ recombination in nonlymphoid cells. Immunity *18*, 65-74.

Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F.W. (2006). Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. Annu Rev Immunol *24*, 541-570.

Kanno, Y., Kanno, T., Sakakura, C., Bae, S.C., and Ito, Y. (1998). Cytoplasmic sequestration of the polyomavirus enhancer binding protein 2 (PEBP2)/core binding factor alpha (CBFalpha) subunit by the leukemia-related PEBP2/CBFbeta-SMMHC fusion protein inhibits PEBP2/CBF-mediated transactivation. Mol Cell Biol *18*, 4252-4261.

Kawamura, M., Ohnishi, H., Guo, S.X., Sheng, X.M., Minegishi, M., Hanada, R., Horibe, K., Hongo, T., Kaneko, Y., Bessho, F.*, et al.* (1999). Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res *23*, 115-126.

Kelliher, M.A., Seldin, D.C., and Leder, P. (1996). Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. Embo J *15*, 5160-5166.

Khor, B., and Sleckman, B.P. (2002). Allelic exclusion at the TCRbeta locus. Curr Opin Immunol *14*, 230-234.

Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. Cell *116*, 259-272.

Kim, W.Y., Sieweke, M., Ogawa, E., Wee, H.J., Englmeier, U., Graf, T., and Ito, Y. (1999). Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. Embo J *18*, 1609-1620.

Kitagawa, Y., Inoue, K., Sasaki, S., Hayashi, Y., Matsuo, Y., Lieber, M.R., Mizoguchi, H., Yokota, J., and Kohno, T. (2002). Prevalent involvement of illegitimate V(D)J recombination in chromosome 9p21 deletions in lymphoid leukemia. J Biol Chem *277*, 46289-46297.

Kobayashi, Y., Tycko, B., Soreng, A.L., and Sklar, J. (1991). Transrearrangements between antigen receptor genes in normal human lymphoid tissues and in ataxia telangiectasia. J Immunol *147*, 3201-3209.

Kosak, S.T., and Groudine, M. (2004). Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation. Genes Dev *18*, 1371-1384.

Krangel, M.S. (2003). Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. Nat Immunol *4*, 624-630.

Krangel, M.S. (2009). Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. Curr Opin Immunol *21*, 133-139.

Krangel, M.S., Carabana, J., Abbarategui, I., Schlimgen, R., and Hawwari, A. (2004). Enforcing order within a complex locus: current perspectives on the control of V(D)J recombination at the murine T-cell receptor alpha/delta locus. Immunol Rev *200*, 224-232.

Krangel, M.S., Yssel, H., Brocklehurst, C., and Spits, H. (1990). A distinct wave of human T cell receptor gamma/delta lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production. The Journal of experimental medicine *172*, 847-859.

Krueger, A., Willenzon, S., Lyszkiewicz, M., Kremmer, E., and Forster, R. (2010). CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. Blood *115*, 1906-1912.

Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. Cell *78*, 191-201.

Kuppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. Nat Rev Cancer *5*, 251-262.

Kuppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. Oncogene *20*, 5580-5594.

Kurimasa, A., Kumano, S., Boubnov, N.V., Story, M.D., Tung, C.S., Peterson, S.R., and Chen, D.J. (1999). Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. Mol Cell Biol *19*, 3877-3884.

Kwon, J., Imbalzano, A.N., Matthews, A., and Oettinger, M.A. (1998). Accessibility of nucleosomal DNA to V(D)J cleavage is modulated by RSS positioning and HMG1. Mol Cell *2*, 829-839.

Kwon, J., Morshead, K.B., Guyon, J.R., Kingston, R.E., and Oettinger, M.A. (2000). Histone acetylation and hSWI/SNF remodeling act in concert to stimulate V(D)J cleavage of nucleosomal DNA. Mol Cell *6*, 1037-1048.

Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V.D., Poirel, H., Quang, C.T., Mauchauffe, M., Berthou, C., Lessard, M., Berger, R., Ghysdael, J.*, et al.* (1997). A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. Science (New York, NY *278*, 1309-1312.

Lahortiga, I., De Keersmaecker, K., Van Vlierberghe, P., Graux, C., Cauwelier, B., Lambert, F., Mentens, N., Beverloo, H.B., Pieters, R., Speleman, F.*, et al.* (2007). Duplication of the MYB oncogene in T cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet *39*, 593-595.

Lam, K., and Zhang, D.E. (2012). RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. Front Biosci *17*, 1120-1139.

Langerak, A.W., Wolvers-Tettero, I.L., van Gastel-Mol, E.J., Oud, M.E., and van Dongen, J.J. (2001). Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in nonlymphoid cells. Blood *98*, 2456-2465.

Larson, R.C., Osada, H., Larson, T.A., Lavenir, I., and Rabbitts, T.H. (1995). The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. Oncogene *11*, 853-862.

Lauzurica, P., and Krangel, M.S. (1994). Enhancer-dependent and -independent steps in the rearrangement of a human T cell receptor delta transgene. The Journal of experimental medicine *179*, 43-55.

Lawrence, H.J., Sauvageau, G., Humphries, R.K., and Largman, C. (1996). The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. Stem Cells *14*, 281-291.

Lawrence, H.J., Stage, K.M., Mathews, C.H., Detmer, K., Scibienski, R., MacKenzie, M., Migliaccio, E., Boncinelli, E., and Largman, C. (1993). Expression of HOX C homeobox genes in lymphoid cells. Cell Growth Differ *4*, 665-669.

Lee, A.C., Fernandez-Capetillo, O., Pisupati, V., Jackson, S.P., and Nussenzweig, A. (2005). Specific association of mouse MDC1/NFBD1 with NBS1 at sites of DNA-damage. Cell cycle (Georgetown, Tex *4*, 177-182.

Lefranc, M.P. (2001). Nomenclature of the human T cell receptor genes. Curr Protoc Immunol *Appendix 1*, Appendix 1O.

Lewis, S., Gifford, A., and Baltimore, D. (1984). Joining of V kappa to J kappa gene segments in a retroviral vector introduced into lymphoid cells. Nature *308*, 425-428.

Lewis, S., Gifford, A., and Baltimore, D. (1985). DNA elements are asymmetrically joined during the site-specific recombination of kappa immunoglobulin genes. Science (New York, NY *228*, 677-685.

Lewis, S.M., Agard, E., Suh, S., and Czyzyk, L. (1997). Cryptic signals and the fidelity of V(D)J joining. Mol Cell Biol *17*, 3125-3136.

Lewis, S.M., Hesse, J.E., Mizuuchi, K., and Gellert, M. (1988). Novel strand exchanges in V(D)J recombination. Cell *55*, 1099-1107.

Li, X., Gounari, F., Protopopov, A., Khazaie, K., and von Boehmer, H. (2008). Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. The Journal of experimental medicine *205*, 2851-2861.

Li, Z., Otevrel, T., Gao, Y., Cheng, H.L., Seed, B., Stamato, T.D., Taccioli, G.E., and Alt, F.W. (1995). The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. Cell *83*, 1079-1089.

Lieber, M.R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. J Biol Chem *283*, 1-5.

Lin, W.C., and Desiderio, S. (1993). Regulation of V(D)J recombination activator protein RAG-2 by phosphorylation. Science *260*, 953-959.

Lin, W.C., and Desiderio, S. (1995). V(D)J recombination and the cell cycle. Immunol Today *16*, 279-289.

Lista, F., Bertness, V., Guidos, C.J., Danska, J.S., and Kirsch, I.R. (1997). The absolute number of trans-rearrangements between the TCRG and TCRB loci is predictive of lymphoma risk: a severe combined immune deficiency (SCID) murine model. Cancer research *57*, 4408-4413.

Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D., and Felsenfeld, G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. Science *293*, 2453-2455.

Liu, Y., Subrahmanyam, R., Chakraborty, T., Sen, R., and Desiderio, S. (2007). A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. Immunity *27*, 561-571.

Livak, F., Wilson, A., MacDonald, H.R., and Schatz, D.G. (1997). Alpha beta lineage-committed thymocytes can be rescued by the gamma delta T cell receptor (TCR) in the absence of TCR beta chain. Eur J Immunol *27*, 2948-2958.

Loeffler, J., Bauer, R., Hebart, H., Douek, D.C., Rauser, G., Bader, P., and Einsele, H. (2002). Quantification of T-cell receptor excision circle DNA using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler system. J Immunol Methods *271*, 167-175.

Lopes, L.F., Dias Neto, E., Lorand-Metze, I., Latorre, M.R., and Simpson, A.J. (2001). Analysis of Vgamma/Jbeta trans-rearrangements in paediatric patients undergoing chemotherapy. Br J Haematol *113*, 1001-1008.

Lopes, L.F., Piccoli Fde, S., Paixao, V.A., Latorre Mdo, R., Camargo, B., Simpson, A.J., and Caballero, O.L. (2004). Association of CYP3A4 genotype with detection of Vgamma/Jbeta trans-rearrangements in the peripheral blood leukocytes of pediatric cancer patients undergoing chemotherapy for ALL. Leuk Res *28*, 1281-1286.

Ma, Y., Pannicke, U., Lu, H., Niewolik, D., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2005). The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. J Biol Chem *280*, 33839-33846.

Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. Cell *108*, 781-794.

Macintyre, E.A., Smit, L., Ritz, J., Kirsch, I.R., and Strominger, J.L. (1992). Disruption of the SCL locus in T-lymphoid malignancies correlates with commitment to the T-cell receptor alpha beta lineage. Blood *80*, 1511-1520.

Magli, M.C., Largman, C., and Lawrence, H.J. (1997). Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. J Cell Physiol *173*, 168-177.

Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P.A., Scollay, R., and Malissen, B. (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. Immunol Today *13*, 315-322.

Marculescu, R., Le, T., Simon, P., Jaeger, U., and Nadel, B. (2002). V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: a functional assessment of genomic instability by cryptic sites. J Exp Med *195*, 85-98.

Marculescu, R., Vanura, K., Le, T., Simon, P., Jager, U., and Nadel, B. (2003). Distinct t(7;9)(q34;q32) breakpoints in healthy individuals and individuals with T-ALL. Nat Genet *33*, 342-344.

Marculescu, R., Vanura, K., Montpellier, B., Roulland, S., Le, T., Navarro, J.M., Jager, U., McBlane, F., and Nadel, B. (2006). Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. DNA Repair (Amst) *5*, 1246-1258.

Maser, R.S., Choudhury, B., Campbell, P.J., Feng, B., Wong, K.K., Protopopov, A., O'Neil, J., Gutierrez, A., Ivanova, E., Perna, I.*, et al.* (2007). Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. Nature *447*, 966-971.

Matthews, A.G., Kuo, A.J., Ramon-Maiques, S., Han, S., Champagne, K.S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D., Cheung, P., Ciccone, D.N.*, et al.* (2007). RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. Nature *450*, 1106-1110.

Mauvieux, L., Villey, I., and de Villartay, J.P. (2001). T early alpha (TEA) regulates initial TCRVAJA rearrangements and leads to TCRJA coincidence. Eur J Immunol *31*, 2080-2086.

McBlane, F., and Boyes, J. (2000). Stimulation of V(D)J recombination by histone acetylation. Curr Biol *10*, 483-486.

McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., and Oettinger, M.A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. Cell *83*, 387-395.

McCormack, M.P., Young, L.F., Vasudevan, S., de Graaf, C.A., Codrington, R., Rabbitts, T.H., Jane, S.M., and Curtis, D.J. (2010). The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. Science (New York, NY *327*, 879-883.

Meaburn, K.J., Misteli, T., and Soutoglou, E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. Semin Cancer Biol *17*, 80-90.

Melichar, H.J., Narayan, K., Der, S.D., Hiraoka, Y., Gardiol, N., Jeannet, G., Held, W., Chambers, C.A., and Kang, J. (2007). Regulation of gammadelta versus alphabeta T lymphocyte differentiation by the transcription factor SOX13. Science (New York, NY *315*, 230-233.

Miller, J.F. (1967). The thymus. Yesterday, today, and tomorrow. Lancet *2*, 1299-1302.

Modesti, M., Junop, M.S., Ghirlando, R., van de Rakt, M., Gellert, M., Yang, W., and Kanaar, R. (2003). Tetramerization and DNA ligase IV interaction of the DNA double-strand break repair protein XRCC4 are mutually exclusive. J Mol Biol *334*, 215-228.

Mombaerts, P., Clarke, A.R., Rudnicki, M.A., Iacomini, J., Itohara, S., Lafaille, J.J., Wang, L., Ichikawa, Y., Jaenisch, R., Hooper, M.L.*, et al.* (1992). Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. Nature *360*, 225-231.

Monroe, R.J., Chen, F., Ferrini, R., Davidson, L., and Alt, F.W. (1999a). RAG2 is regulated differentially in B and T cells by elements 5' of the promoter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 12713-12718.

Monroe, R.J., Sleckman, B.P., Monroe, B.C., Khor, B., Claypool, S., Ferrini, R., Davidson, L., and Alt, F.W. (1999b). Developmental regulation of TCR delta locus accessibility and expression by the TCR delta enhancer. Immunity *10*, 503-513.

Moore, T.A., and Zlotnik, A. (1995). T-cell lineage commitment and cytokine responses of thymic progenitors. Blood *86*, 1850-1860.

Morzycka-Wroblewska, E., Lee, F.E., and Desiderio, S.V. (1988). Unusual immunoglobulin gene rearrangement leads to replacement of recombinational signal sequences. Science (New York, NY *242*, 261-263.

Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N.*, et al.* (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. Cell *105*, 177-186.

Moshous, D., Li, L., Chasseval, R., Philippe, N., Jabado, N., Cowan, M.J., Fischer, A., and de Villartay, J.P. (2000). A new gene involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination is located on human chromosome 10p. Hum Mol Genet *9*, 583-588.

Mueller, D., Bach, C., Zeisig, D., Garcia-Cuellar, M.P., Monroe, S., Sreekumar, A., Zhou, R., Nesvizhskii, A., Chinnaiyan, A., Hess, J.L.*, et al.* (2007). A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. Blood *110*, 4445-4454.

Murray, J.M., O'Neill, J.P., Messier, T., Rivers, J., Walker, V.E., McGonagle, B., Trombley, L., Cowell, L.G., Kelsoe, G., McBlane, F.*, et al.* (2006). V(D)J recombinase-mediated processing of coding junctions at cryptic recombination signal sequences in peripheral T cells during human development. J Immunol *177*, 5393-5404.

Muthusamy, N., Barton, K., and Leiden, J.M. (1995). Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. Nature *377*, 639-642.

Nagel, S., Kaufmann, M., Drexler, H.G., and MacLeod, R.A. (2003). The cardiac homeobox gene NKX2-5 is deregulated by juxtaposition with BCL11B in pediatric T-ALL cell lines via a novel t(5;14)(q35.1;q32.2). Cancer Res *63*, 5329-5334.

Nishino, M., Ashiku, S.K., Kocher, O.N., Thurer, R.L., Boiselle, P.M., and Hatabu, H. (2006). The thymus: a comprehensive review. Radiographics *26*, 335-348.

Nitta, T., Ohigashi, I., Nakagawa, Y., and Takahama, Y. (2011). Cytokine crosstalk for thymic medulla formation. Curr Opin Immunol *23*, 190-197.

Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H.M., Filipovich, A.H., Adelstein, S., Modi, W.S., McBride, O.W., and Leonard, W.J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. Cell *73*, 147-157.

Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. Cell *100*, 71-78.

O'Driscoll, M., Cerosaletti, K.M., Girard, P.M., Dai, Y., Stumm, M., Kysela, B., Hirsch, B., Gennery, A., Palmer, S.E., Seidel, J.*, et al.* (2001). DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. Mol Cell *8*, 1175-1185.

O'Neil, J., Grim, J., Strack, P., Rao, S., Tibbitts, D., Winter, C., Hardwick, J., Welcker, M., Meijerink, J.P., Pieters, R.*, et al.* (2007). FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. The Journal of experimental medicine *204*, 1813-1824.

O'Neil, J., Shank, J., Cusson, N., Murre, C., and Kelliher, M. (2004). TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. Cancer Cell *5*, 587-596.

Ochem, A.E., Skopac, D., Costa, M., Rabilloud, T., Vuillard, L., Simoncsits, A., Giacca, M., and Falaschi, A. (1997). Functional properties of the separate subunits of human DNA helicase II/Ku autoantigen. J Biol Chem *272*, 29919-29926.

Ogawa, E., Maruyama, M., Kagoshima, H., Inuzuka, M., Lu, J., Satake, M., Shigesada, K., and Ito, Y. (1993). PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 6859-6863.

Okada, Y., Jiang, Q., Lemieux, M., Jeannotte, L., Su, L., and Zhang, Y. (2006). Leukaemic transformation by CALM-AF10 involves upregulation of Hoxa5 by hDOT1L. Nat Cell Biol *8*, 1017-1024.

Ono, M., Tucker, P.W., and Capra, J.D. (1994). Production and characterization of recombinant human Ku antigen. Nucleic Acids Res *22*, 3918-3924.

Osato, M., Asou, N., Abdalla, E., Hoshino, K., Yamasaki, H., Okubo, T., Suzushima, H., Takatsuki, K., Kanno, T., Shigesada, K.*, et al.* (1999). Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. Blood *93*, 1817-1824.

Owens, B.M., Hawley, T.S., Spain, L.M., Kerkel, K.A., and Hawley, R.G. (2006). TLX1/HOX11-mediated disruption of primary thymocyte differentiation prior to the CD4+CD8+ double-positive stage. Br J Haematol *132*, 216-229.

Pai, S.Y., Truitt, M.L., Ting, C.N., Leiden, J.M., Glimcher, L.H., and Ho, I.C. (2003). Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development. Immunity *19*, 863-875.

Paietta, E., Ferrando, A.A., Neuberg, D., Bennett, J.M., Racevskis, J., Lazarus, H., Dewald, G., Rowe, J.M., Wiernik, P.H., Tallman, M.S.*, et al.* (2004). Activating FLT3 mutations in CD117/KIT(+) T-cell acute lymphoblastic leukemias. Blood *104*, 558-560.

Palacios, E.H., and Weiss, A. (2004). Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. Oncogene *23*, 7990-8000.

Palomero, T., Sulis, M.L., Cortina, M., Real, P.J., Barnes, K., Ciofani, M., Caparros, E., Buteau, J., Brown, K., Perkins, S.L.*, et al.* (2007). Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. Nat Med *13*, 1203-1210.

Pannicke, U., Ma, Y., Hopfner, K.P., Niewolik, D., Lieber, M.R., and Schwarz, K. (2004). Functional and biochemical dissection of the structure-specific nuclease ARTEMIS. Embo J *23*, 1987-1997.

Passegue, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E., and Weissman, I.L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *100 Suppl 1*, 11842-11849.

Pearson, R., and Weston, K. (2000). c-Myb regulates the proliferation of immature thymocytes following beta-selection. Embo J *19*, 6112-6120.

Plum, J., De Smedt, M., Leclercq, G., Verhasselt, B., and Vandekerckhove, B. (1996). Interleukin-7 is a critical growth factor in early human T-cell development. Blood *88*, 4239-4245.

Poinsignon, C., Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Villey, I., and de Villartay, J.P. (2004). The metallo-beta-lactamase/beta-CASP domain of Artemis constitutes the catalytic core for V(D)J recombination. The Journal of experimental medicine *199*, 315-321.

Porritt, H.E., Rumfelt, L.L., Tabrizifard, S., Schmitt, T.M., Zuniga-Pflucker, J.C., and Petrie, H.T. (2004). Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. Immunity *20*, 735-745.

Pozner, A., Lotem, J., Xiao, C., Goldenberg, D., Brenner, O., Negreanu, V., Levanon, D., and Groner, Y. (2007). Developmentally regulated promoter-switch transcriptionally controls Runx1 function during embryonic hematopoiesis. BMC developmental biology *7*, 84.

Preudhomme, C., Warot-Loze, D., Roumier, C., Grardel-Duflos, N., Garand, R., Lai, J.L., Dastugue, N., Macintyre, E., Denis, C., Bauters, F.*, et al.* (2000). High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. Blood *96*, 2862-2869.

Przybylski, G.K., Dik, W.A., Wanzeck, J., Grabarczyk, P., Majunke, S., Martin-Subero, J.I., Siebert, R., Dolken, G., Ludwig, W.D., Verhaaf, B.*, et al.* (2005). Disruption of the BCL11B gene through inv(14)(q11.2q32.31) results in the expression of BCL11B-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type BCL11B transcripts in T-ALL. Leukemia *19*, 201-208.

Puel, A., Ziegler, S.F., Buckley, R.H., and Leonard, W.J. (1998). Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. Nat Genet *20*, 394-397.

Pui, C.H. (2009). Acute lymphoblastic leukemia: introduction. Semin Hematol *46*, 1-2.

Pui, C.H., Behm, F.G., and Crist, W.M. (1993). Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood *82*, 343-362.

Pui, C.H., and Evans, W.E. (2006). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med *354*, 166-178.

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

Pulford, K., Lecointe, N., Leroy-Viard, K., Jones, M., Mathieu-Mahul, D., and Mason, D.Y. (1995). Expression of TAL-1 proteins in human tissues. Blood *85*, 675-684.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. Immunity *10*, 547-558.

Raghavan, S.C., Kirsch, I.R., and Lieber, M.R. (2001a). Analysis of the V(D)J recombination efficiency at lymphoid chromosomal translocation breakpoints. J Biol Chem *276*, 29126-29133.

Raghavan, S.C., Kirsch, I.R., and Lieber, M.R. (2001b). Analysis of the V(D)J recombination efficiency at lymphoid chromosomal translocation breakpoints. J Biol Chem *276*, 29126-29133.

Raghavan, S.C., Swanson, P.C., Ma, Y., and Lieber, M.R. (2005). Double-strand break formation by the RAG complex at the bcl-2 major breakpoint region and at other non-B DNA structures in vitro. Mol Cell Biol *25*, 5904-5919.

Raghavan, S.C., Swanson, P.C., Wu, X., Hsieh, C.L., and Lieber, M.R. (2004). A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. Nature *428*, 88-93.

Raghavan, S.C., Tong, J., and Lieber, M.R. (2006). Hybrid joint formation in human V(D)J recombination requires nonhomologous DNA end joining. DNA Repair (Amst) *5*, 278-285.

Ramiro, A.R., Trigueros, C., Marquez, C., San Millan, J.L., and Toribio, M.L. (1996). Regulation of pre-T cell receptor (pT alpha-TCR beta) gene expression during human thymic development. The Journal of experimental medicine *184*, 519-530.

Ramsden, D.A., Baetz, K., and Wu, G.E. (1994). Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. Nucleic Acids Res *22*, 1785-1796.

Ramsden, D.A., McBlane, J.F., van Gent, D.C., and Gellert, M. (1996). Distinct DNA sequence and structure requirements for the two steps of V(D)J recombination signal cleavage. Embo J *15*, 3197-3206.

Raval, P., Kriatchko, A.N., Kumar, S., and Swanson, P.C. (2008). Evidence for Ku70/Ku80 association with full-length RAG1. Nucleic Acids Res *36*, 2060-2072.

Res, P., and Spits, H. (1999). Developmental stages in the human thymus. Semin Immunol *11*, 39-46.

Riballo, E., Critchlow, S.E., Teo, S.H., Doherty, A.J., Priestley, A., Broughton, B., Kysela, B., Beamish, H., Plowman, N., Arlett, C.F.*, et al.* (1999). Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. Curr Biol *9*, 699-702.

Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G.C., Recio, M.J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A.*, et al.* (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. Mol Cell *16*, 715-724.

Roberts, J.L., Lauzurica, P., and Krangel, M.S. (1997). Developmental regulation of VDJ recombination by the core fragment of the T cell receptor alpha enhancer. The Journal of experimental medicine *185*, 131-140.

Rooney, S., Sekiguchi, J., Zhu, C., Cheng, H.L., Manis, J., Whitlow, S., DeVido, J., Foy, D., Chaudhuri, J., Lombard, D.*, et al.* (2002). Leaky Scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in Artemis-deficient mice. Mol Cell *10*, 1379-1390.

Roth, D.B. (2003). Restraining the V(D)J recombinase. Nat Rev Immunol *3*, 656-666.

Rothenberg, E.V., Moore, J.E., and Yui, M.A. (2008). Launching the T-cell-lineage developmental programme. Nat Rev Immunol *8*, 9-21.

Roulland, S., Faroudi, M., Mamessier, E., Sungalee, S., Salles, G., and Nadel, B. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. Adv Immunol *111*, 1-46.

Roulland, S., Faroudi, M., Mamessier, E., Sungalee, S., Salles, G., and Nadel, B. (2011). Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. Advances in immunology *111*, 1-46.

Roumier, C., Lejeune-Dumoulin, S., Renneville, A., Goethgeluck, A.S., Philippe, N., Fenaux, P., and Preudhomme, C. (2006). Cooperation of activating Ras/rtk signal transduction pathway mutations and inactivating myeloid differentiation gene mutations in M0 AML: a study of 45 patients. Leukemia *20*, 433-436.

Russell, S.M., Keegan, A.D., Harada, N., Nakamura, Y., Noguchi, M., Leland, P., Friedmann, M.C., Miyajima, A., Puri, R.K., Paul, W.E.*, et al.* (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. Science (New York, NY *262*, 1880-1883.

Sakano, H., Maki, R., Kurosawa, Y., Roeder, W., and Tonegawa, S. (1980). Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. Nature *286*, 676-683.

Schatz, D.G., and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. Nat Rev Immunol *11*, 251-263.

Schilham, M.W., Wilson, A., Moerer, P., Benaissa-Trouw, B.J., Cumano, A., and Clevers, H.C. (1998). Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. J Immunol *161*, 3984-3991.

Schlissel, M.S. (2003). Regulating antigen-receptor gene assembly. Nat Rev Immunol *3*, 890-899.

Schwarz, B.A., Sambandam, A., Maillard, I., Harman, B.C., Love, P.E., and Bhandoola, A. (2007). Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. J Immunol *178*, 2008-2017.

Schwarz, K., Gauss, G.H., Ludwig, L., Pannicke, U., Li, Z., Lindner, D., Friedrich, W., Seger, R.A., Hansen-Hagge, T.E., Desiderio, S.*, et al.* (1996). RAG mutations in human B cell-negative SCID. Science *274*, 97-99.

Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med *2*, 640-653.

Senoo, M., and Shinkai, Y. (1998). Regulation of Vbeta germline transcription in RAG-deficient mice by the CD3epsilon-mediated signals: implication of Vbeta transcriptional regulation in TCR beta allelic exclusion. International immunology *10*, 553-560.

Seo, W., Ikawa, T., Kawamoto, H., and Taniuchi, I. (2012). Runx1-Cbfbeta facilitates early B lymphocyte development by regulating expression of Ebf1. J Exp Med *209*, 1255-1262.

Shih, H.Y., and Krangel, M.S. (2010). Distinct contracted conformations of the Tcra/Tcrd locus during Tcra and Tcrd recombination. The Journal of experimental medicine *207*, 1835-1841.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M.*, et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell *68*, 855-867.

Shirasawa, S., Arata, A., Onimaru, H., Roth, K.A., Brown, G.A., Horning, S., Arata, S., Okumura, K., Sasazuki, T., and Korsmeyer, S.J. (2000). Rnx deficiency results in congenital central hypoventilation. Nat Genet *24*, 287-290.

Sibanda, B.L., Critchlow, S.E., Begun, J., Pei, X.Y., Jackson, S.P., Blundell, T.L., and Pellegrini, L. (2001). Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. Nat Struct Biol *8*, 1015-1019.

Six, E.M., Benjelloun, F., Garrigue, A., Bonhomme, D., Morillon, E., Rouiller, J., Cacavelli, L., Blondeau, J., Beldjord, K., Hacein-Bey-Abina, S.*, et al.* Cytokines and culture medium have a major impact on human in vitro T-cell differentiation. Blood Cells Mol Dis *47*, 72-78.

Six, E.M., Bonhomme, D., Monteiro, M., Beldjord, K., Jurkowska, M., Cordier-Garcia, C., Garrigue, A., Dal Cortivo, L., Rocha, B., Fischer, A.*, et al.* (2007). A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus. The Journal of experimental medicine *204*, 3085-3093.

Sleasman, J.W., Harville, T.O., White, G.B., George, J.F., Barrett, D.J., and Goodenow, M.M. (1994). Arrested rearrangement of TCR V beta genes in thymocytes from children with X-linked severe combined immunodeficiency disease. J Immunol *153*, 442-448.

Sleckman, B.P., Bardon, C.G., Ferrini, R., Davidson, L., and Alt, F.W. (1997). Function of the TCR alpha enhancer in alphabeta and gammadelta T cells. Immunity *7*, 505-515.

Sobacchi, C., Marrella, V., Rucci, F., Vezzoni, P., and Villa, A. (2006). RAG-dependent primary immunodeficiencies. Human mutation *27*, 1174-1184.

Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.M., Regnault, A., Garcia-Peydro, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.L., and Sigaux, F. (2005a). HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). Blood *106*, 274-286. Epub 2005 Mar 2017.

Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.M., Regnault, A., Garcia-Peydro, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.L., and Sigaux, F. (2005b). HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). Blood *106*, 274-286.

Spanopoulou, E., Cortes, P., Shih, C., Huang, C.M., Silver, D.P., Svec, P., and Baltimore, D. (1995). Localization, interaction, and RNA binding properties of the V(D)J recombination-activating proteins RAG1 and RAG2. Immunity *3*, 715-726.

Speck, N.A., and Gilliland, D.G. (2002). Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. Nat Rev Cancer *2*, 502-513.

Spits, H. (2002). Development of alphabeta T cells in the human thymus. Nat Rev Immunol *2*, 760-772.

Spits, H., Blom, B., Jaleco, A.C., Weijer, K., Verschuren, M.C., van Dongen, J.J., Heemskerk, M.H., and Res, P.C. (1998). Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. Immunol Rev *165*, 75-86.

Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. Annu Rev Immunol *21*, 139-176.

Stern, M.H., Lipkowitz, S., Aurias, A., Griscelli, C., Thomas, G., and Kirsch, I.R. (1989). Inversion of chromosome 7 in ataxia telangiectasia is generated by a rearrangement between T-cell receptor beta and T-cell receptor gamma genes. Blood *74*, 2076-2080.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. Nature *403*, 41-45.

Su, X.Y., Busson, M., Della Valle, V., Ballerini, P., Dastugue, N., Talmant, P., Ferrando, A.A., Baudry-Bluteau, D., Romana, S., Berger, R.*, et al.* (2004). Various types of rearrangements target TLX3 locus in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer *41*, 243-249.

Sulis, M.L., Williams, O., Palomero, T., Tosello, V., Pallikuppam, S., Real, P.J., Barnes, K., Zuurbier, L., Meijerink, J.P., and Ferrando, A.A. (2008). NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. Blood *112*, 733-740.

Swanson, P.C., Volkmer, D., and Wang, L. (2004). Full-length RAG-2, and not full-length RAG-1, specifically suppresses RAG-mediated transposition but not hybrid joint formation or disintegration. J Biol Chem *279*, 4034-4044.

Taccioli, G.E., Amatucci, A.G., Beamish, H.J., Gell, D., Xiang, X.H., Torres Arzayus, M.I., Priestley, A., Jackson, S.P., Marshak Rothstein, A., Jeggo, P.A.*, et al.* (1998). Targeted disruption of the catalytic subunit of the DNA-PK gene in mice confers severe combined immunodeficiency and radiosensitivity. Immunity *9*, 355-366.

Taccioli, G.E., Rathbun, G., Oltz, E., Stamato, T., Jeggo, P.A., and Alt, F.W. (1993). Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. Science *260*, 207-210.

Taghon, T., De Smedt, M., Stolz, F., Cnockaert, M., Plum, J., and Leclercq, G. (2001). Enforced expression of GATA-3 severely reduces human thymic cellularity. J Immunol *167*, 4468-4475.

Taghon, T., Thys, K., De Smedt, M., Weerkamp, F., Staal, F.J., Plum, J., and Leclercq, G. (2003). Homeobox gene expression profile in human hematopoietic multipotent stem cells and T-cell progenitors: implications for human T-cell development. Leukemia *17*, 1157-1163.

Taghon, T., Van de Walle, I., De Smet, G., De Smedt, M., Leclercq, G., Vandekerckhove, B., and Plum, J. (2009). Notch signaling is required for proliferation but not for differentiation at a well-defined beta-selection checkpoint during human T-cell development. Blood *113*, 3254-3263.

Takihara, Y., Tkachuk, D., Michalopoulos, E., Champagne, E., Reimann, J., Minden, M., and Mak, T.W. (1988). Sequence and organization of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell delta-chain locus. Proc Natl Acad Sci U S A *85*, 6097-6101.

Tanigaki, K., and Honjo, T. (2007). Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. Nat Immunol *8*, 451-456.

Taniguchi, T., and Minami, Y. (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. Cell *73*, 5-8.

Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., and Littman, D.R. (2002). Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. Cell *111*, 621-633.

Thompson, B.J., Buonamici, S., Sulis, M.L., Palomero, T., Vilimas, T., Basso, G., Ferrando, A., and Aifantis, I. (2007). The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. The Journal of experimental medicine *204*, 1825-1835.

Tillman, R.E., Wooley, A.L., Hughes, M.M., Wehrly, T.D., Swat, W., and Sleckman, B.P. (2002). Restrictions limiting the generation of DNA double strand breaks during chromosomal V(D)J recombination. The Journal of experimental medicine *195*, 309-316.

Tillman, R.E., Wooley, A.L., Khor, B., Wehrly, T.D., Little, C.A., and Sleckman, B.P. (2003). Cutting edge: targeting of V beta to D beta rearrangement by RSSs can be mediated by the V(D)J recombinase in the absence of additional lymphoid-specific factors. J Immunol *170*, 5-9.

Tremblay, M., Herblot, S., Lecuyer, E., and Hoang, T. (2003). Regulation of pT alpha gene expression by a dosage of E2A, HEB, and SCL. J Biol Chem *278*, 12680-12687.

Tripathi, R., Jackson, A., and Krangel, M.S. (2002). A change in the structure of Vbeta chromatin associated with TCR beta allelic exclusion. J Immunol *168*, 2316-2324.

Tsai, A.G., Lu, H., Raghavan, S.C., Muschen, M., Hsieh, C.L., and Lieber, M.R. (2008). Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. Cell *135*, 1130-1142.

Tsai, C.J., Kim, S.A., and Chu, G. (2007). Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 7851-7856.

Tsai, C.L., and Schatz, D.G. (2003). Regulation of RAG1/RAG2-mediated transposition by GTP and the C-terminal region of RAG2. Embo J *22*, 1922-1930.

Tycko, B., and Sklar, J. (1990). Chromosomal translocations in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinase model. Cancer Cells *2*, 1-8.

Tycko, B., Smith, S.D., and Sklar, J. (1991). Chromosomal translocations joining LCK and TCRB loci in human T cell leukemia. The Journal of experimental medicine *174*, 867-873.

van Gent, D.C., Ramsden, D.A., and Gellert, M. (1996). The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. Cell *85*, 107-113.

van Grotel, M., Meijerink, J.P., Beverloo, H.B., Langerak, A.W., Buys-Gladdines, J.G., Schneider, P., Poulsen, T.S., den Boer, M.L., Horstmann, M., Kamps, W.A*., et al.* (2006). The outcome of molecular-cytogenetic subgroups in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of patients treated according to DCOG or COALL protocols. Haematologica *91*, 1212-1221.

Van Limbergen, H., Beverloo, H.B., van Drunen, E., Janssens, A., Hahlen, K., Poppe, B., Van Roy, N., Marynen, P., De Paepe, A., Slater, R*., et al.* (2001). Molecular cytogenetic and clinical findings in ETV6/ABL1-positive leukemia. Genes Chromosomes Cancer *30*, 274-282.

Van Ness, B.G., Weigert, M., Coleclough, C., Mather, E.L., Kelley, D.E., and Perry, R.P. (1981). Transcription of the unrearranged mouse C kappa locus: sequence of the initiation region and comparison of activity with a rearranged V kappa-C kappa gene. Cell *27*, 593-602.

Van Vlierberghe, P., Meijerink, J.P., Stam, R.W., van der Smissen, W., van Wering, E.R., Beverloo, H.B., and Pieters, R. (2005). Activating FLT3 mutations in CD4+/CD8- pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias. Blood *106*, 4414-4415.

Van Vlierberghe, P., Pieters, R., Beverloo, H.B., and Meijerink, J.P. (2008a). Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol *143*, 153-168.

Van Vlierberghe, P., van Grotel, M., Beverloo, H.B., Lee, C., Helgason, T., Buijs-Gladdines, J., Passier, M., van Wering, E.R., Veerman, A.J., Kamps, W.A*., et al.* (2006). The cryptic chromosomal deletion del(11)(p12p13) as a new activation mechanism of LMO2 in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood *108*, 3520-3529.

Van Vlierberghe, P., van Grotel, M., Tchinda, J., Lee, C., Beverloo, H.B., van der Spek, P.J., Stubbs, A., Cools, J., Nagata, K., Fornerod, M*., et al.* (2008b). The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood *111*, 4668-4680.

Vanura, K., Montpellier, B., Le, T., Spicuglia, S., Navarro, J.M., Cabaud, O., Roulland, S., Vachez, E., Prinz, I., Ferrier, P*., et al.* (2007). In vivo reinsertion of excised episomes by the V(D)J recombinase: a potential threat to genomic stability. PLoS Biol *5*, e43.

Vanura, K., Vrsalovic, M.M., Le, T., Marculescu, R., Kusec, R., Jager, U., and Nadel, B. (2009). V(D)J targeting mistakes occur at low frequency in acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer *48*, 725-736.

Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W.S., and Bernstein, I.D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. Nat Med *6*, 1278-1281.

Verschuren, M.C., Wolvers-Tettero, I.L., Breit, T.M., Noordzij, J., van Wering, E.R., and van Dongen, J.J. (1997). Preferential rearrangements of the T cell receptor-delta-deleting elements in human T cells. J Immunol *158*, 1208-1216.

Villa, A., Santagata, S., Bozzi, F., Giliani, S., Frattini, A., Imberti, L., Gatta, L.B., Ochs, H.D., Schwarz, K., Notarangelo, L.D*., et al.* (1998). Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome. Cell *93*, 885-896.

Villa, A., Sobacchi, C., Notarangelo, L.D., Bozzi, F., Abinun, M., Abrahamsen, T.G., Arkwright, P.D., Baniyash, M., Brooks, E.G., Conley, M.E*., et al.* (2001). V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. Blood *97*, 81-88.

Villey, I., Caillol, D., Selz, F., Ferrier, P., and de Villartay, J.P. (1996). Defect in rearrangement of the most 5' TCR-J alpha following targeted deletion of T early alpha (TEA): implications for TCR alpha locus accessibility. Immunity *5*, 331-342.

von Boehmer, H., and Fehling, H.J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. Annu Rev Immunol *15*, 433-452.

Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. Nature *412*, 607-614.

Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A.H., and Speck, N.A. (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 3444-3449.

Wang, X., Xiao, G., Zhang, Y., Wen, X., Gao, X., Okada, S., and Liu, X. (2008). Regulation of Tcrb recombination ordering by c-Fos-dependent RAG deposition. Nat Immunol *9*, 794-801.

Ward, I.M., Minn, K., Jorda, K.G., and Chen, J. (2003). Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. J Biol Chem *278*, 19579-19582.

Watt, P.M., Kumar, R., and Kees, U.R. (2000). Promoter demethylation accompanies reactivation of the HOX11 proto-oncogene in leukemia. Genes Chromosomes Cancer *29*, 371-377.

Wayne, J., Suh, H., Misulovin, Z., Sokol, K.A., Inaba, K., and Nussenzweig, M.C. (1994). A regulatory role for recombinase activating genes, RAG-1 and RAG-2, in T cell development. Immunity *1*, 95-107.

Wei, X.C., Kishi, H., Jin, Z.X., Zhao, W.P., Kondo, S., Matsuda, T., Saito, S., and Muraguchi, A. (2002). Characterization of chromatin structure and enhancer elements for murine recombination activating gene-2. J Immunol *169*, 873-881.

West, K.L., Singha, N.C., De Ioannes, P., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Cortes, P. (2005). A direct interaction between the RAG2 C terminus and the core histones is required for efficient V(D)J recombination. Immunity *23*, 203-212.

West, R.B., Yaneva, M., and Lieber, M.R. (1998). Productive and nonproductive complexes of Ku and DNA-dependent protein kinase at DNA termini. Mol Cell Biol *18*, 5908-5920.

Weterings, E., Verkaik, N.S., Bruggenwirth, H.T., Hoeijmakers, J.H., and van Gent, D.C. (2003). The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. Nucleic Acids Res *31*, 7238-7246.

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

Wilson, A., Held, W., and MacDonald, H.R. (1994). Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. The Journal of experimental medicine *179*, 1355-1360.

Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2002). Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. Immunity *16*, 869-879.

Wolffe, A.P., and Guschin, D. (2000). Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. Journal of structural biology *129*, 102-122.

Wong, W.F., Kohu, K., Chiba, T., Sato, T., and Satake, M. (2011). Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx. Immunology *132*, 157-164.

Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. J Exp Med *184*, 903-911.

Wu, P.Y., Frit, P., Malivert, L., Revy, P., Biard, D., Salles, B., and Calsou, P. (2007). Interplay between Cernunnos-XLF and nonhomologous end-joining proteins at DNA ends in the cell. J Biol Chem *282*, 31937-31943.

Xu, X., and Stern, D.F. (2003). NFBD1/MDC1 regulates ionizing radiation-induced focus formation by DNA checkpoint signaling and repair factors. Faseb J *17*, 1842-1848.

Yancopoulos, G.D., and Alt, F.W. (1985). Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. Cell *40*, 271-281.

Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Suh, H., Hood, L., and Alt, F.W. (1986). Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase. Cell *44*, 251-259.

Yannoutsos, N., Barreto, V., Misulovin, Z., Gazumyan, A., Yu, W., Rajewsky, N., Peixoto, B.R., Eisenreich, T., and Nussenzweig, M.C. (2004). A cis element in the recombination activating gene locus regulates gene expression by counteracting a distant silencer. Nat Immunol *5*, 443-450.

Yin, T., and Li, L. (2006). The stem cell niches in bone. J Clin Invest *116*, 1195-1201.

Yokota, S., Nakao, M., Horiike, S., Seriu, T., Iwai, T., Kaneko, H., Azuma, H., Oka, T., Takeda, T., Watanabe, A.*, et al.* (1998). Mutational analysis of the N-ras gene in acute lymphoblastic leukemia: a study of 125 Japanese pediatric cases. Int J Hematol *67*, 379-387.

Zha, S., Alt, F.W., Cheng, H.L., Brush, J.W., and Li, G. (2007). Defective DNA repair and increased genomic instability in Cernunnos-XLF-deficient murine ES cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 4518-4523.

Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M.*, et al.* (2012). The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. Nature *481*, 157-163.

Zhang, Y., Gostissa, M., Hildebrand, D.G., Becker, M.S., Boboila, C., Chiarle, R., Lewis, S., and Alt, F.W. (2010). The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. Advances in immunology *106*, 93-133.

Zhang, Z., Espinoza, C.R., Yu, Z., Stephan, R., He, T., Williams, G.S., Burrows, P.D., Hagman, J., Feeney, A.J., and Cooper, M.D. (2006). Transcription factor Pax5 (BSAP) transactivates the RAG-mediated V(H)-to-DJ(H) rearrangement of immunoglobulin genes. Nat Immunol *7*, 616-624.

Zhu, C., Bogue, M.A., Lim, D.S., Hasty, P., and Roth, D.B. (1996). Ku86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. Cell *86*, 379-389.

Zlotoff, D.A., Sambandam, A., Logan, T.D., Bell, J.J., Schwarz, B.A., and Bhandoola, A. (2010). CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. Blood *115*, 1897-1905.

Annexes

Annexe 1

Etude des mutations de JAK1 dans les LAL-T

JAK1 mutations are not frequent events in adult T-ALL: a GRAALL study

British Journal of Hematology, 2010

Asnafi V, **Le Noir S**, Lhermitte L, Gardin C, Legrand F, Vallantin X, Malfuson JV, Ifrah N,Dombret H, Macintyre EA

.

Lucey, D.R., Clerici, M. & Shearer, G.M. (1996) Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, **9,** 532–562.

Lund, F.E. (2008) Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Current Opinion in Immunology*, **20,** 332–339.

Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. & O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, **19,** 683–765.

Keywords: B lymphocytes, cytokines, haemophilia A, rituximab, T-helper.

First published online 18 September 2009
doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07911.x

JAK1 mutations are not frequent events in adult T-ALL: a GRAALL study

Activating somatic mutations in Tyrosine Kinase (TK) genes are frequent events in haematological malignancies, when they can provide promising therapeutic targets (Loriaux *et al*, 2008; Scholl *et al*, 2008). Somatic mutations of *JAK1*, a Janus Kinase (JAK) family member which plays important roles in normal and neoplastic haematopoiesis, were reported in 2/94 adult *de-novo* acute myeloid leukaemia (AML) (Xiang *et al*, 2008). Flex *et al* (2008) reported *JAK1* mutations in acute lymphoblastic leukaemia (ALL), particularly in adult T lineage cases, where the mutation rate was 8/38 (21%). Mutations were found within the SH2 (exon 10), Pseudo-Tyr-Kinase (exons 13 and 15) and the Tyr-Kinase (exon 18) domains of *JAK1*, with 6/8 mutations occurring in exons 15 and 18. The structural and functional consequences of these mutations was variable in molecular modelling and *in-vitro* assays (Flex *et al*, 2008). Mutated cases were suggested to be associated with older patients and a poor outcome (Flex *et al*, 2008), despite the fact that all *JAK1* mutated cases also demonstrated *NOTCH1* mutations, which are known to be of favourable prognosis (Breit *et al*, 2006; Asnafi *et al*, 2009). Jeong *et al* identified *JAK1* mutations in exons 13 and 16 in 3 of 11 adult T-ALL, but did not study exons 15 and 18 (Jeong *et al*, 2008). We therefore assessed *JAK1* in adults with T-ALL included in the French prospective multicentre Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukaemia (GRAALL) study (Huguet *et al*, 2009).

We screened for all of these mutations by direct sequencing of genomic DNA at diagnosis in 108 cases. Overall, *JAK1* mutations were found in only four cases (Table I). Two of these mutations were previously reported and the two new mutations were absent from complete remission samples. The frequency of *JAK1* mutation was significantly lower than expected and notably no mutation was observed within the TK domain. Flex *et al* (2008) reported that patients with mutated *JAK1* allele are relatively old, consistent with the lower prevalence of mutation in childhood T-ALL. The overall median age in the present series was 30·5 years, identical to the *JAK1* mutated cases (median 30 years, range 26–33 years). All *JAK1* mutations were associated with *NOTCH1* mutations (3/4 with PEST domain mutations associated or not with HD mutation) but this was not statistically significant because 60% of GRAALL T-ALL cases have *NOTCH1* mutations (Asnafi *et al*, 2009). Two of the *JAK1* mutated cases expressed TLX1 and a third expressed TLX3, but once again this did not have statistical value because 10 TLX3+ and 19 TLX1+ cases included in this study were *JAK1* germline. Regarding the prognostic value of *JAK1* mutations, all 4 cases achieved complete remission and 3/4 were cortico- and chemo-sensitive and were alive in first complete remission (CR1) at 54, 28 and 8 months from diagnosis. One patient was chemo-resistant and underwent bone marrow transplant-allograft in CR1 but died off-therapy

Table I. *JAK1* mutations reported in adult T-ALL.

	Adult T-ALL	Exon 10 SH2	Exon 13 Tyr-kinase-like	Exon 15 Tyr-kinase-like	Exon 16 Tyr-kinase-like	Exon 18 Tyr-kinase	Incidence (%)
Flex *et al* (2008)	38	1 (S512L)	1 (A634D)	3 (R724H)	ND	3 (R879S/C/H)	21·00
Jeong *et al* (2008)	11	ND	2 (V658F)	ND	1 (L783F)	ND	27·30
Present report	108	1 (S512L)	1 (Y652H)	2 (R724H/Q)	0	0	3·70

ND, not done.

 © 2009 Blackwell Publishing Ltd,

from infectious complication. These data are in contradiction to the two previous reports (Flex *et al*, 2008; Jeong *et al*, 2008), and suggest that *JAK1* mutations are rare in adult T-ALL from the GRAALL study, occurring in only 3·7% of patients, nor do they appear to be associated with a particularly poor outcome.

These results merit confirmation in order to determine whether these differences are simply due to statistical variations, small patient numbers or whether factors, such as ethnic group, impact on the incidence of *JAK1* mutations in adult T-ALL.

Acknowledgements

We thank all clinicians and biologists from the GRAALL group for providing data and material and Chantal Persiaux and Caroline Caudron for technical assistance. This work was supported by the Laurette Fugain Association.

Vahid Asnafi[1]
Sandrine Le Noir[1]
Ludovic Lhermitte[1]
Claude Gardin[2]
Faézeh Legrand[3]
Xavier Vallantin[4]
Jean-Valère Malfuson[5]
Norbert Ifrah[6]
Hervé Dombret[7]
Elizabeth Macintyre[1]

[1]CNRS UMR 8147 and Department of Haematology, Hôpital Necker-Enfants-Malades Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Paris-5 Descartes Paris, [2]Department of Haematology, Hôpital Avicenne, Bobigny, [3]Department of Haematology, Hôpital JeanMinjoz, Besançon, [4]Department of Haematology, Centre Hospitalier, Perpignan, [5]Department of Haematology, Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Clamart, [6]Department of Haematology, Centre Hospitalier, Angers, and [7]Department of Haematology Hôpital St-Louis, Paris, France.
E-mail: elizabeth.macintyre@nck.aphp.fr

References

Asnafi, V., Buzyn, A., Le Noir, S., Baleydier, F., Simon, A., Beldjord, K., Reman, O., Witz, F., Fagot, T., Tavernier, E., Turlure, P., Leguay, T., Huguet, F., Vernant, J.P., Daniel, F., Bene, M.C., Ifrah, N., Thomas, X., Dombret, H. & Macintyre, E. (2009) NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. *Blood*, **113,** 3918–3924.

Breit, S., Stanulla, M., Flohr, T., Schrappe, M., Ludwig, W.D., Tolle, G., Happich, M., Muckenthaler, M.U. & Kulozik, A.E. (2006) Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*, **108,** 1151–1157.

Flex, E., Petrangeli, V., Stella, L., Chiaretti, S., Hornakova, T., Knoops, L., Ariola, C., Fodale, V., Clappier, E., Paoloni, F., Martinelli, S., Fragale, A., Sanchez, M., Tavolaro, S., Messina, M., Cazzaniga, G., Camera, A., Pizzolo, G., Tornesello, A., Vignetti, M., Battistini, A., Cave, H., Gelb, B.D., Renauld, J.C., Biondi, A., Constantinescu, S.N., Foa, R. & Tartaglia, M. (2008) Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*, **205,** 751–758.

Huguet, F., Leguay, T., Raffoux, E., Thomas, X., Beldjord, K., Delabesse, E., Chevallier, P., Buzyn, A., Delannoy, A., Chalandon, Y., Vernant, J.P., Lafage-Pochitaloff, M., Chassevent, A., Lheritier, V., Macintyre, E., Bene, M.C., Ifrah, N. & Dombret, H. (2009) Pediatric-inspired therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL-2003 study. *Journal of Clinical Oncology*, **27,** 911–918.

Jeong, E.G., Kim, M.S., Nam, H.K., Min, C.K., Lee, S., Chung, Y.J., Yoo, N.J. & Lee, S.H. (2008) Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers. *Clinical Cancer Research*, **14,** 3716–3721.

Loriaux, M.M., Levine, R.L., Tyner, J.W., Frohling, S., Scholl, C., Stoffregen, E.P., Wernig, G., Erickson, H., Eide, C.A., Berger, R., Bernard, O.A., Griffin, J.D., Stone, R.M., Lee, B., Meyerson, M., Heinrich, M.C., Deininger, M.W., Gilliland, D.G. & Druker, B.J. (2008) High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia. *Blood*, **111,** 4788–4796.

Scholl, C., Gilliland, D.G. & Frohling, S. (2008) Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Seminars in Oncology*, **35,** 336–345.

Xiang, Z., Zhao, Y., Mitaksov, V., Fremont, D.H., Kasai, Y., Molitoris, A., Ries, R.E., Miner, T.L., McLellan, M.D., DiPersio, J.F., Link, D.C., Payton, J.E., Graubert, T.A., Watson, M., Shannon, W., Heath, S.E., Nagarajan, R., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Ley, T.J. & Tomasson, M.H. (2008) Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **111,** 4809–4812.

Keywords: T-acute lymphoblastic leukaemia, Janus Kinase 1.

First published online 18 September 2009
doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07912.x

Annexe 2

Etude des mutations de NOTCH1 et FBXW7 dans les LAL-T

NOTCH1/FBXW7 mutations identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) : a groupe for research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study

Blood, 2009

Asnafi V*, Buzyn A*, **Le Noir S***, Baleydier F, Simon A, Beldjord K, Reman O, Witz F, Fagot T, Tavernier E, Turlure P, Leguay T, Huguet F, Vernant JP, Daniel F, Béné MC, Ifrah N, Thomas X, Dombret H, Macintyre EA.
* co-premiers auteurs

Ce travail avait pour objectif d'identifier un marqueur de stratification dans les LAL-T. Pour ce faire les mutations des gènes NOTCH1 (domaine HD, juxtamembranaire, TAD et PEST) FBXW7 (exons 9, 10, 12) ont été analysées.

Cette étude a porté sur une cohorte de 141 LAL-T traitées dans deux protocoles différents : LALA94 et GRAALL-03.

Des mutations de NOTCH1 ont été identifiées dans 88 cas (62%) de LAL-T. Les mutations du domaine HD sont les plus fréquentes alors que les mutations du domaine juxtamembranaire sont très rares (3 cas). Des mutations de FBXW7 ont été identifiées dans 34 cas (24%) de LAL-T au niveau d'arginine (R479, R465, R505) précédemment décrites comme mutées dans les LAL-T. Les mutations de FBXW7 sont souvent associées aux mutations de NOTCH1 mais jamais au niveau du domaine PEST. Les deux protocoles de traitement présentent les mêmes taux de mutations pour ces deux gènes.

Aucune corrélation clinico-biologique n'a été identifiée selon que les patients présentent ou non des mutations pour les gènes NOTCH1 et FBXW7. Cependant, une étude multivariée a permis d'idendifier le groupe de patients NOTCH1/FBXW7 comme de bon pronostic (EFS 17 vs 36 mois p=0.01).

From www.bloodjournal.org at AP-HP DELEGATION FORMATION DEV COMP on May 29, 2009. For personal use only.

NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study

*Vahid Asnafi,[1,2] *Agnès Buzyn,[1] *Sandrine Le Noir,[1,2] Frédéric Baleydier,[1,2] Arnauld Simon,[1] Kheira Beldjord,[1,2] Oumedaly Reman,[3] Francis Witz,[4] Thierry Fagot,[5] Emmanuelle Tavernier,[6] Pascal Turlure,[7] Thibaut Leguay,[8] Françoise Huguet,[9] Jean-Paul Vernant,[10] Francis Daniel,[9] Marie-Christine Béné,[4] Norbert Ifrah,[11] Xavier Thomas,[12] Hervé Dombret,[13] and Elizabeth Macintyre[1,2]

[1]Université Paris 5 Descartes and Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP) and Hematology Department, Hôpital Necker-Enfants-Malades, Paris; [2]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) EMI0210; [3]Department of Hematology, Centre Hospitalier, Caen; [4]Department of Hematology and laboratoire d'immunophénotypage, Hôpitaux de Brabois, Vandoeuvre les Nancy; [5]Department of Hematology, Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Clamart; [6]Department of Hematology, Institut de Cancérologie de la Loire, St Priest en Jarez; [7]Department of Hematology, Centre Hospitalier Dupuytren, Limoges; [8]Department of Hematology, Centre Hospitalier du Haut Lévêque, Pessac; [9]Department of Hematology, Hôpital Purpan, Toulouse; [10]Department of Hematology, Hôpital Pitié Salpétrière, Paris; [11]Department of Hematology, Centre Hospitalier, Angers; [12]Department of Hematology Hôpital Edouard Herriot, Lyon; and [13]Department of Hematology Hôpital St-Louis, Paris, France

Many somatic genetic abnormalities have been identified in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) but each individual abnormality accounts for a small proportion of cases; therapeutic stratification consequently still relies on classical clinical markers. *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutations both lead to activation of the NOTCH1 pathway and are among the most frequent mutations in T-ALL. We screened 141 adult diagnostic T-ALL samples from patients treated on either the Lymphoblastic Acute Leukemia in Adults (LALA)-94 (n = 87) or the GRAALL-2003 (n = 54) trials. In 88 cases (62%) there were demonstrated *NOTCH1* mutations (42% heterodimerization [HD], 10% HD+proline glutamate serine threonine [PEST], 6% PEST, 2% juxtamembrane mutations, 2% transactivation domain [TAD]) and 34 cases (24%) had *FBXW7* mutations (21 cases had both *NOTCH1* and *FBXW7* mutations); 40 cases (28%) were wild type for both. There was no significant correlation between *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutations and clinico-biologic features. Median event-free survival (EFS) and overall survival (OS) were 36 versus 17 months (*P* = .01) and not reached versus 32 months (*P* = .004) in patients with *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutations versus other patients, respectively. Multivariate analysis showed that the presence of *NOTCH1/FBXW7* mutations was an independent good prognostic factor for EFS and OS (*P* = .02 and *P* = .01, respectively). These data demonstrate that NOTCH1 pathway activation by either *NOTCH1* or *FBXW7* mutation identifies a large group of patients with a favorable outcome that could justify individual therapeutic stratification for T-ALL. (Blood. 2009; 113:3918-3924)

Introduction

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) accounts for 25% of adult ALL cases. Although outcome has been improved with current therapy, survival rates remain between 50% and 60% at 5 years.[1-3] The few initial prognostic factors used for therapeutic stratification are predominantly clinical: age, WBC count, and central nervous system (CNS) involvement. Although recent advances have led to spectacular progress in understanding of T-ALL oncogenesis,[4] molecular markers are so numerous that they are poorly adapted to therapeutic stratification of major discriminatory patient subgroups. The only common subgroup markers with prognostic significance are *TLX1* and *TLX3* overexpression, considered respectively as favorable and adverse genetic markers in adult French and German trials; however, both are present in only 10% to 15% of cases.[5-8] There is therefore a clear need for prognostic markers that identify larger patient subgroups that require specific treatment, notably but not exclusively, the use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in first complete remission (CR).

The NOTCH1 signaling pathway has been shown to be an essential factor in normal and pathologic T-lymphoid development.[9,10] In T-ALL, *NOTCH1* abnormalities were first identified in the t(7;9)(q34;q34.3), which juxtaposes the C-terminal region of human *NOTCH1* to the TCRβ enhancer, leading to aberrant expression of a truncated dominant active and ligand independent form of NOTCH1 (called TAN-1) in rare patients (< 1%).[11] In mouse models, constitutive activation of *NOTCH1* signaling induced T-ALL, as did transplantation with TAN1-expressing hematopoietic progenitor cells.[12-15] In 2004, activating *NOTCH1* mutations were reported in approximately 50% of childhood T-ALLs.[16] These mutations involve either the heterodimerization (HD) domain, when they probably facilitate cleavage of the NOTCH receptor and/or the negative regulatory proline glutamate

Submitted October 17, 2008; accepted December 4, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 23, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-10-184069.

*V.A., A.B., and S.L.N. contributed equally to this report.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2009 by The American Society of Hematology

From www.bloodjournal.org at AP-HP DELEGATION FORMATION DEV COMP on May 29, 2009. For personal use only.

serine threonine (PEST) domain, when they probably increase the half-life of intracellular NOTCH (ICN). A large series of pediatric T-ALLs confirmed this incidence and suggested a favorable outcome overall and within the cortical subgroup.[17] More recently, rare *NOTCH1* mutations of the juxtamembrane domain have been reported as a mechanism of marked NOTCH1 pathway activation in T-ALL.[18] An alternative mechanism of increased NOTCH1 activation by loss-of-function mutations of FBXW7, leading to inhibition of ubiquitin-mediated degradation of the activated form of NOTCH1,[19-21] has also been reported recently but their prognostic impact is unknown in both pediatric and adult T-ALL. The incidence and clinical impact of *NOTCH1* mutations has only been reported in a very limited number of adult cases.[22,23] We therefore evaluated the incidence and prognostic impact of *NOTCH1* and *FBXW7* mutations in 141 adult T-ALLs from the Lymphoblastic Acute Leukemia in Adults (LALA)–94 and Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL)–2003 trials.

Methods

LALA-94 and GRAALL-2003 trials

The present study is based on analysis of a total of 141 adults more than 15 years of age treated on the LALA-94 (n = 87) and GRAALL-2003 (n = 54) prospective multicenter trials. The CR rate, survival, outcome, and follow-up of the 87 LALA-94 T-ALL patients with available material did not differ significantly from the 236 T-ALL patients included in this protocol:[24] their 3-year overall survival rates were 45% (95% confidence interval [CI], 34-55) and 41% (95% CI, 34-47), respectively. The GRAALL-2003 protocol was a pediatric-inspired phase 2 trial that enrolled 224 adults with Ph-negative ALL between November 2003 and November 2005.[25] We report here on 54 patients with T-ALL from whom material was available for single center analysis. These 54 patients were representative of the overall population because their outcome did not differ from the overall 74 patients with T-ALL. The 3-year overall survival rates for these groups were 68% (95% CI, 54%-79%) and 67% (95% CI, 55%-77%), respectively.

Furthermore, the patients from the LALA-94 and the GRAALL-2003 trials did not differ with respect to male-to-female sex ratio (71/16 and 47/7, respectively), age (median, range: 28 years, 15-55 years and 27 years, 15-58 years, respectively), WBC (median, range: 71 10^9/L, 1.4-620 and 31 10^9/L, 0.9-399, respectively) and initial complete remission rate (92% and 98%, respectively). The median follow-up rates for LALA-94 and GRAALL-2003 are 90 and 38 months, respectively, with a median follow-up of 47 months for the cohort presented here. The number of patients who received allogeneic HSCT in first CR was 10 of 87 (11%) in the LALA-94 group versus 15 of 54 (28%) in the GRAALL-2003 protocol.

Samples and diagnostic analysis

Diagnostic peripheral blood or bone marrow samples from 141 adult patients with T-ALL, defined by expression of CD7 and cytoplasmic and/or surface CD3 and negativity for CD19 and MPO, were analyzed, with informed consent according to the Declaration of Helsinki. Details of patient classification, immunophenotype, T-cell receptor (TCR) analysis, fusion transcript detection (*SIL-TAL1* and *CALM-AF10*), and oncogenic transcript quantification (*TLX1* and *TLX3*) are as described.[5]

NOTCH1 and *FBXW7* mutation screening

DNA and RNA were extracted from cryopreserved tissue samples, as described.[5] Direct sequencing was performed centrally at the Necker Hospital for the 141 patients with T-ALL from 121 DNA and 20 cDNA samples. Exons 26 (HD N-terminal), 27 (HD C-terminal), 28 (juxtamembrane domain), and 34 (transactivation domain TAD and the PEST domain) of *NOTCH1* and exons 9, 10, and 12 of WD40 domain of *FBXW7* were sequenced. Primers used for *NOTCH1* and *FBXW7* amplification are reported in Table S1 (available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a 50-μL reaction containing 100 ng DNA (or equivalent cDNA), 0.25 μL HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN, Courtabeauf, France), and 20 μM forward and reverse primer with the GeneAmp 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR products were run on 1.5% agarose gels, purified (QIAGEN), sequenced in both directions, and analyzed using SeqMan software (DNA). Before sequencing, all the *NOTCH1* and *FBXW7* single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in the NCBI SNP database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/). Diagnostic samples were classified on the basis of their *NOTCH1* and *FBXW7* status as mutated or wild-type (WT), based on analysis of the aforementioned gene segments.

Statistical analysis

Patient characteristics and CR rates were compared using the Fisher exact test and median comparisons were performed with the Mann-Whitney test. Overall survival (OS) was calculated from the date of randomization until the date of death or last contact. Event-free survival (EFS) was calculated from the date of randomization until the date of induction failure, first relapse, death, or last contact. OS and EFS were estimated by the Kaplan-Meier method,[26] then compared by the log-rank test.[27] For OS and EFS estimations and comparisons, all patients who received an allogeneic HSCT were analyzed with and without censoring at the time of HSCT. Multivariate analyses were performed using the Cox model and tested by the log likelihood ratio test. The following covariates were tested in univariate analyses for both EFS and OS endpoints: age as continuous variable, WBC as log (WBC+1), GRAALL-2003 versus LALA-94 trial, cortical phenotype, and *NOTCH1* or *NOTCH1/FBXW7* mutational status. Only covariates with a *P* value of .10 or less in univariate analysis were retained for multivariate models. Cortical phenotype was not retained for this reason. As TLX1 expression levels were studied in a subset of 127 patients only, all multivariate analyses were performed first in the whole population of 141 patients, not taking this factor into account, and repeated in these 127 patients but taking TLX1 expression level into account. Hazard ratios (HRs) are given with 95% confidence intervals (CIs). All calculations were performed using the STATA software, version 9.0 (Stata, College Station, TX).

Results

Incidence and type of *NOTCH1* and *FBXW7* mutations in adult T-ALL

Overall, *NOTCH1* mutations were identified in 88 (62%) of the 141 adult patients with T-ALL whereas 53 cases (38%) were wild type (WT) for the HD, TAD, and PEST domains and the recently reported juxtamembrane mutation (Table 1). PEST mutations were only detected in 9 cases as a unique mutation and in 16 cases in association with HD mutation (15 cases) or duplication (1 case). HD mutations alone (59 cases), in association with PEST (15 cases), or TAD mutations (1 case) were the most frequent *NOTCH1* mutations (Table 2). The juxtamembrane mutation was detected in 3 of 141 (2%) adult cases, but was only found as an isolated abnormality in one case, being associated with HD or TAD mutation in the other 2 cases. The translated proteins of all identified *NOTCH1* mutations are shown in Table S2.

FBXW7 mutations were present in 34 cases (24%), alone in 13 cases and in association with *NOTCH1* mutations in 21 cases (Table 1). Of these mutations, 30 of 34 correspond to the 4 previously reported arginine substitutions at R479, R465, R505, and R689.[21] The 4 remaining *FBXW7* mutations (G423V, G477S, S516G, and a stop insertion) were all found in association with an HD *NOTCH1* mutation.

From www.bloodjournal.org at AP-HP DELEGATION FORMATION DEV COMP on May 29, 2009. For personal use only.

Table 1. Clinical, immunophenotypic, and genotypic characteristics of adult T-ALL as a function of *NOTCH1/FBXW7* status

		NOTCH1 mutation		*FBXW7* mutation		*NOTCH1* and/or *FBXW7* mutation	
	Total (%)	Mutant, n (%)	Wild-type, n (%)	Mutant, n (%)	Wild-type, n (%)	Mutant, n (%)	Wild-type, n (%)
	141	88 (62)	53 (38)	34 (24)	107 (76)	101 (72)	40 (28)
TCR subsets analyzed							
Immature	42	25 (60)	17 (40)	6 (14)	36 (86)	27 (64)	15 (36)
Pre-αβ	44	30 (68)	14 (32)	13 (30)	31 (70)	35 (80)	9 (20)
TCR+	29	13 (45)	15 (53)	7 (24)	22 (76)	19 (65)	10 (34)
ND	26	19 (73)	7 (27)	8 (31)	18 (70)	20 (77)	6 (23)
EGIL							
1-2	43	25 (58)	18 (42)	6 (14)	37 (86)	27 (63)	16 (37)
3	73	52 (71)	21 (29)	24 (33)	49 (67)	59 (81)	14 (19)
4	15	7 (47)	8 (53)	4 (27)	11 (73)	11 (73)	4 (27)
ND	10	4 (40)	6 (60)	0 (0)	10 (100)	4 (40)	6 (60)
Genotype subsets analyzed							
CALM-AF10	7	3 (43)	4 (57)	4 (57)	3 (43)	5 (71)	2 (29)
SIL-TAL1	10	4 (40)	6 (60)	1 (10)	9 (90)	5 (50)	5 (50)
HOX11	21	18 (86)	3 (14)	5 (24)	16 (76)	20 (95)	1 (5)
HOX11L2	13	7 (54)	6 (46)	4 (31)	9 (69)	10 (77)	3 (23)
None of above	76	44 (58)	32 (42)	17 (22)	59 (78)	48 (63)	28 (37)
ND	14	12 (86)	2 (14)	3 (21)	11 (79)	13 (93)	1 (7)
Clinical subsets analyzed							
Median age, y	28	28	28	28	31	27	29
Age >35	46 (33)	30 (34)	16 (30)	10 (29)	36 (34)	33 (33)	13 (33)
Median WBC	54	51	94	59	94	51	104
WBC >100g/L	52 (37)	28 (31)	24 (45)	7 (21)	45 (42)	31 (31)	21 (53)
High-risk MRC-ECOG	85 (60)	50 (57)	35 (66)	16 (47)	69 (64)	56 (56)	29 (73)
Mediastinal involvement	66 (47)	43 (48)	23 (43)	20 (59)	46 (43)	51 (52)	15 (38)
CNS involvement	12 (9)	4 (5)	8 (15)	2 (6)	10 (9)	6 (6)	6 (15)

No statistically significant differences were observed.

Overall, 101 cases were classified as *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutated and 40 cases (28%) as WT for both. The proportion of *NOTCH1/FBXW7* mutated cases was similar within the 2 protocols: 39 of 54 (72%) and 62 of 87 (71%) in the GRAALL-2003 and the LALA-94, respectively.

Clinical, phenotypic, and oncogenic features of *NOTCH1* and *NOTCH1/FBXW7* mutated T-ALL

Clinical features of patients were analyzed according to the presence or absence of *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutations (Table 1). The median age of the patients and the incidence of mediastinal involvement were similar in all groups. There was a trend for a higher WBC count and more frequent CNS involvement in patients demonstrating WT *NOTCH1* and *FBXW7* ($P = .08$). Similarly, high-risk Medical Research Council/Eastern Cooperative Oncology Group (MRC/ECOG) features[28] (age > 35 years and WBC count > 100 g/L) were found in 55% of patients with mutated *NOTCH1* and/or *FBXW7*, compared with 72.5% of patients with WT *NOTCH1* and *FBXW7* status, but this difference was not statistically significant ($P = .085$).

Table 2. Combinations of *NOTCH1* mutations HD (heterodimerization) and PEST (proline, glutamatic acid, serine, threonine), and *FBXW7* mutations

NOTCH1/FBXW7 mutation	HD only, n (%)	HD + PEST, n (%)	PEST only, n (%)	Others, n (%)
GL	41 (29)	13 (9)	9 (6)	4* (3)
Mutated	18 (13)	2 (1)	0 (0)	1† (1)
Total	59 (42)	15 (10)	9 (6)	5 (4)

*Duplication, PEST+duplication, TAD+duplication, TAD.
†HD+TAD

In contrast to pediatric T-ALL, there was no statistical correlation between the presence of *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutation and stage of maturation arrest, although mutations tended to be more frequent in pre-αβ/EGILIII immunophenotypic subtypes. With respect to oncogenetic subtypes, *NOTCH1/FBXW7* mutations were more frequent in cases expressing *TLX1* and less frequent in *SIL-TAL1*$^+$ cases. All but one of the 21 *TLX1*-expressing cases (95%) were *NOTCH1/FBXW7* mutated, as compared with only 64% of cases not expressing *TLX1* ($P = .004$).

Prognostic value of *NOTCH1* and *FBXW7* mutations within the adult LALA-94 and GRAALL-2003 therapeutic protocols

Results of prognostic analyses are summarized in Table 3. Basically, we first analyzed the prognosis of patients with mutated *NOTCH1* (n = 88) with those with WT *NOTCH1* (n = 53), without taking into account *FBXW7* status. We then compared patients with a WT genotype for both *NOTCH1* and *FBXW7* (n = 40) with those with either a *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutation (n = 101). As *TLX1* expression level was a significant prognostic factor in this cohort of patients, but could not be tested in all of them, Table 3 also presents multivariate analyses in the subset of 127 patients tested for *TLX1* expression.

When first considering *NOTCH1* mutation only, the CR rate was similar in patients with *NOTCH1* mutations as compared with those with WT *NOTCH1* (97% vs 91% respectively; $P = .15$). The median EFS was 22 months for patients with WT *NOTCH1* versus 36 months for the group with mutated *NOTCH1* ($P = .03$; Figure 1A). The median OS was 38 months for patients with WT *NOTCH1* but had not been reached for cases with *NOTCH1/FBXW7* mutations ($P = .03$; Figure 1B). In multivariate analysis, this good prognostic impact of the presence of a *NOTCH1* mutation did not

From www.bloodjournal.org at AP-HP DELEGATION FORMATION DEV COMP on May 29, 2009. For personal use only.

Table 3. Univariate and multivariate prognostic analysis

	NOTCH1			*NOTCH1/FBXW7*	
	Univariate *P* (95% CI)	**Multivariate HR (95% CI)**	***P***	**Multivariate HR (95% CI)**	***P***
For EFS					
In all patients					
Age*	.22	NA	NA	NA	NA
WBC†	.08	1.11 (0.92-1.34)	.29	1.10 (0.91-1.32)	.33
GRAALL-2003 trial	< .001	0.44 (0.26-0.75)	.002	0.43 (0.25-0.72)	.001
NOTCH mutation	.03	0.68 (0.44-1.06)	.9	NA	NA
NOTCH1/FBXW7 mutation	.01	NA	NA	0.58 (0.37-0.92)	.02
In the 127 pateints tested for *TLX1* expression					
Age*	.27	NA	NA	NA	NA
WBC†	.05	1.12 (0.92-1.36)	.28	1.11 (0.92-1.35)	.28
GRAALL-2003 trial	< .001	0.42 (0.24-0.73)	.002	0.39 (0.22-0.69)	.001
High *TLX1* expression	.03	0.72 (0.48-1.08)	.11	0.73 (0.49-1.09)	.12
NOTCH1 mutation	.02	0.72 (0.45-1.16)	.17	NA	NA
NOTCH1/FBXW7 mutation	.015	NA	NA	0.63 (0.39-1.02)	.06
For OS					
In all patients					
Age*	.03	1.03 (1.01-1.05)	.015	1.03 (1.01-1.05)	.03
WBC†	.09	1.16 (0.95-1.41)	.15	1.14 (0.94-1.39)	.19
GRAALL-2003 trial	.01	0.57 (0.33-0.99)	.05	0.55 (0.31-0.87)	.03
NOTCH1 mutation	.03	0.63 (0.39-1.01)	.06	NA	NA
NOTCH1/FBXW7 mutation	.004	NA	NA	0.54 (0.33-0.87)	.01
In the 127 patients tested for *TLX1* expression					
Age*	.08	1.03 (1.01-1.06)	.02	1.03 (1.01-1.05)	.04
WBC†	.08	1.17 (0.95-1.44)	.13	1.16 (0.94-1.42)	.16
GRAALL-2003 trial	.006	0.53 (0.29-0.96)	.35	0.50 (0.27-0.90)	.02
High *TLX1* expression	.02	0.62 (0.39-0.99)	.05	0.64 (0.40-1.03)	.07
NOTCH1 mutation	.03	0.71 (0.43-1.18)	.19	NA	NA
NOTCH1/FBXW7 mutation	.005	NA	NA	0.61 (0.36-1.01)	.06

HR indicates hazard ratio; and NA, not applicable.
*Considered as a continuous variable.
†Entered as log (WBC+1).

reach statistical significance, although trends were observed for both EFS and OS (Table 3).

When both *NOTCH1* and *FBXW7* mutations were taken into account, CR rates remained comparable in patients with a WT genotype for both *NOTCH1* and *FBXW7* as compared with those with either a *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutation (95% and 92.5%, respectively; $P = .69$). Median EFS for the WT group was only 17 months, compared with 36 months for the mutated group (Figure 2A, $P = .01$). An impact from HSCT in first CR is unlikely since the proportion of patients who underwent transplantation was 6 of 40 (15%) in the WT group as compared with 19 of 101 (19%) in the mutated group ($P = .81$). With respect to OS, median OS was not reached for the mutated group compared with only 32 months for the WT group ($P = .004$; Figure 2B). The 21 patients with both *NOTCH1* and *FBXW7* mutations demonstrated the same OS and EFS as patients with mutations of one or the other (data not shown). In the whole patient population, only 2 independent good prognostic factors were found for EFS (GRAALL-2003 trial and *NOTCH1/FBXW7* mutation; $P = .001$ and .02, respectively) and 3 independent good prognostic factors for OS (younger age, GRAALL-2003 trial, and *NOTCH1/FBXW7* mutation; $P = .03$, .03, and .01, respectively; Table 3). Despite the fact that most patients with high *TLX1* expression had *NOTCH1/FBXW7* mutation (Table 1), trends for a favorable impact of *NOTCH1/FBXW7* mutation were still observed in multivariate analysis performed in the subset of 127 patients tested for *TLX1* expression ($P = .06$ for both EFS and OS; Table 3). On the other hand, patients with *NOTCH1/FBXW7* mutation and no high *TLX1* expression still displayed a better outcome than those without *NOTCH1/FBXW7* mutation ($P = .04$ and .02 for EFS and OS, respectively).

When each protocol was analyzed separately, patients with *NOTCH1/FBXW7* mutations treated on the most recent GRAALL-2003 trial have a 3-year OS of 74% (95% CI, 57-85) compared with 52.5% (95% CI, 25-74) for those with a WT status ($P = .05$) confirming that *NOTCH1/FBXW7* status is of major prognostic significance even in modern trials that give overall good results for T-ALL (Figure 3).

Finally, when censoring patients at the time of HSCT, *NOTCH1/FBXW7* mutations retained their significant favorable impact on EFS and OS in the multivariate analysis ($P = .04$ and .025, respectively; data not shown).

Taken overall, these data demonstrate that detection of *FBXW7* mutations adds significant prognostic value to assessment of *NOTCH1* status alone and allows identification of a majority (72%) of relatively good prognosis patients with a *NOTCH1/FBXW7* mutated T-ALL, which cannot be identified by more classical, clinical, immunophenotypic or oncogenic markers.

Discussion

The pediatric concept of risk-adapted therapy of ALL has recently been extended to adult protocols, leading to marked improvements in outcome.[25] This strategy relies on the identification of risk factors at diagnosis or in response to cortico- or chemotherapy during induction. For high-risk adult patients, classical trials favor

From www.bloodjournal.org at AP-HP DELEGATION FORMATION DEV COMP on May 29, 2009. For personal use only.

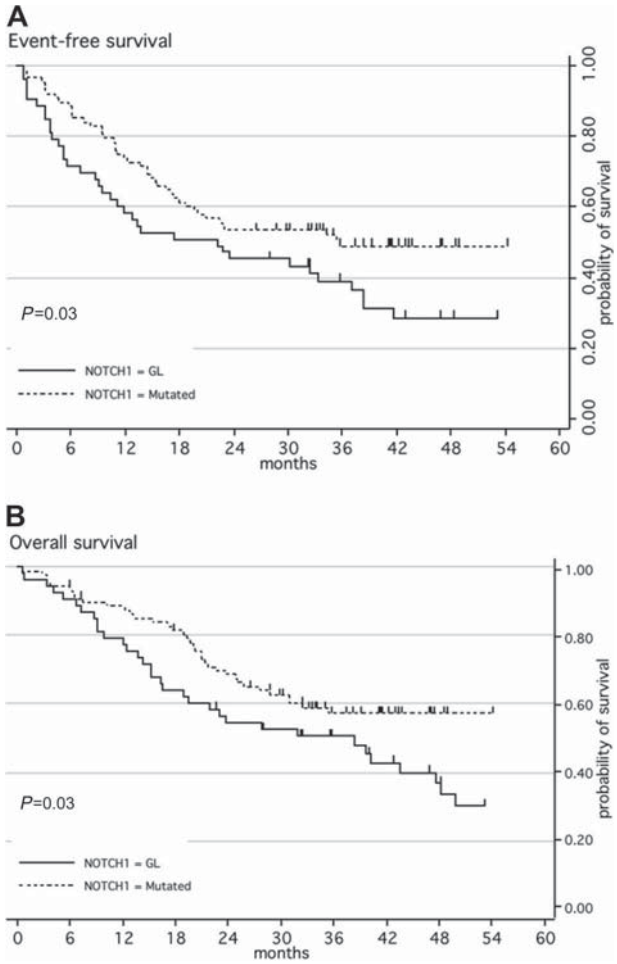


Figure 1. Kaplan-Meier estimates of event-free survival or overall survival according to *NOTCH1* mutation. (A) Event-free survival (EFS); (B) overall survival (OS). Patients with ALL with a wild-type genotype of *NOTCH1* (black line; n = 53) have a significantly higher risk of event or death than patients with ALL with mutated *NOTCH1* (dashed line; n = 88).

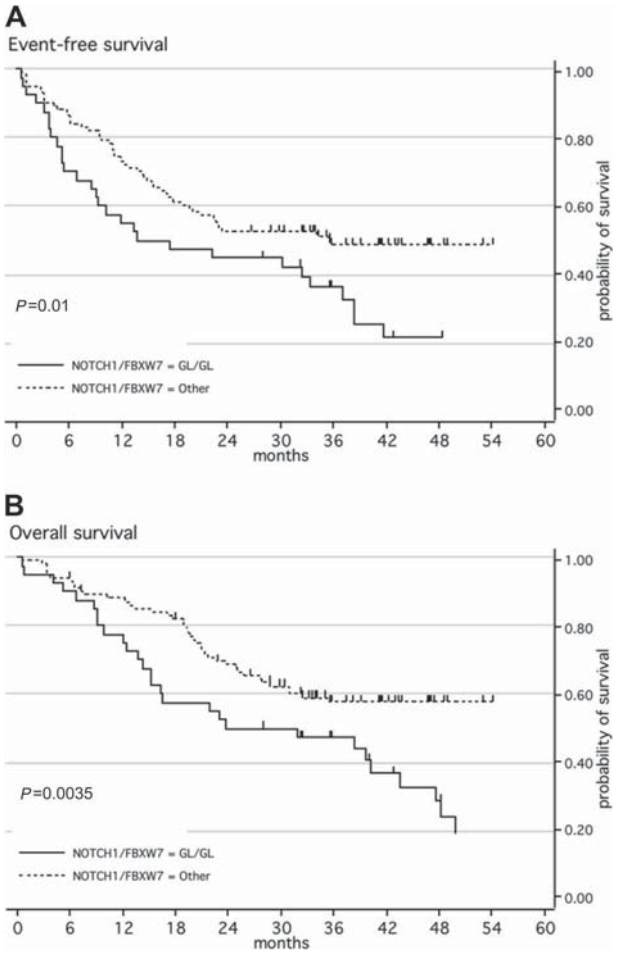


Figure 2. Kaplan-Meier estimates of event-free survival or overall survival according to *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutations. (A) Event-free survival (EFS); (B) overall survival (OS). Patients with ALL with a wild-type genotype of *NOTCH1* and *FBXW7* (black line; n = 40) have a significantly higher risk of event or death than patients with ALL with a mutated *NOTCH1* and/or *FBXW7* (dashed line; n = 110).

treatment intensification based on allogeneic HSCT in first CR. For B-cell ALL, a variety of numerical or structural chromosomal abnormalities identified at diagnosis are used for therapeutic stratification.[29,30] In contrast, corresponding abnormalities in T-ALL, such as *TLX3*, *TLX1*, *CALM-AF10*, *NUP214-ABL*, or *SIL-TAL1* are either found in a small percentage of cases or are of controversial clinical significance.[6-8] Consequently, most adult T-ALL trials use simple clinical features such as age, CNS involvement, or WBC count to define high-risk patients, with relatively limited impact on prognosis.[31]

The identification of a widely expressed genetic marker that could stratify adult patients with T-ALL at diagnosis will allow judicious use of the increasing number of therapeutic alternatives. We here report that *NOTCH1* mutations are present in more than 60% of a large series of adult T-ALL. *FBXW7* is mutated in 24%, alone in 9%, and in association with *NOTCH1* in 15%. Mutation detection allows identification of a major subgroup of 72% of patients with a favorable impact on both EFS and OS.

In the pediatric ALL Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) 2000 protocol, *NOTCH1* mutations were found in 52% of cases and were associated with a good prognosis, including within the favorable cortical thymic subgroup,[17] whereas in a predominantly pediatric Chinese study, *NOTCH1* mutation was associated with a poor prognosis.[23] Little information is available to date regarding the prognostic impact of *FBXW7* mutation but the same synergic good prognosis of *NOTCH1* and *FBXW7* mutations was described in 26 pediatric cases of T-ALL.[32] In this first large series of adult T-ALL, we confirm the good prognosis of *NOTCH1* found in the ALL-BFM series, but more importantly, show that the addition of functionally convergent *FBXW7* mutations strikingly increases prognostic impact. This suggests that NOTCH1 pathway constitutive activation is more important than the type of somatic genetic abnormality and is globally associated with cortico/chemo-responsive T-ALL, which could potentially be further improved by the addition of novel agents such as gamma-secretase inhibitors (GSIs). Conversely, the significant side effects of GSIs as used to date may indicate cautious use in this good prognostic subgroup.[33,34] Furthermore, the proportion of patients with *NOTCH1* mutated T-ALL who have mutated phosphate and tensin homolog (PTEN) will not respond to GSIs.[35] Whether patients with *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutations should be considered for HSCT should be evaluated in a prospective trial since their OS within the GRAALL-2003 trial, adapted to the T-cell lineage, was more than 70% at 3 years. The minor subgroup of *NOTCH1/FBXW7* WT patients have a 52.5% OS rate at 3 years within the GRAALL-2003 trial. As such, these patients are likely to be appropriate candidates for intensive treatment, including HSCT

From www.bloodjournal.org at AP-HP DELEGATION FORMATION DEV COMP on May 29, 2009. For personal use only.

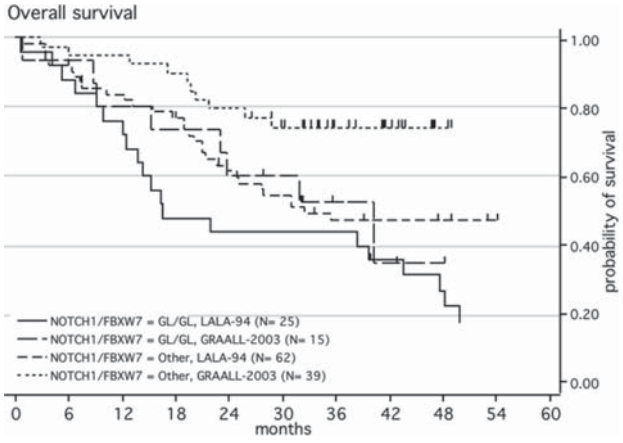


Figure 3. Kaplan-Meier estimates of overall survival of patients with ALL according to the presence of a NOTCH1 and/or FBXW7 mutations and according to the chemotherapeutic protocol. Survival of patients with a wild-type genotype of NOTCH1 and FBXW7, treated with the LALA-94 protocol (n = 25); survival of patients with a wild-type genotype of NOTCH1 and FBXW7, treated with the GRAALL-2003 protocol (n = 15); patients with a mutated genotype of NOTCH1 and/or FBXW7, treated with the LALA-94 protocol (n = 62); patients with a mutated genotype of NOTCH1 and/or FBXW7, treated with the GRAALL-2003 protocol (n = 39).

and/or specific targeted therapy. The relatively small size of the *NOTCH1/FBXW7* WT group prevented retrospective analysis of the impact of HSCT within this group, which will probably require retrospective meta-analysis within different clinical trials.

Compared with previously identified oncogenic or immunophenotypic markers, *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutations identify 2 major subgroups, which justifies prospective screening and therapeutic stratification. Exhaustive diagnostic strategies should involve sequencing *NOTCH1* exons 26 to 28 and 34 (allowing detection of HD, TAD, and PEST mutations and juxtamembrane mutations) and *FBXW7* for all patients. This is justifiable if linked to cognitive analysis of NOTCH pathways in T-ALL, but is relatively onerous if the main priority is individual patient stratification. In the latter situation, since double *NOTCH1/FBWX7* mutated cases do not have a different prognosis from single mutated cases, a more restrictive approach would involve initial sequencing for *NOTCH1* HD and PEST mutations (exons 26, 27, and 34), followed by *FBXW7* sequencing and specific detection of *NOTCH1* ITD by fluorescent PCR sizing for *NOTCH1* WT cases (approximately 40%). Overall, approximately 10% of additional cases will be classified as *NOTCH1* mutated based on their *FBXW7* status and less than 1% on their *NOTCH1* juxtamembrane mutation status. Since *TLX1* expression retains its prognostic impact in patients with *NOTCH1/FBXW7* mutations in this series, molecular analyses of a limited number of genes are likely to be necessary for optimal prognostic classification of T-ALL.

Therapeutic stratification based on mutational status is increasingly used for individual patient management in CLL (IgH)[36] and AML (*NPM*, *FLT3*, and *CEBPα*).[37] The present data justify an extension of this approach to T-ALL. The synergic prognostic impact of *NOTCH1* and *FBXW7* mutations data is in favor of oncogenically significant gain-of-function "driver," rather than "passenger" mutation, as recently identified in AML.[38]

To date, this is the first target for prognostic stratifying diagnostic sequencing in ALL, since to our knowledge, *PAX5* mutations have not yet been shown to have prognostic impact. Judicious use of the increasing range of therapeutic options, including HSCT, will largely justify such an initial diagnostic investment.

Acknowledgments

We especially thank A. Delannoy, J. Soulier, and C. Graux for their constructive comments on the manuscript and V. Lheritier for precious help in collecting samples and data. We thank all participants in the LALA-94 and the GRAALL-2003 trials for collecting and providing data and samples: Hôpital Edouard Herriot, Lyon (X. Thomas, C, Dumontet, S. Hayette, V. Lhéritier); Hôpital Saint-Louis, Paris (H. Dombret, J.M. Cayuela, D. Djordjidjevic); Hôpital du Haut Levêque, Pessac (T. Leguay, F. Lacombe, F. Perry); Hôpital Purpan, Toulouse (F. Huguet, E. Kulhein, C. Escriva); Hôpital Pitié-Salpétrière, Paris; (N. Dhédin, H. Merle-Beral, F. Davi); Institut Paoli Calmettes, Marseille (N. Vey, D. Sainty, G. Dridi); Hôpital Cochin, Paris (F. Dreyfus, F. Picard); Hôpital de l'Archet, Nice (N. Gratecos, P. Philip; I. Touitou); Hôpital Michallon, Grenoble (F. Garban, M.C. Jacob, V. Rolland); Institut Gustave Roussy, Villejuif (J.H. Bourhis, C. Bayle); Center Hospitalier, Caen (O. Reman, V. Salaun, E. Lepesant); HIA Percy, Clamart (T. De Revel, T. Sanson); Hôpital Dupuytren, Limoges (P. Turlure, F. Trimoreau, C. Tisseuil); Center Hospitalier, Avignon (O. Boulat, M. Derre); Center Henri Becquerel, Rouen (St. Leprêtre, B. Lenormand, V. Tallon); Center Hospitalier, Lille (St. De Botton, P. Lepelley, H. Djeda); Hôpital André Mignot, Versailles (S. Castaigne, I. Garcia); Hôpital Beaujon, Clichy (C. Gardin, G. Leroux, B. Beve); Center Hospitalier Lapeyronie, Montpellier (N. Fegueux, J. Taib, M. Leroux); Center Hospitalier, Perpignan (X. Vallantin); Center René Huguenin, St Cloud (M. Janvier, A. Bourgignat); Center Hospitalier, Nantes (P. Chevallier, R. Garand, B. Saulquin); Center Hospitalier, Rennes (M. Escoffre, M. Rousset, C. Picouleau); Institut de Cancérologie de la Loire, St Priest en Jarez (D. Guyotat, L. Campos, S. Marchand); Center Hospitalier, Angers (M. Hunault, L. Baranger, C. Marie); Center Hospitalier, Besancon (F. Legrand, F. Garnache-Ottou); Center Hospitalier Mulhouse (M. Ojeda-Uribe, C. Gervais, S. Iglarz); Center Hospitalier Régional, Orléans (M. Alexis).

This work was supported by grants from the Association Cent Pour Sang La Vie (Convention N°8-Asnafi) and the Association Laurette Fugain (RAF ALF N°06-03), in part by PHRC no. 94-95-97.02, Soutien des therapeutiques innovatrices coûteuses–Réseau de Biologie Innovatrice en Ouco-hématologie (RuBIH), France (LALA-94), by Promoteur Hospices Civils de Lyon- (GRAALL-2003), and by grants P0200701 and P030425/AOM03081 from Le Programme Hospitalier de Recherche Clinique, Ministère de l'Emploi et de la Solidarité (Paris, France).

Authorship

Contribution: V.A., A.B., H.D., and E.A.M. wrote the manuscript; S.L.N., F.B., and A.S. performed NOTCH1/FBXW7 sequencing; S.L.N., V.A., and K.H.B. supervised and analyzed molecular data; O.R., F.W., T.R., E.T., P.T., T.L., F.H., J.P.V., F.D., M.C.B., N.I., and X.T. contributed to supervision of clinical research and data collection; H.D. and E.A.M. oversaw conceptual development of the project.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

From www.bloodjournal.org at AP-HP DELEGATION FORMATION DEV COMP on May 29, 2009. For personal use only.

Correspondence: Elizabeth Macintyre, Hôpital Necker-Enfants Malades, Tour Pasteur 2e étage, Laboratoire d'hématologie, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France; e-mail: elizabeth.macintyre@nck.aphp.fr.

References

1. Stéphane Leprètre, Martine Escoffre-Barbe, Patrice Chevallier, et al. Outcome of patients with T-cell lymphoblastic leukemia or lymphoma: the GRAALL experience [abstract]. Blood. 2007;110: Abstract 2818.
2. Gokbuget N, Hoelzer D, Arnold R, et al. Treatment of adult ALL according to protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). Hematol Oncol Clin North Am. 2000; 14:1307-1325.
3. Annino L, Vegna ML, Camera A, et al. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): long-term follow-up of the GIMEMA ALL 0288 randomized study. Blood. 2002;99:863-871.
4. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. Nat Rev Immunol. 2008;8:380-390.
5. Bergeron J, Clappier E, Radford I, et al. Prognostic and oncogenic relevance of TLX1/HOX11 expression level in T-ALLs. Blood. 2007;110:2324-2330.
6. Ferrando AA, Neuberg DS, Dodge RK, et al. Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2004;363:535-536.
7. Asnafi V, Buzyn A, Thomas X, et al. Impact of TCR status and genotype on outcome in adult T acute lymphoblastic leukemia: a LALA-94 study. Blood. 2005;105:3072-3078.
8. Baak U, Gokbuget N, Orawa H, et al. Thymic adult T-cell acute lymphoblastic leukemia stratified in standard- and high-risk group by aberrant HOX11L2 expression: experience of the German multicenter ALL study group. Leukemia. 2008;22: 1154-1160.
9. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. Nat Immunol. 2004;5:247-253.
10. Maillard I, Fang T, Pear WS. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. Annu Rev Immunol. 2005; 23:945-974.
11. Ellisen LW, Bird J, West DC, et al. TAN1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell. 1991;66:649-661.
12. O'Neil J, Calvo J, McKenna K, et al. Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL. Blood. 2006;107:781-785.
13. Pear WS, Aster JC, Scott ML, et al. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. J Exp Med. 1996;183:2283-2291.
14. Aster JC, Xu L, Karnell FG, Patriub V, Pui JC, Pear WS. Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. Mol Cell Biol. 2000;20:7505-7515.
15. Allman D, Karnell FG, Punt JA, et al. Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. J Exp Med. 2001;194:99-106.
16. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science. 2004;306:269-271.
17. Breit S, Stanulla M, Flohr T, et al. Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. Blood 2006;108:1151-1157.
18. Sulis ML, Williams O, Palomero T, et al. NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. Blood. 2008;112:733-740.
19. O'Neil J, Grim J, Strack P, et al. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. J Exp Med. 2007;204:1813-1824.
20. Maser RS, Choudhury B, Campbell PJ, et al. Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. Nature. 2007;447:966-971.
21. Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, et al. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. J Exp Med. 2007; 204:1825-1835.
22. Mansour MR, Linch DC, Foroni L, Goldstone AH, Gale RE. High incidence of Notch-1 mutations in adult patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2006;20:537-539.
23. Zhu YM, Zhao WL, Fu JF, et al. NOTCH1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance and implication in multifactorial leukemogenesis. Clin Cancer Res. 2006; 12:3043-3049.
24. Thomas X, Boiron JM, Huguet F, et al. Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. J Clin Oncol. 2004;22:4075-4086.
25. Huguet F, Leguay T, Raffoux E, et al. Pediatric-inspired therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL-2003 study. J Clin Oncol. 2009;27: 911-918.
26. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc. 1958;457-481.
27. Peto R, Peto J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures. J R Stat Soc. 1972;185-206.
28. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. Blood. 2005;106:3760-3767.
29. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2006;354:166-178.
30. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2004;350:1535-1548.
31. Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, et al. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). Blood. 2008; 111:1827-1833.
32. Malyukova A, Dohda T, von der Lehr N, et al. The tumor suppressor gene hCDC4 is frequently mutated in human T-cell acute lymphoblastic leukemia with functional consequences for Notch signaling. Cancer Res. 2007;67:5611-5616.
33. Milano J, McKay J, Dagenais C, et al. Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. Toxicol Sci. 2004;82:341-358.
34. van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, et al. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. Nature. 2005;435:959-963.
35. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, et al. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. Nat Med. 2007;13: 1203-1210.
36. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. Haematologica. 2005;90:391-399.
37. Renneville A, Roumier C, Biggio V, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. Leukemia. 2008;22:915-931.
38. Frohling S, Scholl C, Levine RL, et al. Identification of driver and passenger mutations of FLT3 by high-throughput DNA sequence analysis and functional assessment of candidate alleles. Cancer Cell. 2007;12:501-513.

Annexe 3

Recombinaison V(D)J normale et pathologique

Normal and pathological V(D)J recombination: contribution to the understanding of human lymphoid malignancies.

Adv Exp Med Biol. 2009

Dadi S*, **Le Noir S***, Asnafi V, Beldjord K, Macintyre EA.
* co-premiers auteurs

Chapter

Normal and Pathological VDJ Recombination:
Contribution to the Understanding of Human Lymphoid Malignancies

Saïda Dadi, Sandrine Le Noir, Vahid Asnafi, Kheïra Beldjord and Elizabeth A. Macintyre*

Abstract

The majority of haematological cancers involve the lymphoid system. They include acute lymphoblastic leukemias (ALL), which are arrested at variable stages of development and present with blood and bone marrow involvement and chronic leukemias, lymphomas and myelomas, which present with infiltration of a large variety of hematopoietic and non hematopoietic tissues by mature lymphoid cells which express a surface antigen receptor. The majority involve the B-cell lineage and the vast majority have undergone clonal rearrangement of their Ig and/or TCR rearrangements. Analysis of Ig/TCR genomic V(D)J repertoires by PCR based lymphoid clonality analysis within a diagnostic setting allows distinction of clonal from reactive lymphoproliferative disorders, clonal tracking for evidence of tumor dissemination and follow-up, identification of a lymphoid origin in undiagnosed tumors and evaluation of clonal evolution. Ig/TCR VDJ errors are also at the origin of recombinase mediated deregulated expression of a variety of proto-oncogenes in ALL, whereas in lymphoma it is increasingly clear that IgH containing translocations result from abnormalities other than VDJ errors (somatic hypermutation and/or isotype switching). In addition to this mechanistic contribution to lymphoid oncogenesis, it is possible that failure to successfully complete expression of an appropriate Ig or TCR may lead to maturation arrest in a lymphoid precursor, which may in itself contribute to altered tissue homeostasis, particularly if the arrest occurs at a stage of cellular expansion.

Introduction

Approximately 5% of human cancers overall and over 70% of haematological cancers involve the lymphoid system, with the majority involving the B-cell lineage. Lymphoid cancers include immature, "blastic" lymphoid proliferations which involve essentially the blood and/or bone marrow (Acute Lymphoblastic Leukemia or ALL), mature lympho-proliferations involving predominantly secondary lymphoid organs (Non Hodgkin's Lymphomas or NHL) or blood and bone marrow (chronic lymphocytic leukemias or CLL) and expansions of plasmocytes, with predominant bone marrow and tissue involvement (multiple myeloma or MM). Dysimmune states such as Hodgkin's disease or Angioimmunoblastic lymphadenopathy (AILD), at the interface between

*Corresponding Author: Elizabeth A. MacIntyre—Hopital Necker Enfants Malades, Laboratoire d'hématologie, bât. Pasteur, 149 rue de Sèvres 75015 Paris, France.
Email: elizabeth.macintyre@nck.aphp.fr

V(D)J Recombination, edited by Pierre Ferrier. ©2008 Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

reactive immune disorders and lymphoid malignancies, also exist. Whether these are classified as lymphoid malignancies or not often depend on the techniques available for their characterization, notably analysis of the VDJ status of their immunoglobulin (Ig) and T-cell Receptor (TCR) loci by techniques which will be collectively referred to as lymphoid clonality analysis here. Lymphoid malignancies are also frequently characterized by VDJ recombinase errors which lead to transcriptional deregulation of lymphoid "oncogenes" by juxtapositioning to, most commonly, Ig or TCR regulatory sequences. This represents a lymphoid specific form of "physiological genetic instability" which includes VDJ recombinase errors and abnormalities of isotype switching and/or somatic mutation. Only the former will be considered here; they are collectively, if imprecisely, referred to as VDJ translocations. Such errors can be considered to be, at a minimum, mechanistic elements involved in lymphoid oncogenesis. It is, however, possible that failure to successfully complete fabrication and expression of an appropriate Ig or TCR may in itself represent an oncogenic event within the multistage process that is now recognized to preceed clinical presentation of the majority of human cancers.

Since lymphoid cancers represent homogeneous populations arrested at different stages of development, they provide invaluable models for the study of molecular and cellular events leading to interruption of lymphoid development. Within this context, "reading the language" of Ig/TCR rearrangements can provide useful information regarding the type of lymphoid (sub)population involved, the stage of maturation arrest and the chromatin accessibility of the different Ig/TCR loci. It should however be emphasised that the pheno/genotype of the bulk lymphoid cancer is not necessarily synonymous, but most probably downstream, to the lymphoid cancer stem cell. Since any detectable clonal VDJ rearrangement or translocation suggests at a minimum that the Ig/TCR loci were accessible during preceeding stages of lymphoid oncogenesis, such rearrangements represent useful fingerprints of upstream oncogenic events. We have undertaken to review these different, but interlinked, applications of the analysis of normal and abnormal VDJ coding joint repertoires applied to understanding of lymphoid malignancies and their dysimmune close relatives. Such an approach is by definition non-exhaustive and we apologies to all individual contributors which we have only referenced indirectly, in the interests of brevity. We will not discuss therapeutic aspects of VDJ manipulation, nor analysis of transcribed, functional VDJ repertoires and will only briefly touch on detection of signal junction rearrangements.

Diagnostic Clonality Analysis

Molecular analysis of Ig/TCR genomic repertoires in diagnostic evaluation of (suspected) human lymphoid malignancies was initially performed by Southern blot analysis,[1-3] but was progressively replaced from the 1980s onwards by PCR analysis from DNA.[4-9] Both are based on the principal that reactive lymphoproliferations are associated with polyclonal Ig/TCR repertoires whereas the majority of lymphoid cancers demonstrate clonal, homogeneous rearrangements of Ig and/or TCR loci,[10] with the pattern of clonal rearrangements reflecting the lymphoid lineage involved and its stage of maturation arrest.[10-13]

Technical and Practical Aspects

Southern blotting predominantly reflected homogeneous V and J segment usage whereas PCR V(D)J amplification also exploits heterogeneity of VDJ junctional sequences at the third complementarity determining region (CDR3). The longer the CDR3, the easier the distinction of clonal and polyclonal rearrangements.[14] Detection of VDJ, DJ, VD DD and DJ rearrangements are possible if appropriate primers are used.[15] The majority of diagnostic systems use consensus primers directed to relatively conserved framework regions, often in a multiplex format.[15] Predictably, the risk of false negative results is dependent on the complexity of the repertoire (Table 1) and the degree of homology between the V, D and J primers and their target sequences. The other main factor contributing to false negativity is somatic mutation involving PCR primer target sequences but others include: presence of inhibitors; analysis of uninvolved tissue and DNA degradation of fixed tissues.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

Distinction of clonal, oligoclonal and polyclonal PCR products is based on either nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), usually under conditions encouraging heteroduplex formation, or "genescan" sizing of fluorescent PCR products. The former has the advantage of optimising distinction of clonal homoduplexes from polyclonal heteroduplexes but requires optimal PAGE conditions. Genescan sizing allows precise information regarding clonal product size, useful for molecular follow-up and comparison of different samples from a given tumor and can allow identification of V and J segment usage if differently labelled primers are used (Fig. 1). Under qualitative conditions, both have an approximate sensitivity of 1-5%, although this depends on the position of clonal and polyclonal populations, since a clonal population which is situated at the peak of the Gaussian distribution of polyclonal PCR products will be detected with lower sensitivity than one which is either larger or smaller than these fragments (Fig. 1). Quantitation of clonal rearrangements by real-time PCR is possible using CRD3 specific probes, or more usually primers (Fig. 2) (16 and references there in) This requires sequencing of diagnostic material and has been developed essentially for follow-up of patients with ALL. In general, diagnostic strategies aim only to distinguish clonal from polyclonal populations and do not attempt to identify segment usage. Judicious use of appropriately situated, variably labelled fluorescent primers allows identification of V, D and J segments from a limited number of multiplex PCR, based on PCR product size and fluorescence.[17] "Reading the language" of Ig/TCR rearrangements in this way can contribute to identification of the stage of maturation arrest and lineage affiliation. Such analyses do not allow determination of functional, in-frame rearrangement, unless combined with sequence analysis.

Diagnostic PCR have been developed for all loci other than TCRα. The most widely used loci for diagnostic clonality analysis are IgH VDJ and TCRγ VJ, since both rearrange relatively early during normal B and T-lymphoid development respectively, including in all subsets of each lineage. Backup loci for the B-cell lineage include Igκ and IgH DJ rearrangements, whereas Igλ clonality analysis within a diagnostic setting is complex and rarely adds additional information. For suspected T-cell malignancies, TCRγ can be complemented by TCRβ VDJ analysis, which is a more appropriate target than TCRδ; due to the deletion of this locus during TCRα rearrangement and the consequent risk of pseudo-clonality from rare residual TCRδ rearrangements. Use of TCRδ is essentially restricted to clonality analysis in ALL and rare suspected TCRγδ lymphopro-

Table 1. Human Ig/TCR repertoires, combinatorial complexity and chromosomal localisation

	Number of Germline Encoded Segments					
	V	**D**	**J**	**Approximate CDR3 Length(bp)**	**Number of N Regions**	**Chromosomal Localization**
IgH	46-52	27	6	50	1-2	14q32.3
IgK	31-36	0	5	10	1	2p11.2
Igλ	30-33	0	4	10	1	22q11.2
TCRδ	7	3	4	5-50	1-4	14q11.2
TCRα	45-47	0	50	10	1	14q11.2
TCRγ	9	0	5	10	1	7q14
TCRβ	39-47	2	13	10	1-2	7q34

The number of V segments varies. Certain Vα/δ segments can rearrange to both TCRδ and TCRα loci. Number of N region varies with incomplete VD, DD or DJ rearrangements.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

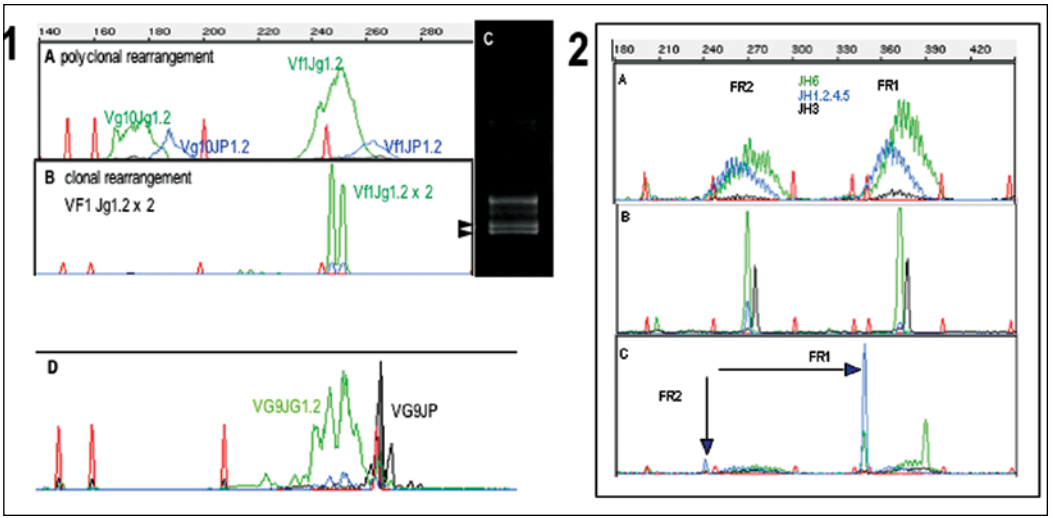


Figure 1. Lymphoid clonality analysis. Genescan and heteroduplex images of TCR and IgH genomic repertoires. 1)- Analysis of multiplex TCRγ rearrangement by PCR from DNA using fluorescent primers and genescan (GS) evaluation (left) compared to nondenaturing PAGE analysis of heteroduplex (HD) PCR products (right): A = polyclonal rearrangements. B and C = Clonal bi-allelic VfI-Jγ1/2 rearrangements in a B-cell precursor ALL, analysed by GS (B) or HD (C). Slow migrating clonal heteroduplexes are seen when both alleles undergo rearrangement with the same Vγ and Jγ segments, but different CDR3. Homoduplexes are indicated by arrows. The use of differently labelled primers allows identification of the V and J segments used on the basis of PCR product size and colour, as shown. Size markers are in red. D = polyclonal TCR Vγ9-Jg rearrangement (green) and canonical Vγ9JP (black). The latter represents a selected, functional repertoire, as evidenced by the 3bp spacing between peaks, as seen with IgH, but not with other TCRγ rearrangements. 2)- Analysis of multiplex multifluorescent IgH rearrangement by PCR from DNA using fluorescent primers and genescan evaluation. Polyclonal (A) and clonal (B and C) rearrangements are shown. The use of 3 differently labelled JH primers (JH1,2,4,5 in blue, JH6 in green and JH3 in black) gives improved resolution in polyclonal rearrangements, the majority of which use JH4-6 segments. IgH rearrangements are amplified with both FR1 and FR2 consensus primers in separate reactions but analysed together, in order to increase clonal informativity in cases having undegone somatic mutation. For example, of the 2 B-cell precursor ALLs shown , sample B demonstrates a major JH6 and a minor JH3 rearrangement which are informative with both FR1 (right) and FR2 (left) VH primers. For sample C, in contrast, the major JH1,2,4,5 rearrangement is amplified efficiently from the FR1 but poorly from the FR2 primer and the minor JH6 rearrangement is only seen with FR1. A color version of this image is available at www.eurekah.com. The uniform intensity, red peaks coorespond to size markers.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

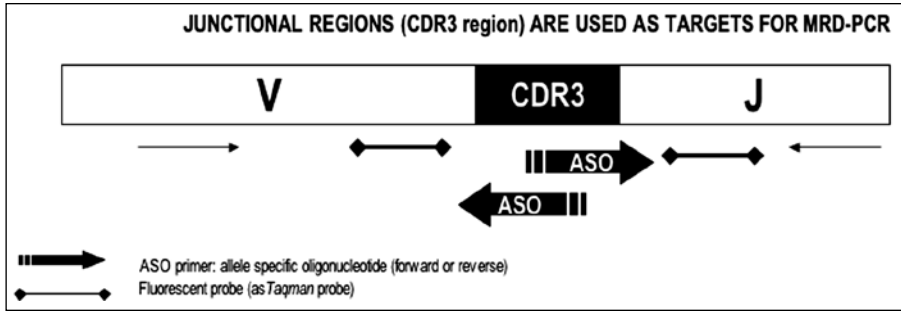


Figure 2. Real time quantitative Ig/TCR CDR3 specific strategies. Quantification by RQ-PCR of the tumor load or minimal residual disease (MRD). For each Ig/TCR rearrangement, the junctional region is amplified, sequenced and several "clone-specific" primers or allele specific oligonucleotides (ASO) are designed. Specific CDR3 specific primers are then used for clone specific amplification of follow-up material using CDR3 and V, D or J primers and V or J Taqman probes. Quantification is performed using a standard curve constructed from the RQ-PCR assay by serial dilutions of patient's blasts in a peripheral blood mononuclear cell pool (10^{-1} to 10^{-5}).

liferative disorders. Details regarding the incidence and patterns of Ig/TCR rearrangements in the main categories of lymphoproliferative disorders (LPD) can be found in Table 2.[15,18-24] Succinctly, mature B lineage LPD rearrange IgH and Igκ (VJ or Kappa deleting element—KDE) in the vast majority of cases, with extensive repertoires which lead to little risk of false positive results and a risk of false negative results which is proportional to the degree of somatic mutation. Mature T lineage LPD rearrange TCRγ and TCRβ and occasionally TCRδ. The restricted repertoire of TCRγ VJ rearrangements leads to a risk of false positive detection of pseudoclonality, particularly if PAGE conditions are suboptimal.[15] PAGE heteroduplex analysis is preferable to fluorescent genescan analysis in a diagnostic setting, since there is a lower risk of false positives. The presence of canonical "invariant" rearrangements, such as Vγ9-JP rearrangements in circulating TCRγδ lymphocytes, can also be erroneously interpreted as indicating clonal expansion by inexperienced operators and for this reason not all diagnostic multiplex strategies include a JP (also referred to as Jγ1.2) specific primer.[15] Two classifications for human TCRγ V and J segments exist.[15] The presence of minor normal clonal/invariant populations is well recognised in circulating CD8+ T-lymphocytes from older individuals and in reactive disorders such as lymphomatoid papulosis. The risk of false positive results can be minimised by simultaneous use of TCRβ analysis[19] and restriction of these analyses to high throughput laboratories, in order to maximise experience. Interpretation of lymphoid clonality profiles should be undertaken in close interaction with the prescribing physician or pathologist and with knowledge of the clinical context.

Cross lineage rearrangements, also referred to as "illegitimate rearrangements" (Ig rearrangements in a T LPD or vice versa) are rare in mature LPD. They are common in acute lymphoblastic leukemias, with the majority of B lineage ALL demonstrating TCRγ rearrangement and/or TCRδ or, more rarely TCRβ rearrangements. Ig rearrangements in T-ALL are less common and are preferentially found in the TCRγδ lineage.[25-27] Illegitimate rearrangements reflect the fact that ALLs remain recombinase competent and consequently rearrange all loci in an accessible chromatin configuration. Rearrangement patterns differ with oncogenic subtype, with stage of maturation arrest and with patient age. Amongst B-cell precursor ALLs, for example, relatively mature cases which express Ig cyt μ rarely demonstrate TCRγ rearrangements, whereas the majority of CD10+ cyt μ- ETV6-RUNX1 or BCR-ABL cases do so.[28,29] Details of Ig/TCR rearrangement profiles in ALL can be found in Table 2. Detection of lymphoid clonality is rarely required to make a diagnosis of ALL and is essentially used for molecular follow-up (see below).[16] Extensive sequence analysis of these clonal rearrangements has, however, allowed accumulation of a large databank allowing

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

Table 2. Approximate incidence of clonal Ig/TCR rearrangement in lymphoid malignancies, as detected by PCR from DNA. Only diagnostic PCR targets are cited

	IgH	IgK	Igλ	TCRδ	TCRγ	TCRβ
B-Cell Proliferation						
BCP-ALL	90	30	20	30	60	30
CLL	100	100	30	10	20	25
Nonhodgkin Lymphoma						
FL	90	85	20	5	5	5
MCL	100	100	45	5	10	10
BLBCL	85	80	30	15	15	20
MZL	95	80	30	10	15	20
T-Cell proliferation						
T-ALL	5	0	0	50	90	90
T-LGL	0	5	5	30	95	95
AILT	30	30	5	35	90	90

Abbreviations: BCP-ALL: B-cell precursor Acute Lymphoblastic Leukemia; CLL: Chronic Lymphocytic leukemia; FL: Follicular Lymphoma; MCL: Mantle Cell Lymphoma; BLBCL: Diffuse Large B-Cell Lymphoma; MZL: Marginal Zone Lymphoma; T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukaemia; T-LGL: T-Large Granular lymphocytic leukaemia; AILT: Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma.

analysis of V, D and J segment usage and CDR3 diversity, which may eventually lead to improved understanding of the pathogenic stages leading to ALL development.

Clinical Applications

Diagnostic clonality analysis is mainly used to distinguish reactive, polyclonal LPD from clonal, probably but not necessarily, malignant LPD. Once a clonal population has been identified, it is possible to track this clone in different tissue samples, in order to assess dissemination at diagnosis, or to determine clonal identity at relapse. Clonal tracking has also been used within a minimal residual disease setting in ALL and certain NHL, once apparent complete remission has been obtained, to stratify individual patient management, based on the cinetics of response to remission induction at diagnosis. Succinctly, clonal tracking with CDR3 specific probes, used within a strictly standardised, quantitative setting, allow the detection of minor clonal poulations with a reproducible sensitivity of at least 10^{-4} (1 malignant cell amongst 10000 normal cells). It has also been used to "back-track" preclinical development of ALL, in conjuction with molecular oncogenic markers, allowing the identification of leukemic clones many years before clinical presentation, including in postnatal samples prior to development of pediatric ALL.[30,31]

Recombinase Mediated Oncogenesis

Analysis of structural chromosomal abnormalities by classical morphological karyotyping in lymphoid malignancies allowed the identification of recurrent translocations involving the Ig loci in B lymphoid malignancies and TCR loci in T-cell malignancies. The advent of molecular techniques led to identification of the Ig/TCR partner genes and the demonstration that karyotypic analysis largely underestimated the incidence and complexity of these rearrangements. The large number of partner genes identified has allowed numerous insights into normal and pathological lymphoid

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

development and function, but their very number precludes their description here and readers are invited to consult the following reviews on the subject.[32-36] Only general aspects relevant to VDJ rearrangement will be detailed here. Within the context of lymphoid malignancies, the term "illegitimate" rearrangement is usually reserved for cross-lineage intra-locus rearrangements, such as the TCR rearrangements identified in B lineage ALL described above. "Trans-rearrangement" refers to rearrangement between distinct Ig and TCR loci, abnormalities which have been principally described in patients with Ataxia Telangiectasia.[37] VDJ translocations usually implies structural karyotypic abnormalities involving a proto-oncogene and an Ig or TCR locus (Fig. 3 and Table 3). The increasing recognition of recombinase mediated deregulation of genes with no involvement of an Ig/TCR locus, including those resulting from microscopic, intragenic rearrangements not associated with evident karytoypic abnormalities, justifies use of the more general term "recombinase mediated oncogenesis". Comparative genomic hybridization has demonstrated that in pediatric B lineage ALL, many of these deletions involve genes which regulate B-cell development, including TCF3 (also known as E2A), EBF1, LEF1, IKZF1 (IKAROS) and IKZF3 (AIOLOS).[38] At least a proportion of these are mediated by the recombinase.

Recombinase mediated events can occur at the site of any RSS-like sequence which is in an accessible chromatin configuration during recombinase activity. One of the best studied examples outside the lymphoid oncogenesis context is deletions of the HPRT locus.[39-42] These have been used as a measure of genomic instability, some of which are mediated by the recombinase complex. Within the present context, only VDJ recombinase mediated events with oncogenic potential will be detailed. The role of recombinase abnormalities in Ig/TCR rearrangements is illustrated by their high incidence in patients with Ataxia Telangiectasia and similar disorders.[43]

VDJ Errors in Lymphoid Malignancies

During lymphoid development, recombinase activity targeted to recombination signal sequences (RSS) would ideally be restricted to legitimate targets within Ig/TCR loci and all genes controlling tissue homeostasis would be protected from this lymphoid specific form of "physiological genomic instability". The existence, however, of a large number of RSS-like sequences

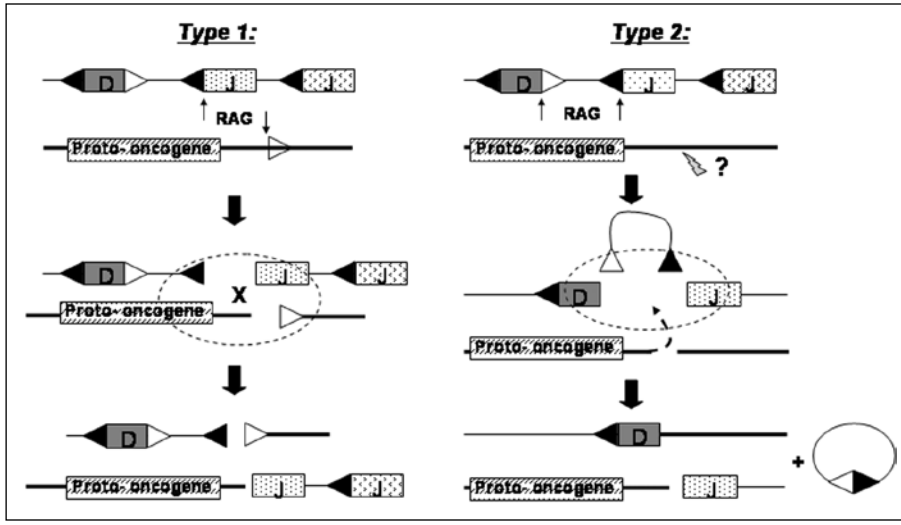


Figure 3. Type 1 and 2 Ig/TCR rearrangements. Recognition signal sequences (RSS) are represented by triangles at V, D and J segment extremities. Gray triangles represent cryptic RSS. In type I rearrangements, RAG targets both the bona-fide and the cryptic RSS. In type 2 junctions, the break in the proto-oncogene is targeted by unknown mechanisms. In both cases, there is excision of intervening DNA, in the signal joint shown at the bottom right hand corner.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

Table 3. Deregulation of lymphoid oncogenes by Ig/TCR juxtapositioning in ALL

Oncogene (Ig/tcr Partner Genes)	Protein Family Group	Translocations Involved	References
B-ALL	**Translocation Involving Ig Genes**		
ID4	Inhibitor of DNA binding(ID)HLH	t(6; 14)(p21; q32)	61
LHX4	LIM-homeodomain	t(1; 14)(q25; q32)	60
BCL9	Not identified	t(1; 14)(q21; q32)	59
IL3	4H Cytokine	t(5; 14)(q32; q32)	62
c-Myc	bHLH-Zip	t(8; 14)(q24; q32)	58,55
		t(2; 8)(p12; q24)	56
		t(8; 22)(q24; q11)	57
CEBP	bZIP	t(14; 19)(q32; q13); t(8; 14)(q11; q32); Inv(14)(q11; q32)/ t(14; 14)(q11; q32) t(14; 20)(q32; q13)	63
T-ALL	**Translocation Involving TCR Genes**		
HOXA cluster	Class I homeodomaincontaining	Inv(7)(p15q34)t(7; 7)	90,91
TLXI(HOXII)	Class II homeodomaincontaining	t(7; 10)(q34; q24)	65,66
		t(10; 14)(q24; q11)	
TLX3 (HOXIIL2)*	Class II homeodomaincontaining	t(5; 14)(q35; q32)	86,87
LMO1	LIM-only domain	t(11; 14)(p15; q11)	68
LMO2	LIM-only domain	t(11; 14)p13; q11),	69
		t(7; 11)(q35; q13)	71
TAL1	b HLH type II	t(1; 14)(p32; q11),	100
		t(1; 7)(p32; q34)	91
TAL2	b HLH type II	t(7; 9)(q34; q32)	75
LCK	SRC family of tyrosine kinase	t(1; 7)(p34; q34)	95,101
BHLHB1	b HLH type II	t(14; 21)(q11.2; q22)	76
LYL1	b HLH type II	t(7; 19)(q34; p13)	74
CCND2	D-type cyclin	t(7; 12)(q34; p13)	102
		t(12; 14)(p13; q11)	103
NOTCH1	Notch receptor family	t(7; 9)(q34; q34.3)	94

**TLX3* is included despite the fact that the predominant t(5; 14) involves BCL11B, not IgH, since these *BCL11B-TLX3* translocations are mediated by the recombinase and since rare translocations involving *TLX3* and *TCR*α/δ are described.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

throughout the genome (10 million or 1 cryptic RSS every 1-2 kb on average) means that non-specific targeting of RAG1 can induce double stranded breaks outside Ig/TCR loci, leading to intergenic rearrangements and deregulation of genes by juxtapositioning to Ig/TCR regulatory sequences (promoters or enhancers).[44] This can lead to increased expression or non-extinction of the juxtaposed "proto-oncogene" by promoter/enhancer substitution or by separation of coding sequences from negative regulatory elements. Only those rearrangements which lead to deregulated tissue homeostasis will be associated with lymphoid malignancies. If the deregulated genes induce a survival or proliferative advantage or a block to maturation, the clone bearing the translocation will be transformed, or at least immortalised. Based on these considerations, VDJ errors will only occur in cells which are recombinase competent and will target proto-oncogenes which are accessible during this phase of recombinase activity.

It is increasingly recognised that the transcriptional and phenotypic profile observed in a cancer at diagnosis is not necessarily identical, but is probably more mature, when compared to the cancer initiating or stem cell. Genetic modifications which occur in this cancer stem cell are, however, transmitted to all clonal descendants. Within this context, both bona-fide Ig/TCR rearrangements and recombinase mediated oncogenic rearrangements detected in diagnostic material can represent genetic fingerprints of earlier events which have occurred in lymphoid cancer stem cells, or in intermediate malignant precursor populations. If such markers are present in the majority of the tumor at diagnosis, it is likely that they reflect an upstream event during oncogenic development, wheras those present in minor subclones are more likely to represent downstream events occurring in tumor subclones. The capacity to accurately evaluate the proportion of cells demonstrating a given marker depends on the techniques used. Briefly, molecular PCR and CGH based techniques using extracted DNA are poorly adapted to precise quantification and cytogenetic analysis of mitotic material is biased by potential nonrepresentativity of the cells undergoing mitosis under the culture conditions used. FISH analysis of interface nuclei has the advantage of being cell based, but is only applicable to certain oncogenic markers, not to V(D)J rearrangements and is heavily dependent on the quality of material analysed (bare nuclei vs. tissue sections, for example). Given these reserves, detection of an Ig or TCR rearrangement in an apparently nonlymphoid cancer, implies prior exposure of malignant precursors to recombinase activity. Identification of Ig/TCR rearrangements in Acute Myeloid leukaemia, for example, is preferentially found in cases with MLL gene rearrangement, with the MLL fusion transcript partners being associated with different Ig/TCR profiles.[45] Similarly, detection of a recombinase mediated oncogenic marker implies chromatin accessibility of the partner gene during a phase of recombinase competence prior to tumor development. What level of qualitative and/or quantitative recombinase competence and/or RAG1/2 activity is required for these recombinase errors is not clear. Rearrangement of TCRδ and TCRγ can occur in the presence of much lower levels of RAG1 activity than that required for TCRβ rearrangement [46] and it is possible to induce TCRδ rearrangement in kidney cells in the presence of E2A and HEB.[47,48]

Categories of Recombinase Errors

Two categories of recombinase errors are recognised:[44,49,50] type I rearrangements demonstrate breaks at RSS at both loci, one of which is usually an Ig or TCR; in type II rearrangements, only the Ig/TCR break is mediated by RAG and the mechanisms targeting the double stranded break on the partner gene are incompletely understood (Fig. 3). Once generated, this DNA fragment becomes included in the recombinase complex, with the translocation resulting from a DNA repair error, rather than mistargetting of the recombinase. A recombinase mediated error is characterized by i) involvement of an Ig/TCR locus; ii) recurrent genomic breakpoints; iii) identification of a bona-fide RSS-like sequence at the breakpoint on the partner chromosome iv) addition of non-germline encoded nucleotides at the translocation breakpoint and v) generation of a signal joint. Recombinase mediated translocations were first identified in B lymphoid nonHodgkin's lymphoma (NHL) with the t(14; 18) translocation involving IgH and BCL2.[51-53] Translocations involving Ig loci preferentially involve the IgH locus and are found in relatively mature, sIg+ lymphomas. These translocations are essentially type II and primarily involve abnormalities of class switch and

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

somatic hypermutation; [54] as such, they are beyond the scope of this article, which is restricted to VDJ recombinase errors in immature lymphoproliferative disorders, essentially ALL. A proportion of these abnormalities are also found in certain lymphomas, notably those involving *MYC* in Burkitt's lymphoma and those involving *HOX11/TLX1* in T-lymphoblastic lymphoma.

VDJ Deregulation with Oncogenic Potential

Ig translocations are found in approximately 1% of B lineage ALL, when they are virtually restricted to mature, sIg + cases. Partner genes include MYC,[55-58] BCL-9,[59] LHX4,[60] ID4,[61] IL3[62] or the different members of the CEBP family[63] (Table 3). In contrast, chromosomal abnormalities involving the TCR loci are among those most frequently encountered in T-ALL. Most involve the TCRα/δ locus on chromosome 14q11 or more rarely, TCRβ on chromosome 7q34; [35,64] rearrangements involving TCRγ are exceptional. The first TCR translocations to be described in T-ALL were those involving HOX11/TLX1 at chromosome 10q24[65-67] and LMO1/2 on chromosome 11p.[68-71] The incidence of TCR translocations by classical, morphological karyotyping was underestimated and it was only with the advent of screening by FISH that the true incidence was appreciated. Screening for TCR translocations demonstrated that approximately 45% of T-ALLs demonstrate translocations, including a minority with as yet unidentified partners. Predominant known TCR partner genes can be divided into those of the bHLH, LMO and HOX/TLX families.

The most commonly encountered bHLH partner is TAL1/SCL, which was initially described in the rare t(1; 14)(p32; q11).[72] Much more frequent is the SIL-TAL1 recombinase mediated intrachromosomal deletion, which places the entire TAL1 coding sequence under control of the SIL promoter.[73] SIL-TAL1 deletions are found in 20% of pediatric and 5-10% of adult T-ALLs. Other bHLH translocations include the rare t(7; 19)(q34; p13),[74] t(7; 9)(q34; q32)[75] and t(14; 21)(q11; q22)[76] involving LYL-1, TAL2 and bHLHB1 respectively. The frequent involvement of members of the bHLH family of transcriptional regulators is coherent with the fundamental role of bHLH proteins in regulation of T and B lymphoid lineage development . This is further emphasised by the fact that the LMO proteins deregulated by TCR juxtapositioning in translocations involving LMO1 (11p15)[68] or LMO2 (11p13)[69,71] form part of a complex which also includes TAL1 and its bHLH partner, E2A.[77-81]

Deregulation of homeobox gene expression is increasingly recognised in T-ALL. The orphan homeobox gene, HOX11/TLX1, is predominantly involved in the t(10; 14)(q24; q11) and more rarely the t(7; 10)(q34; q24).[65-67] Forced expression of TLX1 in murine bone marrow gives rise to T-ALL-like malignancies with long latency, suggesting that other events are necessary to induce leukemia; but with TLX1 expression representing an early event.[82,83] TLX1 regulates the G1/S checkpoint of T-ALL via its biding capability to the protein serine/threonine phosphatases PP2A and PP1.[84,85] Chromosomal translocations t(10; 14)(q24; q11) involving TLX1 are amongst the clearest example of recombinase involvement in T-ALL. Deregulated expression of HOX11L2/TLX3 is frequently found in pediatric T-ALL, due in most cases to a t(5; 14) involving the TLX3 locus at 5q35 and CTIP2/ BCL11B at 14q32, 7000 kb proximal to the IgH locus.[86,87] Despite the absence of Ig/TCR involvement, this translocation is mediated by the recombinase and rare translocations involving TLX3 and TCRα/δ have been described.[88] TLX3 has very close homology to TLX1, as evidenced by microarray studies showing that TLX1 and TLX3 T-ALLs cluster together.[89,90] TCR translocations involving the HOXA cluster on chromosome 7 predominantly involve the TCRβ locus, leading to a cryptic intrachromosomal inversion.[90,91] Another common abnormality in T-ALL is deletion of the p16/INK4/Cdk2 gene; [92,93] this is recombinase mediated in at least a proportion of cases. Other rare recombinase mediated abnormalities include translocations involving TCRβ and Notch1 in the t(7; 9)(q34; q34)[94] and t(1; 7)(q34; q34) involving LCK and TCRβ.[95,96]

In general, these recombinase mediated errors are restricted to T-ALLs of the TCRαβ lineage, which express RAG1 and have undergone extensive TCR rearrangement. The HOX/TLX cases are arrested prior to TCRα rearrangement, in contrast to SIL-TAL1 cases, which have undergone TCRα rearrangement on at least one allele. They are rarely found in TCRγδ expressing

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

T-ALLs, with the exception of TLX3 expressing cases, which frequently express both TCRγδ and cytoplasmic TCRβ.[97] Recombinase VDJ errors are clearly an important mechanism in the development of immature T-cell malignancies. Attempts to recreate these malignancies in murine models have frequently demonstrated long latency and/or a low proportion of mice developing leukaemia/lymphoma, in keeping with multistage oncogenesis.[98,99] In keeping with this, low levels of translocations involving LMO2 have been identified in normal thymus.[49]

Conclusion

The aforementioned abnormalities represent a mechanistic role for the recombinase in development of lymphoid malignancies. It is however also possible that failure to complete production of a mature, functional Ig or TCR may favour malignant expansion, particularly if the cells are arrested at a stage when the pre B or TCR is expressed and capable of mediating ligand driven cellular expansion. The majority of acute leukaemias do not express a surface Ig/TCR, despite having undergone extensive Ig/TCR rearrangement. This failure to complete successful Ig/TCR rearrangement is likely to be at least partially at the origin of the recombinase competence and the maintenance of RAG1 expression. It is therefore at least theoretically possible that abrogation of the factors blocking completion of Ig or TCR assembly could lead to expression of the appropriate Ig/TCR at the surface, downregulation of RAG expression and possibly even leukemic cell death by differentiation. As mentioned above, a significant proportion of HOX11L2/TLX3+ T-ALLs express unusual TCRγδ receptors and cytoplasmic TCRβ. These T-ALLs maintain high levels of RAG1 transcripts, despite the expression of a surface TCR, suggesting that expression of an "inappropriate, default" TCRγδ in cells having undergone beta selection is insufficient to allow extinction of the recombinase. Exploration of the mechanisms underlying the failure to rearrange TCRα may further our understanding of T-ALL oncogenesis.

In conclusion, understanding and exploiting normal and abnormal recombinase activity can be used both in individual patient management and in understanding lymphoid oncogenesis.

Acknowledgements

We thank all the technicians and students from the immunogenetics section of the diagnostic haematology platform and INSERM EMIU 0210 at Necker-Enfants Malades who have contributed over the years to accumulation of our experience of lymphoid clonality analysis. Thanks also to Claudine Schiff, Bertrand Nadel and Pierre Ferrier at Centre d'Immunologie Marseille Luminy for fruitful discussions and collaborations and to Jacques van Dongen et al for the coordination of the Biomed2 programs which allowed standardisation and optimised exploitation of clonality analysis in lymphoproliferative disorders. We also thank all French adult and pediatric clinicians who manage patients with lymphoid malignancies, without whose collaboration it would be impossible to further our understanding of these disorders.

Note

Saïda Dadi and Sandrine Le Noir have contributed equally to this work.

References

1. Beishuizen A, Verhoeven MA, Mol EJ et al. Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. Leukemia 1993; 7(12):2045-2053.
2. Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Detection of T-cell receptor beta (TCRB) gene rearrangement patterns in T-cell malignancies by Southern blot analysis. Leukemia 1999; 13(6):965-974.
3. van Krieken JH, Elwood L, Andrade RE et al. Rearrangement of the T-cell receptor delta chain gene in T-cell lymphomas with a mature phenotype. Am J Pathol 1991; 139(1):161-168.
4. Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T-cell receptor genes for clonality assessment in suspect T-cell proliferations. Leukemia 1997; 11(12):2192-2199.
5. Gonzalez M, Gonzalez D, Lopez-Perez R et al. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell nonHodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. Haematologica 1999; 84(9):779-784.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

6. Derksen PW, Langerak AW, Kerkhof E et al. Comparison of different polymerase chain reaction-based approaches for clonality assessment of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements in B-cell neoplasia. Mod Pathol 1999; 12(8):794-805.
7. Krafft AE, Taubenberger JK, Sheng ZM et al. Enhanced sensitivity with a novel TCRgamma PCR assay for clonality studies in 569 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) cases. Mol Diagn 1999; 4(2):119-133.
8. Assaf C, Hummel M, Dippel E et al. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. Blood 2000; 96(2):640-646.
9. Theriault C, Galoin S, Valmary S et al. PCR analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and TcR-gamma chain gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: results of a study of 525 cases. Mod Pathol 2000; 13(12):1269-1279.
10. van Dongen JJ. Analysis of immunoglobulin genes and T-cell receptor genes as a diagnostic tool for the detection of lymphoid malignancies. Neth J Med 1987; 31(5-6):201-209.
11. Gleissner B, Maurer J, Thiel E. Detection of immunoglobulin heavy chain genes rearrangements in B-cell leukemias, lymphomas, multiple myelomas, monoclonal and polyclonal gammopathies. Leuk Lymphoma 2000; 39(1-2):151-155.
12. Sen F, Vega F, Medeiros LJ. Molecular genetic methods in the diagnosis of hematologic neoplasms. Semin Diagn Pathol 2002; 19(2):72-93.
13. Langerak AW, van Krieken JH, Wolvers-Tettero IL et al. The role of molecular analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders. J Clin Pathol 2001; 54(7):565-567.
14. Miqueu P, Guillet M, Degauque N et al. Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B-cell repertoire biases. Mol Immunol 2007; 44(6):1057-1064.
15. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003; 17(12):2257-2317.
16. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. Leukemia 2007; 21(4):604-611.
17. Delabesse E, Burtin ML, Millien C et al. Rapid, multifluorescent TCRG Vgamma and Jgamma typing: application to T-cell acute lymphoblastic leukemia and to the detection of minor clonal populations. Leukemia 2000; 14(6):1143-1152.
18. van Krieken JH, Langerak AW, San Miguel JF et al. Clonality analysis for antigen receptor genes: preliminary results from the Biomed-2 concerted action PL 96-3936. Hum Pathol 2003; 34(4):359-361.
19. Droese J, Langerak AW, Groenen PJ et al. Validation of BIOMED-2 multiplex PCR tubes for detection of TCRB gene rearrangements in T-cell malignancies. Leukemia 2004; 18(9):1531-1538.
20. Evans PA, Pott C, Groenen PJ et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. Leukemia 2007; 21(2):207-214.
21. van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA et al. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. Leukemia 2007; 21(2):201-206.
22. Bruggemann M, White H, Gaulard P et al. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. Leukemia 2007; 21(2):215-221.
23. Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL et al. Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2007; 21(2):222-229.
24. Liu H, Bench AJ, Bacon CM et al. A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology. Br J Haematol 2007; 138(1):31-43.
25. Asnafi V, Beldjord K, Garand R et al. IgH DJ rearrangements within T-ALL correlate with cCD79a expression, an immature/TCRgammadelta phenotype and absence of IL7Ralpha/CD127 expression. Leukemia 2004; 18(12):1997-2001.
26. Kitchingman GR, Rovigatti U, Mauer AM et al. Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 1985; 65(3):725-729.
27. Szczepanski T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW et al. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. Blood 1999; 93(12):4079-4085.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

28. Chen Z, Le Paslier D, Dausset J et al. Human T-cell gamma genes are frequently rearranged in B-lineage acute lymphoblastic leukemias but not in chronic B-cell proliferations. J Exp Med 1987; 165(4):1000-1015.
29. Brumpt C, Delabesse E, Beldjord K et al. The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. Blood 2000; 96(6):2254-2261.
30. Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. Eur J Cancer 1999; 35(14):1941-1953.
31. Greaves M. Childhood leukaemia. BMJ 2002; 324(7332):283-287.
32. Graux C, Cools J, Michaux L et al. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. Leukemia 2006; 20(9):1496-1510.
33. O'Neil J, Look AT. Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. Oncogene 2007; 26(47):6838-6849.
34. Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. Oncogene 2007; 26(47):6766-6776.
35. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 2005; 23(26):6306-6315.
36. Willis TG, Dyer MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. Blood 2000; 96(3):808-822.
37. Stern MH, Lipkowitz S, Aurias A et al. Inversion of chromosome 7 in ataxia telangiectasia is generated by a rearrangement between T-cell receptor beta and T-cell receptor gamma genes. Blood 1989; 74(6):2076-2080.
38. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. Nature 2007; 446(7137):758-764.
39. Fuscoe JC, Zimmerman LJ, Lippert MJ et al. V(D)J recombinase-like activity mediates hprt gene deletion in human fetal T-lymphocytes. Cancer Res 1991; 51(21):6001-6005.
40. Fuscoe JC, Zimmerman LJ, Harrington-Brock K et al. Deletion mutations in the hprt gene of T-lymphocytes as a biomarker for genomic rearrangements important in human cancers. Carcinogenesis 1994; 15(7):1463-1466.
41. Fuscoe JC, Zimmerman LJ, Harrington-Brock K et al. Large deletions are tolerated at the hprt locus of in vivo derived human T-lymphocytes. Mutat Res 1992; 283(4):255-262.
42. Finette BA, Kendall H, Vacek PM. Mutational spectral analysis at the HPRT locus in healthy children. Mutat Res 2002; 505(1-2):27-41.
43. Digweed M. Human genetic instability syndromes: single gene defects with increased risk of cancer. Toxicol Lett 1993; 67(1-3):259-281.
44. Marculescu R, Vanura K, Montpellier B et al. Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. DNA Repair (Amst) 2006; 5(9-10):1246-1258.
45. Dupret C, Asnafi V, Leboeuf D et al. IgH/TCR rearrangements are common in MLL translocated adult AML and suggest an early T/myeloid or B/myeloid maturation arrest, which correlates with the MLL partner. Leukemia 2005; 19(12):2337-2338.
46. Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E et al. Analysis of TCR, pT alpha and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. Blood 2003; 101(7):2693-2703.
47. Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, van Gastel-Mol EJ et al. Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in nonlymphoid cells. Blood 2001; 98(8):2456-2465.
48. Ghosh JK, Romanow WJ, Murre C. Induction of a diverse T-cell receptor gamma/delta repertoire by the helix-loop-helix proteins E2A and HEB in nonlymphoid cells. J Exp Med 2001; 193(6):769-776.
49. Marculescu R, Le T, Simon P et al. V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: a functional assessment of genomic instability by cryptic sites. J Exp Med 2002; 195(1):85-98.
50. Lieber MR, Yu K, Raghavan SC. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination and class switch recombination in chromosomal translocations. DNA Repair (Amst) 2006; 5(9-10):1234-1245.
51. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J et al. The t(14; 18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. Science 1985; 229(4720):1390-1393.
52. Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14; 18) translocation. Cell 1986; 47(1):19-28.
53. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83(14):5214-5218.
54. Schlissel MS, Kaffer CR, Curry JD. Leukemia and lymphoma: a cost of doing business for adaptive immunity. Genes Dev 2006; 20(12):1539-1544.
55. Dalla-Favera R, Martinotti S, Gallo RC et al. Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. Science 1983; 219(4587):963-967.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

56. Davis M, Malcolm S, Rabbitts TH. Chromosome translocation can occur on either side of the c-myc oncogene in Burkitt lymphoma cells. Nature 1984; 308(5956):286-288.
57. Hollis GF, Mitchell KF, Battey J et al. A variant translocation places the lambda immunoglobulin genes 3′ to the c-myc oncogene in Burkitt's lymphoma. Nature 1984; 307(5953):752-755.
58. Manolov G, Manolova Y. Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. Nature 1972; 237(5349):33-34.
59. Willis TG, Zalcberg IR, Coignet LJ et al. Molecular cloning of translocation t(1; 14)(q21; q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21. Blood 1998; 91(6):1873-1881.
60. Kawamata N, Sakajiri S, Sugimoto KJ et al. A novel chromosomal translocation t(1; 14)(q25; q32) in preB acute lymphoblastic leukemia involves the LIM homeodomain protein gene, Lhx4. Oncogene 2002; 21(32):4983-4991.
61. Bellido M, Aventin A, Lasa A et al. Id4 is deregulated by a t(6; 14)(p22; q32) chromosomal translocation in a B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2003; 88(9):994-1001.
62. Meeker TC, Hardy D, Willman C et al. Activation of the interleukin-3 gene by chromosome translocation in acute lymphocytic leukemia with eosinophilia. Blood 1990; 76(2):285-289.
63. Akasaka T, Balasas T, Russell LJ et al. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Blood 2007; 109(8):3451-3461.
64. Raimondi SC, Behm FG, Roberson PK et al. Cytogenetics of childhood T-cell leukemia. Blood 1988; 72(5):1560-1566.
65. Hatano M, Roberts CW, Minden M et al. Deregulation of a homeobox gene, HOX11, by the t(10; 14) in T-cell leukemia. Science 1991; 253(5015):79-82.
66. Dube ID, Kamel-Reid S, Yuan CC et al. A novel human homeobox gene lies at the chromosome 10 breakpoint in lymphoid neoplasias with chromosomal translocation t(10; 14). Blood 1991; 78(11):2996-3003.
67. Kennedy MA, Gonzalez-Sarmiento R, Kees UR et al. HOX11, a homeobox-containing T-cell oncogene on human chromosome 10q24. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88(20):8900-8904.
68. McGuire EA, Hockett RD, Pollock KM et al. The t(11; 14)(p15; q11) in a T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line activates multiple transcripts, including Ttg-1, a gene encoding a potential zinc finger protein. Mol Cell Biol 1989; 9(5):2124-2132.
69. Royer-Pokora B, Loos U, Ludwig WD. TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11; 14)(p13; q11). Oncogene 1991; 6(10):1887-1893.
70. Van Vlierberghe P, van Grotel M, Beverloo HB et al. The cryptic chromosomal deletion del(11)(p12p13) as a new activation mechanism of LMO2 in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 2006; 108(10):3520-3529.
71. Boehm T, Foroni L, Kaneko Y et al. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88(10):4367-4371.
72. Bernard O, Barin C, Charrin C et al. Characterization of translocation t(1; 14)(p32; q11) in a T and in a B acute leukemia. Leukemia 1993; 7(10):1509-1513.
73. Aplan PD, Lombardi DP, Ginsberg AM et al. Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. Science 1990; 250(4986):1426-1429.
74. Mellentin JD, Smith SD, Cleary ML. lyl-1, a novel gene altered by chromosomal translocation in T-cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. Cell 1989; 58(1):77-83.
75. Xia Y, Brown L, Yang CY et al. TAL2, a helix-loop-helix gene activated by the (7; 9)(q34; q32) translocation in human T-cell leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88(24):11416-11420.
76. Wang J, Jani-Sait SN, Escalon EA et al. The t(14; 21)(q11.2; q22) chromosomal translocation associated with T-cell acute lymphoblastic leukemia activates the BHLHB1 gene. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(7):3497-3502.
77. Baer R. TAL1, TAL2 and LYL1: a family of basic helix-loop-helix proteins implicated in T-cell acute leukaemia. Semin Cancer Biol 1993; 4(6):341-347.
78. O'Neil J, Billa M, Oikemus S et al. The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. Oncogene 2001; 20(29):3897-3905.
79. Bain G, Engel I, Robanus Maandag EC et al. E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. Mol Cell Biol 1997; 17(8):4782-4791.
80. Yan W, Young AZ, Soares VC et al. High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice. Mol Cell Biol 1997; 17(12):7317-7327.
81. O'Neil J, Shank J, Cusson N et al. TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. Cancer Cell 2004; 5(6):587-596.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution

82. Hawley RG, Fong AZ, Lu M et al. The HOX11 homeobox-containing gene of human leukemia immortalizes murine hematopoietic precursors. Oncogene 1994; 9(1):1-12.
83. Hawley RG, Fong AZ, Reis MD et al. Transforming function of the HOX11/TCL3 homeobox gene. Cancer Res 1997; 57(2):337-345.
84. Kawabe T, Muslin AJ, Korsmeyer SJ. HOX11 interacts with protein phosphatases PP2A and PP1 and disrupts a G2/M cell-cycle checkpoint. Nature 1997; 385(6615):454-458.
85. Riz I, Hawley RG. G1/S transcriptional networks modulated by the HOX11/TLX1 oncogene of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Oncogene 2005; 24(36):5561-5575.
86. Bernard OA, Busson-LeConiat M, Ballerini P et al. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5; 14)(q35; q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2001; 15(10):1495-1504.
87. MacLeod RA, Nagel S, Kaufmann M et al. Activation of HOX11L2 by juxtaposition with 3′-BCL11B in an acute lymphoblastic leukemia cell line (HPB-ALL) with t(5; 14)(q35; q32.2). Genes Chromosomes Cancer 2003; 37(1):84-91.
88. Hansen-Hagge TE, Schafer M, Kiyoi H et al. Disruption of the RanBP17/Hox11L2 region by recombination with the TCRdelta locus in acute lymphoblastic leukemias with t(5; 14)(q34; q11). Leukemia 2002; 16(11):2205-2212.
89. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell 2002; 1(1):75-87.
90. Soulier J, Clappier E, Cayuela JM et al. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). Blood 2005; 106(1):274-286.
91. Speleman F, Cauwelier B, Dastugue N et al. A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias. Leukemia 2005; 19(3):358-366.
92. Ohnishi H, Kawamura M, Ida K et al. Homozygous deletions of p16/MTS1 gene are frequent but mutations are infrequent in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 1995; 86(4):1269-1275.
93. Cayuela JM, Madani A, Sanhes L et al. Multiple tumor-suppressor gene 1 inactivation is the most frequent genetic alteration in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 1996; 87(6):2180-2186.
94. Ellisen LW, Bird J, West DC et al. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell 1991; 66(4):649-661.
95. Burnett RC, Thirman MJ, Rowley JD et al. Molecular analysis of the T-cell acute lymphoblastic leukemia-associated t(1; 7)(p34; q34) that fuses LCK and TCRB. Blood 1994; 84(4):1232-1236.
96. Burnett RC, David JC, Harden AM et al. The LCK gene is involved in the t(1; 7)(p34; q34) in the T-cell acute lymphoblastic leukemia derived cell line, HSB-2. Genes Chromosomes Cancer 1991; 3(6):461-467.
97. Asnafi V, Beldjord K, Libura M et al. Age-related phenotypic and oncogenic differences in T-cell acute lymphoblastic leukemias may reflect thymic atrophy. Blood 2004; 104(13):4173-4180.
98. Larson RC, Osada H, Larson TA et al. The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. Oncogene 1995; 11(5):853-862.
99. Aplan PD, Jones CA, Chervinsky DS et al. An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. EMBO J 1997; 16(9):2408-2419.
100. Carroll AJ, Crist WM, Link MP et al. The t(1; 14)(p34; q11) is nonrandom and restricted to T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. Blood 1990; 76(6):1220-1224.
101. Tycko B, Smith SD, Sklar J. Chromosomal translocations joining LCK and TCRB loci in human T-cell leukemia. J Exp Med 1991; 174(4):867-873.
102. Le Coniat M, Della Valle V, Marynen P et al. A new breakpoint, telomeric to TEL/ETV6, on the short arm of chromosome 12 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1997; 11(8):1360-1363.
103. Karrman K, Andersson A, Bjorgvinsdottir H et al. Deregulation of cyclin D2 by juxtaposition with T-cell receptor alpha/delta locus in t(12; 14)(p13; q11)-positive childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Eur J Haematol 2006; 77(1):27-34.

©2008 Copyright Landes Bioscience. Not for Distribution